

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03782

研究課題名（和文）腸内細菌叢に標的をおいた敗血症の多角的病態解明および新規治療法開発

研究課題名（英文）Multifaceted pathophysiologic evaluation of sepsis targeting the intestinal microflora and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

志馬 伸朗（SHIME, NOBUAKI）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：00260795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,300,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症患者の臨床情報と血液検体を解析し、各種マーカーの意義を検討し以下の結果を得た。1)腸管透過性マーカーであるゾヌリンの低値が予後悪化に関連する。2)ミトコンドリアタンパク質であるTSP0が敗血症患者で低下する。3)ミトコンドリア機能障害の指標とされるGDF-15が、敗血症心筋症患者で上昇する。4)リポミクス解析で、敗血症患者ではlysophosphatidylcholine 16:0、18:0などが健常者に比べて有意に低下し、重症度と相関する。動物実験では、敗血症の長期的な影響としての行動異常を調べるマウスモデルを確立し、TSP0の関与を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢、腸管上皮細胞、免疫系は相互に作用し合う。敗血症患者における腸管機能は近年主要な介入標的として着目されている。敗血症における腸管関連の新しい特定代謝産物の変化を同定し、免疫賦活効果や腸管透過性など腸管機能の改善効果、さらには中枢神経系や心臓など敗血症性多臓器不全に及ぼす影響を明らかにできれば、これまで特異的な治療法がなかった敗血症に伴う臓器不全症に対する新規治療法につながる基礎的知見を提供できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed clinical information and blood samples from septic patients and investigated the significance of various markers and obtained the following results: 1) low levels of zonulin, a marker of intestinal permeability, are associated with worse prognosis; 2) TSP0, a mitochondrial protein, is decreased in septic patients; 3) GDF-15, an indicator of mitochondrial dysfunction, is increased in septic cardiomyopathy patients; and 4) lipidomics analysis revealed that lysophosphatidylcholine 16:0 and 18:0 are significantly decreased in septic patients compared to healthy controls, correlating with severity of illness. In animal studies, a mouse model was established to examine behavioral abnormalities as a long-term effect of sepsis, and the association of TSP0 were confirmed.

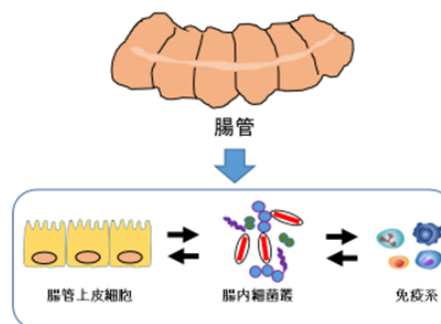
研究分野：集中治療医学，救急医学，感染症学

キーワード：敗血症 腸管 TSP0 臓器不全 心筋症 脳症 Zonulin

1. 研究開始当初の背景

敗血症は致死率の高い救急集中治療領域の代表的診療病態であり、感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害と定義される。この臓器障害の機序の解明は、敗血症患者の生命予後改善に大きな意義を持つ。

腸管はそれ自体が敗血症の原因の感染巣となるだけでなく、臓器障害の進行において中心的な役割を果たす。腸管を構成する主要な要素として腸内細菌叢、腸管上皮細胞、免疫系があり、これらは相互に作用し合う。近年の研究では、重症病態では腸内細菌叢の構成に変化が起り、腸管上皮細胞にも影響を及ぼすことが分かっている(Katherine T, et al, 2017)。我々はかつて腸内細菌叢の攪乱は局所及び全身的な自然免疫系の反応性にも影響することを報告した(Umenai T, Shime N, et al, 2010)。



敗血症患者における腸内細菌叢を解析することで、増減している細菌を特定し、さらにその細菌の代謝産物およびその関連物質の変化を同定する。さらにこれらの物質による、免疫系や臓器不全への影響を解析する。特定代謝産物による免疫賦活や腸管透過性など腸管機能への影響、さらには多臓器不全症の関連を明らかにできれば、敗血症の新規治療法への進展が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症患者における腸内細菌叢変化および関連物質の変化と、臓器不全や患者予後などの臨床情報との関連性を評価することで、敗血症の病態解明と治療介入の可能性を探ることである。腸管の細菌叢を、遺伝子学的手法を用いて網羅的かつ定量的に解析するとともに、腸管機能に関連する物質を同定し、それらが敗血症性多臓器不全に及ぼす影響を多角的な指標を用いて検討する。加えて、代謝物質を網羅的に検索し、重要関連因子を同定する手法は、敗血症の病態解析および治療介入につながる。

敗血症に関連して発症する臓器不全のうち、脳や心臓は生命維持のみならず、生存者における長期的予後に関連する重要臓器である。特に敗血症性生存者における精神障害・認知機能障害などの後遺症が問題になっており、敗血症後症候群と呼ばれている。我々は炎症、酸化ストレス、中枢神経系でのステロイド生成に関与する多面的なミトコンドリアタンパク質であるトランスロケータータンパク質 18kDa (TSPO) が精神疾患や神経変性疾患におけるバイオマーカーであることに着目してきた(Giga H, Kikutani K, Shime N, et al, 2020)。このタンパク質が敗血症後症候群においてどのような役割を担っているのかを解明する。

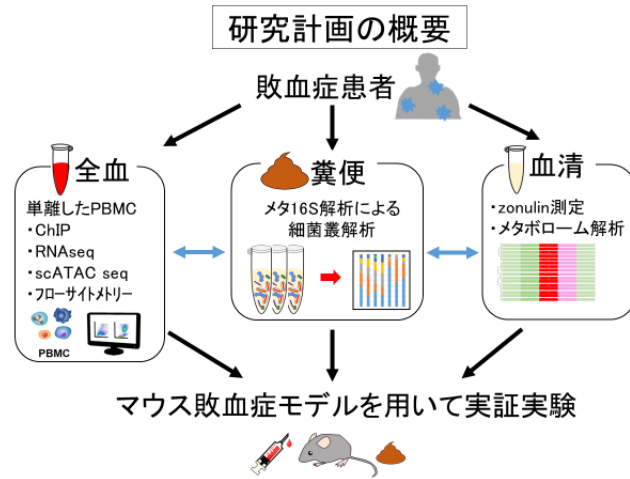
3. 研究の方法

本研究は、1)臨床患者検体や臨床情報を用いた解析と、2)動物実験モデルで再確認する実験系、に分けられる。

1)臨床検体/情報を用いた解析

- ①敗血症患者における腸管の細菌叢、
- ②腸管透過性のマーカーとされる zonulin をはじめとする血中の代謝物、
- ③患者の臨床情報、の関連を明らかにする。

臨床検体の採取は広島大学病院高度救命救急センター・ICUで行う。採取した臨床検体の解析は、広島大学救急集中治療医学研究室と大阪の国立研究開発法人医薬基盤・健康・影響研究所（以下、基盤研）の感染病態制御ワクチンプロジェクトとの共同で行う。



患者本人もしくは家族より文書で同意を得て、糞便、血液（全血と血清）を採取する。初回の検体は救命センター・ICU への入室から 24 時間以内に採取する。血液はすでに確保してある動脈ラインから採取、もしくは新たに血管穿刺を行い採取する。一部は全血で保存、残りは遠心し血清を保存する。便検体は患者の肛門にスワブを 1-2cm ほど挿入し 360°回転させて採取する。糞便、血液（全血と血清）については健常ボランティアからも採取する。

糞便からの細菌 DNA を抽出し、次世代シーケンシング法により腸内細菌叢を同定する。16S rRNA 遺伝子の特異的に PCR により増幅、遺伝子ライブラリーを作成する。血清を用いて、腸管透過性のマーカーとされる zonulin を ELISA 法で測定し、腸内細菌叢の変化との相関を検討する。血漿を用いて、ミトコンドリアタンパク質であるトランスロケータープロテイン(TSPO)の測定を行う。敗血症患者の血清を用いたリポドミクス解析を行い、代謝物の網羅的解析を行う

上記実験で得られた知見と、採取した敗血症患者の詳細な臨床情報との相関を解析する。広島大学のデータベースに、詳細な患者情報（敗血症の原因疾患、既往疾患、重症度スコア、使用薬剤、動脈血ガス分析、血液マーカー、経腸栄養、人工呼吸器日数、予後、生存期間など）を記録しており、これらの情報を使用する。

2)動物実験モデル

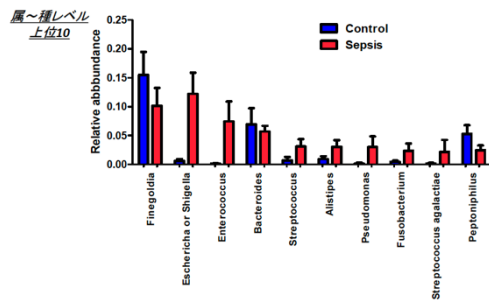
上記の臨床検体の解析から得られた知見を、マウスを用いての動物実験により実証、発展させる。敗血症のマウスモデルとして盲腸結紮穿刺（Cecal Ligation Puncture: CLP）モデルを作成する。腸内細菌叢の役割を検討するうえで、研究代表者が過去に行った多剤抗菌薬を一定期間投与し、腸内細菌叢を根絶させたモデルを dysbiosis のモデルとして作成・応用する。敗血症の長期的な影響に着目し、慢性期における行動異常を調べるために、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、尾懸垂試験、前肢握力試験などの複数の行動実験手法と解析方法を確立する。さらにこれらのモデルを用いて、敗血症後の精神・認知障害に関連したマウスの行動の長期的障害における TSPO の役割を調べる。

4. 研究成果

ICU に入室した敗血症患者を対象として、臨床情報（敗血症の原因疾患、既往疾患、重症度スコア、使用薬剤、血液マーカー、治療介入や生存期間など）の収集を行った。また、敗血症患者

における腸管の細菌叢の変化と、腸管透過性のマーカーなど血中の代謝物、患者の臨床情報、との関連を明らかにするために、糞便や血液検体の採取を行い、保管した。

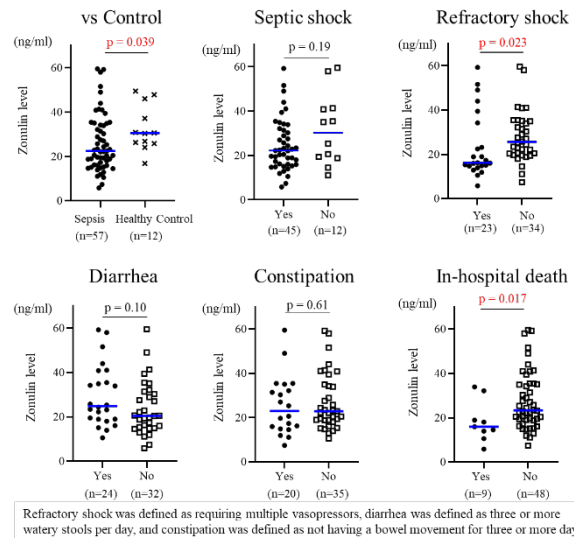
敗血症患者と健常者の腸内細菌の比較



便検体を用いたマイクロバイーム解析により、敗血症患者の腸内細菌叢では、*Escherichia spp.*、*Enterococcus spp.*等の有意な増加が確認された。加えて、マウスモデルでスワブ付着便から調整した便懸濁液の移植により無菌マウスに細菌叢の定着が見られることが確認できた。

敗血症患者の血清を用いて、腸管透過性のマーカーとして知られるゾヌリンを ELISA 法で測定し、臨床転帰や合併症との関連を調べた。ゾヌリンの低値は難治性の敗血症ショックや予後の悪化に関連したが、ICU 在室中の下痢や便秘などの消化器症状との関連は認めなかった。

ミトコンドリアタンパク質であるトランスロケータープロテイン(TSPO)の測定を行った。敗血症患者では健常者に比べて、血漿中の TSPO が有意に低下しており、血漿 TSPO が敗血症診断に有用である可能性を示した。また、この機



Refractory shock was defined as requiring multiple vasopressors, diarrhea was defined as three or more watery stools per day, and constipation was defined as not having a bowel movement for three or more days.

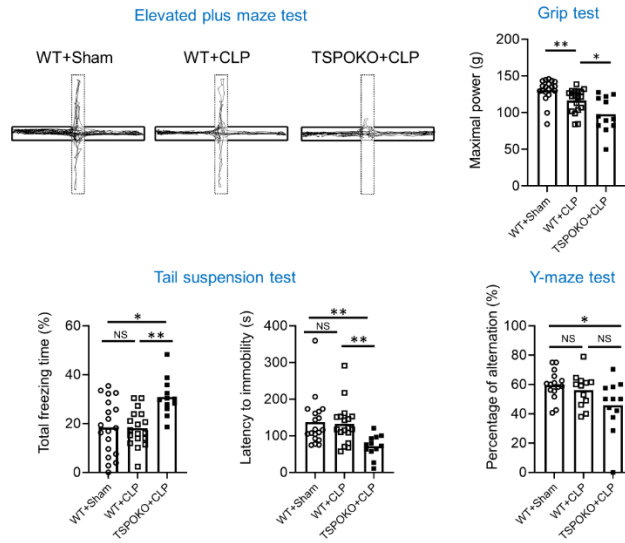
序の解明の過程で、ミトコンドリア機能障害の指標とされる growth differentiation factor 15 (GDF-15)に着目し、ELISA 法で敗血症患者の血漿 GDF-15 を測定した。敗血症合併症の一つである敗血症心筋症を合併した患者の血漿中では、非合併の敗血症患者に比べて、GDF-15 が有意に上昇しており、敗血症性心筋症のバイオマーカーになりうることを示した。

敗血症患者の血清を用いたりピドミクス解析を行い、患者の臨床情報（重症度、合併症、転帰）との関連を調べた。その結果、敗血症患者では lysophosphatidylcholine (LPC) 16:0、18:0 などが健常者に比べて有意に低下しており、敗血症の重症度と相関があることを示した。また LPC 20:4 や LPC 22:6 が敗血症の合併症である播種性血管内凝固症候群と関連があることを示唆する結果を得た。この結果から得た知見をもとに、今後、マウスを用いた実証実験につなげる。

2) 動物モデルを用いた実験

敗血症のマウスモデルとして盲腸結紮穿孔モデルを確立した。また敗血症の長期的な影響に着目し、慢性期における行動異常を調べる複数の行動実験手法と解析方法を確立した。盲腸結紮穿孔から 14 日以降の慢性期において、CLP 施行群ではオープンフィールド試験で、行動量がコントロール (Sham 手術群) に比べ有意に低下しており、前肢筋力試験でも有意な筋力低下が認められた。

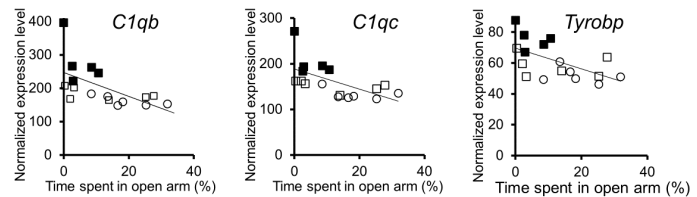
次に、敗血症後の精神・認知障害に関連したマウスの行動の長期的障害における TSPO の役割を調べた。マウスを、(i) wild type (WT) + sham, (ii) WT + CLP, (iii) TSPO knock out + CLP の 3 群に分けた。手術後 17 日目までの生存率と



体重変化を評価した。また、生存したマウスについて、不安様行動、うつ様行動、認知機能、運動活動、前肢筋力を、それぞれ高架式十字迷路、尾懸垂試験、Y 迷路、オープンフィールド試験、握力試験により評価した。行動実験終了後に、マウスの海馬を採取し RNA を抽出後、RNA-seq により、遺伝子発現の変化を調べ、行動試験との関連を評価した。TSPO 遺伝子を欠損させたマウスでは、WT マウスに比べて、

CLP による死亡率が高く、体重減少が長期に遷延した。また、敗血症回復後の不安様行動、うつ様行動、前肢筋力低下が WT マウスに比べて増悪することが明らかとなった。

海馬の RNA-seq 解析により、C1q 補体経路の遺伝子 (C1qb, C1qc, Tyrobp) の発現上昇が代表的な行動異常であった不安様行動の程度と有意に相関があった。さらに、これらの C1q 補体経路の遺伝子は尾



懸垂試験や前肢筋力試験など、他の行動異常の程度とも相関があった。

この結果は、C1q 経路が敗血症後症候群で観察される精神・認知障害に関与していることを示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計49件（うち査読付論文 34件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shime N, Inagawa T, MacLaren G	4. 巻 52
2. 論文標題 Time to Reexamine the Definition of Sepsis?	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Crit Care Med	6. 最初と最後の頁 e107-e108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CCM.0000000000006085	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 該当する
1. 著者名 Kikutani K, Hosokawa K, Giga H, Ota K, Matsumata M, Zhu M, Takemoto H, Ji B, Ohshimo S, Shime N, Aizawa H.	4. 巻 59
2. 論文標題 GENETIC DELETION OF TRANSLOCATOR PROTEIN EXACERBATES POST-SEPSIS SYNDROME WITH ACTIVATION OF THE C1Q PATHWAY IN SEPTIC MOUSE MODEL	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 82-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000002030	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 Kikutani K, Giga H, Hosokawa K, Shime N, Aizawa H.	4. 巻 140
2. 論文標題 Microglial translocator protein and stressor-related disorder.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 104855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104855	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 Giga H, Ji B, Kikutani K, Fukuda S, Kitajima T, Katsumata S, Matsumata M, Suhara T, Yamawaki S, Shime N, Hosokawa K, Aizawa H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pharmacological and Genetic Inhibition of Translocator Protein 18 kDa Ameliorated Neuroinflammation in Murine Endotoxemia Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001703	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 衣笠 泰葉, 西野 泰子, Mara Anais Llamas-Covarrubias, 尾崎 勝彦, 藤村 義明, 大橋 壯樹, 福田 貢, 東上 震一, 藤野 裕士, 小谷 透, 志馬 伸朗, 北野 宏明, 谷内江 綾子, 今井 由美子	4. 巻 40
2. 論文標題 新型コロナウイルス感染症の重症化予測AIモデル	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 人工呼吸	6. 最初と最後の頁 59-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50903/jsrsm.40.1_59	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 該当する

[学会発表] 計28件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kikutani K, Shime N, Nishikimi M, Ota K, Hattori M, Ohshimo S
2. 発表標題 Low serum zonulin concentrations are associated with an unfavorable outcome in patients with sepsis,
3. 学会等名 2nd Joint Scientific Congress of JSICM/TSCCM (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 服部幸, 菊谷知也, 細川康二, 錦見満暁, 太田浩平, 大下慎一郎, 相澤秀紀, 志馬伸朗
2. 発表標題 敗血症バイオマーカー候補としての血漿トランスロケータータンパク質の検討
3. 学会等名 第51回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菊谷 知也, 儀賀 普嗣, 松股 美穂, 朱 美娜, 細川 康二, 太田 浩平, 志馬 伸朗, 相澤 秀紀
2. 発表標題 敗血症と集中治療後症候群におけるミトコンドリアタンパク質TSP0の役割
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅田 萌々子, 稲川 高紘, 山賀 聡之, 大下 慎一郎, 志馬 伸朗
2. 発表標題 重症COVID-19感染後に難治性下痢をきたした2例
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊谷 知也, 儀賀 普嗣, 松股 美穂, 朱 美娜, 細川 康二, 太田 浩平, 志馬 伸朗, 相澤 秀紀
2. 発表標題 敗血症と集中治療後症候群におけるミトコンドリアタンパク質TSP0の役割
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志馬伸朗
2. 発表標題 外科感染症と栄養管理 重症患者における栄養管理 最近のコントロールバシー
3. 学会等名 第35回日本臨床栄養代謝学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1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	今井 由美子 (Imai Yumiko) (50231163)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ヘルス・メディカル微生物研究センター・副センター長 (84420)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	菊谷 知也 (Kikutani Kazuya)	医系科学研究科・助教 (15401)	

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