

令和元年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05009

研究課題名(和文)急性生体侵襲下における単球系細胞の機能解析と組織傷害関連物質(DAMPs)の制御

研究課題名(英文) Functional analysis of monocyte-lineage blood cells and control of damage-associated molecular patterns (DAMPs) under the whole-body responses to injury/illness

研究代表者

並木 淳(NAMIKI, JUN)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・客員准教授

研究者番号：20189195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：重症外傷患者の末梢血単球で一過性のHLA-DR発現低下がみられ、外傷後の予後を悪化させる易感染性状態を反映した反応と考えられた。重症sepsis患者では単球の傷害を示すHistone H3のリン酸化が認められ、生体侵襲後の細胞崩壊の指標となり得ることが示唆された。

組織傷害関連物質(DAMPs)が生体侵襲後に血中に遊離し、予後を悪化させることが知られている。Sepsis患者ではHMGB-1とtotal Histone H3が病状悪化に関係し、鈍的肝損傷モデルマウスを用いた検討では特にtotal Histone H3がDAMPs制御のターゲットの一つになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は全身反応を引き起こす分子として炎症性サイトカインなどの液性因子が注目されてきた。本研究では、体循環中の細胞成分とくに単球系細胞の反応と組織傷害関連物質(DAMPs)との関連に着目し、『組織傷害により体循環に放出されたDAMPsが単球を活性化して炎症性サイトカインの産生や組織因子の発現・放出、さらには単球の崩壊による更なるDAMPsの放出を引き起こして病態の急性転化をきたす』との仮説に基づき、重症生体侵襲の病態において重症度や転帰と関連するDAMPsや単球細胞の反応が新たな治療ターゲットとなる可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Expression of HLA-DR temporary decreased in peripheral monocytes of patients with severe trauma, suggesting that a response reflecting the compensatory anti-inflammatory response syndrome that worsen the prognosis after trauma. Phosphorylation of Histone H3 was observed in monocytes of severe sepsis patients and may be an indicator for broken monocytes after the whole-body responses to injury/illness.

It is known that damage-associated molecular patterns (DAMPs) release into the bloodstream after the whole-body responses to injury/illness and worsen the prognosis. HMGB-1 and total Histone H3 related to poor prognosis in septic patients. Our study of liver injury model mice showed especially total Histone H3 may be a target molecule for control of DAMPs.

研究分野：救急医学

キーワード：生体侵襲 ヒストン 敗血症 肝損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床においては、これまで怪我や急病の急性侵襲に関して主に臓器単位の研究がすすめられてきた。しかし、近年では生体侵襲を全身の反応ととらえ、病原体からの侵襲を PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) 損傷組織の傷害細胞からの放出因子による侵襲を DAMPs (damage-associated molecular patterns) として、包括的な生体メカニズムとして理解し生体侵襲制御に結び付けようとするアプローチが行われている(Bianchi et al. J Leucoc Biol 2007)。すなわち、損傷あるいは罹患臓器に対する従来の治療的介入に加えて、全身反応の制御をターゲットとした治療戦略が求められる。とりわけ後者の全身管理が重症患者を救命するためには重要であり、救急医・救急集中治療医が果たす役割は大きい。研究代表者は救急医療の臨床に従事し、多くの救急集中治療の症例を経験してきた。重症傷病者の経過中に全身反応の急性増悪、急性転化をきたして、DIC (disseminated intravascular coagulation) や多臓器不全に陥るメカニズムは未解明の部分が多く、新たな治療介入の開発による治療成績の向上が期待される。このことは救急患者に限らず、臓器別診療科が扱う傷病者が集中治療を必要とする病態に陥った場合においても同様であり、PAMPs と DAMPs のパターン認識の考え方は、重症化した病態において共通する生体反応メカニズムが存在することを示している。すなわち、重症外傷、熱傷、敗血症などでは当初の標的臓器や侵襲は異なっても、全身反応には共通した molecular pattern の時間的・量的暴露が関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

従来は全身反応を引き起こす分子として炎症性サイトカインなどの液性因子が注目されてきたが、研究代表者は体循環中の細胞成分とくに単球系細胞の反応と DAMPs との関連に着目し(図)、『組織傷害により体循環に放出された DAMPs が単球を活性化して炎症性サイトカインの産生や組織因子の発現・放出、さらには単球の崩壊による更なる DAMPs の放出を引き起こして病態の急性転化をきたす』との仮説をたてた。活性化単球の果たしている役割(炎症性サイトカイン産生、抗原提示能、TF の発現と放出など) DAMPs の時間的・量的暴露と単球の反応(核内蛋白質 Histone のリン酸化、細胞死、DAMPs 放出など)について、臨床検体と動物実験ならびに invitro の培養細胞を用いた実験により解明し、単球の機能制御が新たな治療ターゲットとなる可能性を明らかにすることを目的とした。

