

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20346

研究課題名(和文) 自然免疫受容体発現のパターン解析による発熱の新規鑑別法の開発

研究課題名(英文) Differential diagnosis of fever using canonical discriminant analysis of innate immune receptor gene expression profiles

研究代表者

田島 吾郎 (TAJIMA, Goro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：00437427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：集中治療患者における感染を単一のバイオマーカーで診断することが困難である。本研究の目的は、感染性または無菌性の炎症における自然免疫受容体の遺伝子発現の経時変化を明らかにし、遺伝子発現パターンを正準判別分析を用いた早期診断法を確立することである。
マウス腹膜炎モデルと熱傷モデルを用いて、自然免疫受容体の発現パターンを比較した。受傷後6時間から各群とも特徴的な遺伝子発現パターンを示し、正準判別分析では、過誤率は0%で各群を判別可能であった。自然免疫受容体の遺伝子発現パターンの正準判別分析は全身性炎症の病態診断の新規アプローチとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Infection in patients with systemic inflammation is difficult to diagnose with a single biomarker. We aimed to clarify the time course of change in the gene expression profile of innate immune receptors in infectious or sterile inflammation and to establish an early diagnostic method using canonical discriminant analysis (CDA) of the gene expression profile. Using murine peritonitis model and burn injury models, we compared the expression pattern of innate immune receptors. In the CDA, each group showed distinctive gene expression patterns at just 6 hours after injury. Each group was clearly classified, and the classification error rates were 0% at all of the time points. CDA of the gene expression profile of innate immune receptors could be a novel approach for diagnosing the pathophysiology of complicated systemic inflammation from the early stage of injury.

研究分野：救急医学

キーワード：自然免疫受容体 全身性炎症 判別分析

1. 研究開始当初の背景

発熱は臨床医にとって極日常的に接する症状だが、急性期患者における発熱の鑑別は急を要する一方で容易ではなく、未だ解決すべき臨床的重要課題である。発熱はさまざまな原因に起因する非特異的反応であり、ICU入院中の発熱の23~70%は感染症と無関係との報告もある(Laupland et al:2009, Crit Care Med)。感染症診断において gold standard である培養検査は結果を得るのに数日を要するうえ、既に抗生剤が使用されている場合には陰性となる可能性も高い。細菌感染のマーカーとしてCRPやプロカルシトニンなどのバイオマーカーが使用されているが、いずれも十分な特異性はなく経験的治療に頼らざるを得ない。

自然免疫反応は免疫担当細胞の自然免疫受容体(PRRs:TLRs,NLRs,RLRs)がリガンドとなる特定の分子パターン(PAMPs,DAMPs)を認識することにより始まる。我々はこれまで侵襲時の過剰免疫反応と免疫不全状態に着目し、免疫担当細胞の活性化とコミュニケーションについて研究してきた。過大侵襲に続発する敗血症がTh2優位による免疫不全状態に起因することを明らかにし、その原因としてマクロファージなどによる自然免疫系の活性化と同時に、獲得免疫系のT細胞が関与していることを指摘した。さらに、免疫抑制の抗炎症反応を起こすメカニズムとして、制御性T細胞(Treg)やGR-1陽性マクロファージなどの抑制性細胞の活性化を明らかにしてきた。一方、これらの研究の中で、侵襲の原因や活性化する細胞が異なっても、最終的に上昇するシグナル分子やサイトカインが同様であることが多々見受けられる点に着目した。これは臨床において測定しうるバイオマーカーからの原因の特定が困難であることを裏付けており、特に単一のバイオマーカーでの原因特定は適切でないと考えられる。以上のように原因に関わらず、最終

