

令和元年6月18日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09945

研究課題名(和文) 感染性心内膜炎における新規バイオマーカーendocanの統合的解析

研究課題名(英文) A therapeutic biomarker endocan in infective endocarditis

研究代表者

北沢 貴利 (KITAZAWA, Takatoshi)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：90505900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：感染性心内膜炎において、C-関連タンパク(CRP)、プロカルシトニン(PCT)など既存のバイオマーカーは、予後評価、治療の方向性の決定に直結しにくい。本研究では、新規感染症バイオマーカーであるendocanが既存のバイオマーカーと比べて治療評価マーカーとして有効か否かを検討した。治療経過中、血清endocan濃度は従来のCRP、PCTに比べ緩やかに減少した。カットオフを0.7ng/mLとすると治療時には達成率は0%、28日後は85.7%で、早期の陰性化率が高いPCT、終了時の陰性化が低いCRPと比べ有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染性心内膜炎では、抗菌薬による治療治療が必要であり、その治療評価を客観的に判断するバイオマーカーが確立していなかった。Endocanの経過の中で緩やかに減少する特性を治療評価マーカーに応用することで、炎症の早期陰性化した症例や発熱が持続している症例など、治療期間の定めにくい症例においても適正に治療期間を設定できる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：In infectious endocarditis, previous biomarkers such as C-related protein (CRP) and procalcitonin (PCT) have been difficult to determine the appropriate timing of antibiotic treatment termination. Endocan is a novel biomarker of sepsis or bacteremia. In this study, we investigated effectiveness of endocan as a therapeutic biomarker. During the course of treatment, serum endocan concentrations decreased slowly compared to CRP and PCT. When the cut-off of endocan is 0.7 ng/mL, the rate of cases with lower endocan level than the cutoff was 0% on day 0, and 85.7% on day 28. The rate of cases with lower CRP level than the cutoff was higher on day 28, and the rate of cases with lower PCT level than the cutoff was higher from day 3 to day 21. Endocan could be a useful therapeutic biomarker of infective endocarditis.

研究分野：感染症

キーワード：感染性心内膜炎 バイオマーカー endocan

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 感染性心内膜炎のバイオマーカーの意義

感染性心内膜炎は、心臓弁を感染巣とする持続菌血症であり、感受性のある抗菌薬を投与しても、菌血症や炎症反応の持続や、治療完遂後の再燃をもたらすことがある。感染症診療では、早期診断、治療の適正の判断、治療期間の決定、終了後の評価を行うのに、バイオマーカーは日常的に利用されているが、C-関連タンパク(CRP)、プロカルシトニン(PCT)など既存のバイオマーカーは、感染性心内膜炎のような長期経過にわたりバイオマーカーに対し複雑性に影響する病態では、予後評価、治療の方向性の決定に直結しにくい。理想的な感染症のバイオマーカーとは、組織特異的に発現し、産生が鋭敏なメカニズムで制御され、感染症がもたらす機能障害度に強く関連する分子と言え、そのような分子を見出し、制御メカニズムを解明することは、感染性心内膜炎の診療マーカーとしての有効性の確立だけでなく、制御可能な治療標的として診療における新たな起点となる可能性を有する。

2 感染性心内膜炎における血管内皮の役割

血管内皮は、菌血症の発症初期から病原因子の曝露を受け、生体の免疫応答でも主要な機能を果たす。血管内皮細胞は、代表的起因菌である黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンなど病原因子を認識し、VCAM-1 など血球の接着因子を発現し、炎症の惹起に参与する。実際に臨床症例においても、接着因子の発現を中心とした血管内皮の機能変化が確認され、また敗血症を中心とする感染症の新たな治療戦略として statin の可能性が注目され、そのメカニズムに抗炎症作用を中心に解明がすすめられているが、内皮細胞間や血球細胞との細胞接着も変化させる。感染性心内膜炎の病態を理解する上で血管内皮機能の変化、その制御に着目する重要性は論を待たないが、バイオマーカーとして血管内皮細胞由来の分子を用いた検討はほとんどなされていない。

内皮細胞特異的分子-1(endothelial cell specific molecule-1, endocan)は 50KDa の可溶性のデルマトン硫酸のプロテオグリカンで、1996 年に同定された。肺癌をはじめとする腫瘍細胞でも認められ、転移、増殖の危険因子となる。近年、敗血症、敗血症性ショック、健常人を対象に、endocan を他のバイオマーカーと比較し、endocan のみ 3 群全てに有意差を確認できた。更に、感染症症例の臨床経過における変動を解析し、endocan の特性として、発症時に上昇し、緩徐に低下する、PCT、CRP と相関しない、菌血症のマーカーとして PCT、CRP 以上の有用性を示す点を明らかとなった。endocan を実臨床に応用するにあたり、感染性心内膜炎は、炎症の長期持続性、内皮細胞での機能障害が病態との関連をもつという特性を考えると、優れた予後マーカーとなり得る。しかし、感染性心内膜炎での治療後も含めた endocan の長期的な濃度の推移を検討した報告はなく、至適性の評価は不十分である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に endocan の産生・分泌の経過が、感染性心内膜炎の進行、治癒過程にどのように影響するか、治療評価マーカーとして既存のバイオマーカーと比べて有効か否かを検証することであり、第二に血管内皮細胞において、微生物病原因子により endocan が産生され、産生が持続性を示すかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 感染性心内膜炎症例における endocan の経時的変化

