

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：34447

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592757

研究課題名(和文)敗血症におけるプロカルシトニンの意義 プロカルシトニン欠損マウスを用いてー

研究課題名(英文)Significance of procalcitonin in sepsis-analysis of procalcitonin knockout mouse-

## 研究代表者

中村 美砂 (NAKAMURA, Misa)

大阪河崎リハビリテーション大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：70285386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロカルシトニン欠損マウス(PCT KO)を用いて、リポポリサッカライド(LPS)により誘発された敗血症における生理的变化を調べた。その結果、LPS投与が生存期間に与える影響については、野生型とKOとの間には違いは見られなかったものの、野生型の方が若干生存率が高かった。また、KOマウスは野生型と比較してLPS投与後の血中IL-6濃度が高く、IL-10は低かった。本結果よりPCTは敗血症による死亡には大きく影響しないが、サイトカインを介して敗血症症状を軽減する働きのあることが推測された。

研究成果の概要(英文)：The role of procalcitonin (PCT) in sepsis was investigated using PCT knockout mouse (PCT KO). However, there was no statistical difference of duration of survival between KO and wild injected of lipopolysaccharide (LPS), wild group showed a little higher survival rate than KO. And KO showed higher level of IL-6 and lower of IL-10 concentration in blood than wild. These results suggested that PCT have no effect on survival in sepsis, however reduces a condition of sepsis mediated by various cytokines.

研究分野：内分泌学

キーワード：プロカルシトニン 敗血症 サイトカイン ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

プロカルシトニン(PCT)は116個のアミノ酸から成る分子量13kDaの蛋白で、N末端側には57個のアミノ酸から成る領域があり、中央に32個のアミノ酸から成るカルシトニン(CT)部分、C末端側には21個のアミノ酸から成るカタカルシン部分が存在する。

敗血症は体温、末梢白血球数、脈拍数、呼吸数で定義される全身性炎症反応症候群(SIRS)と感染を有する状態を指すが、その要因は血中に侵入した細菌や真菌、ウイルス、寄生虫等多岐にわたり、細菌感染の有無を迅速かつ的確に把握し得るマーカーは存在しなかった。PCTはカルシトニンの前駆蛋白として甲状腺のC細胞において生成されるが、通常血中には検出されない。しかし全身の細菌感染症においては多臓器から産生され、血中に放出されると考えられており、PCTは新しい信頼性の高い敗血症のマーカーとして近年注目されている。PCTのRNAおよび蛋白の発現はLPSおよび敗血症関連サイトカインによって調節されているといわれている。またPCTは敗血症のマーカーだけでなく、メディエーターでもあるとの報告もみられる。しかしながら、敗血症におけるPCTの生物学的意義については明らかではない。

申請者は、cDNA subtraction法により、腎上皮細胞においてCTによる発現遺伝子を単離、同定した。その結果、敗血症性ショックの血行動態に深く関与する物質であるiNOSの発現誘導を調節するnuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)、好中球やT細胞の浸潤に関与するIL-8、IL-3 promoter transcriptional activator (NF-IL3A)、thrombospondin、apolipo-proteinB、connective tissue growth factor、urokinase-type plasminogen activator (uPA)などの発現がCTにより誘導されることを明らかにした。このことから、敗血症におけるPCTの役割は非常に重要であることが推測される。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究発表をもとに、本研究は敗血症におけるPCTのまだ解明されていない生物学的意義を解明する。すでに申請者はC57BL/6JマウスでCT遺伝子のエクソン4を欠損させたPCTノックアウトマウス(PCT KO)を作出しており、甲状腺でPCTのRNA発現が見られないことをRT-PCR法により確認している。生殖能および生育能は、野生型と比較して差が見られず、安定して系統を維持することが可能となっている。また外観、全身臓器形態および組織形態も野生型マウスと比較して違いが認められていない。

本研究では主にこのPCT KOマウスを用いて、研究期間内に敗血症を誘発したPCT KOマウスにおける病態生理的作用を明らかにすることを目的にPCT KOマウスにおけるLPS投与が生存率に与える影響およびPCT KOマウスにおけるLPS投与が敗血症に関与していることが報告されている生体物質であるIL-6、IL-10、uPAに与える影響について調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) リポポリサッカライド(LPS)投与後の生存率の比較

KOマウスと野生型マウスにおいてLPS腹腔内投与後の生存率の比較を行った。

### (2) LPS投与後の血中サイトカイン濃度の比較

LPS投与したマウスから時間経過を追って血清を回収しELISA法によりIL-6、IL-10、uPAを定量し、野生型でのそれと比較することにより、PCTが炎症性物質に及ぼす効果を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) LPS投与後の生存率の比較

PCT KO(KO)マウスと野生型マウス(Wild)を用いて、LPS投与が生存期間に与える影響について比較した。LPS 35 $\mu$ g/g体重の腹腔投与では、両者に大きな違いは見られず、24時間後には両者とも死亡した。LPS 10 $\mu$ g/g体重の投与

24 時間後では、野生型マウスの方が生存率が高かった(表1)。本結果よりPCT は、敗血症症状を軽減する働きのあることが推測された。

表1 . LPS 投与 24 時間後の生存率

	生存数	死亡数	生存率 (%)
Wild	8	2	80.0
KO	7	3	70.0

	生存数	死亡数	生存率 (%)
Wild	5	2	71.4
KO	3	3	50.0

age; 8weeks, LPS; 10 $\mu$ g /g body weight

## (2) LPS 投与後の血中サイトカイン濃度の比較

(1)の結果よりPCT は敗血症症状を軽減する働きのあることが推測された。そこで、炎症性サイトカイン IL-6 および炎症と関わりの深いおよび uPA に着目して野生型と KO マウスとの間における血中濃度の比較を行った。LPS 濃度は 10 $\mu$ g /体重に設定し、血清のサンプリングは投与後 3、6、24 時間後に行った。その結果、LPS 投与 6 時間までは、両群で大差が見られなかったが 24 時間後では KO 群は野生型と比較して上昇率は高かった(図 1)。また、LPS 濃度の違いによる IL-6 量の効果については、濃度依存的に IL-6 は高く、その傾向は KO 群で特に顕著であった。以上の結果より、PCT は、敗血症の際のバイオマーカーであることが言われている IL-6 の産生を抑制している可能性が推測された。

一方、uPA に関しては、LPS 投与後 3 時間後では両者とも増加が見られたが、その後減少した。血中濃度については、野生型と KO 間で違いは認められなかった。

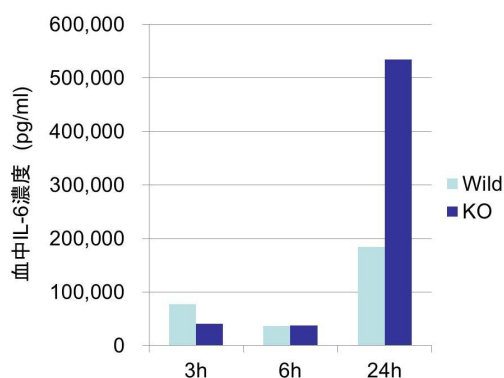


図1. LPS投与後の血中IL-6濃度の経時変化

次に抗炎症サイトカインである IL-10 に着目して PCT KO と野生型の間における血中濃度の比較を行った。LPS 濃度は 10 $\mu$ g/g 体重に設定し、血清のサンプリングは投与後 3、6、24 時間後に行った。ELIZA による測定の結果、LPS 投与 3 時間後で KO 群での上昇が顕著であった。その後、野生型群では、上昇していったのに対し、KO 群では減少していった(図 2)。

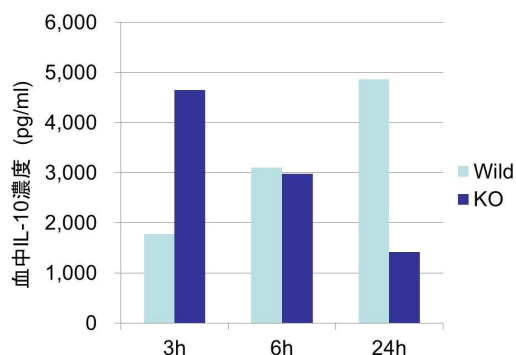


図2. LPS投与後の血中IL-10濃度の経時変化

以上の結果より、PCT が IL-6 や IL-10 などのサイトカインを介して敗血症の軽減作用を有している可能性が示唆された。今後は、PCT のサイトカイン調節の詳細なメカニズムを明らかにすることが課題である。

## < 引用文献 >

Russwurm, et al. Procalcitonin--a novel biochemical marker for the mediator-directed therapy of sepsis. Mol. Med. Today 5(7):286-287, 1999

Nakamura et al. Calcitonin induces connective tissue growth factor through ERK1/2 signaling in renal tubular cells. Exp Mol Med 31;41(5):307- 315, 2009

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

M Nakamura, R Kono, S Nomura, H Utsunomiya  
Procalcitonin : Mysterious protein in sepsis  
Journal of Basic and Clinical Medicine 査読有,  
2(1) ;7-11, 2013

T Wakasa, Y Li, Y Bai, Z Liu, T Ozaki, I Mori, A Miyauchi, K Kakudo, M Nakamura Up-regulation of urinary-type plasminogen activator correlates with high-risk papillary thyroid carcinoma with BRAF<sup>V600E</sup> mutation and its possible molecular mechanism. Pathology-Research and Practice 査読有, 61(3): 109-115, 2014  
doi: 10.1016/j.prp.2014.06.025.

[学会発表] (計 5 件)

国際学会

M Nakamura, B Han, K Kakudo Calcitonin targets ERK signaling pathway in cancer cells. Annual Protein and Peptide Conference 2012. 3.23-25., Beijing

国内学会

教育講演

覚道健一、中村美砂 内分泌病理入門コース  
遺伝性甲状腺癌 日本臨床内分泌病理学会 2013.10.4-5. 横浜

日本内分泌病理学会 佐野賞受賞講演

中村美砂 薬剤としてのカルシトニンが腫瘍におよぼす効果 細胞内シグナル伝達と遺伝子発現を中心に 日本内分泌病理学会 2014.11.1-2. 東京

口演

中村美砂、覚道健一 甲状腺乳頭癌における urokinase-type plasminogen activator 発現と BRAF<sup>V600E</sup> 変異および ERK シグナル系の関係 日本臨床内分泌病理学会 2013.10. 4-5.横浜

中村美砂 細胞内シグナル伝達におけるカルシトニンの正と負の調節 ERK シグナル系と urokinase-type plasminogen activator 発現に着目して 関西カルシウム研究会 2012.3.31.大阪

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村美砂 (NAKAMURA, Misa)

大阪河崎リハビリテーション大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号: 70285386

### (2)連携研究者

河野良平 (KONO, Ryohei)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70569110