

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592681

研究課題名(和文)免疫細胞学的、再生医学的アプローチによる急性肺損傷の病態解明

研究課題名(英文) Immunology and regenerative medicine-based approach to acute lung injury

研究代表者

藤島 清太郎 (Fujishima, Seitaro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00173419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：1) IL-17欠損マウスでブレオマイシン誘発急性肺損傷が増悪する機序を検討し、IL-12発現樹状細胞の関与が推測された。2) 高濃度酸素曝露による内皮細胞反応性亢進に伴い、パターン認識受容体TLR family、NOD family遺伝子発現の変動を認めた。3) ヒトES細胞の空気接触環境下における肺胞上皮細胞への分化を、SPC、aquaporin-5(AP5)をマーカーとして検討し、SPC発現は培養20日後に増加、40日後には減少、AP5発現は時間とともに増加した。4) ヒトのARDS、IPF剖検肺で、肺組織幹細胞・前駆細胞を探索するも確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：1) We examined the mechanisms of exaggerated bleomycin-induced acute lung injury in IL-17-deficient mice, and found that IL-12-expressing dendritic cells were increased in the knockout mice. 2) In human endothelial cells, in association with the accelerated response, gene expression of TLR and NOD families were significantly affected under hyperoxia. 3) We examined the differentiation of human embryonic stem cells to alveolar epithelial cells under air-liquid interface, using SPC and AP5 as markers. The expression of SPC was increased at 20 days, but was decreased at 40 days, whereas that of AP5 was increased with time. 4) We examined lung stem cells and progenitor cells in autopsied lungs from patients with ARDS and IPF. In ARDS, accumulation of inflammatory cells in the early phase and metaplastic epithelial cells in the late phase were observed, but Musashi-1 and SPC double positive cells were not observed. In IPF, Musashi-1 and CCSP double positive cells were also not observed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：炎症性肺疾患 急性呼吸促迫症候群

1. 研究開始当初の背景

生体細胞の機能は、様々な微量生理活性物質により統合的かつ動的に調節され、また各臓器・組織の細胞は、常に組織幹細胞や前駆細胞により補充されて、その機能を維持している。しかし、生体が高度侵襲や感染などの二次刺激に暴露されると、全身性炎症反応症候群 (SIRS) が惹起され、細胞が多数傷害されて、急性肺損傷 (ALI) 急性呼吸促進症候群 (ARDS) を発症するため、その予防と治療が重要である。

我々は従来から高度侵襲、炎症性肺疾患病態下における炎症、抗炎症性反応を主にサイトカイン、ケモカインの面から研究し、様々な炎症性ケモカインの敗血症、ALI/ARDS、炎症性肺疾患病態への関与を明らかにしてきた。近年では、一次刺激後の免疫機能変化が priming に関与しているとの仮説に基づき、熱傷負荷後の過剰炎症反応性を明らかにし、その制御が病態改善に有効であることを示した (Sasaki J, et al.: AJP 2003)。また、高度侵襲後の IL-18 の低下とその少量補充による病態改善を見いだした (Sekine K, et al.: Shock 2009)。

2. 研究の目的

本研究は、細胞培養、動物実験系、臨床検体を用いて、炎症性肺疾患病態下の免疫炎症・代謝関連因子や細胞機能の変動、及び組織幹細胞・前駆細胞の動態を総合的に解析し、病的環境下における生体内傍細胞環境の異常変動を明らかにし、また異常変動をきたしている生理活性物質の補正が免疫機能・細胞機能に及ぼす効果を検証することで、炎症性肺疾患、特に ALI/ARDS に対する新規治療法、予防法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの SIRS、炎症性肺疾患モデルを用いた、侵襲後の免疫炎症・代謝変動の総合的解析

マウスをネブタール麻酔した後、マイクロスプレーを用いて 1~3 mg/kg Bleomycin などの傷害性物質を含む水 50~100 μ L を気道内へ噴霧投与する。その後様々な時間 (1, 3, 7 日) に動物を屠殺し、血液、各種臓器 (肺、肝臓、脾臓、等) から総 RNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA を合成後、液性因子、刺激伝達系酵素、免疫関連因子を含めた遺伝子発現と蛋白質を各々網羅的に解析する。これらのスクリーニングで候補となった遺伝子や蛋白質を、リアルタイム遺伝子定量法や ELISA 法などを用いて個々に定量し、変動を確認する。

(2) 細胞培養系を用いた、肺細胞、免疫細胞

の機能変動補正因子の解明

ヒトやマウスの肺実質細胞、免疫細胞を、各々の至適培地を用いて培養する。候補因子の濃度を様々に変えた環境下で上記細胞を培養し、細胞形態や各種細胞機能、侵襲負荷に対する反応性、抵抗性などの変化を明らかにする。侵襲負荷としては細菌内毒素、TNF、IL-1 等の炎症性サイトカインなどを用いる。さらに、上記 (1) と同様の解析も行う。

(3) ヒト ES 細胞からのヒト肺組織細胞の効率的産生誘導法の確立

当大学生理学教室、腎臓内科学教室と共同で、ヒトの ES 細胞を様々な条件下で培養し、肺胞上皮細胞などへの効率的誘導手法を探索する。まず、「Air-liquid interface 法」をヒト ES 細胞の分化誘導に応用する。分化誘導の確認には、SPC、Secretoglobulin 1A1 (別名 CCSP、CC10) などのマーカーを用いる。

(4) SIRS、ALI/ARDS、炎症性肺疾患患者における免疫炎症・代謝および組織幹細胞の動態解明

SIRS、炎症性肺疾患患者の末梢血、また臨床気管支鏡検査が必要な場合に採取した気管支肺胞洗浄液を用いて、網羅的に解析する。一方、ALI/ARDS、炎症性肺疾患患者の剖検または生検組織を用いて、Musashi-1、SPC、Secretoglobulin 1A1 などのマーカーにより肺組織幹細胞・前駆細胞を探索する。

4. 研究成果

(1) マウスの SIRS、炎症性肺疾患モデルを用いた、侵襲後の免疫炎症・代謝変動の総合的解析

我々はこれまで、IL-17欠損マウスにおいて、プレオマイシン投与後の ALI が増悪するとともに、IL-12 の発現が増強するとの知見を得ており、IL-12 発現増強の機序を明らかにするための検討を行った。野生型および IL-17欠損マウス (医科学研究所より供与) にプレオマイシンを経気管投与した後、7 日後の肺組織を採取し、IL-12 の発現を免疫染色にて検討した。IL-17欠損マウスにおいて、肺の樹状細胞が増加傾向にあり、さらに同細胞に IL-12 発現を認めたことから、IL-12 の由来として樹状細胞が推測された。

(2) 細胞培養系を用いた、肺細胞、免疫細胞の機能変動補正因子の解明

内皮細胞における高濃度酸素下の刺激反応性亢進機序を解明するため、同細胞における pattern recognition receptor (PRRs) の発現変動を検討したところ、TLR family に加えて NOD family 遺伝子発現の変動を認めた。

(3) ヒト ES 細胞からのヒト肺組織細胞の効率的産生誘導法の確立

当大学腎臓内科学教室との共同研究として、ヒトのES細胞を空気に接触する環境下 (Air-liquid interface) で3~6週間培養し、気道肺胞上皮特異的マーカーである surfactant protein C (SPC)、aquaporin-5(AP5)の遺伝子発現をFACS解析により検討した。興味深いことにSPCの発現は培養後20日に増加したが、40日後にはむしろ減少した。一方、AP5の発現は培養日数に応じて、発現量が増加した。更に、発生・形態学的に肺上皮との類似点を認め、研究が進んでいる腎上皮細胞の発現誘導条件を参考に、気道肺胞上皮細胞の発現誘導を促進する因子を検索したが、本研究期間内では、より効果的な分化誘導因子は見いだせなかった。

(4) SIRS、ALI/ARDS、炎症性肺疾患患者における免疫炎症・代謝および組織幹細胞の動態解明

ALI/ARDS 患者の剖検肺では、好中球を中心とする炎症細胞の集積を認め、発症 1 週間以降には化生上皮を認めた。次に、Musashi-1、SPC をマーカーとして肺組織幹細胞・前駆細胞を細気管支・肺胞領域を中心に探索したが、明らかな共発現細胞を確認できなかった。

また、IPF/UIP 患者の剖検肺組織を用いて、Musashi-1、Secretoglobulin 1A1 (CCSP)をマーカーとして肺組織幹細胞・前駆細胞を探索したが、やはり共発現細胞を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 28 件)

- (1) 藤島清太郎、ALI/ARDS の診断と治療：バイオマーカー、呼吸器内科、査読無、25(3)、2014、204-11
- (2) Fujishima S, Gando S, et al., A multicenter, prospective evaluation of quality of care and mortality in Japan based on the Surviving Sepsis Campaign guidelines、J Infect Chemother、査読有、20(2)、2014、:115-120、<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2013.09.003>
- (3) Ogura H, Fujishima S, et al., Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: a prospective multicenter study. J Infect Chemother、査読有、20(3)、2014、157-62、<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2013.07.006>
- (4) Gando S, Fujishima S, et al., A multicenter, prospective validation study of the Japanese Association for Acute Medicine disseminated intravascular coagulation scoring system in patients with severe sepsis. Crit Care、査読有、17、2013、R111、doi:10.1186/cc12783
- (5) Homma K, Fujishima S, et al., Skew of plasma low- and high-density lipoprotein distributions to less dense subfractions in normotriglyceridemic chronic kidney disease patients on maintenance hemodialysis treatment. Nephron Clin Pract、査読有、123、2013、41-5、DOI:10.1159/000351506
- (6) Sasaki J, Fujishima S, et al., Pharmacokinetics of a polyene antifungal agent, liposomal amphotericin B (L-AMB), in a severely burned patient. J Chemother、査読有、2013 (印刷中)、<http://dx.doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000141>
- (7) Kushimoto S, Fujishima S, et al., The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. Crit Care、査読有、17(6)、2013、R271、doi:10.1186/cc13106
- (8) Hayashida K, Fujishima S, et al., Neuroleptic malignant syndrome-induced massive coagulopathy successfully treated by combination therapy of recombinant soluble thrombomodulin and antithrombin III: a case report. Am J Emerg Med、査読有 ;31(3): 2013、636.e1-3、<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2012.10.025>
- (9) Hifumi T, Fujishima S, et al., Fatal overwhelming postsplenectomy infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in mothers within 1 year after delivery: case report. J Infect Chemother、査読有、19、2013、1202-05、<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-013-0613-x>
- (10) 樽井武彦, 藤島清太郎, 他、日本救急医学会 Sepsis Registry 特別委員会報

- 告：Severe sepsis の早期予後予測指標の検討：septic shock と比較して、日救急医学会誌、査読有、24(5), 2013, 315-319
- (11) 白石振一郎, 藤島清太郎, 他、日本救急医学会 Sepsis Registry 特別委員会報告：肺炎・膿胸による severe sepsis の血液・巣培養結果と重症度の関係についての検討、日救急医学会誌、査読有、24(5), 2013, 310-314
- (12) 山下典雄, 藤島清太郎, 他、日本救急医学会 Sepsis Registry 特別委員会報告：Severe sepsis 患者における Body Mass Index(BMI)の影響 日本救急医学会 Sepsis Registry 535 例の解析、日救急医学会誌、査読有、24(5), 2013, 305-309
- (13) 久志本成樹, 藤島清太郎, 他、日本救急医学会 Sepsis Registry 特別委員会報告：Severe sepsis における体温は重症度と転帰に関連する、日救急医学会誌、査読有、24(5), 2013, 297-304
- (14) 藤島清太郎、呼吸既感染症におけるプロカルシトニンのバイオマーカーとしての意義、分子呼吸器病、査読無、17(1), 2013, 48-53
- (15) 藤島清太郎、急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の新定義と個別化治療戦略、呼吸器内科、査読無、23(4), 2013, 379-389
- (16) 織田成人, 藤島清太郎, 他、日本版敗血症診療ガイドライン、日本集中治療医学会雑誌、査読有、20(1), 2013, 124-173
、
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsicm/20/1/20_124/_article/-char/ja/
- (17) 藤島清太郎、ショック、敗血症、臓器障害における最新治療：急性呼吸促迫症候群(ARDS) エビデンスに基づく治療の個別化の試み、Shock (日本 Shock 学会雑誌)、査読無、27(2), 2013, 31-35、
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cb1shock/2012/002702/010&name=0031-0035j&UserID=131.113.183.243&base=jamas_pdf
- (18) 藤島清太郎、敗血症の診断と治療、感染防止、査読無、23(4), 2013, 1-8
- (19) 丸藤哲, 藤島清太郎, 他、日本救急医学会 Sepsis Registry 特別委員会報告：総論 Sepsis Registry の概要、日救急医学会誌、査読有、24(5), 2013, 247-262
- (20) Takesue Y, Fujishima S, et al., Clinical efficacy and safety of intravenous itraconazole in the management of invasive candidiasis in patients of surgery and critical care、J Infect Chemother、査読有、18, 2012, 515-21
、
<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-012-0371-1>
- (21) 藤島清太郎、急性肺損傷(ALI)/急性呼吸窮(促)迫症候群(ARDS)、Emergency Care、査読無、25(7), 2012, 658-63
- (22) Kamata H, Fujishima S, et al. Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice. Exp Biol Med (Maywood)、査読有、236(3), 2011, 315-24、doi: 10.1258/ebm.2011.010180
- (23) Hayashida K, Fujishima S, et al., Early administration of sivelestat, the neutrophil elastase inhibitor, in adults for acute lung injury following gastric aspiration、Shock、査読有、36(3), 2011, 223-7、DOI: 10.1097/SHK.0b013e318225acc3
- (24) 藤島清太郎、Sepsis 診断におけるプロカルシトニンの意義、化学療法の領域、査読無、27(1), 2011, 134-141
- (25) 藤島清太郎、肺血栓塞栓症にみられる呼吸不全、The lung perspectives、査読無、19(1), 2011, 38-45
- (26) 佐藤幸男、藤島清太郎、侵襲に対する神経・内分泌反応、救急医学、査読無、35(7), 2011, 753-6
- (27) 藤島清太郎、急性肺損傷(ALI)、急性呼吸促迫症候群(ARDS)、最近のトピックスと基礎傷病別のエビデンス、呼吸、査読無、30(9), 2011, 761-771
- (28) 林田敬、藤島清太郎、Activated protein C を介した凝固炎症反応と PROWESS、Thrombosis Medicine、査読無、1(2), 2011, 163-169
- 〔学会発表〕(計 24 件)
- (1) 藤島清太郎、急性呼吸不全を呈する救急疾患の診療、第 64 回日本救急医学会関東地方会教育講演、2014 年 2 月 1 日、横浜
- (2) Fujishima S, Acute Respiratory Distress Syndrome: A Case-based Approach for a Heterogenous Pathophysiological Condition, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR2013) Coffee Break Seminar 3, November 13, 2013, Yokohama
- (3) 藤島清太郎、ARDS：新たな定義と病態の多様性、第 41 回日本救急医学会総会・学術集会モーニングセミナー-8、2013 年 10 月 23 日、東京
- (4) 藤島清太郎、急性呼吸促迫症候群：画像とバイオマーカーからの病態評価、第 23 回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会シンポジウム 6、2013 年 10

- 11日、東京
- (5) 藤島清太郎、敗血症：病態と診断・治療、第145回感染防止研究会2013年7月6日、東京
- (6) 藤島清太郎、敗血症の疫学・病態と診断、第10回東京消化器外科感染症研究会パネルディスカッション、2013年7月6日 東京
- (7) 藤島清太郎、JAAM-SR Basic 症例登録結果から見る我が国の敗血症診療の実態 第40回日本救急医学会総会・学術集会教育講演、2012年11月14日、京都
- (8) 一二三亨、藤島清太郎、他、肺炎球菌が原因と判断された成人急性感染症における予後因子の検討、第40回日本救急医学会総会・学術集会ポスター、2012年11月14日、京都
- (9) 藤島清太郎、救急/ICU が抱える感染症の諸問題：重症・劇症感染症の診断と治療、第61回日本感染症学会東日本地方会/第59回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会シンポジウム16、2012年10月11日、東京
- (10) 河野茂、藤島清太郎、他、全国多施設での院内肺炎の病態と治療に関する実態調査成績、第61回日本感染症学会東日本地方会/第59回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、2012年10月11日、東京
- (11) 藤島清太郎、呼吸器救急診療のポイント、第22回日本救急放射線研究会 ER セミナー、2012年9月29日、長崎
- (12) 藤島清太郎、敗血症とは？世界敗血症デー記念講演会、2012年9月22日、東京
- (13) Kamiishi N, Fujishima S, et al. Interleukin-17A in the pathogenesis of elastase-induced emphysema in mice. European Respiratory Society 2012 Annual Congress, September 1-5, 2012, Vienna, Austria.
- (14) Fujishima S, et al., Quality of care and mortality of severe sepsis and septic shock in Japan. American Thoracic Society (ATS) 2012 International Conference, May 23, 2012, San Francisco, USA
- (15) 藤島清太郎、急性呼吸促迫症候群：エビデンスに基づく治療の個別化の試み、第27回日本 Shock 学会総会 2012年5月12日 東京
- (16) 藤島清太郎、第86回日本感染症学会・学術講習会ランチョンセミナー9 感染症 Biomarker としての Procalcitonin、2012年4月26日、長崎
- (17) 藤島清太郎、呼吸器疾患における肺循環障害の治療と今後の展望：ARDS における肺循環障害と治療、第52回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム2、2012年4月20日、神戸
- (18) 藤島清太郎、急性呼吸促迫症候群：新たな診断基準と個別化治療戦略、第52回日本呼吸器学会学術講演会イブニングシンポジウム6、2012年4月20日、神戸
- (19) Hayashida K, Fujishima S, et al., Successful treatment of disseminated intravascular coagulation with recombinant human soluble thrombomodulin in a patient with neuroleptic malignant syndrome. 41st Critical Care Congress, February 6, 2012, Houston, USA
- (20) 藤島清太郎、ALI/ARDS に関する最近のトピックスと基礎傷病別のエビデンス、第21回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会、2011年11月3日、松本
- (21) 藤島清太郎、感染症 biomarker としての procalcitonin、第39回日本救急医学会総会・学術集会教育セミナー、2011年10月18日、東京
- (22) 藤島清太郎、他、日本救急医学会 Sepsis Registry 特別委員会、わが国の多施設共同調査研究、レジストリーの成果とこれから 日本救急医学会 Sepsis Registry Basic 版によるデータ収集と診療の質の評価、第39回日本救急医学会総会・学術集会シンポジウム、2011年10月20日、東京
- (23) 小倉裕司、藤島清太郎、他、わが国の多施設共同調査研究、レジストリーの成果とこれから 日本救急医学会 Sepsis Registry Basic 版によるデータ収集と診療の質の評価、第39回日本救急医学会総会・学術集会教育セミナー、2011年10月20日、東京
- (24) 一二三亨、藤島清太郎、他、侵襲性肺炎球菌感染症の臨床病態に関する後ろ向き検討、第39回日本救急医学会総会・学術集会、2011年10月19日、東京
- 〔図書〕(計6件)
- (1) 藤島清太郎、医学書院、今日の治療指針2013年版：急性呼吸促迫症候群、2013、314-315
- (2) 藤島清太郎、南江堂、今日の治療看護：急性肺損傷・急性呼吸促迫症候群、2013、407-410
- (3) 藤島清太郎、医歯薬出版、別冊・医学の歩み：呼吸器疾患 state of arts Ver. 6：急性呼吸促迫症候群(ARDS)の病態、2013、4-7
- (4) 藤島清太郎、南江堂、今日の処方改訂第

5 版 : 急性呼吸促迫症候群(ARDS)、2013、
256-257

- (5) 藤島清太郎、学研メディカル秀潤社、医療スタッフのための日本版敗血症診療ガイドライン活用マニュアル：敗血症の病態、2013、24-27
- (6) 藤島清太郎、南江堂、感染症専門医テキスト第Ⅰ部解説編：全身管理と対症療法、2011、422-5

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤島 清太郎 (Fujishima Seitaro)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：00173419