

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23390413

研究課題名(和文) 生体侵襲制御と組織修復・再生における骨髄由来細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of bone marrow-derived cells on control of the whole-body responses to injury/illness, regeneration and tissue restoration

研究代表者

並木 淳(NAMIKI, JUN)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20189195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：重症sepsis患者において、フローサイトメーターで測定されたCD14陽性単球に対するCD14・CD16二重陽性の活性化単球の割合はsepsisの重症度を反映し、病初期に上昇、病態改善に伴い健常人と同等のレベルまで低下した。重症外傷および重症熱傷患者においては、活性化単球はむしろ減少し、とくに最重症例ではCD14陽性の単球が末梢血中からほとんど消失しており、過剰な侵襲に対する生体反応の抑制が示唆された。重症sepsis患者から採取した単球をリン酸化プロテオミクスにより解析した結果、DAMPs関連蛋白質のリン酸化が認められ、sepsis病態の超早期における細胞応答を示していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In severe sepsis patients, the ratio of CD14・CD16-double positive activated monocytes to CD14-positive monocytes measured by a flow-cytometer correlated to the severity of sepsis: increase at an early phase and decrease with a recovery of the illness to the normal levels of the ratio. On the other hand, activated monocytes decreased in severe trauma and burn patients, especially CD14-positive monocyte almost disappeared in the peripheral blood of the most severe case, indicating that the biological responses were suppressed to the excessive severity of injuries. Phospho-proteome analysis showed that a DAMPs-related protein was phosphorylated in monocytes obtained from the severe sepsis patients. This phosphorylation of the intracellular protein may be an early physiological response to sepsis.

研究分野：救急医学

キーワード：臨床 生体侵襲 蛋白質 プロテオーム 集中治療医学 単球 骨髄 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

臨床においては、これまで怪我や急病の急性侵襲に関して、主に臓器単位の研究がすすめられてきた。しかし、近年では生体侵襲を全身の反応ととらえ、病原体からの侵襲を PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) 損傷組織の傷害細胞からの放出因子による侵襲を DAMPs(damage-associated molecular patterns) として、包括的な生体メカニズムとして理解し生体侵襲制御に結び付けようとするアプローチが行われている。すなわち、損傷あるいは罹患臓器に対する従来の治療的介入に加えて、全身反応の制御をターゲットとした治療戦略が求められる。とりわけ後者の全身管理が重症患者を救命するためには重要であり、救急医・救急集中治療医が果たす役割は大きい。

研究代表者は救急医療の臨床に従事し、多くの救急集中治療の症例を経験してきた。重症傷病者の経過中に全身反応の急性増悪、急性転化をきたして、DIC (disseminated intravascular coagulation) や多臓器不全に陥るメカニズムは未解明の部分が多く、新たな治療介入の開発による治療成績の向上が期待される。このことは救急患者に限らず、臓器別診療科が扱う傷病者が集中治療を必要とする病態に陥った場合においても同様であり、PAMPs と DAMPs のパターン認識の考え方は、重症化した病態において共通する生体反応メカニズムが存在することを示している。すなわち、重症外傷、熱傷、敗血症などでは当初の標的臓器や侵襲は異なっても、全身反応には共通した molecular pattern の時間的・量的暴露が関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

急性侵襲に対する生体反応として骨髄から動員される細胞が『組織あるいは全身の維持を図る合目的役割』を果たしているという仮

説にたち、骨髄由来の末梢血細胞成分等について侵襲制御と組織修復・再生の観点からの機能解析を行い、新たな治療戦略を提示することを目的とする。また、重症sepsis患者については、グラム陰性桿菌の産生するエンドトキシンを除去する目的で施行されるPMX膜を用いた血液浄化の効果を検討する。

とくに全身反応として末梢血中の単球系細胞の機能に注目し、『組織傷害により体循環に放出されたDAMPs が単球を活性化して炎症性サイトカインの産生や組織因子の発現・放出、さらには単球の崩壊による更なるDAMPs の放出を引き起こして病態の急性転化をきたす』との仮説をたて、単球の機能制御が新たな治療ターゲットとなる可能性を明らかにする。臨床例で得られた結果を検証するため、鈍的外傷の定量的動物モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

急性侵襲の臨床病態として、重症sepsis、重症外傷、重症熱傷を対象疾患とし、患者末梢血を入院当日、入院3日後、および入院8日後に採取した。対照群として、健常成人ボランティアから採取した末梢血を用いた。密度勾配法により末梢血単核球 (PBMC) を分離した。この分画にはリンパ球および単球が含まれる。

末梢血中に存在する骨髄由来細胞が、生体侵襲制御と組織修復・再生に果たす役割を包括的に理解するため、単球・リンパ球・骨髄球・組織幹/前駆細胞などの蛋白質発現をフローサイトメーター、酵素免疫測定法 (ELISA) などにより解析した。目的とする細胞を表面抗原の標識によりフローサイトメーターを用いて分離、リン酸化プロテオミクスによる細胞内シグナル伝達の網羅的解析から、活性化シグナル伝達経路を推定した。

また、実験動物を用いた急性侵襲モデルの介入実験を行い、患者検体で得られた結果を

検証した。

4. 研究成果

重症sepsisの患者から採取したPBMCを試料として、フローサイトメーターを用いてCD14とCD16発現プロファイルからCD14陽性単球とCD14・CD16二重陽性の活性化単球の割合を定量解析した結果、患者単球における活性化単球の割合はsepsisの重症度を反映し、病初期に上昇、病態改善に伴い健常人と同等のレベルまで低下することが示された。重症sepsisの病初期において増加していた活性化単球は、重症外傷および重症熱傷ではむしろ減少していることが観察され、とくに最重症例ではCD14陽性の単球が末梢血中からほとんど消失し、過剰な侵襲に対する生体反応の抑制が示唆された。さらに、重症外傷/熱傷患者の臨床において観察される感染続発症の観点から、抗原提示能についてHLA-DRの発現を定量評価した。

重症sepsis患者について、グラム陰性桿菌の産生するエンドトキシンを除去する目的で施行されるPMX膜を用いた血液浄化の効果を検討した。その結果、病初期において増加している単球(活性化単球)の多くが、PMX膜に吸着することによって除去されていることが示唆された。この作用が病態に与える影響について、臨床経過と合わせた検討を加えた。

CD14陽性単球をセルソーターにより分離・採取して、リン酸化プロテオミクスによりリン酸化ペプチドのプロファイルを得た。クラスター解析を行い、重症sepsis病初期にリン酸化反応が強く、病状の改善に伴いリン酸化反応が低下する蛋白質に注目した。その結果、重症sepsisとの関連が最近報告されている damage-associated molecular patterns (DAMPs)に関連した蛋白質に、sepsis病初期に限ったリン酸化が認められ、sepsis病態の超早期における細胞応答を示している可能性が示唆された。

実験動物にマウスを用いて、開腹下に鈍的肝損傷モデルを作成し、重症腹部鈍的外傷の臨床例に類似した測定結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

渋沢崇行, 並木淳, 鈴木さゆり, 佐々木淳一, 堀進悟

熱傷基礎研究の最前線 熱傷患者における末梢血単球系細胞の表面抗原プロファイルの解析

熱傷(査読無)

40巻, 2014年, 190頁

https://shunkosha2.sakura.ne.jp/jsbi-burn.org/members/login/_temp/146391268822zAMKZvzw72/no40_4-5.pdf

〔学会発表〕(計11件)

(1) 関根和彦, 多村知剛, 栗原智宏, 渋沢崇行, 入野志保, 武部元次郎, 林田敬, 並木淳, 堀進悟

重度外傷・熱傷患者における白血球フェノタイプの変化から感染合併症が予知できるか? 第42回日本救急医学会

2014年10月28日~2014年10月30日

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

(2) 渋沢崇行, 並木淳, 鈴木さゆり, 林田敬, 関根和彦, 佐々木淳一, 堀進悟

敗血症に対する末梢血単球系細胞の表面抗原プロファイルの解析

第42回日本救急医学会

2014年10月28日~2014年10月30日

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

(3) Takayuki Shibusawa, Jun Namiki, Sayuri Suzuki, Junichi Sasaki, Shingo Hori
Analysis of the surface antigen profile of the peripheral monocytes in burn patients

The 17th congress of the international society for burn injuries.

2014年10月12日～16日

シドニー（オーストラリア）

(4) 渋沢崇行, 並木淳, 鈴木さゆり, 林田敬, 佐藤幸男, 田島康介, 佐々木淳一, 関根和彦, 堀進悟

外傷患者における末梢血単球系細胞の表面抗原プロファイルの解析

第28回日本外傷学会

2014年06月25日～2014年06月26日

東京ビックサイト（東京都江東区）

(5) 渋沢崇行, 並木淳, 鈴木さゆり, 佐々木淳一, 堀進悟

熱傷患者における末梢血単球系細胞の表面抗原プロファイルの解析

第40回日本熱傷学会

2014年06月05日～2014年06月06日

ラフレさいたま（埼玉県さいたま市）

(6) 渋沢崇行, 並木淳, 鈴木さゆり, 林田敬, 関根和彦, 佐々木淳一, 堀進悟

マウス肝損傷モデルを用いたDAMPsの検討

第29回日本Shock学会

2014年05月16日～2014年05月16日

松山市コミュニティーセンター（愛媛県松山市）

(7) 多村知剛, 関根和彦, 小林陽介, 渋沢崇行, 林田敬, 並木淳, 堀進悟

重症救急患者における白血球表面抗原解析による易感染性状態と臓器不全の関連性の解明

第41回日本集中治療医学会

2014年2月27日～3月1日

国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都（京都府京都市）

(8) 並木淳, 関根和彦, 林田敬, 鈴木さゆり,

渋沢崇行, 多村知剛, 堀進悟

生体侵襲制御と組織修復・再生における骨髄由来細胞の機能解析.

第40回日本救急医学会総会

2012年11月13日～2012年11月15日

国立京都国際会館（京都府京都市）

(9) Hayashida K, Namiki J, Sekine K, Suzuki S, Masuda T, Ishihama Y, Hori S

Phosphorylation of Histone H3 in Peripheral Blood Monocytes Parallels the Clinical Course in a Patient With Severe Sepsis. Pan-Pacific Emergency Medicine Congress 2012

2012年10月23日～2012年10月26日

ソウル, (韓国)

(10) Masuda T, Igarashi Y, Tomita M, Namiki J, Sugiyama N, Ishihama Y

Highly sensitive LC-MS/MS analysis of phosphorylated peptides in minimal number of cells.

60th American Society for Mass Spectrometry Conference

2012年05月20日～2012年05月24日

バンクーバー, (カナダ)

(11) Masuda T, Igarashi Y, Tomita M, Namiki J, Sugiyama N, Ishihama Y

Highly sensitive phosphoproteome analysis of a minute number of cells

59th American Society for Mass Spectrometry Conference

2011年06月05日

デンバーコロラド州, (米国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

並木 淳 (JUN NAMIKI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20189195

(2)研究分担者

石濱 泰 (YASUSHI ISHIHAMA)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30439244

(3)連携研究者

なし