OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Enhanced Expression of Heat Shock Proteins in Activated Polymorphonuclear Leukocytes in Patients with Sepsis
Author(s)	橋口, 尚幸
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44542
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	橋口尚幸（はしぐちなおゆき）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 17206 号
学位授与年月日	平成14年5月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Enhanced Expression of Heat Shock Proteins in Activated Polymorphonuclear Leukocytes in Patients with Sepsis （Sepsis患者における多核白血球の熱ショック蛋白質発現）
論文審査委員	（主査） 教授 杉本 壽 （副査） 教授 真下 節　教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】熱ショック蛋白質（HSP）は、様々なストレスに対して細胞の恒常性を保つため分子シャペロンとして重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。我々は外傷や熱傷、sepsis時には多核白血球（PMNL）の活性酸素産生能が亢進すること、アポトーシスが抑制されることを明らかにし、侵襲時にはPMNLが生態防御および組織障害の両面で重要な役割を果たしていることを報告してきた。しかし、侵襲時のPMNL機能を調節している因子に関しては明らかではない。本研究の目的は、侵襲時のPMNL機能（活性酸素産生能、アポトーシスの抑制、など）の調節にHSPが関与しているか否かを明らかにすることである。本研究ではsepsis患者のみならず外傷患者も含め急性病態期において以下の2点に焦点を当て研究を行なった。①外傷、sepsis患者患者のPMNLにおいて、HSP発現量の変化と機能変化を明らかにする事　②PMNLのHSP発現がPMNLの機能変化に及ぼす影響を明らかにする事（in-vitro実験）

【方法ならびに結果】

（臨床研究）

〔方法〕対象は、大阪大学特殊救急部に入院した患者のうち、外傷患者は50症例、sepsis患者はthe American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Conference（ACCP/SCCM）が定義したsepsisの条件を満たす患者21症例である。外傷患者は男性39名、女性11名で、平均年齢は39.3±16.3歳、ISSは31.8±10.8であった。受傷後、0-1、2-5、6-14病日の各ポイントで検体を採取し、PMNLを分離後、フローサイトメトリー法でHSP発現量、活性酸素産生能、およびアポトーシスの経日的変化を測定した。sepsis患者は男性17名、女性4名で、平均年齢は55.8±15.3歳、採血時の白血球数の平均は15,300±2,300 cell/μL、C-reactive protein（CRP）の平均は16.5±4.8 mg/dLであった。検体はsepsisと診断後24時間以内にヘパリン採血を行ない、PMNLを分離採取後フローサイトメトリー法でHSP発現量、活性酸素産生能、およびアポトーシスの変化を測定した。PMNLに発現するHSPは、分子量の違う4種類のHSP（HSP27、HSP60、HSP70、HSP90）を評価し、各モノクロナール抗体および2次抗体としてFITC goat anti-mouse IgGを使用し測定した。活性酸素産生能はPMNLにDCFH-DAを取り込ませ、FMLP刺激により産生した活性酸素により非蛍光のDCFH-DAから蛍光を発するDCFに変化する際の平均蛍光強度として測定した。またアポトーシスは、分離したPMNLを24時間培養し、Propidium iodideでDNAを染色

し、アポトーシスに特異的なHypodiploid DNAを有するPMNLの割合として測定した。健常人17人（平均31.7±5.8歳）から採取したPMNLのHSP発現量、活性酸素産生能、アポトーシスを基準値として用いた。

〔結果〕外傷患者のPMNLにおいて、HSP発現量は受傷後2・5病日をピークに著明に増加し、活性酸素産生能もHSP発現と同様に2・5病日をピークに著明に亢進した。一方、アポトーシスは受傷後2週間にわたり著明に抑制された。sepsis患者のPMNLにおいて、HSPの発現量の増加と活性酸素産生能の亢進およびアポトーシスの抑制が同時に認められた。

（in-vitro研究）

〔方法〕健常人14人から採取したPMNLを使用し室温で実験を行なった。PMNLのHSP発現を抑制する目的でQuercetin（Q、最終濃度30 μM）を、HSP発現を増強させる目的でSodium Arsenite（As、最終濃度100 μM）を使用した。総反応時間は3時間で、以下の4群に分類した。採取したPMNLに、採取後2時間経過してからAsを投与し1時間経過群（HSP強制発現群）、Qを投与し2時間後にAsを投与しその後1時間経過した群（HSP発現抑制群）、Qを投与し3時間経過群（ケルセチン群）、採取後QもAsも投与せず3時間経過した群（コントロール群）の4群で、それぞれ反応時間経過後、PMNLを分離し、代表的HSPであるHSP70、活性酸素産生能、アポトーシスをフローサイトメトリー法で測定した。

〔結果〕健常人のPMNLにおいて、Sodium Arsenite刺激によりHSP発現量を増加させると活性酸素産生能も著明に亢進し、アポトーシスは著名に抑制された。一方、あらかじめQuercetinでHSP発現量の増加を抑制すると、Sodium Arsenite刺激による活性酸素産生能の亢進は認めず、アポトーシスの抑制も認めなかった。

【総括】

1．臨床症例でPMNLのHSP発現量の変化をフローサイトメトリー法で初めて測定した。
2．外傷、sepsis患者のPMNLにおいて、HSP発現量の増加は、活性酸素産生能の亢進や、アポトーシスの抑制に密接に関連している事が判明した。

論文審査の結果の要旨

熱ショックたんぱく質（HSP）は、様々なストレスに対して細胞の恒常性を保つため分子シャペロンとして重要な役割を果たしている。我々は外傷や熱傷、sepsis時には多核白血球（PMNL）が生体防御作用に重要な役割を果たしていることを報告してきた。しかし、侵襲時のPMNL機能を調節している因子に関しては明らかでない。本研究では①外傷、sepsis患者におけるPMNLのHSP発現量ならびに活性酸素産生能およびアポトーシスの変化に関する臨床研究。②HSPによる活性酸素産生並びにアポトーシスの調節に関するin-vitro研究を行なった。外傷患者のPMNLおいて、HSPの発現量は受傷後2・5病日をピークに著明に増加し、活性酸素産生能もHSP発現と同様に2・5病日をピークに著名に亢進した。アポトーシスは受傷後2週間にわたり著明に抑制された。Sepsis患者のPMNLおいて、HSPの発現量増加と活性酸素産生能の亢進およびアポトーシスの抑制が同時に認められた。In-vitro実験で、PMNLに発現するHSP発現量を増加させると活性酸素産生能も著明に亢進し、アポトーシスは著明に抑制された。一方、HSP発現量の増加を抑制しておくと活性酸素産生能の亢進は認めず、アポトーシスの抑制も認めなかった。臨床症例でPMNLのHSP発現量の変化を測定した最初の報告であり、外傷、sepsis患者のPMNLにおいて、HSPの発現量の増加は、活性酸素産生能の亢進やアポトーシスの抑制と密接に関連することを明らかにしたことは、博士（医学）の学位授与に値する。