また、NETs を構成している Histone の由来は明らかでなく、病態急性転化をきたす DAMPs 放出・単球傷害・崩壊の悪循環における、NETs による DAMPs 捕捉の役割(図)も解明する。さらに、急性侵襲下の末梢血中の EPC(circulating EPC)による血管内皮の修復・再生能と、DAMPs との関係についても解析し、EPC の補充や骨髄からの動員促進が血管内皮傷害に対する新たな治療戦略となる可能性についても提示する。

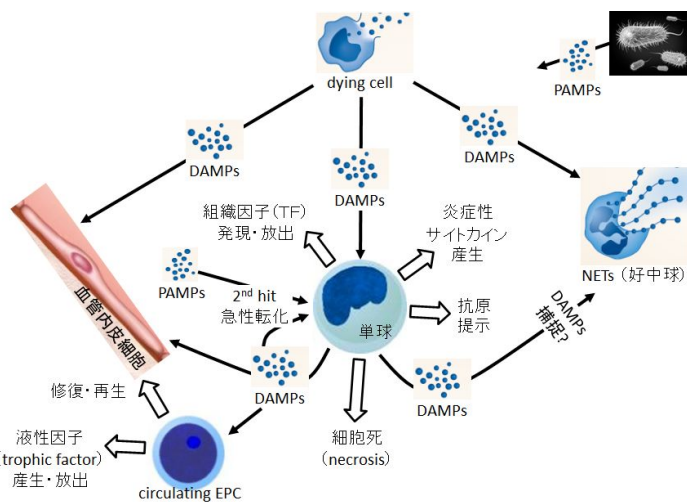
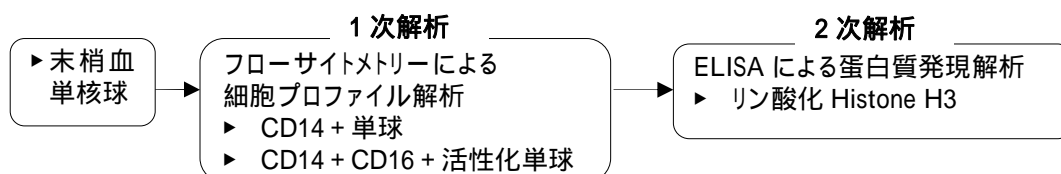


図 急性侵襲下の DAMPs と末梢血単球および内皮細胞・EPC・NETs の反応

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血単球の機能解析

生体侵襲制御と組織修復・再生に果たす役割を理解するため、単球の蛋白質発現をフローサイトメーター、酵素免疫測定法 (ELISA) により解析する。急性侵襲下の重症 sepsis、重症外傷、重症熱傷の病態を対象とし、患者末梢血を試料とする。



(2) 末梢血中 DAMPs の測定

実験動物を用いた重症肝損傷モデルを作成し、末梢血を採取して肝逸脱酵素や炎症性サイトカインのほか、以下の DAMPs について測定する。

DAMPs 分子	測定法
total Histone H3・Histone H4	ELISA
High mobility group box-1 (HMGB1)	ELISA
mitochondrial DNA	定量 rt-PCR

(3) 心肺停止蘇生後 (PCAS) の生体侵襲評価

来院時心肺停止の救急患者のうち蘇生に成功した患者を対象として、循環停止に引き続く再灌流による単球の機能異常と末梢血中の DAMPs の放出と生命予後ならびに神経学的機能予後の関係を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血単球の機能解析

外傷の重症度を示す指標である Injury Severity Score が高値を示す重症外傷患者では、CD14 陽性単球における HLA-DR の発現が受傷数日後に著明に低下し、外傷後の易感染性状態 (compensatory anti-inflammatory response syndrome) に関連した反応が示された。Sepsis 患者の末梢血中 DAMPs については、HMGB-1 と total Histone H3 は病状の回復とともに減少したが、total Histone H4 と mitochondrial DNA は病初期から高値のまま推移し、病状の変化との関係は認められなかった。

重症 sepsis 患者では、単球の傷害を示す Histone H3 のリン酸化が認められた。年齢のマッチした非 sepsis 患者の対照群では、単球のリン酸化 Histone H3 の上昇は軽度であった。Histone H3 のリン酸化は生体侵襲の程度による細胞崩壊の指標になり得ることが示唆された。リン酸化 Histone H3 と末梢血中 DAMPs の関連について、今後の研究の展開が期待される。