的に炎症を惹起する発熱物質やサイトカインが同様ならば、原因物質が最初に作用するPRRsの発現を網羅的にパターン解析することが妥当であると考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は病原体センサーである自然免疫受容体(pattern recognition receptors:PRRs)の発現パターンに基づいた発熱の新規鑑別法(原因別分類)を開発することである。集中治療中の発熱の鑑別においては、特に細菌感染は早期の鑑別を要し、適切な抗生剤の早期投与が予後の改善に重要である。鑑別診断のために各種マーカーの特異性が報告されているが、実臨床では外傷や熱傷などの非感染性の炎症との鑑別において実用性は不十分である。本研究では単一のバイオマーカーの測定値の絶対値による評価ではなく、自然免疫系を構成する複数のマーカーでシステム全体の傾向を捉えられるよう、パターンを評価することを目的として、(1)マウス各種炎症モデルにおける血中のPRRsの遺伝子発現を経時的な変化を測定する。(2)原因疾患別にPRRsの発現をレーダーチャート表示し発現パターンを正準判別分析を用いて判別する。

3. 研究の方法

(1)マウス全身性炎症モデルにおける自然免疫受容体(PRRs)の遺伝子の経時的測定

マウス炎症モデルと実験プロトコール
細菌感染モデル(Cecal Ligation and Puncture:CLP):敗血症研究に広く用いられている腹膜炎モデルである(Hubbard WJ et al:2005,SHOCK)。マウスを開腹後、盲腸を根部で結紮して23G針で1回貫通するもので、死亡率が約80%の致死的な重症敗血症モデルである。

無菌的炎症(広範囲熱傷モデル):マウスの

体表面積の25%のareaをあけたデバイスを用い、背部を90度の熱湯につけることで、度の熱傷を作成する。本モデルは我々のこれまでの研究において、臨床の重症熱傷患者を模した強い全身性炎症を引き起こすことが分かっている。

上記の各炎症モデル群とSham群で、受傷(感染)6、12、24時間後にマウスを安楽死させて、血液は心腔内採血しサンプリングする。

PRRsの遺伝子発現解析

末梢血液からQIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAの抽出を行う。プライマーは細菌、ウイルス、損傷組織の認識に重要なPRRsとして、Tlr2、Tlr4、Tlr9、Nlrp3、Rig-Iを、内部コントロールとしてRibosomal protein S18(Rps18)を用いる。Prime-Script™ RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)を用いて逆転写後、選択した遺伝子についてSYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.)を用いてThermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc.)でPCRを施行し、内部コントロール比としてmRNAを定量化する。

(2) 自然免疫受容体 (PRRs) 発現のレーダーチャート表示とパターン解析

PRRsの発現パターンの表示

mRNA発現は内部コントロール比として定量化した値を、5つ遺伝子発現のパターンとして評価するため、5つのマーカーの最大値の平均値で割ることによって、最大値が1となるレーダーチャートに表示する。その結果、絶対値の大小に関わらずPRRsの発現パターンを図形的特徴として視覚的に評価できる。

PRRsの発現パターンの解析

視覚的な分類に加えて、病態の判別(パターンの判別)をパターン認識理論に基づいて、特徴ベクトルの抽出(スケーリングした変数)多変量解析による識別(正準判別分析)の流れで行う。正準判別分析により正準スコアに基づいた二次元表示から視覚的な病態

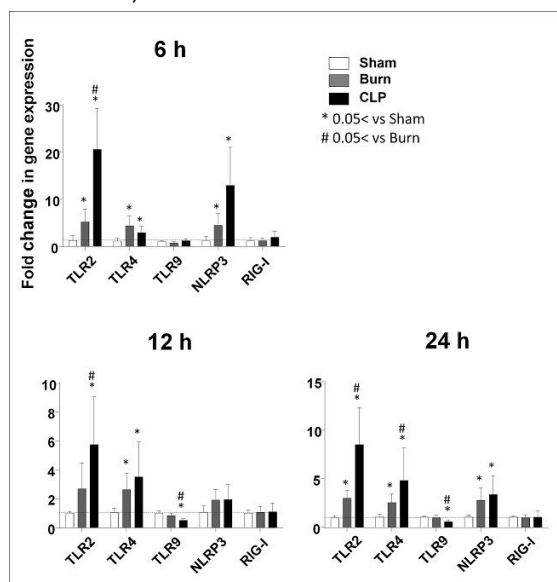
判別が可能となり、さらに正準関数から各病態の判別率も算出できる。

4. 研究成果

(1) マウス全身性炎症モデルにおける自然免疫受容体 (PRRs) の遺伝子の経時的測定

Sham、敗血症モデル (CLP)、熱傷モデル (Burn) の3群で、侵襲後の自然免疫受容体の経時的な遺伝子発現を測定した(6, 12, 24時間)。TLR2, TLR4の発現はCLP、Burnにおいて受傷6時間後から有意に上昇した($p < 0.05$)。TLR9の発現はCLPにおいて12, 24時間後でSham, Burnより有意に低下した($p < 0.05$)。NLRP3の発現はCLP、Burnにおいて6, 24時間後で有意に上昇した。(図1)

(図1: マウス全身性炎症モデル; sham, Burn, CLPにおける自然免疫受容体の経時的な遺伝子発現)



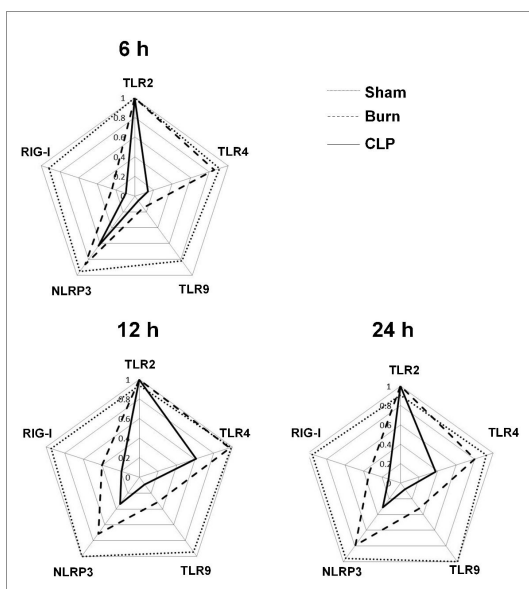
(2) 自然免疫受容体 (PRRs) 発現のレーダーチャート表示とパターン解析

各自然免疫受容体の遺伝子発現をパターンとして評価するために、mRNAの発現量をスケールリングしてレーダーチャート表示すると、受傷6時間後、12時間後、24時間後のすべての群において、sham、Burn、CLPとも特徴的な発現パターンを示した。(図2)

