

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10997

研究課題名(和文) 侵襲下における血管新生と血管透過性の動態解析：幹細胞移植による再生治療の試み

研究課題名(英文) Stem cell transplantation for vascular permeability and angiogenesis under surgical stress

研究代表者

武山 直志 (Takeyama, Naoshi)

愛知医科大学・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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：【背景】neutrophil extracellular traps (NETs) 形成を反映する血中ミエロペロキシダーゼ-DNA複合体(MPO-DNA)を敗血症性ショック患者において、測定し、臓器不全とNETs形成の関連を検討した。【方法】対象は敗血症性ショック患者55名。入室後1,3,7病日に、MPO-DNA,SOFAスコアを測定した。【結果】MPO-DNAは1,3,7病日に有意な増加を認めた。3,7病日のMPO-DNAはSOFAスコア、病院死亡と有意な相関を認めた。【結語】敗血症性ショックではNETs産生の高まっている。NETs産生の遷延は、臓器障害、予後悪化要因の一つであると推察された。

研究成果の概要(英文)：Aim: The objectives of this study were to investigate the correlations between plasma myeloperoxidase (MPO) conjugated-DNA level with degree of organ dysfunction, disease severity, and ICU mortality in septic shock patients. Results: On day 1, septic shock patients displayed a marked increase of plasma MPO-DNA level compared with the healthy volunteers. Plasma MPO-DNA levels were significantly decreased on days 3 and 7. The MPO-DNA level on 7th day was inversely correlated with both the mean arterial pressure and P/F ratio at 7th day. Negative correlation was observed between plasma MPO-DNA level on 1st day. Positive correlation was observed between plasma MPO-DNA level on 7th day and SOFA at 7th day. Using Wilcoxon signed-rank test the high MPO-DNA on 3rd day was found to be associated with the hospital mortality. Discussion: High MPO-DNA levels at 3rd and 7th days of septic shock patients are associated with the degree of organ dysfunction and hospital mortality.

研究分野：救急集中治療

キーワード：MPO-DNA 敗血症性ショック

## 1. 研究開始当初の背景

ネクローシス、アポトーシスなどの細胞死により放出される物質の多くは PAMPs と同様に pattern recognition receptors を介して炎症に関与する。この中で好中球においてはネクローシスやアポトーシスとは異なる細胞死をとることがあり、NETosis と呼ばれている。neutrophil extracellular traps (NETs) は微生物除去等の生理的役割を担う一方で、その過剰産生は臓器不全に関与すると推察されている。NETs は活性化された好中球により細胞外に放出された顆粒タンパクと DNA の核クロマチンにより網状に形成され、グラム陽性菌陰性菌に関わらず結合し捉えると 2004 年に初めて報告された全く新しい好中球の感染防御機能である。敗血症においては、全身各所で NETs が増加することが知られており、マウスを用いた検討では、cell-free (cf)-NETs、anchored NETs とともに盲腸の後毛細管細静脈、肝類洞で増加した。また肺胞腔、肺毛細血管にも観察され、血小板凝集や白血球血小板凝集により微小循環傷害を呈した (Tanaka K et al; PLoS One. 2014)。一方、NETs の形成される過程で、Histone、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)、エラスターゼなどの抗菌作用を有する細胞内物質が血中に放出されることにより、宿主に対しても傷害性を有する。それは血管内皮細胞や肺胞上皮細胞が標的となりやすい。NETs は自然免疫反応の一部で、histone や細胞内タンパク質、DNA を含んだ網目構造で、血小板の接着活性化凝集を促す。また NETs は赤血球を補捉、フィブリン形成を誘導し赤色血栓の形成も促している。cf-DNA は 深部静脈血栓患者の血漿からも検出されている (Fuchs TA et al; Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。NETs が細菌捕獲に働く一方でその構成成分の histone は高い殺菌作用と凝固促進活性

を有するため (Esmon CT et al; J Thromb Haemost. 2011)。血中に遊離した histone は組織傷害性を発揮し敗血症の増悪因子となり得る。また感染各所から漏出し全身血液中に回る NETs 放出物質 (cf-DNA, histone, MPO, 好中球エラスターゼ) が遠隔臓器障害を引き起こす一因になりうる

## 2. 研究の目的

従来から、NETs 形成の指標として血中 cf-DNA が測定されているものの、細胞壊死等の他の要因でも上昇する事が知られている。今回我々は、NETs 形成を特異的に反映する血中 MPO-DNA 複合体 (MPO-DNA) を敗血症性ショック患者において、経時的に測定し、臓器不全と NETs 形成の関連を検討した。

## 3. 研究の方法

対象は敗血症性ショック (sepsis 1 定義) 患者 55 名とした。年齢 68 歳。入室後 1,3,7 病日に、MPO-DNA (ELISA)、cf-DNA (Qubit)、IL-6、IL-8 (ELISA)、SOFA スコアを測定した。対照は年齢をマッチさせた健康人 13 名とした。

## 4. 研究成果

Table 1. に敗血症性ショック症例と健康対照の背景を示す。両群間に年齢、性別で有意差を認めない。ICU 滞在日数は 10 日間であった。敗血症性ショックの原因として 56% が腹腔内感染で最も多く、次いで呼吸器感染、腎・尿路感染と続く。検出菌種はグラム陰性桿菌が 62% であった。APACHE II スコアは 23 点、SOFA スコアは 12 点であった。28 日死亡率は 33% であった。DIC 合併率は 53%、人工呼吸器装着率は 85%、外科的処置施行は 47% であった。日和見感染と考えられた症例は 15% を占めた。血液中 IL-6、IL-8 共に高値を示した。MPO-DNA は 1,3,7 病日に (図 1A)、cf-DNA は 1 病日に有意な増加を認めた (図 1B)。3,7 病日の MPO-DNA は平均血圧 (図 2B)、P/F 比 (図

2A)と有意な逆相関を認め、

表 1 患者背景

| Characteristic                       | Patients                 |                         | P value |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|
|                                      | with septic shock (n=55) | Control subjects (n=13) |         |
|                                      | Median (IQR)             | Median (IQR)            |         |
| Age, y/o                             | 68 (55, 79)              | 60 (49, 71)             | 0.47    |
| Male, No. (%)                        | 39 (71)                  | 8 (62)                  | 0.96    |
| ICU stay, days                       | 10 (7, 18)               | n/a                     |         |
| Site of infection, No. (%)           |                          | n/a                     |         |
| Abdomen                              | 31 (56)                  | -                       |         |
| Respiratory tract                    | 10 (18)                  | -                       |         |
| Urinary tract                        | 9 (16)                   | -                       |         |
| Skin/Soft tissue                     | 4 (7)                    | -                       |         |
| Others                               | 1 (2)                    | -                       |         |
| Community/hospital infections, l (%) | 8 (15)                   | n/a                     |         |
| Pathogen, No. (%)                    |                          | n/a                     |         |
| Gram positive                        | 14 (27)                  |                         |         |
| Gram negative                        | 33 (62)                  |                         |         |
| Both                                 | 7(13)                    |                         |         |
| Fungi                                | 1 (2)                    |                         |         |
| APACHE II score                      | 23 (20, 27)              | n/a                     |         |
| SOFA score                           | 12 (9, 13)               | n/a                     |         |
| Comorbidities                        |                          | None                    |         |
| 0, No. (%)                           | 32 (58)                  | -                       |         |
| >1, No. (%)                          | 23 (42)                  |                         |         |
| Surgical intervention, No. (%)       | 26 (47)                  | n/a                     |         |
| DIC, No. (%)                         | 29 (53)                  | n/a                     |         |
| Mechanical ventilation, No. (%)      | 47 (85)                  | n/a                     |         |
| 28-day mortality, No. (%)            | 18 (33)                  | n/a                     |         |
| Plasma cytokine level, pg/ml         |                          |                         |         |
| IL-6                                 | 850                      | 28 (25, 32)             | <0.001  |
| IL-8                                 | 380                      | 51 (42, 68)             | <0.001  |

SOFA スコア(図 2C)、病院死亡と有意な相関を認めた(図 3)。一方 cf-DNA はこれらのパラメータと相関を認めなかった(図 2A, B,

C)。MPO-DNA、cf-DNA 共に DIC スコアとの相関は認めなかった。本研究で敗血症性ショック初期において NETs 産生の高まっていることが明らかになった。NETs 産生の遷延は、臓器障害発生、予後悪化要因の一つであると推察された。今回の検討では DIC と NETs の関連を認めなかった。