Protein	Phosphorylated sites	Normalized peak area		
		Day1	Day 4	Day 9
Histone H1x	Ser31	2.11	0.26	0.63
Histone H3.1t	Ser29	3.00	0.00	0.00
Histone H3.1t	Ser58	2.97	0.03	0.00

表 重症 sepsis 患者の末梢血単球における Histone リン酸化サイトとリン酸化の経時的変化

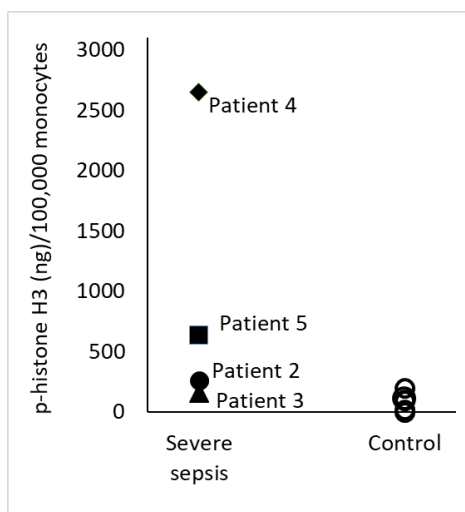


図 重症 sepsis 患者と対照群の末梢血単球におけるリン酸化 Histone H3 の定量測定

(2) 末梢血中 DAMPs の測定

これまで重症鈍的腹部外傷の有用な動物モデルは存在しなかったが、鈍的肝損傷の新たなモデルマウスを作成した。炎症性サイトカイン IL-6 の上昇を指標とする中等度と高度の2段階の定量的肝損傷を作成し、末梢血中に遊離する DAMPs を定量測定した。HMGB1 の上昇は損傷後一過性であり、速やかに washout され損傷程度による差はなかった。Total Histone H3 は高度肝損傷群でのみ損傷早期から上昇し血中からの washout はみられなかった。一方、total Histone H4 は中等度・高度肝損傷群とも損傷早期から上昇し washout は遷延した。Mitochondrial DNA については、肝損傷による有意な血中への遊離は認められなかった。

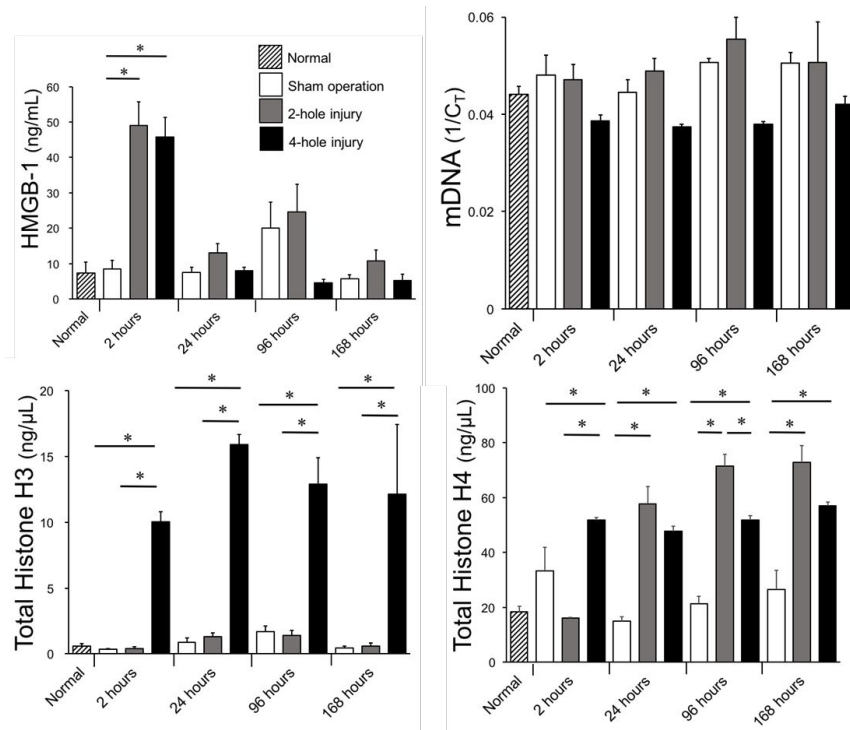


図 純的肝損傷モデルマウスの末梢血中における DAMPs の定量測定とその経時変化

(3) PCAS の生体侵襲評価

PCAS 患者 50 例を対象とした多施設前向き研究を実施し、定量的瞳孔計により計測された瞳孔反応が、PCAS 患者の蘇生直後から予後予測に有用であることを明らかにした (Tamura T, et al. Resuscitation 2018)。従来の定性瞳孔反応では測定感度以下である縮瞳率 3% が生存予測の、縮瞳率 6% が神経予後良好のカットオフ値であった。

蘇生直後に定量的瞳孔計を用いて測定した縮瞳率から PCAS 患者を 2 群に分けて採血検体を採取し、心肺停止による虚血脳損傷由来の血中 DAMPs ならびに末梢血単球の機能異常を比較検討する臨床研究への展開を計画中である。

Time after ROSC (h)	PLR cutoff value (%)	Sensitivity	Specificity	NPV (95% CI)
90-day survival (ALL)				
0	3	0.87	0.80	0.87 (0.66–0.97)
6	12	0.77	0.90	0.78 (0.56–0.93)
12	6	0.91	0.65	0.85 (0.55–0.98)
24	5	0.91	0.65	0.85 (0.55–0.98)
48	12	0.82	0.75	0.69 (0.39–0.91)
72	8	0.90	0.75	0.82 (0.48–0.98)
90-day favorable neurological outcome (ALL)				
0	6	0.92	0.74	0.96 (0.81–1.00)
6	16	0.77	0.76	0.88 (0.69–0.98)
12	4	1.00	0.42	1.00 (0.72–1.00)
24	6	1.00	0.54	1.00 (0.77–1.00)
48	15	0.85	0.62	0.87 (0.60–0.98)
72	10	1.00	0.60	1.00 (0.74–1.00)

表 心肺停止蘇生後患者における心拍再開後の定量的な縮瞳率測定による予後予測
ROSC, 自己心拍再開; PLR, 瞳孔対光反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Tamura T, Namiki J, Sugawara Y, Sekine K, Yo K, Kanaya T, Yokobori S, Roberts R, Abe T, Yokota H, Sasaki J: Quantitative assessment of pupillary light reflex for early prediction of outcomes after out-of-hospital cardiac arrest: a multicentre prospective observational study. Resuscitation 査読 有 131: 108-113, 2018
<https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2018.06.027>

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Tamura T, Namiki J, Sugawara Y, Sekine K, Yo K, Kanaya T, Yokobori S, Roberts R, Abe T, Yokota H, Sasaki J: Quantitative assessment of pupillary light reflex for early prediction of outcomes after out-of-hospital cardiac arrest: a multicentre prospective observational study. The 5th SG-ANZICS 2018 Asia Pacific Intensive Care Forum, 2018
2. 多村知剛, 並木淳, 鈴木さゆり, 菅原洋子, 関根和彦, 葉季久雄, 金谷貴大, 横堀将司, 横田裕行, 佐々木淳一: 客観的瞳孔反応による院外心停止後患者の早期神経学的予後予測. 第46回日本集中治療医学会, 2018年
3. 多村知剛, 並木淳, 菅原洋子, 関根和彦, 葉季久雄, 金谷貴大, 横堀将司, 横田裕行, 佐々木淳一: 院外心停止後患者に対する自己心拍再開直後の定量的瞳孔計による予後予測. 第45回日本救急医学会, 2017年
4. 並木淳, 多村知剛, 堀進悟, 関根和彦, 葉季久雄, 宮武諭, 横堀将司, 横田裕行: 瞳孔計を用いた対光反射の定量評価による蘇生後脳症の予後予測: 多施設共同前向き研究の進捗状況. 第44回日本救急医学会, 2016年
5. Shibusawa T, Namiki J, Suzuki S, Sasaki J: Damage associated molecular patterns releasing in a new blunt liver injury model in mice. The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies, 2016
6. 渋沢崇行, 並木淳, 鈴木さゆり, 関根和彦, 佐々木淳一, 堀進悟: 重症敗血症における DAMPs の経時的変化. 第30回日本 Shock 学会, 2015年
7. Shibusawa T, Namiki J, Suzuki S, Sekine K, Horii S: Analysis of the surface antigen profile of the peripheral monocytes in trauma patients. The 16th European congress of trauma and emergency surgery, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 鈴木 さゆり

ローマ字氏名: SUZUKI, Sayuri

研究協力者氏名: 林田 敬

ローマ字氏名: HAYASHIDA, Kei

研究協力者氏名: 渋沢 崇行

ローマ字氏名: SHIBUSAWA, Takayuki

研究協力者氏名: 多村 知剛

ローマ字氏名: TAMURA, Tomoyoshi

研究分担者氏名: 石濱 泰

ローマ字氏名: ISHIHAMA, Yasushi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。