

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08892

研究課題名(和文) パターン認識に基づく新たな炎症病態解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to discriminate the pathophysiology of inflammation based on pattern recognition

研究代表者

田島 吾郎 (Tajima, Goro)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：00437427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：感染性炎症(敗血症)、非感染性炎症(熱傷)と病態の異なるマウス全身性炎症モデルを用いて、次世代シーケンサーで白血球のRNAシーケンスを施行した。トランスクリプトーム解析で各炎症病態で発現する遺伝子を網羅的に測定し、GO解析で病態に特徴的な遺伝子群を抽出した。遺伝子群のPCRによる測定値をスケールリングして遺伝子発現をパターン化した。遺伝子発現には病態に特徴的なパターンがあり、実測値とパターン化した値に対して正準判別分析を施行することで、重症度と無関係に各病態を100%判別可能であった。トランスクリプトーム解析で抽出した遺伝子発現パターンによる炎症病態の新たな病態判別法の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

集中治療患者における原因不明の発熱や炎症病態では、炎症・抗炎症に関わるさまざまなバイオマーカーの上昇が報告されるが、単独のマーカーによる診断は困難で、常に「炎症と抗炎症のバランス」が重要であることが強調されてきた。本研究により複数マーカーの活性化のバランス(=パターン)を評価することで、「炎症と抗炎症のバランス」を評価する新たな方法の可能性が示唆された。、複数マーカーのパターンを新たな指標として「どのような炎症か(炎症の量ではなく質)」を評価することで、これまで診断不能であった不明熱や炎症病態の判別が可能となり、適切な病態理解、治療決定につなげられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using mouse model of different pathological systemic inflammation, infectious inflammation (sepsis) and non-infectious inflammation (burns), RNA sequencing of leukocytes was performed by next-generation sequencing. Gene expression in each systemic inflammation comprehensively underwent transcriptome analysis, and a group of genes characteristic of each pathophysiology was extracted by GO analysis. Gene expression was patterned by scaling PCR measurements of gene groups. Gene expression had a characteristic pattern of each pathophysiology, and by performing canonical discriminant analysis on the measured and patterned values, each pathophysiology could be discriminated 100% independently of the severity. The results suggest that the gene expression patterns extracted by transcriptome analysis may be a novel method for discriminating inflammatory pathophysiology.

研究分野：救急医学

キーワード：全身性炎症反応 敗血症 熱傷 パターン認識

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

集中治療患者における原因不明の発熱や炎症病態では、その鑑別に急を要する一方で容易ではなく、高度の炎症があることは分かっているにもかかわらず、治療方針の決定に難渋することがある。複雑な炎症病態では、炎症・抗炎症に関わるさまざまなバイオマーカーの上昇が報告され、常に‘炎症と抗炎症のバランス’が重要であることが強調されるが、そのバランスの評価や制御の方法はない。臨床的にも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十分な病態特異性はなく、TNF $\alpha$ 、TLR4など急性炎症における主要マーカーに対する分子標的薬も有効利用には至っていない(Rice et al. *Cri Care Med.*2010)。これらの結果は、単独のバイオマーカーによる複雑な炎症病態の評価・治療の限界を示しており‘炎症と抗炎症のバランス’を評価するには複数マーカーの活性化のバランス(=パターン)を評価するという新たな方法が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は炎症病態を免疫系を構成する複数マーカーの発現パターンとして捉えて、病態固有のパターンから病態を判別することである。そのために炎症病態を各炎症マーカーの絶対値の大小ではなく、発現のバランスを病態固有のパターンとして評価することを目指す。医療分野ではパターンを評価することは一般的な手法ではないが、生物形態学や生体認証では、かたちやパターンの解析からグループや個人を同定するパターン認識の理論が研究され、定型的なアプローチがなされている。本研究では病態をパターンとしてとらえて、形態学的解析と同様に解析する。そして、複数マーカーのパターンを新たな指標として‘どのような’炎症か(炎症の量ではなく質)を評価することで、これまで診断不能であった不明熱や炎症病態の判別が可能となり、適切な病態理解、治療決定につながれると考える。

### 3. 研究の方法

本研究では炎症病態のパターンを解析するために、全身性炎症モデルとして感染性炎症(敗血症モデル)と非感染性炎症(熱傷モデル)でそれぞれ重症度の異なるモデルを用いて、白血球中から抽出した遺伝子の発現パターンを解析した。

#### (1) マウス全身性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18Gあるいは25G針で1回貫通するもので、18G群は死亡率が約80%の致死的な重症敗血症モデルで、25G群は約10%の致死率である。

非感染性炎症(広範囲熱傷モデル):マウスの体表面積の30%、10%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3、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。

#### (2) RNA抽出と次世代シーケンサー(NGS)

末梢血液からQIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAの抽出を行った。抽出したRNAからTruSeq RNA Library Prep Kit v2(Illumina)を用いてRNAseqライブラリーを作成した。NGSはIlluminaのMiseqを用いてRNAシーケンスを施行した

#### (3) 遺伝子発現解析

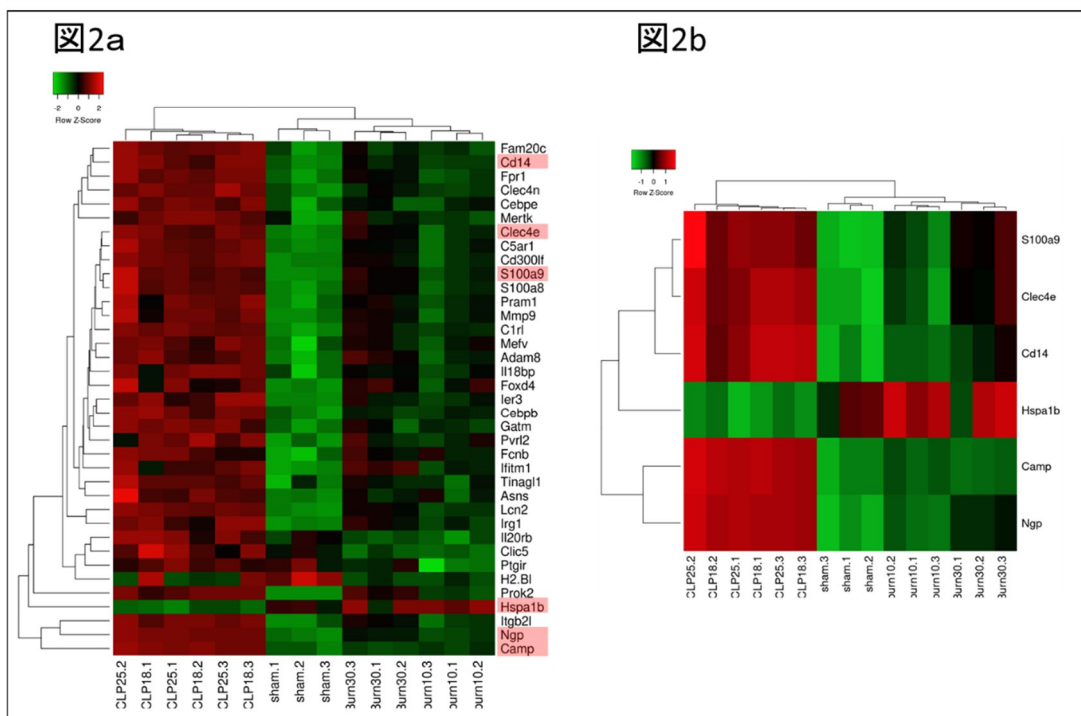
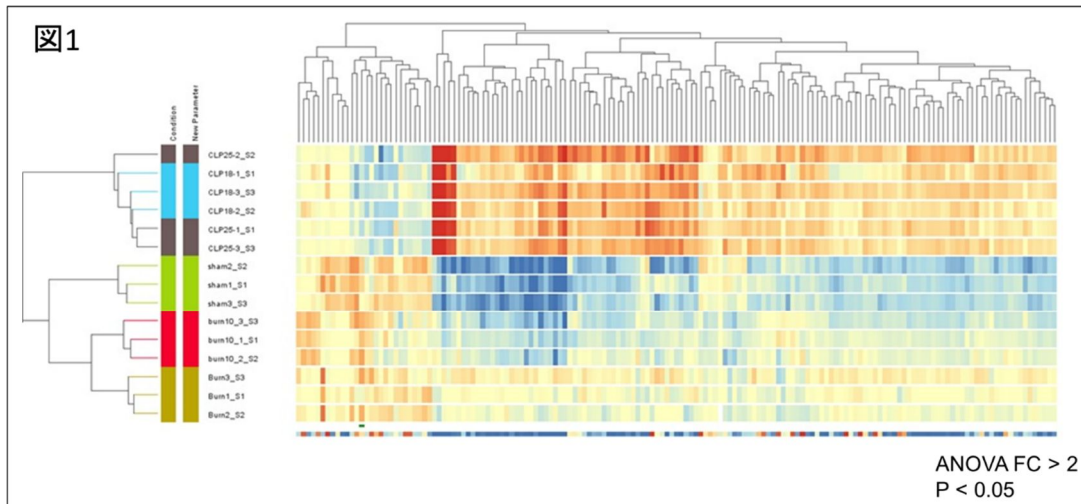
バイオインフォマティクス解析にはStrand NGS(Strand Life Sciences Pvt. Ltd.)を用い、免疫系に関連するGO解析を行い抽出した遺伝子群に対してqPCRを行った。内部コントロールとしてRibosomal protein S18(Rps18)を用いた。Prime-Script™ RT Reagent Kit(Takara Bio Inc., Otsu, Japan)を用いて逆転写後、選択した遺伝子についてSYBR Premix Ex Taq(Takara Bio Inc.)を用いてThermal Cycler Dice Real Time System(Takara Bio Inc.)でPCRを施行し、内部コントロール比としてmRNAを定量化した。

#### (4) PRRsの発現パターンの解析

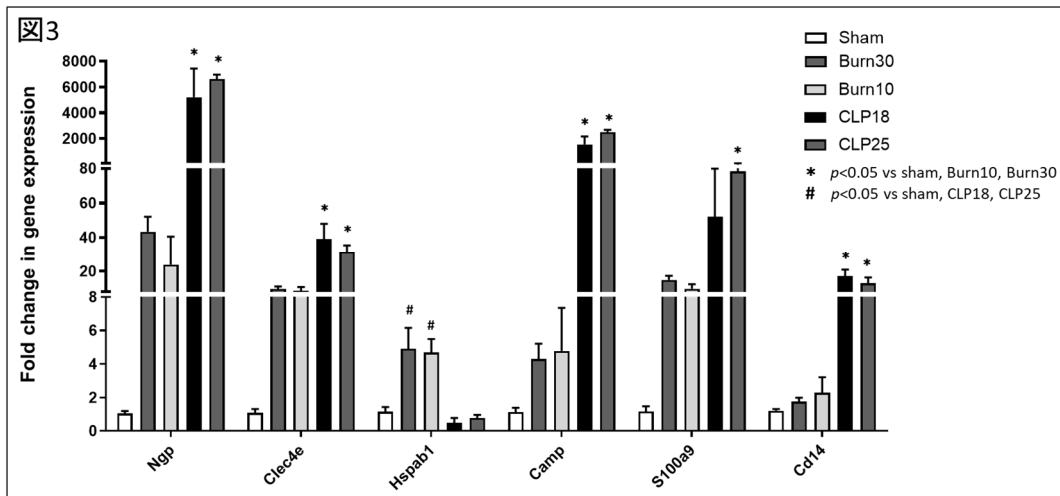
病態の判別(パターンの判別)をパターン認識理論に基づいて、特徴ベクトルの抽出(スケーリングした変数)多変量解析による識別(正準判別分析)の流れで行った。

#### 4. 研究成果

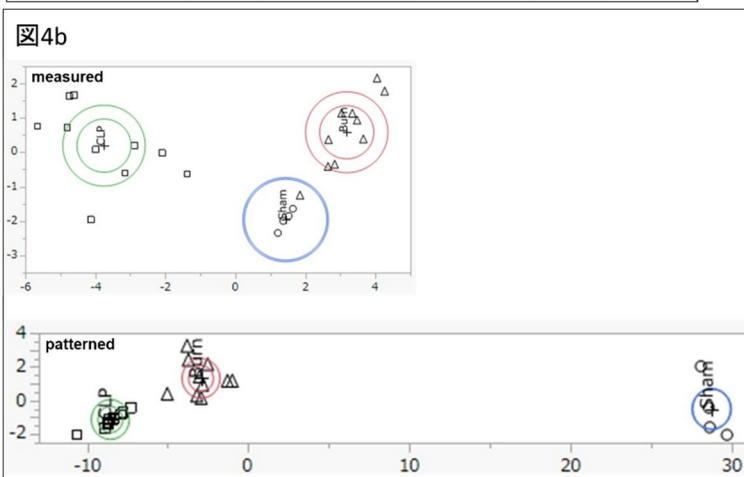
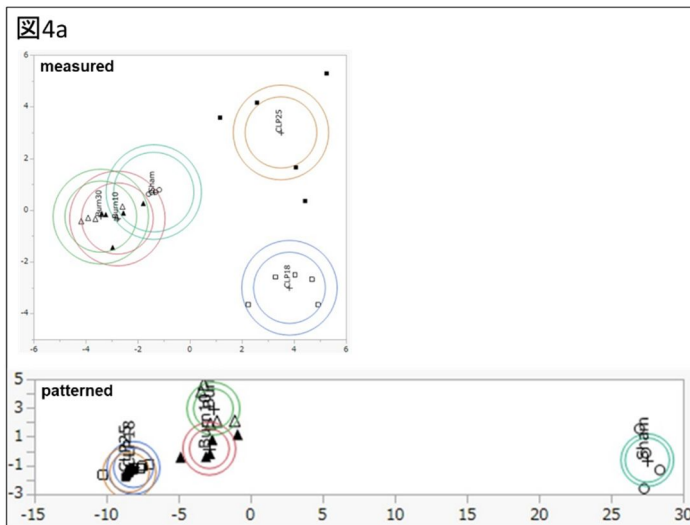
NGS後のバイオインフォマティクス解析では157の遺伝子で5群間で有意に2倍以上の変動を認め(ANOVA  $p < 0.05$ )、各群ともshamに対して2倍以上の増加を示した遺伝子が100~120、2倍以上低下した遺伝子が30~50程度あった(図1)。2倍以上の有意な変化を示した遺伝子でGO解析を行い、免疫反応に関係したGO term “Immune response, response to external stimulus, response to other organism, regulation of leukocyte mediated immunity, defense response” などから39の遺伝子が抽出された。これらのheatmapを作成し(図2a)さらに侵襲に対する免疫反応に重要に関係していると思われる著明な変化を示した6つの遺伝子を抽出した(図2b)。



次に抽出した6つの遺伝子(Ngp, Clec4e, Camp, S100a9, Cd14, Hspa1b)をターゲットにqPCRを施行した。PCRではCLPでNgp, Clec4e, Camp, S100a9, Cd14がsham, Burnと比べ有意に上昇し( $p < 0.05$ )、BurnでHspa1bがsham, CLPに比べて著明な上昇を示した( $p < 0.05$ )(図3)



判別分析では実測値による解析とパターン化された値による正準判別分析（CDA）施行して比較した。、パターンによる解析は各実測値を相対値としてパターン化するため、パラメータの最大平均値で割ってスケールングすることでパターン化した。実測値による解析では、sham と 10%熱傷、30%熱傷の 3 群は判別が困難であったが、パターン化されたデータでは 10%と 30%の熱傷、18G と 25G の CLP はそれぞれ非常に類似した発現を示し、病態毎の分離が明確となった( 図 4a )。重症度と関係なく病態ごとの解析でも実測値よりもパターン化したデータの方が病態ごとの判別が明確になることがわかった。そして、これらの遺伝子群の発現パターンによる判別分析では重症度と無関係に各病態を 100%判別可能であった ( 図 4b )。



本研究の結果、病態ごとに遺伝子発現に特徴的なパターンがあり、遺伝子発現のパターン解析により重症度と無関係に各病態を判別可能であることが示され、トランスクリプトーム解析で抽出した遺伝子発現パターンによる新たな病態判別法の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamakawa Kazuma, Tajima Goro, Keegan Joshua W, Nakahori Yasutaka, Guo Fei, Seshadri Anupamaa J, Cahill Laura A, Lederer James A	4. 巻 109
2. 論文標題 Trauma induces expansion and activation of a memory-like Treg population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.4A0520-122R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Eri, Tajima Goro, Murahashi Shimon, Matsumoto Naoya, Tokunaga Ayako, Miura Miyuki, Murase Takehiko, Ikematsu Kazuya, Tasaki Osamu	4. 巻 90
2. 論文標題 The expression of repulsive guidance molecule a after traumatic brain injury: Time-course changes in gene expression in a murine model of controlled cortical impact	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trauma and Acute Care Surgery	6. 最初と最後の頁 281 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TA.0000000000003041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田島吾郎、上村恵理、村橋志門、三浦深雪、梅原敬弘、池松和哉、田崎修
2. 発表標題 病態と重症度からみた自然免疫システムの遺伝子発現分析
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goro Tajima, Eri Uemura, Ayako Tokunaga, Miyuki Miura, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, Osamu Tasaki
2. 発表標題 PATTERN-BASED ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILES BY CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS COULD IDENTIFY PATHOPHYSIOLOGY REGARDLESS OF DISEASE SEVERITY
3. 学会等名 79th Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田島吾郎、上村恵理、徳永彩子、三浦深雪、梅原敬弘、池松和哉、田崎修
2. 発表標題 自然免疫システム遺伝子発現のパターン分析による病態判別
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田島吾郎、徳永彩子、梅原敬弘、池松和哉、田崎修
2. 発表標題 全身性炎症における自然免疫システムの遺伝子発現パターンによる病態判別
3. 学会等名 第47回日本救急医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島 吾郎
2. 発表標題 全身性炎症における自然免疫受容体発現パターンの経時変化
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田島 吾郎
2. 発表標題 NOVEL METHOD TO DISCRIMINATE THE PATHOPHYSIOLOGY OF INFLAMMATION BY PATTERN OF INNATE IMMUNE SYSTEM
3. 学会等名 Society of Critical Care Medicine 48th Critical Care Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松本 直也 (Matsumoto Naoya)  (50359808)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  (17301)	
研究分担者	山野 修平 (Yamano Shuhei)  (60570538)	長崎大学・病院(医学系)・助教  (17301)	
研究分担者	梅原 敬弘 (Umehara Takahiro)  (60617421)	産業医科大学・医学部・准教授  (37116)	
研究分担者	池松 和哉 (Ikematsu Kazuya)  (80332857)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  (17301)	
研究分担者	田崎 修 (Tasaki Osamu)  (90346221)	長崎大学・病院(医学系)・教授  (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------