

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08660

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップ(NETs)の臨床検査医学的評価法の確立

研究課題名(英文)Establishment of clinical and pathological evaluation method of NETs

研究代表者

西郷 勝康(Saigo, Katsuyasu)

姫路獨協大学・看護学部・教授

研究者番号：20304107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好中球細胞外トラップ(NETs)は、抗菌作用の他に組織傷害や敗血症、血栓症、がんの転移、動脈硬化など多彩な作用を示す。我々はヘミンのNET作用について検討し、短時間でNETを誘導すること、酸化ストレスの存在により増強されることを見出した。さらにdeferasirox、アセテートがNETを抑制することも確認した。またNET形成の必要条件である好中球の活性化を、空胞形成を指標として自動血球係数装置で定量観察可能であることを見出した。臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil extracellular traps are related to tissue damage, sepsis, thrombosis, cancer metastasis, and arteriosclerosis in addition to antibacterial activity. We have studied the effect of hemin on NET producing effects. Hemin induced NETs in a short period, and that was enhanced by the presence of oxidative stress. Deferasirox and acetate inhibited NET formation. Neutrophil activation, prerequisite for NET, was quantitatively detectable by using automated hematology analyzer. These results help the understanding of NET biology and provide a possible clinical detection method.

研究分野：血液病学

キーワード：好中球 細胞外トラップ ヘミン デフェラシロクス アセテート 自動血球計数装置

1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ現象 (NET) は、強力な抗菌作用を示す他に、組織傷害や敗血症、血栓症、がんの転移、動脈硬化など多彩な作用を示す。このような現象を増悪させる因子を明らかにすること、より簡便に検出し臨床に応用することは極めて重要である。

これまでに NET 形成促進因子として、PMA が *in vitro* 研究では多用され、そのほかエンドトキシン、TNF α 、免疫複合体など様々なものが利用され、我々も含め複数のグループからヘムタンパク (ヘミン) が好中球を活性化させる可能性が示されている。またわれわれは、ヘミンが PMA より、より短時間で NET を誘導することをすでに報告した (Transfusion, 2014)。

生体内での NET 現象検出は、放出された DNA、あるいは DNA-ミクロペロキシダーゼ複合体、などを測定する方法が時に応用されているが、より簡便な方法の確立が臨床的には重要であると考えられている。

2. 研究の目的

2-1 微小な溶血は、敗血症をはじめとした重症病態の進展に寄与すると報告されている。そこでヘミンによる好中球活性化が、NET 形成を引き起こすか否か、その特徴、増強因子、抑制因子、などについて明らかにすることを目的とした。

2-2 同時に臨床的にも応用可能な、簡便な検出法の確立をめざすことを目的とした。

なお、いずれの研究も姫路獨協大学生命倫理委員会にて承認されている。

3. 研究の方法

3-1 *In vitro* での NET 形成は、主に Syox Green を用いた蛍光顕微鏡、あるいは共焦点レーザー顕微鏡、による形態観察、および遊離核酸を定量する方法でおこなった。

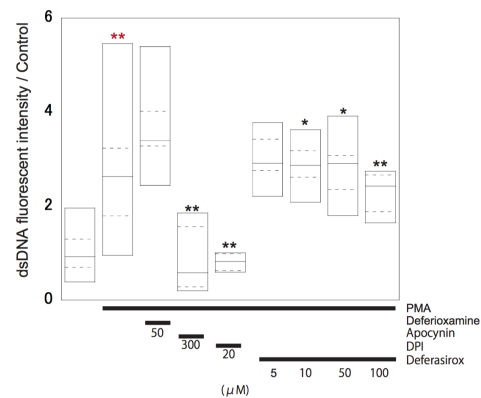
3-2 一般臨床で頻繁に利用されている血球計数装置、あるいはフローサイトメトリーによる検出から可能性を推察し、さらに血球計数機でも反映させることの可能性について検討した。

4. 研究成果

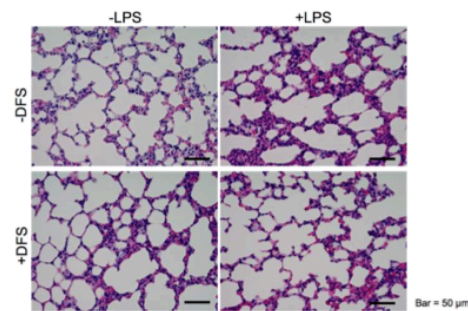
4-1 ヘミンが短時間で NET を形成させることはすでに報告した (Transfusion 2014)。この研究期間では NET を抑制する因子について検討した。

鉄キレート剤 deferasirox は、desferral と異なり好中球活性酸素種 (ROS) 産生を抑制す

ることをすでに報告した (J Clin Med Res, 2013)。そこで本剤が NET を抑制するかどうかを検討したところ、形態的にも、また放出 DNA 定量においても抑制作用が確認され報告した (雑誌論文④)。

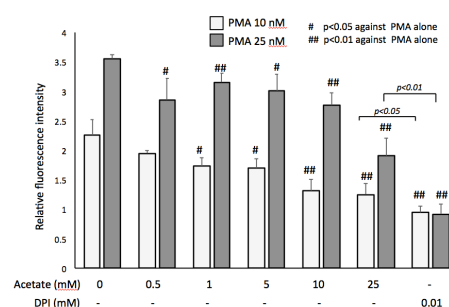


なお deferasirox による抑制は、マウス肺障害モデルを用いた *in vivo* 検討でも確認でき、投稿準備中である。



一方、ヘミンによる NET 形成を増強させる因子について検討し、少量の過酸化水素の存在が増強因子であることを認め、雑誌論文③として報告した。

さらに短鎖脂肪酸であるアセテートの免疫抑制作用に着目し、アセテートが NET 形成を抑制するか否かを検討した。腸管内濃度のアセテートは、マイルドに NET 形成を抑制し、炎症性長症候群での治療メカニズムの一つの要因であろうと推測された (雑誌論文①)。

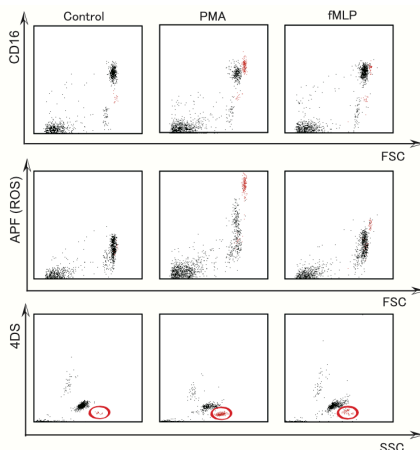


4-2 臨床的に応用可能な簡便検出法につき、主にフローサイトメトリー法の応用を試みた。

当初 NET を放出した好中球を検出することを試みたが、非特異的反応が強く、定量化に応用することは不可能であった。

そこで、NET 形成の必要条件である ROS 産生を簡便に計測する方法の確立を目指した。ROS 産生を直接検出するには、特殊な試薬の使用が必要であり、われわれは ROS 産生時に随伴して発生する空胞形成を指標とする可能性について検討した。

空胞形成細胞はフローサイトメーターの SCC 増強として検出できることを見出したので、さらに自動血球計数装置への応用をこころみた。シスメックス社の血球計数装置を用いて検討したところ、好酸球領域に出現することが判明し、今後臨床的にも応用可能なプログラム作成をこころみたい（投稿中）。



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 7 件)

① Ayako Ohbuchi, Mari Kono, Mariko Takenokuchi, Shion Imoto, Katsuyasu Saigo. Acetate moderately attenuates the generation of neutrophil extracellular traps. *Blood Research*, in press

② 大淵絢子、河野麻理、炬口真理子、井本しおん、西郷勝康. ミニレビュー、鉄キレート療法の多彩な効果. *兵庫県医師会医学雑誌* 印刷中

③ Ohbuchi A, Kono M, Kitagawa K, Takenokuchi M, Imoto S, Saigo K. Quantitative analysis of hemin-induced neutrophil extracellular trap formation and

effects of hydrogen peroxide on this phenomenon. *Biochem Biophys Rep*. 2017;11:147-153.

doi: 10.1016/j.bbrep.2017.07.009.

④ Kono M, Saigo K, Yamamoto S, Shirai K, Iwamoto S, Uematsu T, Takahashi T, Imoto S, Hashimoto M, Minami Y, Wada A, Takenokuchi M, Kawano S. Iron chelating agent, Deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap (NET) formation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016; 43: 915-920. doi: 10.1111/1440-1681.12612.

⑤ Saigo K, Mori C, Iwamoto S, Shirai K, Uematsu T, Takenokuchi M, Kono M, Imoto S. Recombinant thrombomodulin does not impair neutrophil functions. *J Thromb Thrombolysis*, 2015; 39: 536-538. doi: 10.1007/s11239-014-1137-7.

⑥ Takenokuchi M, Miyamoto K, Saigo K and Taniguchi T. Bortezomib Causes ER Stress-related Death of Acute Promyelocytic Leukemia Cells Through Excessive Accumulation of PML-RARA. *Anticancer Res* 2015; 35: 3307-3316.

⑦ Nakamura T, Ishida Y, Ainai K, Nakamura S, Shirata S, Murayama K, Kurimoto S, Saigo K, Murashige R, Tsuda S, Sasaki YF. Genotoxicity-suppressing effect of aqueous extract of *Connarus ruber* cortex on cigarette smoke-induced micronuclei in mouse peripheral erythrocytes. *Genes Environ* 2015; 37:17 DOI 10.1186/s41021-015-0009-5

[学会発表] (計 6 件)

①第64回日本臨床検査医学会 鎖脂肪酸アセテートによる好中球細胞外トラップ形成の抑制 2017

②第38回日本血栓止血学会 デフェラシロックスは急性肺傷害モデルマウスの好中球の活性化と細胞外トラップを抑制する 2017

③第63回日本臨床検査医学会 Sytox Greenを用いた NET 定量計測法の検討とヘミンの効果 2016

④第89回日本薬理学会 Hemin 誘発性 NETosis および鉄キレート剤の効果 (シンポジウム) 2016

⑤第78回日本血液学会 Detection method of neutrophil after extracellular trap formation using flow cytometry 2016

⑥ The 9 Congress of the Asia-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. Detection method of neutrophil after extracellular trap formation using flowcytometry. 2016

[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：
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

西郷 勝康 (SAIGO, Katsuyasu)
姫路獨協大学・看護学部・教授
研究者番号：20304107

(2) 研究分担者

炬口 真理子 (TAKENOKUCHI, Mariko)
姫路獨協大学・薬学部・准教授
研究者番号：10379430

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

河野 麻理 (KONO, Mari)
シスメックス株式会社・学術推進部

平松 靖史 (HIRAMATSU, Yasushi)

姫路赤十字病院・血液腫瘍内科・部長

山本 光輝 (YAMAMOTO, Mitsuteru)
バークレ動物病院・院長

岡村 明治 (OKAMURA, Akiharu)
加古川中央市民病院・病理部