2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１４４０１

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：１９Ｈ０３７６０

研究課題名（和文）侵襲時再生治療に関する新たな発展：新規炎症増幅メカニズムの制御

研究課題名（英文）New developments in regenerative therapy for critical illness: the role of novel inflammatory amplification mechanisms.

研究代表者

小倉　裕司（Ogura, Hiroshi）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：７０３０１２６５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、重度侵襲時における新規炎症増幅メカニズムとしてArid-5aシグナル関連分子に注目し、骨髄由来単核球細胞移植の効果などを評価した。本研究の解析から、１）パブリックデータベース から抽出した、敗血症患者における単球のArid-5a関連分子のRNA発現が、IL-6など炎症性サイトカインと並行して増強すること,２）敗血症患者において全血RNAシークエンス解析を行い、Arid-5a, Regnase-1, STAT3およびIL-6のRNA発現がいずれも増加すること、３）骨髄単核球細胞移植は、多臓器障害モデルにおいIL-6産生を抑え、血管内皮保護作用を発揮することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、重度侵襲時における新規炎症増幅メカニズムとしてArid-5aシグナル関連分子に注目して評価した。敗血症患者におけるArid-5a関連分子(Arid-5a, Regnase-1, STAT3, IL-6)のRNＡ発現が増強すること、骨髄単核球細胞移植は多臓器障害モデルにおいて血中IL-6の上昇を抑え、内皮細胞保護作用を発揮することを明らかにした。以上の結果は、今まで不明であった敗血症など重度侵襲時の過剰炎症メカニズム、侵襲時幹細胞移植が有効性を発揮するメカニズムの解明に繋がる可能性を示しており、その学術的意義は大きい。また、今後の臨床応用に繋がれば、その社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on Arid-5a signaling-related molecules as a novel mechanism of inflammation amplification during severe invasion and evaluated the effects of bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in a model of multiple organ damage. The following results were obtained. 1) RNA expression of Arid-5a-related molecules (Arid-5a, Regnase-1, STAT3) on monocytes in sepsis patients, extracted from public databases, was significantly enhanced in parallel with inflammatory cytokines such as IL-6 2) Whole blood RNA sequencing analysis in septic patients revealed that RNA expression of Arid-5a, Regnase-1, STAT3 and IL-6 were all increased. 3) Bone marrow mononuclear cell transplantation suppresses elevated blood IL-6 and syndecan-1 levels and exerts endothelial cytoprotective effects in a model of sepsis.

研究分野：救急医学

キーワード：再生　骨髄単核球細胞　細胞移植　IL-6　Arid-5　幹細胞　グリコカリックス　臓器障害

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

（１）敗血症において、LPS などの PAMPs（pathogen-associated molecular patterns）が単球などの免疫担当細胞上のパターン認識受容体に結合し、サイトカインが産生される。さらに、産生されたサイトカインは血管内皮上のパターン認識受容体に結合し、IL-6 等のサイトカイン産生が促進される。侵襲時生体反応において、Arid-5a シグナル関連分子(Arid-5a/Regnase-1/STAT3/IL-6)は IL-6 産生増幅機構に関連することで、新規炎症増幅関連因子として注目されている。一方、ゲノムシークエンシング技術の進展に伴い、大量のゲノム情報が得られるようになった。ゲノム情報を解析するため、バイオインフォマティクス技術が急速に発展している。我々は、バイオインフォマティクス技術を用いて、敗血症における Arid-5a シグナル関連分子を評価することが重要と考えた。研究１では全血 RNA シークエンス解析で、研究２では単球 RNA シークエンス解析により、敗血症における Arid-5a シグナル関連分子(Arid-5a/Regnase-1/STAT3/IL-6)を評価した。

（２）最近、敗血症の病態において、血管内皮グリコカリックスが注目されている。血管内皮のグリコカリックス層の分解は、全身の炎症の進行や臓器の機能障害と相関していると報告されており、血管内皮グリコカリックス層を保護・修復することは、敗血症の予後を改善する治療戦略となりうる。骨髄由来単核球細胞 (Bone Marrow Derived Mononuclear Cells; BMMNCs)は、骨髄由来の未分化細胞集団である。BMMNCs は宿主を保護する抗炎症作用を持ち、虚血再灌流や重症熱中症などの全身性炎症による臓器障害を軽減することが示唆されており、さらに BMMNCs は内皮前駆細胞、間葉系幹細胞などの前駆細胞が含まれており、生体損傷に対する再生能力を有することが報告されている。我々は、BMMNCs の抗炎症作用と再生作用により、血管内皮グリコカリックス層を保護することで、敗血症における全身の炎症反応とそれに続く臓器機能障害を軽減できるのではないかという仮説を立てた。研究 3 では、敗血症モデルラットにおいて、BMMNCs 移植による病態改善効果を評価し、その作用メカニズムを解析した。

２．研究の目的

研究１および２の目的は、バイオインフォマティクス技術を用いて、敗血症における Arid-5a シグナル関連分子を評価しすることである。また、研究３の目的は、敗血症モデルラットにおいて、BMMNCs 移植による病態改善効果を評価し、その作用メカニズムを解明することである。

３．研究の方法

（１）研究１

大阪大学附属病院高度救命センターにおいて、前向き観察研究、単一施設研究を実施した。研究プロトコルはヘルシンキ宣言の原則に準拠し、大阪大学医学部附属病院施設審査委員会の承認を得た（承認番号：885）。敗血症および細菌感染症と診断され、2020 年 8 月から 2021 年 2 月の間に大阪大学附属病院高度救命センターに入院した患者から検体を採取した。全患者が Sepsis-3 の診断基準を満たし、培養検査に基づき細菌感染症と診断された。健常人は、公開ポスター広告で募集した。

臨床データとして、年齢、性別、BMI、重症度（APACHEII: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II /SOFA: Sequential Organ Failure Assessment)、既存症（高血圧、糖尿病、高脂血症)、予後を電子カルテから収集した。

血液検体は、当院に入院した初日または 2 日目（24 時間以内）に採取された。全血 RNA 分離と

RNA ライブラリ構築。PAXgene™ Blood RNA System（BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA）を用いて、全血から Total RNA を分離した。血液サンプルの入った採血管は、解析まで-30°Cで保存した。RNA の質と量は、Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて評価した。RNA は、SMART-seq HT キット（Takara, Shiga, Japan）を用いて、プロトコールに従って二本鎖 cDNA ライブラリに変換された。ライブラリーは Illumina Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて定量し、バイオアナライザーを用いて断片サイズ分布を決定した。
High-throughput sequencing は、MGIseq 2000 system (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, China) を用いて、100-bp paired-end reads を行い、fastq に変換して使用した。Tophat2 を用いて、ヒト参照ゲノム (hg19) を用いたアラインメントを読み取った。BAM ファイルは featureCount を用いて raw count に変換した。raw count は、TCC パッケージの iDEGES/edgeR を使用して解析した。網羅的 RNAs から Arid-5a シグナル関連分子(Arid-5a/Regnase-1/STAT3/IL-6)を抽出し、健常人と Sepsis について、Mann-Whitney U-test 法にて有意差を評価した。

（２）研究２

パブリックデータベース（GEO;Gene expression omnibus）にて、"敗血症"、"単球"をキーワードにデータを検索した。抽出した単球の網羅的遺伝子発現データのから、Arid-5a シグナル関連分子(Arid-5a/Regnase-1/STAT3/IL-6)を抽出し、健常人と Sepsis について、Mann-Whitney U-test 法にて有意差を評価した。

（３）研究３

実験には specific pathogen-free の Wistar ラットのオス 12 週齢を使用した。敗血症モデルは全身麻酔下に盲腸結紮穿刺により作成した。BMMNCs 溶液の作成は、ラットの大腿骨、脛骨より骨髄液を採取した後、密度勾配遠心法によって行った。BMMNCs 溶液は盲腸結紮穿刺処置の 30 分後に敗血症モデル一個体に対して 5.0×10^6 個を尾静注投与した。コントロール群（敗血症あり、治療なし)、BMMNCs 群（敗血症あり、治療あり)、Sham 群（敗血症なし、治療なし)の 3 群に分けて検討した。

４．研究成果

（１）研究１

患者の特徴（表 1）

患者の特徴の概要を示す。敗血症、健常人の患者の年齢の中央値は、それぞれ 81 歳、51 歳であった。肥満の指標である BMI は、それぞれ 24.2 kg/m2、22kg/m2 であった

表 1．入院時の患者の臨床所見

	SEPSIS (N = 18)	HEALTHY (N = 16)
Age (IQR)-years	81 (73.25–83.75)	47 (34–55.5)
Male sex-no,(%)	14 (77.8)	8(50)
BMI (IQR)-kg/m^2	24.2 (20.4–27.5)	23.1 (20.7–26.7)
APACHE II score (IQR)	21 (14–26)	-
SOFA score (IQR)	8 (4–12)	-
Comorbidity-no,%)		
Hypertension	7 (38.9)	2 (12.5)
Hyperlipidemia	3 (16.7)	6 (37.5)
Diabetes	2 (11.1)	1 (6.3)
Hospital death-no,(%)	4 (22.2)	-

敗血症における Arid-5a シグナル関連分子発現の差分解析（図１）

Arid-5a シグナル関連分子(Arid-5a/Regnase-1/STAT3)において、健常人と敗血症で有意な上

昇を認めた。一方、IL-6 は健常人と比較して、敗血症で有意に低下していた。感染に伴う生体侵襲から免疫担当細胞が活性化し、Arid-5a シグナル関連分子のうち Arid-5a/Regnase-1/STAT3 mRNA 発現量が増加していた。一方、Arid-5a シグナルに関連する IL-6 mRNA 発現量は低下していた。IL-6 mRNA 産生は様々な負のフィードバック機構が関連しており、これから全血球（24 時間以内）における IL-6 mRNA は下方制御されていた可能性が示唆される。

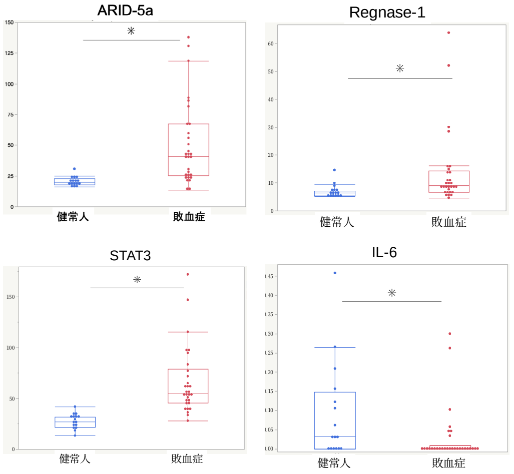

図１ 敗血症における Arid-5a シグナル関連分子発現の差分解析

総括１:敗血症患者(入院後 24 時間以内)に全血 RNA シークエンス解析を行い、Arid-5a, Regnase-1、STAT-3 mRNA 発現量が増加することを明らかにした。一方、IL-6 mRNA 発現量は低下していた。

（２）研究２

２つのデータベースが検出され、このうち超急性期（診断後３時間後以内）の敗血症を扱う１つめのデータベース（GSE46955）を解析に用いた。対象となる敗血症患者は８人、健常人は６人出会った。Arid-5a シグナル関連分子(Arid-5a/Regnase-1/STAT3/IL-6)全てで、健常人と敗血症で有意な上昇を認めた。これから超急性期の単球（診断後３時間以内）において、Arid-5a シグナルは活性化し、炎症増幅関連因子として役割を担っている可能性が示唆された。

総括２：パブリックデータベース から抽出した、敗血症患者（診断後３時間以内）における単球の Arid-5a 関連分子(Arid-5a、 Regnase-1, STAT3、IL-6）の評価を行い、これらの炎症増幅関連 RNA 発現が有意に増強することを明らかにした。

（３）研究３

7 日間生存率はコントロール群 25% (4/16)、BMMNCs 群 75% (12/16)で BMMNCs 群ではコントロール群に比べて有意に生存率が高かった(p=0.005)(図 2)。

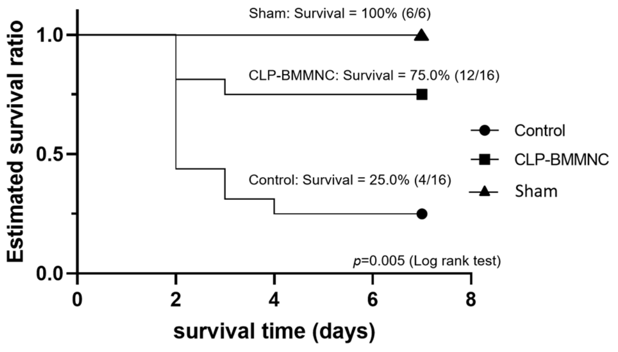

図２.3 群における 7 日間生存率

コントロール群における血清中の IL-1β、IL-6、TNF-α、Syndecan-1 濃度は処置後から 3、6、

12 時間後全てにおいて、Sham 群よりも有意に高かった。BMMNCs 群におけるこれらのサイトカイン濃度は全ての測定時間でコントロール群よりも低い傾向があり、特に 6 時間後の IL-6 と 12 時間後の TNF-α、6 時間後の Syndecan-1 濃度は有意に低かった(図 3)。

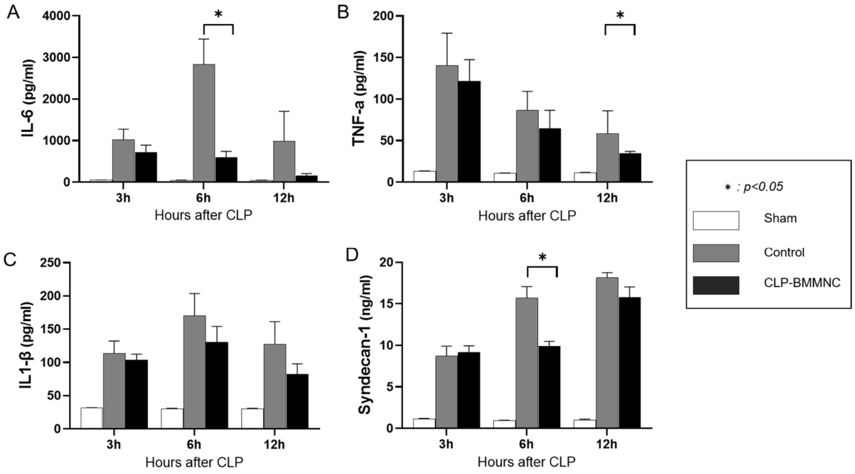

図３．血清中濃度の推移

組織学的検査において、コントロール群では処置後 6 時間後の肺組織で間質浮腫、肺胞構造の破綻、好中球浸潤などの著明な炎症所見を認めたが、BMMNCs 群ではこれらが抑制されていた。コントロール群の処置後 6 時間後の肺組織において、肺の組織切片の蛍光免疫染色では血管内皮グリコカリックス層の主要成分である Syndecan-1 の発現は、sham 群と比較して著明に低下していたが、BMMNCs 移植群では発現が保たれていた。さらに走査型電子顕微鏡で、BMMNCs 移植群ではコントロール群と比較し、血管内皮グリコカリックスが保たれていることが確認された(図 4)。

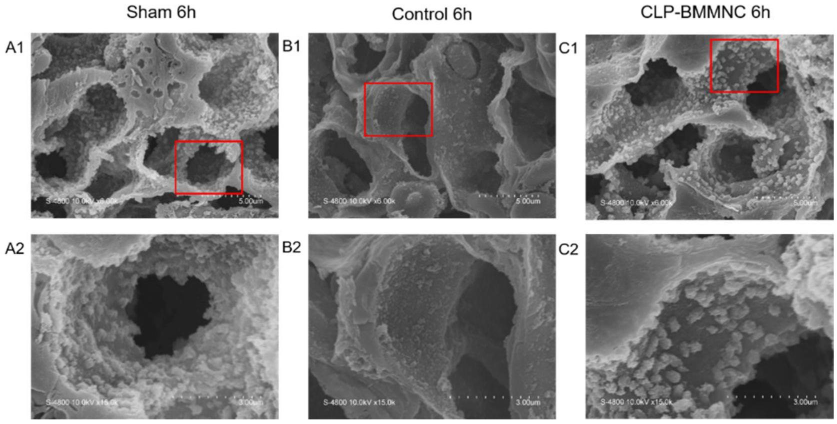

図４.肺の血管内皮グリコカリックス（走査型電子顕微鏡）

総括３：敗血症病態に対する BMMNCs 移植は、過剰な炎症反応を抑制し、血管内皮保護作用を発揮し、臓器障害や生命予後を改善する可能性が示された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1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 Matsubara Tsunehiro、Umemura Yutaka、Ogura Hiroshi、Matsuura Hiroshi、Ebihara Takeshi、Matsumoto Hisatake、Yamakawa Kazuma、Shimizu Kentarou、Okada Hideshi、Shimazu Takeshi	４．巻 56
２．論文標題 Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Transplantation Can Reduce Systemic Inflammation and Endothelial Glycocalyx Damage in Sepsis	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Shock	６．最初と最後の頁 260～267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000001710	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3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 松原庸博、梅村穣、松浦裕司、蛯原健 、松本寿健、清水健太郎、岡田 英志、小倉 真治、小倉裕司、嶋津岳士
２．発表標題 急性炎症病態に対する骨髄由来単核球細胞移植による侵襲反応制御
３．学会等名 第48回 救急医学会総会・学術集会
４．発表年 2020年

１．発表者名 松原庸博、梅村穣、松浦裕司、蛯原健 、松本寿健、山川一馬、清水健太郎、岡田 英志、小倉 真治、小倉裕司、嶋津岳士
２．発表標題 侵襲時血管内皮障害とその制御(血管内皮グリコカリックスの視点から)
３．学会等名 第47回集中治療医学会学術集会
４．発表年 2020年

１．発表者名 Tsunehiro Matsubara, Yutaka Umemura, Hiroshi Matsuura, Takeshi Ebihara, Hisatake Matsumoto, Kazuma yamakawa, Kentarou Shimizu, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu
２．発表標題 BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS TRANSPLANT CAN REDUCE SYSTEMIC INFLAMMATION AND ENDOTHELIAL DAMAGES IN SEPSIS RATS
３．学会等名 43rd CONFERENCE ON SHOCK（国際学会）
４．発表年 2020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	入澤　太郎 (IRISAWA TAROU) (50379202)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	清水　健太郎 (SHIMIZU KENTAROU) (60379203)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	松本　寿健 (MATSUMOTO HISATAKE) (70644003)	大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤） (14401)	
研究分担者	嶋津　岳士 (SHIMAZU TAKESHI) (50196474)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	吉矢　和久 (YOSHIYA KAZUHISA) (40379201)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	

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