臨床症例での血清濃度の推移を治療開始から終了後まで継時的に解析した。対象は、非担癌症例である感染性心内膜炎症例 11 例に対して、治療開始日を 0 日として、0、3、7±1、14±1、28±1 日、及び治療終了後 1 ヶ月の血清を採取し、endocan 濃度を ELISA 法にて測定した。また同時にプロカルシトニン、CRP を同時に測定した。

(2) 血管内皮細胞における endocan の産生の持続性の解析

endocan の感染性心内膜炎を含む感染症における産生持続性についての機序を明らかにするために、血管内皮細胞における endocan の産生の持続性の検証と、持続性を制御する機序の解析を行った。細胞は正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用い、endocan 産生刺激物質として、大腸菌 LPS を用いた。刺激後 6 日間連続で細胞上清を回収し、上清中の endocan 濃度を測定した。次に、LPS 刺激を連続刺激の細胞と、一定時間(24 時間)の限定指摘との細胞とで、刺激後 6 日間連続で細胞上清を回収し、上清中の endocan 濃度を測定し、両者の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 感染性心内膜炎症例における endocan の経時的変化

感染性心内膜炎症例 11 例に対して、治療開始日を 0 日として、0、3、7±1、14±1、21±1、28±1 日の血清を採取し、endocan 濃度を ELISA 法にて測定した。また同時にプロカルシトニン、CRP を同時に測定した。

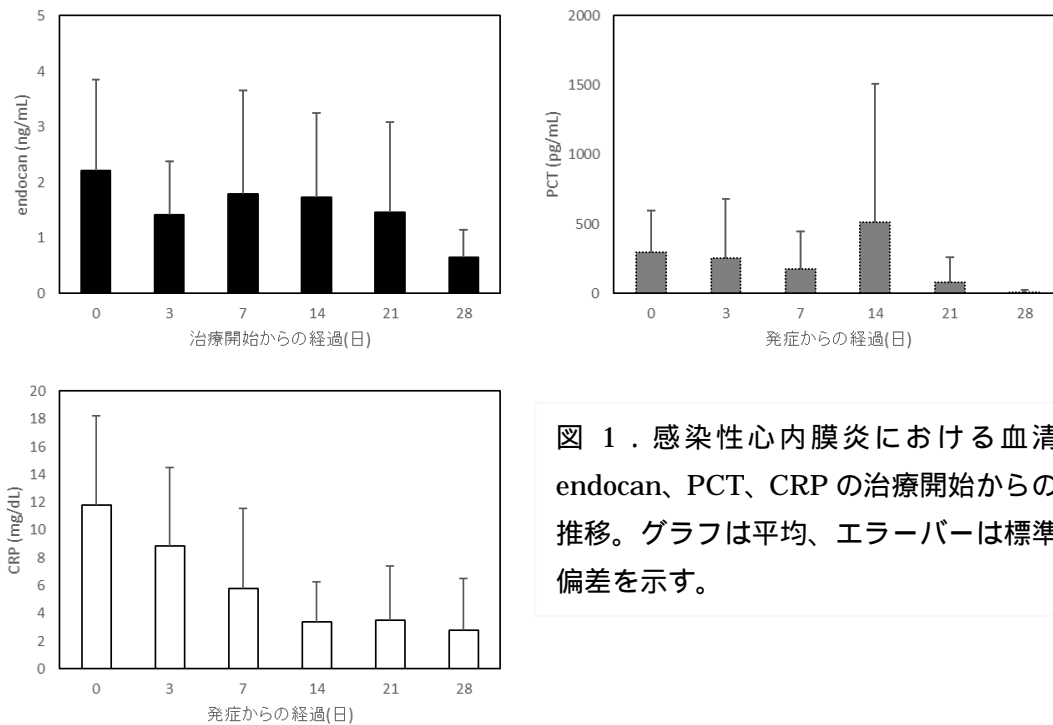


図 1 . 感染性心内膜炎における血清 endocan、PCT、CRP の治療開始からの推移。グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。

血清 endocan 濃度はいずれの症例においても徐々に減少傾向を示し、0 日で平均±SD で 2.21 ± 1.63 ng/mL、28 日で 0.66 ± 0.48 ng/mL となった。一方プロカルシトニンと CRP は減少が早く、プロカルシトニンは 0 日で 295 ± 301 pg/mL、28 日で 9 ± 17 pg/mL となり、CRP は 0 日で 11.8 ± 6.4 mg/dL、28 日で 2.8 ± 3.7 mg/dL であった。以上より endocan を経時的に測定することで、治療を反映している可能性が示唆され、治療終了時期における endocan の測定が治療終了の効果判定に有用となる可能性が示唆された。

プロカルシトニンは菌血症や敗血症の診断においてカットオフが文献上示されているが、これまで治療評価のバイオマーカーとして検討した報告はなく、本研究をもとに治療評価のカットオフを設定した。

バイオマーカー	カットオフ基準	治療開始後日数					
		0	3	7	14	21	28
Endocan	<0.7 ng/mL	0.0	0.0	9.1	10.0	20.0	85.7
PCT	<50 pg/mL	0.0	18.2	27.3	40.0	60.0	100.0
CRP	<0.3 mg/dL	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	44.4

表 1 各バイオマーカーのカットオフ基準に達した患者割合。測定症例にて集計。

プロカルシトニンの正常化例は 3 日目で 18%、21 日目で 60%と早期から正常化し、一方で CRP は 3 日目で 0%、28 日目で 44%と遅れて正常化する。endocan は正常化のカットオフが設定されていないが、0.7 ng/mL とすると、3 日目で 0%、28 日目で 86%と治療終了時に基準以下となる割合が高く、治療終了評価のマーカーとなる可能性が示唆された。

(2) 血管内皮細胞における endocan の産生の持続性の解析

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対して大腸菌 LPS を刺激後 6 日間連続で細胞上清を回収し、上清中の endocan 濃度を測定した。次に、LPS 刺激を連続刺激の細胞と、一定時間(24 時間)に限定した刺激を受けた細胞とで、刺激後 6 日間連続で細胞上清を回収し、上清中の endocan 濃度を測定し、両者の比較を行った。

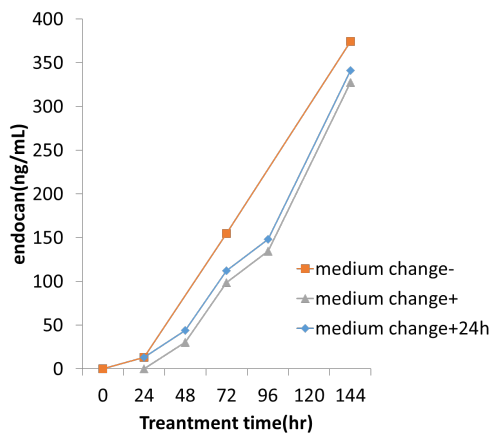


図2 HUVECのLPS刺激に対するendocan産生の揭示推移。LPS連続刺激後で回収した上清(medium change-)、24時間刺激後入れ替え、追加刺激で回収した上清(medium change+)、24時間刺激後入れ替え、追加無刺激で回収した上清(medium change+24h)

endocanは7日間連続して産生し続けることが明らかとなった。またLPSの連続刺激と24時間の限定刺激とでは、endocanの産生量は大きな差はみられないことが明らかとなった。

以上より、LPS刺激によりendocanは少なくとも6日間は連続的に産生し、その産生持続性は初期の刺激によって維持されることが示された。この結果は微生物病原因子が治療によって除去された後もendocan産生が持続、炎症の改善よりも遅く減少する感染性心内膜炎の病態と一致する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kitazawa T, Ishigaki S, Seo K, Yoshino Y, Ota Y. Catheter-related bloodstream infection due to *Rhodotorula mucilaginosa* with normal serum (1-3)-D-glucan level. *J Mycol Med*. 2018;28:393-395. 査読有 doi: 10.1016/j.mycmed.2018.04.001.

Mitsui M, Kataoka A, Konno K, Kitazawa T, Yokoyama N, Shimokawa T, Kozuma K. A case of prosthetic aortic valve endocarditis with massive vegetation underestimated by conventional two-dimensional transesophageal echocardiography: efficacy of three-dimensional transesophageal echocardiography. *J Echocardiogr*. 2017;15:46-47. 査読有 doi: 10.1007/s12574-016-0311-7.

Yoshino Y, Okugawa S, Kimura S, Makita E, Seo K, Koga I, Matsunaga N, Kitazawa T, Ota Y. Infective endocarditis due to *Enterobacter cloacae* resistant to third- and fourth-generation cephalosporins. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015;48:226-8. 査読有 doi: 10.1016/j.jmii.2012.07.015.

Seo K, Kitazawa T, Yoshino Y, Koga I, Ota Y. Characteristics of serum endocan levels in infection. *PLoS One*. 2015;10:e0123358. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0123358.

〔学会発表〕(計2件)

山本 藍, 大和 洸, 内野 卓也, 高橋 諭, 三須 恵太, 妹尾 和憲, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男, 滝川 一. サルモネラ腸腰筋膿瘍の治療後に持続した溶血性貧血から診断にいたった人工弁心内膜炎の1例. 第638回日本内科学会関東支部関東地方会, 2017
妹尾 和憲, 吉野 友祐, 古賀 一郎, 北沢 貴利, 太田 康男. レプトスピラ感染症における血清endocan濃度の推移. 第65回日本感染症学会東日本地方会, 2016

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.med.teikyo-u.ac.jp/infectious/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：下川 智樹
ローマ字氏名：(SHIMOKAWA, tomoki)
所属研究機関名：帝京大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：30599270

研究分担者氏名：上妻 謙
ローマ字氏名：(KOZUMA, ken)
所属研究機関名：帝京大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：90365940

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。