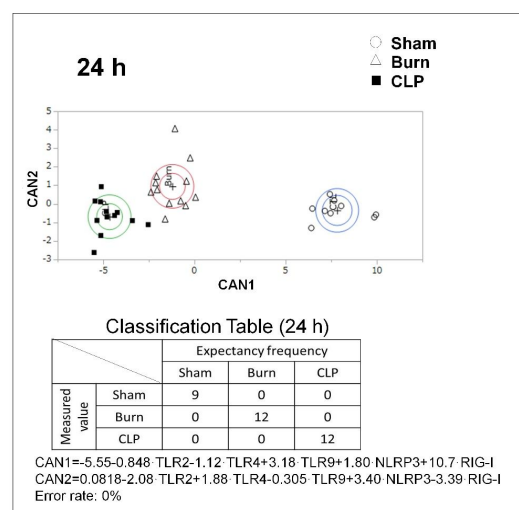
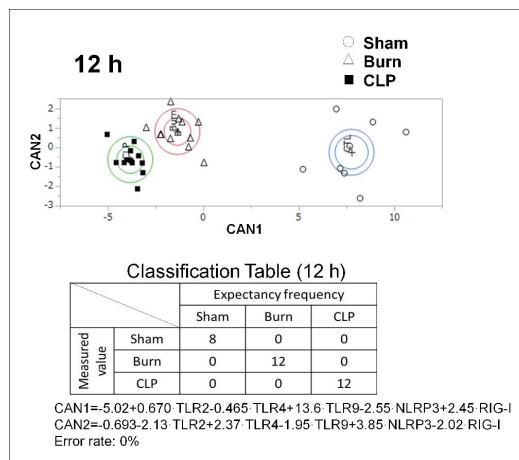
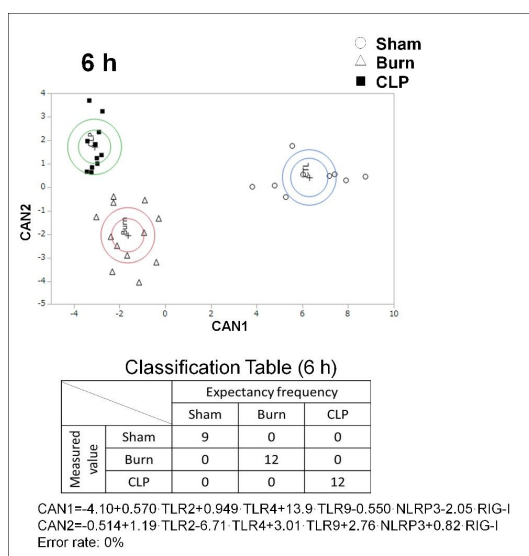
各病態別の遺伝子発現パターンを比較す

るため、6 時間後、12 時間後、24 時間後の各群で正準判別分析を施行したところ、各群とも過誤率 0% で Sham、Burn、CLP を判別することができた。(図 3) 本判別式における汎化能を評価するために各群において学習データと検証データを 8:2 にして検証したところ、同様に 0% で判別が可能であった。

(図 2: マウス全身性炎症モデル; sham, Burn, CLP における自然免疫受容体遺伝子発現パターンのレーダーチャート表示)



(図 3: マウス全身性炎症モデル; sham, Burn, CLP における自然免疫受容体遺伝子発現の正準判別分析によるパターン解析)



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1件)

- 1) Tajima G, Tokunaga A, Umehara T, Ikematsu K, Miyamoto J, Sato S, Tasaki O Early diagnosis using canonical discriminant analysis of innate immune receptor gene expression profiles in a murine infectious or sterile systemic inflammation model. J Trauma Acute Care Surg. 2018 Apr;84(4):583-589. (査読あり)

[学会発表](計4件)

- 1) 田島吾郎、梅原敬弘、池松和哉、田崎修 全身性炎症における自然免疫受容体発現

パターンによる早期病態判別法

第 45 回 日本救急医学会総会 リーガロイヤルホテル大阪 大阪国際会議場 (大阪)
2017 年 10 月 24 日

2) **Goro Tajima**, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki

EARLY DIAGNOSIS USING CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS OF INNATE IMMUNE RECEPTOR GENE EXPRESSION PROFILE IN INFECTIOUS OR STERILE SYSTEMIC INFLAMMATION

76th Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery

Baltimore Marriott Waterfront (米国ボルチモア) 2017 年 9 月 14 日

3) **田島吾郎**、梅原敬弘、池松和哉、田崎修
全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンによる感染症診断法

第 44 回日本救急医学会総会 グランドプリンスホテル新高輪 (東京) 2016 年 11 月 18 日

4) **Goro Tajima**, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki

INFECTION DIAGNOSIS IN SYSTEMIC INFLAMMATION BY INNATE IMMUNE RECEPTOR EXPRESSION PATTERN

75th Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery

Hilton Waikoloa Village (米国 ハワイ)
2016 年 9 月 14 日

〔図書〕(計 1 件)

1) **田島吾郎**、松本直也

救急医学・集中治療における基礎医学トピックス 救急・集中治療医学レビュー 2016-'17, 364-371 2016 年 2 月 2 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 吾郎 (TAJIMA, Goro)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号 : 00437427

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし