

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09304

研究課題名(和文)敗血症の炎症最適化のためのマーカーと分子病態分類の解明:HIVEP1の臨床応用

研究課題名(英文)Development of biomarker and molecular pathological classification for optimizing inflammation in sepsis:clinical application of HIVEP1

研究代表者

松本 寿健(Matsumoto, Hisatake)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：70644003

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):敗血症患者の全血を用いてRNAシーケンス解析を行なった。健常人と比較して、多くのmRNAが発現変動を認めた。変動したmRNAを用いてパスウェイ解析を行なったところ、T細胞疲労に関連するシグナルが同定された。上方制御解析ではHIVEP1の抑制が同定され、HIVEP1が敗血症病態において重要な役割を担っていることが分かった。一方、血球HIVEP1遺伝子発現量に関わらず、重症度の異なるクラスターに分類された。これから血球HIVEP1遺伝子発現量をバイオマーカーとした新規分子病態分類の解明には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症患者の全血を用いてRNAシーケンス解析を行ない、HIVEP1が敗血症病態で重要な役割を担っていることが検証できた。本研究では血球HIVEP1遺伝子発現量をバイオマーカーとした新規分子病態分類の解明には至らなかったが、今後、敗血症に対する新規創薬標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文):RNA sequencing of whole blood from septic patients revealed that HIVEP1 plays an important role in the pathogenesis of sepsis. However, it was not possible to elucidate a novel molecular classification of sepsis using HIVEP1 as a biomarker.

研究分野:敗血症

キーワード:NF B RNAシーケンス 敗血症 バイオインフォマティクス 分子病態分類 サブタイプ

1. 研究開始当初の背景

敗血症は依然として ICU での死因の第一位を占めており、予後不良疾患である。敗血症では、細菌などの病原体関連分子パターン (PAMPs) や細胞障害に伴う損傷関連分子パターン (DAMPs) が、免疫担当細胞上に存在するパターン認識受容体 (PPR) にリガンドとして結合する。結合を介して活性化した細胞内転写因子が核内の DNA に結合し、急性炎症反応が進行する。NF- κ B は急性炎症反応における中心的な転写因子であり、様々な炎症性メディエーターの転写を促進する。炎症が過剰になると、致死的な播種性血管内凝固症候群 (DIC) や多臓器障害をきたす。

1989 年に、HIVEP1 (human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1) は HIV-1 ウイルスが結合する NF- κ B 結合配列 (NF- κ B モチーフ) に結合する蛋白としてはじめて報告された (J Biol Chem 1989)。近年、ヒト菌血症モデルにおける免疫細胞で、HIVEP1 遺伝子発現が NF- κ B シグナルにおけるドライバー遺伝子であることが明らかにされた (PLoS One 2013、アムステルダム大学附属病院、分子生物学教室、van der poll 教授)。以上は、HIVEP1 遺伝子発現が NF- κ B シグナルの多くの遺伝子発現と関連し、NF- κ B シグナルで中心的な役割を担っていることを示唆する。申請者は同教室で HIVEP1 の研究を行い、以下を明らかにした。HIVEP1 遺伝子ノックアウト細胞では刺激により炎症性サイトカインが上昇し、HIVEP1 遺伝子過剰発現細胞では刺激により炎症性サイトカインが低下する。

HIVEP1 は炎症性サイトカインプロモーター領域の NF- κ B モチーフに結合し、NF- κ B の結合を阻害する。HIVEP1 遺伝子ノックダウン敗血症ゼブラフィッシュでは炎症性サイトカインが増加する。以上から敗血症において、HIVEP1 は NF- κ B モチーフに結合し、NF- κ B 活性の直接的ブレーキ機能を有することが明らかになった。

敗血症患者の治療において、多くの抗炎症治療薬の臨床試験が行われてきたが、いずれも治療効果を示せず失敗に終わっている。炎症は生体防御に必須であり、必要な炎症をコントロールする“炎症の最適化”が重要である。今回我々は、炎症のアクセル機能に関連する NF- κ B とその転写産物 (炎症/抗炎症サイトカインなど) ではなく、ブレーキ機能に関連する因子を用いることで、生体防御に必要な炎症が評価できると想定し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、NF- κ B の直接的ブレーキ機能を有する HIVEP1 を用いて、“炎症の最適化”のための新規マーカー開発と分子病態分類の解明を目指す。

3. 研究の方法

2020 年の 8 月から 2021 年の 2 月までに、大阪大学医学部附属病院の高度救命救急センターに搬送され、敗血症と診断されて同センターで治療を受けた患者群を研究の対象とした。敗血症の診断基準は Sepsis-3 に従った。参加者全員からこの研究に対する同意を得た。患者群は入院初日、健常対照群は対象期間中に採血を行い、その後白血球から全 RNA を抽出し、白血球内の mRNA を抽出後に RNA シーケンスで評価した。

発現変動解析: RNA シーケンスデータは iDEP (integrated Differential Expression and Pathway analysis) を使用して解析した。mRNA と miRNA の発現変動の閾値は false discovery rate [FDR] <0.05、 $|\log_2 \text{fold change}| >1.2$ と設定した。この基準に基づき、健常対照群に対

比して、患者群で顕著な発現変動を示す mRNA を特定した。

パスウェイ解析：発現変動解析で選ばれた mRNA を用いてパスウェイ解析を行った。敗血症の病態に関連する細胞シグナル伝達経路の特定を目指し、IPA (Ingeuity pathway analysis)を使用して RNA シーケンスデータを解析し、敗血症で活性化された canonical シグナル伝達経路を抽出した。

上方制御解析：発現変動解析で選ばれた mRNA を用いて上方制御解析を行った。敗血症の病態に重要な影響を及ぼす上方制御因子を探るために、IPA を用いて RNA シーケンスデータ解析を行った。

非階層型クラスタリング解析:HIVEP1 と、予後との関連が報告されている年齢、重症度スコア (SOFA スコア) を変数として使用し、非階層型クラスタリング解析を行った。

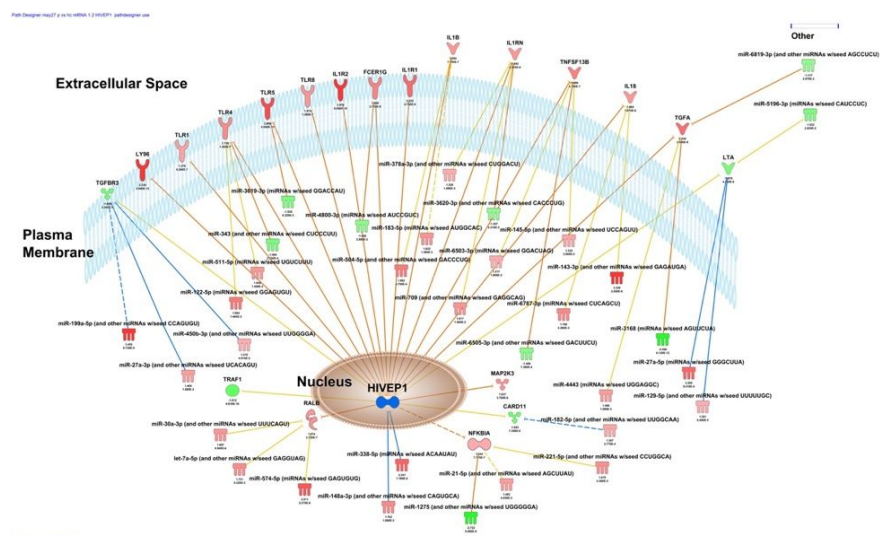
4 . 研究成果

患者群14例で健常対照群15例、患者の平均年齢は76歳であった。男性の割合は約64.3%(14例中9例)、女性の割合は約35.7%(14例中5例)であった。平均BMIは22.8、APACHE スコアの平均は17.3で、SOFAスコアの平均は5.4であった。原因疾患として、肺炎が約42.86%(14例中6例)、間質性肺炎が約35.71%(14例中5例)、誤嚥性肺炎が約21.5%(14例中3例)であった。すべての患者は回復し、死亡者はいなかった。患者のうち、78.5% (14例中11例) が人工呼吸管理を受けていた。患者群は全例敗血症を併発し、そのうち6例が敗血症性ショックだった。患者群と健常群の間で、年齢を除き各数値に有意差は認めなかった。

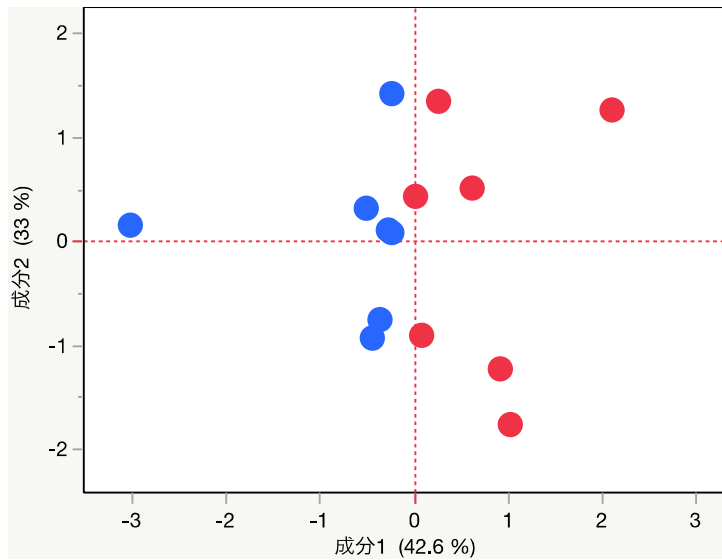
発現変動解析では、RNA シーケンスにより血球中の 19154 個の mRNA と 15976 個の miRNA が同定された。この中で発現が上昇した mRNA は 1209 個、発現が減少した mRNA は 1461 個だった。

パスウェイ解析では、発現変動解析で有意に変化が認められた mRNA を用いてパスウェイ解析を行ったところ、mRNA におけるパスウェイ解析では PD-1 and PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの発現が上昇し、Th1 シグナルの発現が減少していた。

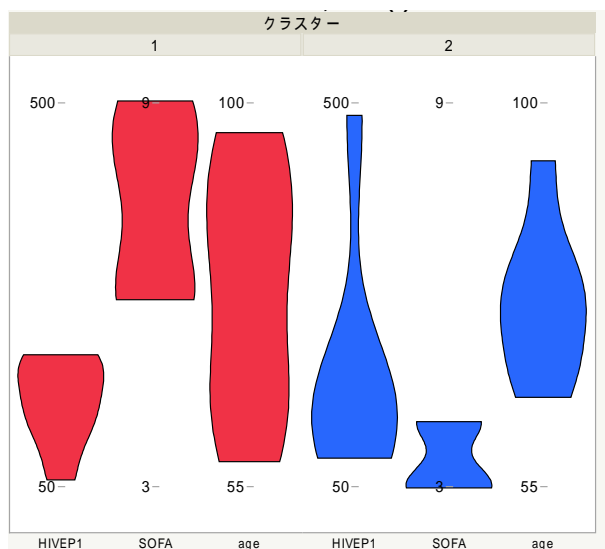
上方制御解析では、発現変動解析で有意に変化が認められた mRNA を用いて上方制御解析を行ったところ、それぞれ 10 個の活性化した上方制御因子と、発現が抑制された上方制御因子がそれぞれ 10 個同定された。発現が抑制された上方制御因子の一つとして HIVEP1 が認められた。以下に上方制御因子である HIVEP1 と関連する mRNA をまとめた図を示す。



す。赤がクラスター 1、青がクラスター 2 である。



2つ目の分子病態群(クラスター 2)と比較して、1つ目の分子病態群(クラスター 1)は、HIVEP1 は Wilcoxon 検定にて有意差を認めなかったが、SOFA スコアは有意に高値 ($p=0.0017$) であった。年齢に関して、両群間で差異は認められなかった。以下に各クラスターにおける、HIVEP1、SOFA、年齢を比較したバイオリンプロットを示す。



敗血症患者の全血を用いて RNA シークエンス解析を行なった。健常人と比較して、多くの mRNA 発現変動を認めた。変動した mRNA を用いてパスウェイ解析を行なったところ、PD-1 and PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの発現が上昇し、Th1 シグナルの発現が減少していた。これから、敗血症の急性期において T 細胞が疲労している可能性が示唆された。上方制御解析では HIVEP1 の抑制が認められ、HIVEP1 が敗血症における重要な役割を担っていると考えられた。HIVEP1 を説明変数の一つとして用いた非階層型クラスタリング解析では、入院時の血球 HIVEP1 遺伝子発現量に関わらず、重症度の異なるクラスターに分類された。これから、血球 HIVEP1 遺伝子発現量をバイオマーカーとした新規分子病態分

類の解明はできなかった。

限界点として、以下の2つがある。1つ目は単施設研究であること。2つ目はサンプル数が少ないこと。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito Hiroshi, Ishikawa Masakazu, Matsumoto Hisatake, Sugihara Fuminori, Okuzaki Daisuke, Hirata Haruhiko, Ogura Hiroshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Transcriptional differences between coronavirus disease 2019 and bacterial sepsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-022-01930-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ebihara Takeshi, Matsumoto Hisatake, Matsubara Tsunehiro, Togami Yuki, Nakao Shunichiro, Matsuura Hiroshi, Onishi Shinya, Kojima Takashi, Sugihara Fuminori, Okuzaki Daisuke, Hirata Haruhiko, Yamamura Hitoshi, Ogura Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Resistin Associated With Cytokines and Endothelial Cell Adhesion Molecules Is Related to Worse Outcome in COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 830061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.830061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ebihara Takeshi, Matsumoto Hisatake, Matsubara Tsunehiro, Togami Yuki, Nakao Shunichiro, Matsuura Hiroshi, Kojima Takashi, Sugihara Fuminori, Okuzaki Daisuke, Hirata Haruhiko, Yamamura Hitoshi, Ogura Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cytokine Elevation in Severe COVID-19 From Longitudinal Proteomics Analysis: Comparison With Sepsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 798338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.798338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小田 紗矢香, 松本 寿健, 奥崎 大介, 小倉 裕司, 田中 晋, 織田 順.
2. 発表標題 メッセンジャー RNA とマイクロ RNA の統合解析による肺炎病態の評価
3. 学会等名 第30回日本集中治療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 寿健, 小倉 裕司, 織田 順 大阪大学附属病院高度救命救急センター
2. 発表標題 網羅の分子解析に基づく新たな分子病態分類と個別化医療
3. 学会等名 第30回日本集中治療学会
4. 発表年 2023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	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	山川 一馬 (Yamakawa Kazuma) (50597507)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	清水 健太郎 (Shimizu Kentaro) (60379203)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	小倉 裕司 (Ogura Hiroshi) (70301265)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (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
---------	---------