図 1 A 経時的な MPO-DNA の推移

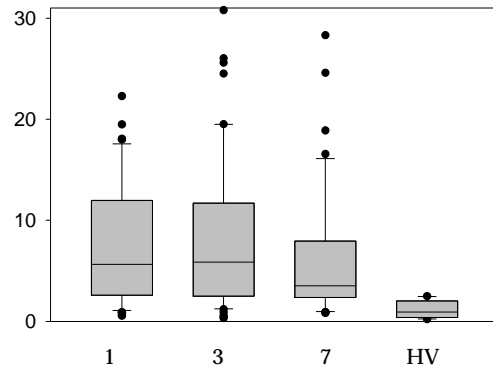


図 1B 経時的な cf-DNA の推移

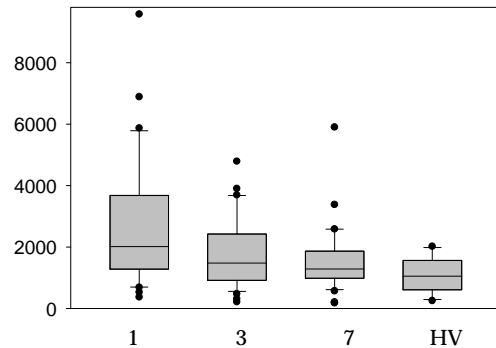
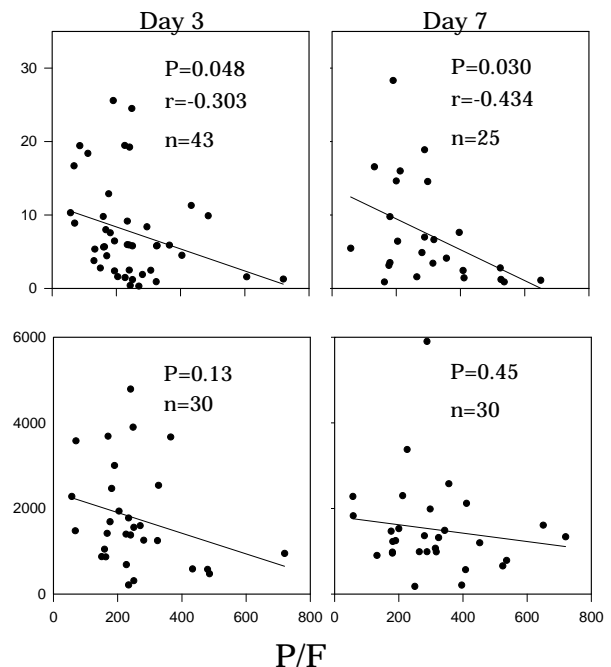


図 2A MPO-DNA, cf-DNA と P/F 比の相関



P/F

図 2B MPO-DNA, cf-DNA と MAP の相関

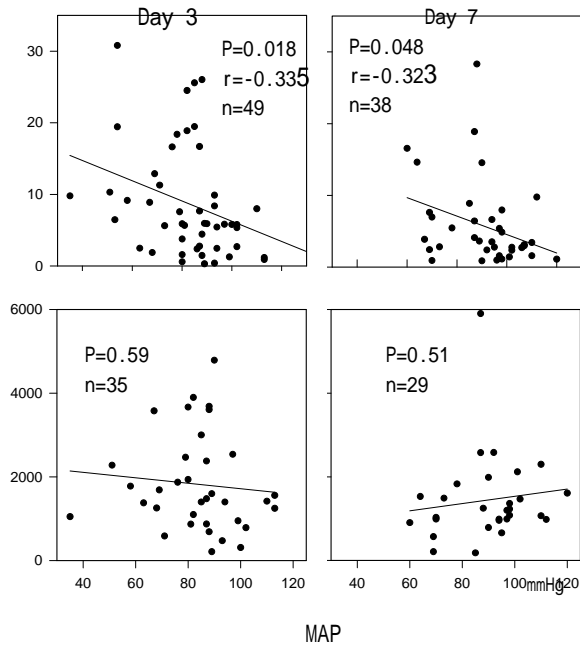


図 2C MPO-DNA, cf-DNA と SOFA の相関

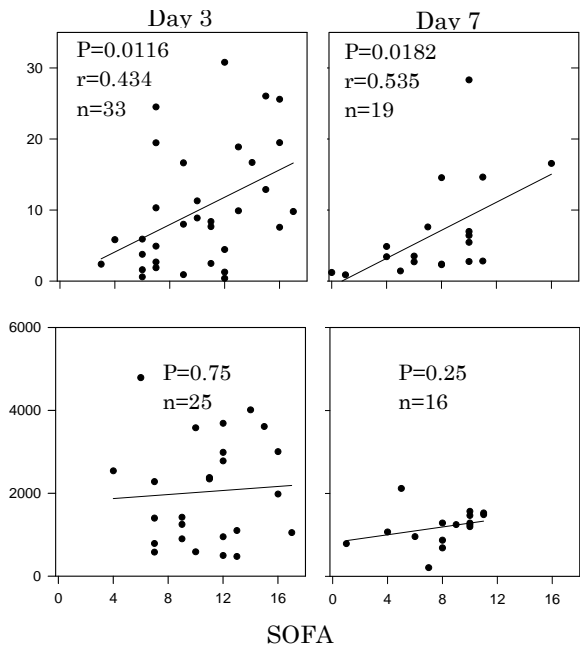
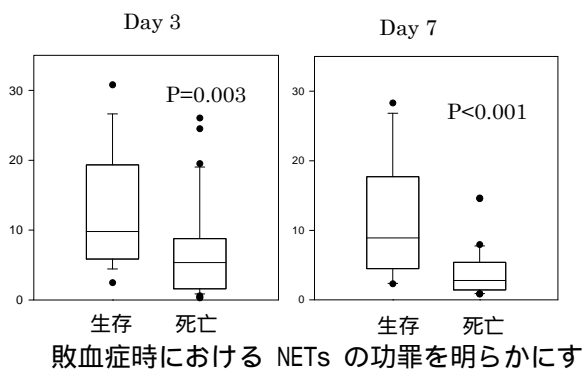


図 3 予後別に見た MPO-DNA 値



敗血症時における NETs の功罪を明らかにす

るにはさらなる検討が必要である。

### 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) Assessment of mortality by qSOFA in patients with sepsis outside ICU: A post hoc subgroup analysis by the Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry Study Group. Umemura Y, Ogura H, Gando S, Kushimoto S, Saitoh D, Mayumi T, Fujishima S, Abe T, Ikeda H, Kotani J, Miki Y, Shiraishi SI, Shiraishi A, Suzuki K, Suzuki Y, Takeyama N, Takuma K, Tsuruta R, Yamaguchi Y, Yamashita N, Aikawa N; JAAM Sepsis Registry (JAAMSR) Study Group. J Infect Chemother 23: 757-762; 2017. 査読あり
- 2) Early evaluation of severity in patients with severe sepsis: a comparison with “septic shock”—subgroup analysis of the Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM-SR). T Tarui, Y Yamaguchi, K Suzuki, R Tsuruta, H Ikeda, H Ogura, S Kushimoto, J Kotani, S Shiraishi, Y Suzuki, K Takuma, N Takeyama, S Fujishima, T Mayumi, Y Miki, N Yamashita, N Aikawa, and S Gando. Acute Medicine & Surgery 4: 426–431; 2017. 査読あり
- 3) Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study. A Tomino, M Tsuda, R Aoki, Y Kajita, M Hashiba, T Terajima, H Kano, N Takeyama. PLOS ONE: DOI: 10.1371/journal.pone. 0169653 January 10; 2017. 査読あり
- 4) Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. Y Maruchi, M Tsuda, H Mori, N Takenaka, T

Gocho, AM Huq, and N Takeyama. Crit Care; under submission 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

- 1) Neutrophil extracellular traps induce organ damage during sepsis: protective effect of hemoperfusion with a polymyxin B cartridge. MA Huq, Y Kajita, Y Maruchi, Y Kato, A Tomino, R Aoki, H Mori, M Hashiba, T Terajima, M Tsuda, H Kano, and N Takeyama. International Shock Congress (Tokyo), 2016. 10
- 2) Altered T cell Repertoire Diversity and Increased PD-1 Expression Predict Mortality in Patients with Septic Shock. N Takeyama; M Tsuda; H Kano; R Aoki; Y Kajita; M Hashiba; T Terashima; A Tomino. 37<sup>th</sup> International symposium on Intensive Care and Emergency medicine (Brussels), 2017, 3
- 3) Plasma myeloperoxidase conjugated-DNA level as predictors of outcome and organ dysfunction in septic shock patients: possible therapeutic effect of hemoperfusion with a polymyxin B immobilized fiber column. N Takeyama; Y Maruchi; T Gocho; H Mori; N Takenaka; M Tsuda; H Noguchi. 38<sup>th</sup> International symposium on Intensive Care and Emergency medicine (Brussels), 2018, 3

〔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

武山 直志 (TAKEYAMA Naoshi)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00155053

(2) 研究分担者

野口 宏 (NOGUCHI Hiroshi)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20065569

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )