

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462752

研究課題名(和文)多臓器不全における骨髄由来細胞の役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of bone marrow-derived cells in multiple organ dysfunction

研究代表者

田畑 貴久 (TABATA, Takahisa)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90278200

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)：多臓器不全は難治性で致死率の高い病態であるが、そのメカニズムは未だ明らかではない。多臓器不全患者の合併症と糖尿病合併症の類似点から両者には共通のメカニズムがあると考え、糖尿病にて出現すると報告されているproinsulin陽性細胞につき組織学的検討と、臨床研究を行った。組織学的検討にて、proinsulin陽性細胞は糖尿病患者だけでなく、多臓器不全患者においても出現していた。臨床研究では、末梢血液中のinsulin mRNA発現が増加している患者群は死亡率が高かった。多臓器不全のメカニズムにproinsulin陽性細胞が関与する可能性を示唆するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Multiple organ failure (MOF) is a refractory disease condition with high mortality rate, and its mechanism has not been elucidated yet. Based on the similarities between complications of MOF patients and diabetic complications, we considered that there is a common mechanism between them, and histological investigation and clinical studies were conducted for proinsulin positive cells reported to appear in diabetic mice. Histologically, proinsulin positive cells appeared not only in diabetic patients but also in patients with MOF. In clinical studies, the mortality rate was high in the group of patients with increased insulin mRNA expression in the peripheral white blood cells. The appearance of proinsulin positive cells may be involved in the mechanism of MOF.

研究分野：多臓器不全

キーワード：多臓器不全 proinsulin陽性細胞 骨髄由来細胞

## 1. 研究開始当初の背景

1) 過大侵襲術後や多発外傷後の重症患者は、感染のリスクが増大し、敗血症や DIC さらには多臓器不全を発症し患者を死に至らしめている。多臓器不全となる原因については、血管内皮細胞の傷害による末梢循環不全や、微小血管の血栓症による臓器虚血が原因とされているが、そのメカニズムについては未だ明らかにはされていない。

2) 重症患者においては、炎症性サイトカインや、コルチゾールなどが過剰分泌され、糖新生を促進し、末梢のインスリン抵抗性を増加させ、高血糖状態となることがよく知られている。Burghe らは、ICU 入室患者の血糖値を 80mg/dl 以上、110mg/dl 以下にコントロールする Intensive insulin therapy を行うことにより、死亡率を減少させるだけでなく、血液透析が必要となった率、人工呼吸器の使用期間、輸血率、末梢神経障害率、高ビリルビン血症率、敗血症を生じた率のいずれをも有意に減少させたと報告した (Burghe et al, New Engl J Med;345(19):1359-67,2001)。

生体において、病的な高血糖状態が多臓器不全進行へのリスクファクターとなっていることが示唆される一方、糖尿病患者においても腎不全や末梢神経障害といった多臓器不全患者でよく見られる徴候を、認めることができる。申請者はここに多臓器不全のメカニズムが存在する可能性があると考え研究を開始した。

## 2. 研究の目的

糖尿病合併症の成因について Kojima らは、高血糖状態においては proinsulin 産生細胞が肝臓、脂肪細胞等に認められ、これらの細胞は骨髄細胞に由来することをマウスにて観察した。(Kojima H, et al PNAS;101(8):2458 -63, 2004) さらに糖尿病モデルマウスにて坐骨神経細胞に proinsulin 陽性細胞が融合し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を産生し、糖尿病性の神経障害の成因となっている可能性につき報告した (Terashima T, Kojima H et al PNAS;102(35):12525-12530, 2005)。申請者らは重症患者においても、骨髄細胞よりの異常な細胞が高血糖により誘導され、各臓器細胞へ融合し、炎症性サイトカインを放出することにより多臓器不全を発症させているとの仮説を立て、証明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

研究開始当初、以下の3つの方法を考え、研究を進めた。

1) 集中治療室(ICU)に入室する患者に対し、白血球中 proinsulin mRNA 発現を定量化し、

SOFA score、APACHE score 等の重症度との相関、死亡率との相関について調査を行う。

2) 病理献体標本にて抗 proinsulin 抗体による染色を行い、各臓器に移行した proinsulin 陽性細胞と臓器不全との関わりにつき詳しい検討を行う。

3) 重傷患者を Intensive insulin therapy を行う群、行わない群の2群に分け、それぞれの群にて白血球中 proinsulin mRNA 発現量を測定する。RCT形式にて研究を行い、Intensive insulin therapy により白血球中 proinsulin mRNA 発現量が低下するか否かを検討する。

## 4. 研究成果

1) 集中治療室(ICU)に入室する患者における白血球中 insulin mRNA 発現の検討。

ICU 入室患者に対し、週2回の採血を行い、白血球より mRNA を抽出し、定量的 PCR 法にて insulin mRNA 発現量の定量を行い、ICU 滞在中の最大 insulin mRNA 発現値を比較検討した。その結果、insulin mRNA 発現上昇群(4分位最上位群)では、他の3群に比べ生命予後が有意に悪化していることが明らかとなった。

(図1)

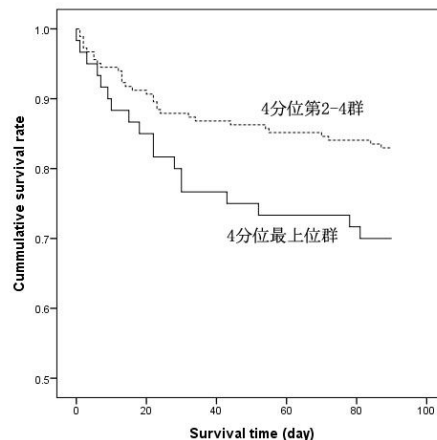


図1: Insulin mRNA 発現上昇群と非上昇群における Kaplan-meier 曲線。Insulin mRNA 4分位最上位の群は他の3群に比べて有意に生存率が低下していた (Log-rank test  $p < 0.05$ )

さらに交絡因子を含めた多変量解析を Logistic regression analysis にて検討したところ、insulin mRNA 発現上昇群は2臓器不全数となるリスクが有意に上昇していた。これらの結果より、末梢血白血球中の insulin mRNA 発現上昇は、多臓器不全、生命予後との関連があることが示唆された。

2) 病理献体標本における各臓器に移行した proinsulin 陽性細胞と臓器不全との関わりについての検討。

proinsulin 陽性細胞の定量が比較的簡便であった肝臓にて、proinsulin 陽性細胞数と臓

器不全数の関係につき調査を行った。当施設にて病理解剖された肝臓の献体標本を用いて、proinsulin 抗体にて免疫染色を行い、proinsulin 陽性細胞数に応じて0-3にスコア化した。その結果 Kojima らがマウスによる実験にて報告した結果と同様に、糖尿病患者においても proinsulin 陽性細胞を認めた。しかし、非糖尿病患者においても proinsulin 陽性細胞は存在し、両者とも死亡時の臓器不全数に応じて高いスコアとなる傾向を認めた。(図2)

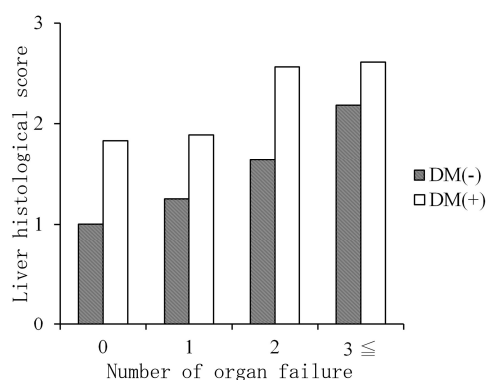


図2：肝臓における proinsulin 陽性細胞数のスコア(Liver histological score)と死亡時の臓器不全数の関係。臓器不全数に応じて、スコアが上昇する傾向を認めた。

次に、proinsulin 陽性細胞が骨髄由来であることを確認するため、男性から女性に骨髄移植を受けた肝臓の検体標本にて、Y 染色体を in situ hybridization 法にて染色した。proinsulin 陽性細胞は Y 染色体染色陽性であり、さらにアルブミンを産生していた。Kojima らが報告したマウスでの研究と同様に、ヒトにおいても proinsulin 陽性細胞は骨髄で産生され、臓器細胞に融合していることが示唆された。

以上1)-2)の結果より、proinsulin 陽性細胞と臓器不全との密接な関係が示唆されたが、insulin mRNA 発現上昇と採血時の血糖値の関係につき調査を行ったところ、血糖値上昇との関連は認められなかった。従って、研究開始当初考えていた研究方法3)の項目に記載した、重傷患者を intensive insulin therapy を行う群、行わない群の2群に分け、それぞれの群にて白血球中 insulin mRNA 発現量を測定し、intensive insulin therapy により白血球中 proinsulin mRNA 発現量が低下するか否かの検討は行わず、proinsulin 陽性細胞出現を誘発する因子の調査を行うこととした。

### 3) proinsulin 陽性細胞誘導の要因

1)の研究で採取した検体を用いて、ICU 入室患者における、insulin mRNA 発現量上昇に関与する誘因を調査した。発現量上昇の前に生じたイベントを調査し、多変量解析をおこ

なったところ、ショック、ステロイドの投与が独立した発現量上昇に関与する因子であることがわかった。

以上の結果より、proinsulin 陽性細胞の出現は、ICU 入室患者の重症度、死亡率と関連しているが、その増加は血糖値に依存するものではなく、ショックやステロイド投与により誘発されることが明らかとなった。多臓器不全の成因に関する重要な知見を得られたと考えている。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
田畑 貴久(TABATA Takahisa)  
滋賀医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90278200

(2)研究分担者  
藤野 和典(FUJINO Kazunori)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70402716

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし