

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592756

研究課題名(和文)敗血症性急性腎不全に対するmesenchymal stem cell移植療法

研究課題名(英文)Effect of mesenchymal stem cells on septic acute renal failure

研究代表者

武山 直志 (TAKEYAMA, Naoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00155053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞受容体(TCR)多様性の遺伝子解析を敗血症性ショック患者において経時的に検討した。TCR多様性、リンパ球数は健常人に比し敗血症性ショック患者において1病日にすでに減少を認め、以後全身状態の改善とともに回復傾向を示した。死亡例においては低値で推移した。敗血症性ショック患者では発症早期よりT細胞、単球間における抗原情報受け渡しシステムに障害を来すとともに、TCR多様性にも障害を認めた。リンパ球は数の減少のみならず質的障害も生じていることが明らかになった。Immunoparalysisは敗血症末期の合併症でなく、敗血症発症早期から認められ、重症化の原因である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the impact of sepsis on the adaptive immune system and to monitor T cell receptor (TCR) diversity. TCR diversity was markedly decreased in septic patients at day 1 compared to the healthy volunteer. A recovery of TCR diversity was observed at days 3 and 7 except for dead patient. HLA-DR expression was significantly decreased in septic patients at day 1. Total lymphocyte count reduced in septic patients at day 1, but lymphocyte count recovered at days 3 and 7 except for dead patient. We observed a lower TCR diversity and lymphopenia in early stage of septic shock. A quickly recovery of TCR diversity and lymphocyte count were observed in live patients. On the other hand, dead patient stayed on the lower level over the course of the study. These results suggest that altered TCR diversity and lymphopenia might participate in increased mortality and susceptibility to secondary nosocomial infections.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 T細胞 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

敗血症性急性腎不全は救急集中治療領域でしばしば遭遇する重篤な病態であり、その発症は予後悪化の大きな要因となりうる。われわれは間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) の有する多能性、とりわけ抗アポトーシス、内皮細胞・尿細管細胞再生ならびに免疫調整作用に着目し、骨髄由来の MSCs が敗血症性急性腎不全の腎修復に重要な役割を果たしているかと推察した。敗血症性急性腎不全の発症原因として虚血再灌流 (血栓形成、低酸素血症) mediator・腎毒性物質による直接作用、アポトーシスなど複合的な要因が推察されているものの、いまだ根本的な治療法が確立されていない。最近の報告によると急性腎不全は骨髄から MSCs を動員し、傷害を受けた部位に集積させ傷害細胞の修復を行っている事が明らかになりつつある。MSCs は分化増殖後、傷害細胞に置き替わる (Syres K et al. Blood 2009; 114: 2542-52) のみでなく、それ自身 hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, fibroblast growth factor 2, vascular endothelial-growth factor, epidermal growth factor などの細胞保護・増殖因子を産生し腎修復作用を発揮する (Li L et al. Am J Physiol Renal Physiol 2011) と推察されている。MSCs は免疫炎症系にも影響を与えている。すなわち単球における TGFβ および IL-10 産生促進、IFNγ および IL-6 産生抑制などの抗炎症作用が知られている (Crisostomo PR et al. Surgery 2008; 143: 577-81)。一方、細菌除去に欠かすことのできない好中球貪食能、殺菌能は MSCs により賦活化されると報告されている (Mei SHJ et al. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182: 1047-57)。強い抗アポトーシス作用も有するため、敗血症性急性腎不全の治療に際し理想

的な特徴を兼ね備えている。敗血症患者の自然免疫障害は比較的よく検討されている。すなわち好中球接着因子の発現、遊走能障害、活性酸素種産生異常をはじめとした末梢血液中での好中球活性化、マクロファージ HLA-DR 発現低下等が知られている。一方獲得免疫の中核をなす T 細胞に及ぼす敗血症の影響は、アポトーシス亢進による量的減少以外不明な点が多い。

2. 研究の目的

今回、T 細胞レパトア形成に必須である T 細胞受容体 (TCR) 多様性の遺伝子解析、抗原提示の抑制分子である programmed death (PD)-1 の T 細胞における発現を中心に敗血症性ショック患者における T 細胞機能を経時的に検討した。

3. 研究の方法

対象は敗血症性ショック患者 12 名である。ヘパリン化全血は ICU 入室 1,3,7 病日に採取し測定に供した。対照には健常成人から採取した血液を用いた。TCRβV-J 領域の遺伝子解析は、ヘパリン化全血から濃度勾配遠心分離法にて分離した単核球 (2.5×10^6) を使用した。Genomic DNA を抽出した後、V 領域、J 領域のプライマーを用いて multiplex PCR にて 299 種類の VJ-rearrangements を測定した。結果解析には ConstelID software を用いた。PD-1⁺CD4⁺、HLA-DR⁺CD14⁺、CD3⁺リンパ球数は FACS にて解析した。

4. 研究成果

TCR 多様性の典型例を図 1 に示す。V 領域は 23 種類、J 領域は 13 種類のプライマーを用い合計 299 種類の TCR 遺伝子発現量を示している。第 1 病日において多様性が最も少なく、以後経時的に多様性が回復している。CD4⁺PD-1⁺リンパ球は、健常人に比し敗血症性ショック患者において 1 病日にすでに増加を示しており以後回復に伴い減少に転じた

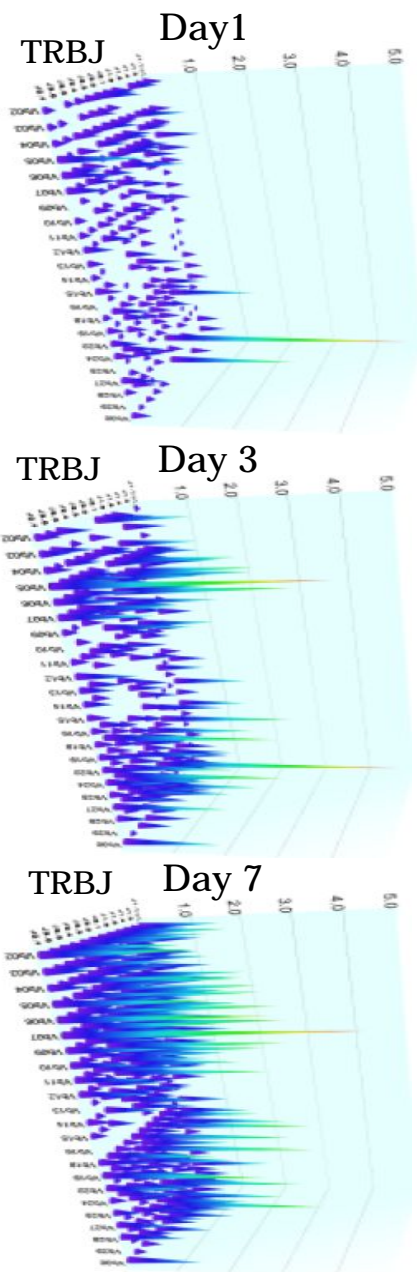


図1 敗血症ショック患者におけるT細胞遺伝子再編成

(図2)。単球における HLA-DR 発現は1病日にすでに著明な低下を認めた(図3)。リンパ球数は健常人に比し敗血症性ショック患者において1病日にすでに減少を認め、以後全身状態の改善とともに回復傾向を示した。死亡例においては低値にて推移した。今回の結果より単球の抗原提示に必須である HLA-DR の低下、TCR の多様性障害、さらには PD-1 の発現亢進が相まって抗原情報の

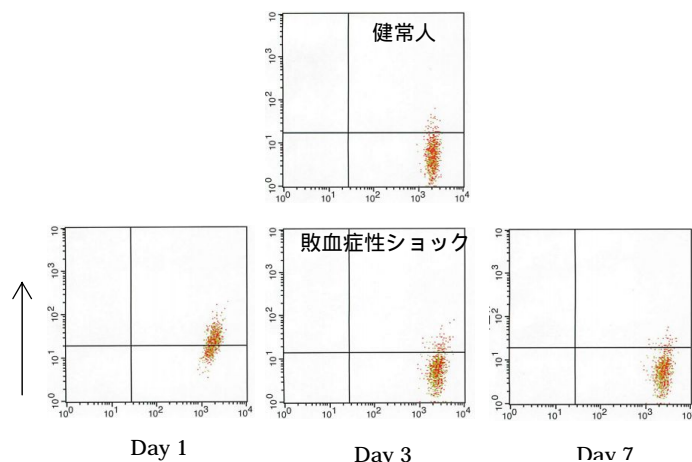


図2 CD4+PD-L1 の経時的推移

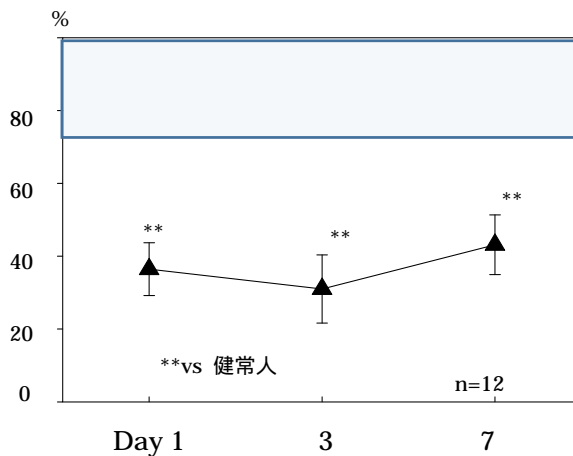


図3 敗血症患者におけるCD14+HLA-DR+細胞の経時的推移

T細胞への伝達障害が敗血症性ショック患者で認められることが推察された。リンパ球は数の減少のみならず質的障害も生じていることが明らかになり最近の報告とも一致している。Immunoparalysisは敗血症末期の合併症でなく、敗血症発症早期から認められ、重症化の原因である可能性が示唆された。今後敗血症の根本治療法の一つとして免疫賦活療法が注目される可能性がある。

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4件)

1) Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. J Surg Res 194: 248-254; 2015. Hashiba M, Huq MA, Tomino A, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H, Tsuda M, and Takeyama N 査読有

2) 敗血症性ショック患者における T 細胞機能障害 日本ショック学会誌 平成 26 年 ; 29 (2):9-12 武山直志、富野敦稔、波柴尉充、安藤雅規、後長孝佳、宮部浩道、津田雅庸、服部友紀、加納秀記、平川昭彦 査読有

3) Successful treatment of septic shock due to New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred from India to Japan. Acute Medicine & Surgery 1: 181-185; 2014. Kano H, Hirakawa A, Miyabe H, Hattori T, Mikamo H, Yoshida S, and Takeyama N 査読有

4) Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: A prospective multicenter study. J Infect Chemother 20: 157-62; 2014. Ogura H, Gando S, Saitoh D, Takeyama N, Kushimoto S, Fujishima S, Mayumi T, Araki T, Shiraishi S, Kotani J, Ikeda H, Suzuki K, Suzuki Y, Miki Y, Takuma K, Tsuruta R, Yamashita N, Yamaguchi Y, Aikawa N, JAAM Sepsis Registry (JAAMSR) Study Group 査読有

{ 学会発表 } (計 7 件)

1) Takeyama N, Huq MA, Ando M, Gocho T, Tomino A, Miyabe H, Kano H, Tsuda M, Hattori T, Hirakawa A, Hashiba M. Ex vivo and in vivo generation of neutrophil extracellular traps by neutrophils from

septic patients. 35th International symposium on Intensive Care and Emergency medicine, Brussels (Belgium), Brussels Meeting Center, 2015. 3

2) 武山直志、富野敦稔、波柴尉充、安藤雅規、5、敗血症性ショック患者における T 細胞機能障害、第 29 回日本ショック学会、平成 26 年 5 月、愛媛 松山、松山総合コミュニティーセンター

3) Takeyama N, Tomino A, Hashiba M, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H. Altered T cell repertoire diversity in septic shock patients. 31st International symposium on Intensive Care and Emergency medicine, Brussels (Belgium), Brussels Meeting Center, 2014. 3

4) 小倉裕司、丸藤 哲、齋藤大蔵、武山直志 15、日本における敗血症(セプシス)の疫学：海外との比較、第 26 回日本外科感染症学会総会、平成 25 年 11 月、兵庫 神戸、神戸国際会議場

5) Ogura H, Gando S, Saito D, Fujishima S, Takeyama N, et al. Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: A prospective multicenter study. The 7th Asian conference on emergency medicine, Tokyo, Tokyo International Forum, 2013. 10

6) Huq MA, Hirakawa A, Hattori T, Kano H, Miyabe H, Tomino A, Gocho T, Ando M, Nakagawa T, and Takeyama N. Neutrophil extracellular trap formation capacity is altered in neutrophil from septic patients. The 7th Asian conference on emergency medicine, Tokyo, Tokyo International

Forum, 2013. 10

7) Huq MA, Hirakawa A, Hattori T, Kano H, Miyabe H, Tomino A, Hashiba M, Gocho T, Ando M, Nakagawa T, and Takeyama N. Sepsis alters the extracellular bacterial killing capacity of neutrophil. Seventh Mediterranean Emergency Medicine Congress, Marseille (France), Palais des Congrès et des Expositions de Marseille, 2013. 9

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武山 直志 (TAKEYAMA, Naoshi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00155053

(2) 研究分担者

平川 昭彦 (HIRAKAWA, Akihiko)
藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00319633

津田 雅庸 (TSUDA, Masanobu)

藤田保健衛生大学・医学部・准
教授

研究者番号：70506683

(3) 連携研究者
()

研究者番号：