

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462809

研究課題名(和文) IL6炎症・抗炎症反応を制御するSTAT3/SOCS3解明による敗血症遺伝子治療

研究課題名(英文) The gene therapy for sepsis by the clarification of STAT3/SOCS3 which control an inflammatory or an anti-inflammatory reaction

研究代表者

澤村 淳(Sawamura, Atsushi)

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00241448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IL-6 KOマウス(以下IL-M)、Wild Typeマウス(以下WT-M)の各30匹にLPS投与し致死率は46.7%と96.7%であった。TNF- KOマウス(以下TNF-M)とWT-Mの各25匹にLPS投与し致死率は32.0%と100.0%であった。

IL-MのRT-PCRではSO-3の増幅効率がST-3に比べ高値であった。TNF-MのRT-PCRではLPS投与群でST-3の増幅効率がSO-3にくらべ明らかに抑制された。以上から敗血症病態の進展にIL-6、TNF- の関与つまりST-3の17q21.31とSO-3の17q25.3の遺伝子が関連しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：LPS was administration to each thirty Wild type mice (WT-M) and IL-6 KO mice (IL-M). The case fatality was 96.7% and 46.7%. LPS was administration to each twenty-five Wild type mice (WT-M) and TNF- KO mice (TNF-M). The case fatality was 100.0% and 32.0%.

The amplification efficiency of SOCS3 (SO-3) was a high price compared with STAT3 (ST-3). Moreover, in the LPS administration group, the amplification efficiency of SO-3 and ST-3 compared with the LPS non-administration group was together restrained. RT-PCR was performed using TNF-M. In TNF-M, the amplification efficiency of ST-3 was clearly restrained compared with SO-3 by the LPS administration group. Moreover, in the LPS non-administration group, the amplification efficiency of ST-3 was a high price in TNF-M compared with WT-M. It thought that the gene of the involvement of IL-6, TNF- , i.e. 17q21.31 of ST-3 and 17q25.3 of SO-3 related to the developing of the septic clinical condition from above.

研究分野：医歯薬学

キーワード：敗血症病態 サイトカイン IL-6 TNF- KO 遺伝子治療 Western Blotting 敗血症脳症 TNF-

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染防御反応における炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカイン発現に関してはこの分野の主要な研究対象の一つとして多くの研究が国内外で行われてきた。獲得免疫系で見られる Th1/Th2 バランスに類似して、自然免疫系において感染初期に産生される炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインは相互に作用し合い、自然免疫系の活性化のみならず、それに続く獲得免疫の動向 (Th1/Th2 細胞の誘導・分化) をも制御する。つまり、炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスは自然免疫、獲得免疫を含めた免疫システムの全体を制御していると考えられる

2. 研究の目的

敗血症 (Sepsis) は国際的に年々増加傾向にあり、その治療に決定的なものはない。Sepsis において有効な感染防御反応を誘導するには、感染初期に産生された炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスの制御機構の解明が非常に重要である。IL-6 KO マウスを用いて Sepsis における STAT3 および SOCS3 発現を検討することにより TNF- α /IL-6 バランスを検討し、Sepsis を制御する機構を解明することにより治療へ発展させ、Sepsis を抑止することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)重症敗血症 (Sepsis) 病態における TNF- α /IL-6 バランスに関して IL-6 KO マウス等を用いて致死率の検討
IL-6 欠損における IL-6 産生に与える影響の検討
IL-6 および TNF- α の中和の TNF- α 、IL-6 産生に与える影響の検討を行う。
(2)重症敗血症 (Sepsis) 病態における STAT3 と SOCS3 の活性化に関して *in vitro* と *in vivo* での検討をそれぞれ行う。
(3) TNF- α /IL-6 バランスにおける STAT3 と SOCS3 の役割に関して *in vitro* と *in vivo* での検討をそれぞれ行う。
(4) TNF- α と IL-6 のシグナル伝達経路上の標的遺伝子を DNA chip 法を用いて同定する。
(5) RNA 干渉法を用いて標的遺伝子に対する遺伝子治療を行う。

4. 研究成果

(1)IL-6 KO マウス (以下 IL-M)、Wild Type マウス (以下 WT-M) の各 30 匹に LPS 投与し致死率は IL-M が 46.7%に対し、WT-M は 96.7%であった。平均生存期間は IL-M は 3.82 日、WT-M は 2.26 日であった。
(2)TNF- α KO マウス (以下 TNF-M) と WT-M の各 25 匹に LPS 投与し致死率は TNF-M が 32.0%、WT-M は 100.0%であった。平均生存

期間は TNF-M が 3.38 日、WT-M は 2.44 日であった。

(3)IL-M を用いて RT-PCR を行った。Ct 値は IL-M の LPS 投与群で SOCS3 (以下 S0-3) が 27.8、STAT3 (以下 ST-3) が 19.9、WT-M は S0-3 が 25.2、ST-3 が 18.3 であった。また、LPS 非投与群では IL-M は S0-3 が 29.9、ST-3 が 20.4 であり WT-M は S0-3 が 27.8、ST-3 が 20.0 であった。つまり、IL-M では S0-3 の増幅効率が ST-3 に比べ高値であった。しかも、LPS 投与群では非投与群に比べ S0-3 と ST-3 の増幅効率が共に抑制された。

(4)TNF-M を用いた RT-PCR を行った。Ct 値は TNF-M の LPS 投与群で S0-3 が 27.5、ST-3 が 13.6 であり WT-M は S0-3 が 25.6、ST-3 が 18.3 であった。また、LPS 非投与群では TNF-M の S0-3 が 30.5、ST-3 が 18.4 であり WT-M は S0-3 が 30.4、ST-3 が 14.2 であった。つまり、TNF-M では LPS 投与群で ST-3 の増幅効率が S0-3 にくらべ明らかに抑制された。しかも、LPS 非投与群では ST-3 の増幅効率が WT-M に比べ TNF-M で高値であった。

(5)以上から敗血症病態の進展に IL-6、TNF- α の関与つまり ST-3 の 17q21.31 と S0-3 の 17q25.3 の遺伝子が関連しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

(1) Jesmin S, Gando S, Wada T, Hayakawa M, Sawamura A.

Activated protein C does not increase in the early phase of trauma with disseminated intravascular coagulation: comparison with acute coagulopathy of trauma-shock. 査読あり

Journal of Intensive Care 4:1, 2016
DOI: 10.1186/s40560-015-0123-2

(2) Wada T, Gando S, Ono Y, Maekawa K, Katabami K, Hayakawa M, Sawamura A.

Disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype predicts the outcome of patients with out-of-hospital cardiac arrest. 査読あり
Thrombosis Journal. 14:43,2016

DOI: 10.1186/s12959-016-0116-y

(3) Ono Y, Hayakawa M, Iijima H, Maekawa K, Kodate A, Sadamoto Y, Mizugaki A, Murakami H, Katabami K, Sawamura A, Gando S.

The response time threshold for predicting favourable neurological outcomes in patients with bystander-witnessed out-of-hospital cardiac arrest. 査読あり

Resuscitation 107:65-70, 2016
DOI: 10.1016/j.resuscitation.2016.08.005
(4) Hayakawa M, Gando S, Ono Y, Wada T, Yanagida Y, Sawamura A, Ieko M. Noble-Collip drum Trauma induces disseminated intravascular coagulation but not acute coagulopathy of trauma-shock. 査読あり
Shock 43:261-267, 2015
DOI: 10.1097/SHK.0000000000000281.
(5) Hayakawa M, Gando S, Ono Y, Wada T, Yanagida Y, Sawamura A. Fibrinogen level deteriorates before other routine coagulation parameters and massive transfusion in the early phase of severe trauma: a retrospective observational study. 査読あり
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 41:35-42, 2015
DOI:10.1055/s-0034-1398379.
(6) Wada T, Koboyashi M, Ono Y, Mizugaki A, Katabami K, Maekawa K, Miyamoto D, Yanagida Y, Hayakawa M, Sawamura A, Iseki K, Gando S. Pharmacokinetics and the optimal regimen for levofloxacin in critically ill patients receiving continuous hemodiafiltration. 査読あり
Journal of Intensive Care 3:22, 2015 May8
DOI:10.1186/s40560-015-0089-0
(7) Ono Y, Hayakawa M, Wada T, Sawamura A, Gando S. Effects of prehospital epinephrine administration on neurological outcomes in patients with out-of-hospital cardiac arrest. 査読あり
Journal of intensive care 3(1):29, 2015
DOI: 10.1186/s40560-015-0094-3
(8) Hayakawa M, Gando S, Ono Y, Mizugaki A, Katabami K, Maekawa K, Miyamoto D, Wada T, Yanagida Y, Sawamura A. Rapid evaluation of fibrinogen levels using the CG02N whole blood coagulation analyzer. 査読あり
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 41:267-271, 2015
DOI: 10.1055/s-0035-1547372.
(9) Ono Y, Hayakawa M, Maekawa K, Mizugaki A, Katabami K, Wada T, Sawamura A, Gando S. Should laryngeal tubes or masks be used for out-of-hospital cardiac arrest patients? American Journal of Emergency Medicine 査読あり
33:1360-1363, 2015
DOI: 10.1016/j.ajem.2015.07.043.

(10) Jesmin S, Shimojo N, Yamaguchi N, Mowa CN, Oki M, Zaedi S, Sultana SN, Rahman A, Islam M, Sawamura A, Gando S, Kawano S, Miyauchi T, Mizutani T. Effects of protease activated receptor (PAR)2 blocking peptide on endothelin-1 levels in kidney tissues in endotoxemic rat mode. 査読あり
Life Science 102:127-133, 2014
DOI: 10.1016/j.lfs.2014.03.013.
(11) Hayakawa M Ono Y, Wada T, Yanagida Y, Sawamura A, Takeda H, Gando S. Effects of Rikkunshito (traditional Japanese medicine) on enteral feeding and the plasma ghrelin level in critically ill patients: a pilot study. 査読あり
Journal of Intensive Care 2014;2:53, 2014
DOI: 10.1186/s40560-014-0053-4
(12) Hayakawa M, Gando S, Ieko M, Honma Y, Homma T, Yanagida Y, Kubota N, Uegaki S, Sawamura A, Asakura H. Massive amounts of tissue factor induce fibrinogenolysis without tissue hypoperfusion in rats. 査読あり
Shock 39:514-519, 2013
DOI: 10.1097/SHK.0b013e318293980d.
(12) Yanagida Y, Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Uegaki S, Kubota N, Homma T, Ono Y, Honma Y, Wada T, Jesmin S. Normal prothrombinase activity, increased systemic thrombin activity, and lower antithrombin levels in patients with disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma: comparison with acute coagulopathy of trauma-shock. 査読あり
Surgery 154:48-57, 2013
DOI: 10.1016/j.surg.2013.02.004.
(13) Nakahashi S, Gando S, Ishikawa T, Wada T, Yanagida Y, Kubota N, Uegaki S, Hayakawa M, Sawamura A. Effectiveness of end-expiratory lung volume measurements during the lung recruitment maneuver for patients with atelectasis. 査読あり
Journal of Critical Care 534:e1-e5, 2013
DOI: 10.1016/j.jcrc.2012.11.003.

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) Gando S, Wada T, Ono Y, Maekawa K, Katabami K, Hayakawa M, Sawamura A. DIC and fibrinolysis in patients with trauma and out-of-hospital cardiac arrest. The 9th Congress of Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis October6-9, 2016, Taipei(Taiwan)

(2) Kodate A, Katabami K, Wada T, Ono Y, Maekawa K, Hayakawa M, Sawamura A, Gando S.

Disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype predicts the outcome of patients with patients with out-of-hospital cardiac arrest. 29th Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine October1-5, 2016, Milano(Italy)

(3) Ono Y, Hayakawa M, Iijima H, Maekawa K, Kodate A, Sadamoto Y, Mizugaki A, Murakami H, Katabami K, Wada T, Sawamura A, Gando S.

The response time threshold for predicting favorable neurological outcomes in patients with bystander-witnessed out-of-hospital cardiac arrest. 29th Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine October1-5, 2016, Milano(Italy)

(4) Maekawa K, Hayakawa M, Ono Y, Kodate A, Sadamoto Y, Tominaga N, Mizugaki A, Murakami H, Yshida T, Katabami K, Wada T, Sawamura A, Gando S.

Impact of age on the relationship between resuscitation duration and neurologically intact survival after out-of-hospital cardiac arrest. 29th Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine October1-5, 2016, Milano(Italy)

(5) Sadamoto Y, Katabami K, Wada T, Ono Y, Maekawa K, Hayakawa M, Sawamura A, Gando S.

Disseminated intravascular coagulation during early phase of out-of-hospital cardiac arrest and resuscitation belongs to the fibrinolytic phenotype. 29th Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine October1-5, 2016, Milano

(6) Sawamura A, Yanagida Y, Wada T, Yamamoto H, Miyamoto D, Ono Y, Sugano M, Hayakawa H, Gando S

Cerebral fat embolism syndrome in severe trauma patients
The European Society of Intensive Care Medicine 26th Annual Congress October5-9, 2013, Paris(France)

(7) Hayakawa M, Yamamoto H, Ono Y, Wada T, Yanagida Y, Sugano M, Sawamura A, Takeda H, Gando S

Effects of Rikkunshito (traditional Japanese Kampo) on enteral feeding and plasma ghrelin concentration in critically ill patients: A double-blind, randomized, controlled trial.

The European Society of Intensive Care Medicine 26th Annual Congress October5-9, 2013, Paris(France)

(8) Gando S, Yanagida Y, Sawamura A, Hayakawa M, Kubota N, Wada T, Ono Y, Yamamoto H

Normal prothrombinase activity, increased systemic thrombin activity, and lower antithrombin levels in patients with disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma: comparison with acute coagulopathy of trauma-shock XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis June29-July4, 2013, Amsterdam(Netherlands)

(9) Gando S, Yanagida Y, Sawamura A, Hayakawa M, Kubota N, Ono Y, Wada T, Yamamoto H

Increased thrombin activation and lower antithrombin levels in patients with DIC and acute coagulopathy of trauma-shock(ACOTS)

17th International Meeting of the Danubian League against Thrombosis and Haemorrhagic disorders (DLTH) May22-25, 2013, Hradec Kralove(Czech republic)

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
澤村 淳 (SAWAMURA ATSUSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00241448

(3)連携研究者
丸藤 哲 (GANDO SATOSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30125306

(4)研究協力者
なし