

平成30年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05004

研究課題名(和文) 周術期における好中球細胞外トラップ形成と臓器障害の関連に関する検討

研究課題名(英文) Relationship between perioperative neutrophil extracellular trap formation and organ dysfunction

研究代表者

内田 篤治郎 (UCHIDA, Tokujiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：40262183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：周術期好中球細胞外トラップ形成の指標として、血清遊離二重鎖DNA濃度を測定したところ、心臓血管手術では、術直後に有意な上昇が認められ、手術翌日まで漸減していく傾向が認められた。術後の炎症が遷延する患者では、このクリアランスが遅延する傾向が認められ、手術翌日の血清二重鎖DNA濃度が、手術翌日における血清クレアチニン値の上昇度と良好な相関が認められた。一方、呼吸器外科手術では、血清二重鎖DNA濃度手術翌日にかけて、有意な上昇が認められるたが、この血清遊離二重鎖DNA濃度の上昇と、血清クレアチニン濃度の上昇度や、IL6濃度との間では有意な相関は認められなかった。今後の更なる見当が期待される。

研究成果の概要(英文)：Perioperative change in serum double-strand DNA (dsDNA) as a marker reflecting neutrophil extracellular trap concentration was studied. Serum samples were collected at baseline, immediately after surgery, and the day after surgery (POD-1). In patients undergoing elective cardiac surgery, serum dsDNA concentration was significantly increased from baseline to immediately after surgery, and they were reduced by POD-1. The difference in serum creatinine concentration between baseline and POD-1 was correlated with dsDNA concentration on POD-1. We also investigated the relationship between serum dsDNA levels and renal function in patients undergoing lung surgery. Although serum dsDNA levels are significantly elevated on POD-1 in these patients, there were no patients diagnosed as acute kidney injury in this cohort. Further studies are needed to determine the relationship between serum dsDNA levels and renal dysfunction.

研究分野：周術期管理医学

キーワード：細胞外トラップ 周術期腎障害

1. 研究開始当初の背景

好中球は、外傷による組織の損傷や、感染が起きた際に、DNA・ヒストタンパクを含む自身の核成分を細胞外に放出し、粘性のある網目状の構造を形成し、血中の病原体を捕捉してプロテアーゼにより攻撃する性質を持つ。好中球から放出される二重鎖 DNA を骨格とする病原微生物の捕捉構造を好中球細胞外トラップ(NETs)と呼び、自然免疫のメカニズムの一つと考えられているが、NETs が過度に形成されると、血管内皮傷害が起こり、凝固機能を修飾したり、肺傷害、腎障害、血栓塞栓症を引き起こしたりするとの指摘がある。

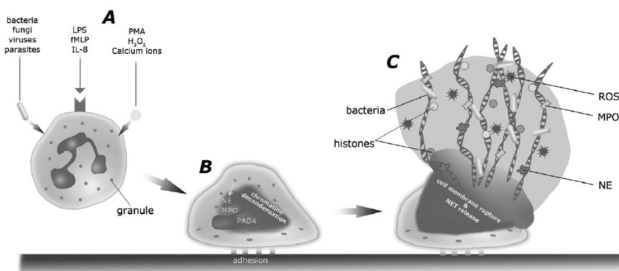


図1 好中球細胞外トラップの形成。(A)血中の病原微生物やリポポリサッカライド(LPS)、IL-8 などにより、好中球が刺激を受けると、(B)好中球が血管内皮に接着すると同時に核内の成分が凝集をし始め、(C)二重鎖 DNA を骨格として好中球顆粒やヒストン蛋白を接着したまま細胞外に放出され、細胞外トラップを形成し、病原微生物を捕捉して、好中球エラスターゼ(NE)やミエロペルオキシダーゼ(MPO)、活性酸素種(ROS)により死滅させる。(Zawrotniak M et al. Acta Biochim Pol. 2013;60:277-84..より引用)

我々は、心臓血管手術を施行した患者 80 名を対象に、NETs 形成の指標として血清中の二重鎖 DNA 濃度を、麻酔導入直後 (Baseline)、手術直後 (PostOp)、手術の翌日 (POD1) の 3 点で採取された検体において測定し、手術に伴う二重鎖 DNA (dsDNA) 濃度の変化と臓器障害との関連について検討したところ、術直後に DNA 分解酵素の活性が低下し、二重鎖 DNA の濃度が上昇すること、手術翌日の血清二重鎖 DNA 濃度が、術前から手術翌日にかけての血清クレアチニン値の上昇との間に比較的強い相関が認められることなどの結果を暫定的な結果として得ることができた。これらの結果より、周術期には、組織への外科的操作等により、好中球が活性化を受け、NETs が放出され、同時に、一時的に NETs が分解を免れるような機構が働くが、炎症の遷延などにより、これらの状態が持続すると、腎組織をはじめとするさまざまな臓器が傷害を受けるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、心臓外科手術、呼吸器外科手術、における周術期の NETs 形成に関する検討を行い、NETs の過形成が関与する病態を明らかにすることを目的として設定した。従来、NETs について行われてきた臨床的な研究としては、多発外傷、敗血症患者を対象としたものが中心であり、周術期の全身状態を対象とする研究は、従来あまり行われていなかった。周術期の腎機能低下については、詳細なメカニズムが確立している状況ではなく、本研究により、NETs 形成が寄与していることが明らかになれば、これを新たな治療的介入のターゲットとすることが可能になると考えた。

3. 研究の方法

(1) 心臓手術における周術期 NETs 形成の動態と周術期腎機能障害の関係に関する検討
過去に施行された多施設共同研究「RAGE の肺障害マーカーとしての臨床的意義の検討 探索的研究」において採取された血清サンプルについて、以下の項目の測定を行った。採血は麻酔導入直後 (Baseline)、手術直後 (PostOp)、手術の翌日 (POD1) の 3 点で行われた。

血清中の dsDNA 濃度、DNaseI の活性および抗原濃度

手術前および手術翌日の血清クレアチニン値

人工呼吸期間、手術終了直後および手術翌日の胸部 X 線写真

上記のデータと血清 dsDNA 濃度や DNaseI 活性との相関について検討し、腎機能障害、肺傷害、との相関について検討した。

(2) 呼吸器外科手術における周術期の NETs 形成に関する検討

東京医科歯科大学医学部附属病院における呼吸器外科手術 90 症例において、(1)と同様に、麻酔導入後手術前、手術終了直後、手術翌日の 3 回採血を行い、血清中の二重鎖 DNA 濃度、DNase の活性および DNaseI の抗原濃度を測定し、手術前から手術翌日までの血清クレアチニン値の変化ならびに、血漿 D-ダイマー濃度との相関について検討した。

4. 研究成果

(1) 心臓手術における周術期 NETs 形成の動態と周術期腎機能障害の関係に関する検討

血清中の二重鎖 DNA 濃度は、Baseline においては、中間値 398 ng/mL [四分位範囲 372-475 ng/mL]であったが、手術直後には 540 ng/mL [437-682 ng/mL]まで上昇し、POD1

までに 323 ng/mL [256-436 ng/mL]) まで減少した (図 2)。

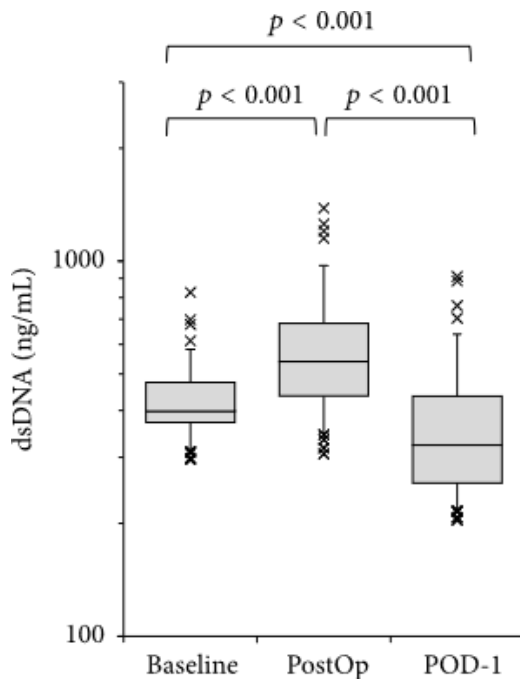


図 2 心臓手術における血清二重鎖 DNA 濃度の推移

一方、血中の DNase-I 活性は、術直後に著しく低下し、血清二重鎖 DNA の濃度上昇と関連があると考えられた (図 3)。

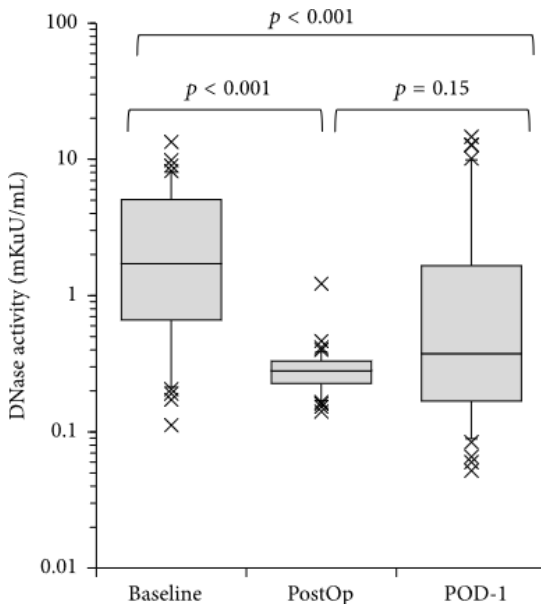


図 3 心臓血管手術患者における周術期 DNase 活性の推移

POD1 における血清二重鎖 DNA 濃度と血清クレアチニン濃度の周術期上昇度を見るとの関係を見ると、スピアマンの相関係数 $R_s=0.61$ であり、血清クレアチニン濃度が 0.3mg/dL

以上上昇した 22 例では、血清 2 重鎖 DNA 濃度が有意に高値を示した (図 4)。

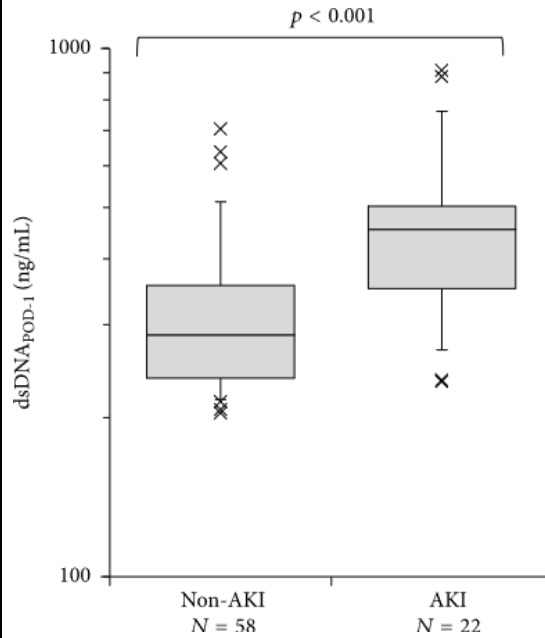


図 4 術前から血清クレアチニンの動画 0.3mg/dL 以上上昇した症例における血清 2 重鎖 DNA 濃度：クレアチニン上昇がみられなかった症例と比較して、有意に高値を示した。

(2) 呼吸器外科手術における周術期の NETs 形成に関する検討

東京医科歯科大学医学部付属病院における呼吸器外科手術 78 症例において、麻酔導入後、手術開始前、手術終了直後、手術翌日の 3 回採血を行い、血清中の遊離二重鎖 DNA 濃度を測定し、炎症性サイトカイン IL-6 および血管内皮透過性の指標である angiopoietin-2 の測定値と比較検討した。血清二重鎖 DNA 濃度の中央値 (四分位範囲) は、麻酔導入直後手術開始前が 220 (174-275) ng/mL、手術終了直後 214 (176-271) ng/mL と、術中から手術直後にかけては有意な変化がなかったが、手術翌日は 316 (270-365) ng/mL となり、手術翌日にかけて、有意な上昇が認められることが明らかになった。しかし、この血清遊離二重鎖 DNA 濃度の上昇と、IL-6, Angiopoietin-2 濃度との間では 3 つの測定店のいずれにおいても有意な相関は認められなかった。また、血清クレアチニン値が 0.3mg/dL 以上上昇した症例も存在しなかったため、腎機能低下との関係について、一定の傾向は明らかにならなかった。

(3) 考察

今回、心臓血管手術や呼吸器外科手術において、術後一定の時間帯に血清 2 重鎖 DNA 濃度が上昇することが示された。特に心臓外科症例においては、術直後の上昇度が大きく、POD1 にかけて、上昇が続く症例では、血清クレアチニンの上昇が大きいことが示唆され

る結果となった。
ただし、血清二重鎖 DNA 濃度の測定だけからは、この遊離 DNA の由来がわからないという、方法論上の限界があり、今後の検討が待たれる。この点に対して、近年提唱されているフローサイトメーターによる定量法の導入を図ったが、方法論的に確立したものとならず、この方法で成果を得るには至らなかった。今後、周術期の腎機能障害のメカニズムにおける一つの可能性として、検討する余地があるように思われる。

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1件)

Yu Qi, Tokujiro Uchida, Mamoru Yamamoto, Yudai Yamamoto, Koji Kido, Hiroyuki Ito, Nagara Ohno, Miho Asahara, Yoshitsugu Yamada, Osamu Yamaguchi, Chieko Mitaka, Makoto Tomita, Koshi Makita. Perioperative Elevation in Cell-Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction. Anesthesiol Res Pract 2794364, 2016
DOI: 10.1155/2016/2794364 (査読有)

[学会発表](計3件)

内田篤治郎, 伊藤裕之. シンポジウム 外科医の求める麻酔管理と答える麻酔科医 腹腔鏡下肝臓外科手術の麻酔管理 日本臨床麻酔学会 第 37 回大会 東京都港区 2017.11.3

内田篤治郎, 三高千恵子. シンポジウム AKI の治療法: 心房性 Na 利尿ペプチド. 日本麻酔科学会 第 64 回学術集会兵庫県神戸市 2017.6.8.

Yudai Yamamoto, Tokujiro Uchida, Hiroyuki Ito, Koji Kido, Mamoru Yamamoto, Yoshitsugu Yamada, Nagara Ohno, Miho Asahara, Osamu Yamaguchi, Koshi Makita. Perioperative Elevation in Cell Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction: A Multicenter Observational Study. Anesthesiology 2015, San Diego, USA, 2015.10.24

[図書](計3件)

内田篤治郎 麻酔科医として必ず知っておきたい周術期の呼吸管理 第 1 章 呼吸器系の機能解剖と臨床麻酔 3. 下気道,

肺胞, 呼吸筋: 酸素化と換気 (磯野史朗 編) 2017 年 1 月 羊土社

内田篤治郎 麻酔科医として必ず知っておきたい周術期の呼吸管理 第 8 章 術前呼吸器系合併症とその対策 5. 喘息 (磯野史朗 編) 2017 年 1 月 羊土社

内田篤治郎 最先端外科手術の麻酔管理: IV 消化器外科領域 3. 腹腔鏡下肝臓手術 (稲垣喜三 編) 2016 年 6 月克誠堂出版

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5110877/>

<https://www.hindawi.com/journals/arp/2016/2794364/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 篤治郎 (UCHIDA, Tokujiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 40262183

(2) 研究分担者

槇田 浩史 (MAKITA, Koshi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・名誉教授
研究者番号: 20199657

三高 千恵子 (MITAKA, Chieko)

順天堂大学医学部・特任教授
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師
研究者番号: 20126254

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし