

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19681

研究課題名(和文) 新生児慢性肺疾患におけるmicrovesiclesの役割と免疫学的機序の解明

研究課題名(英文) The role and immunological mechanism of microvesicles in neonatal chronic lung disease

研究代表者

若林 健二 (Wakabayashi, Kenji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20723795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は近年の免疫学的手法の発展に伴って大きな技術的進歩を遂げている、細胞外小胞の一種であるmicrovesiclesの解析を通して新生児慢性疾患の病因を明らかにすべく計画された。本研究において好中球由来microvesiclesが実験的 newborn 慢性肺疾患モデルにおいて著増することが示され、新規バイオマーカーもしくは発症メカニズムの解明につながる可能性が考えられた。本研究は更に基盤研究(C)として発展し、継続研究がなされる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児慢性肺疾患は低出生体重児として出生後の新生児集中治療室治療後の最大の合併症であり、社会経済的にも影響が大きい疾患である。本研究は実験モデルを用いて、細胞外小胞の一種であるmicrovesicles(MV)、中でも好中球由来MVが肺内に増加することを示した。本研究は好中球由来MVが発症メカニズムにおいて重要な役割を果たしている可能性を示唆し、加えて病状を反映する新規指標になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Bronchopulmonary dysplasia (BPD) remains a major complication of premature birth. Although the underlying mechanism for the evolution of BPD has not been well elucidated, intra-alveolar inflammation caused by various factors such as perinatal infection, mechanical ventilation, and hyperoxia is considered to play an important role. Extracellular microvesicles (MVs) carry a variety of molecules (proteins, lipids, RNAs, etc) as their cargo and their expression of surface markers allow us to identify parental cells, making them an informative biomarker in various inflammatory diseases. In this study, we investigated MV numbers and their subtypes within the alveolar space during the development of BPD in mice. We demonstrated, for the first time, that neutrophil-derived MVs increased within intra-alveolar space in the very early stage of BPD. Our findings suggest that intra-alveolar neutrophil-derived MVs may serve as a useful early biomarker of BPD, which warrants further investigation.

研究分野：集中治療医学

キーワード：新生児医学 集中治療医学 呼吸病学 生理学 免疫学 慢性肺疾患 細胞外小胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出生後のNICU内におけるCLD進行防止の為に有効とされる主な治療は、水分制限や人工呼吸器設定調整などの支持療法がその中心である。病因に関しては、胎内・生後のステロイド投与がCLDの予防や、一時的な呼吸状態改善に効果を上げる事などから、炎症性サイトカインのCLDにおける影響は大きな話題の一つである。一方で詳細な病態生理には不明な点も多く、分子標的薬などのより選択的かつ効果的である可能性を有する治療法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は近年のフローサイトメトリー (FACS)の発展に伴って大きな技術的進歩を遂げている、microvesicles (MV)の解析を通してCLDの病因を明らかにすべく計画された。本研究の主たる目的としては、以下の3つであった。

- 1) 新生児マウスとヒト血液検体を用いたMVの解析手法の確立
- 2) マウス新生児慢性肺疾患モデルにおけるMVの動態
- 3) 新生児慢性肺疾患症例の臨床検体を用いたMVの解析

3. 研究の方法

1)に関しては、新生児マウス検体とヒト血液検体を用いたMV測定手技確立と、採取・保存条件による安定性評価を初期に行った。具体的にはヒトボランティア血液検体を用いたMV測定におけるFACS設定の調整を行い、加えて多施設研究を見越した検体保存条件の違いによる影響の解析を行った。

2)に関しては、高酸素曝露にて誘導される新生児慢性肺疾患マウスモデルの改良を行い、再現性と信頼性の高い実験モデルを樹立した。具体的にはC57BL/6新生児マウスを高酸素 ($F_{I}O_2$ 0.8, BPD群)もしくは空気 ($F_{I}O_2$ 0.21, Ctrl群)に1-3週間曝露してBPDモデルを作成。FACSを用いて肺胞洗浄液 (BALF)中のMVを解析した。MVの由来(親細胞)は細胞特異的表面マーカー(好中球: CD45+CD11b、肺胞マクロファージ: CD45+CD11c)を用いて同定した。成人と新生児の差異を見るためにC57BL/6成熟オスマウスを高酸素 ($F_{I}O_2$ 0.8, 高酸素群)もしくは空気 ($F_{I}O_2$ 0.21, Ctrl群)に5日間まで曝露した後にBALF中のMVも解析を行った。

4. 研究成果

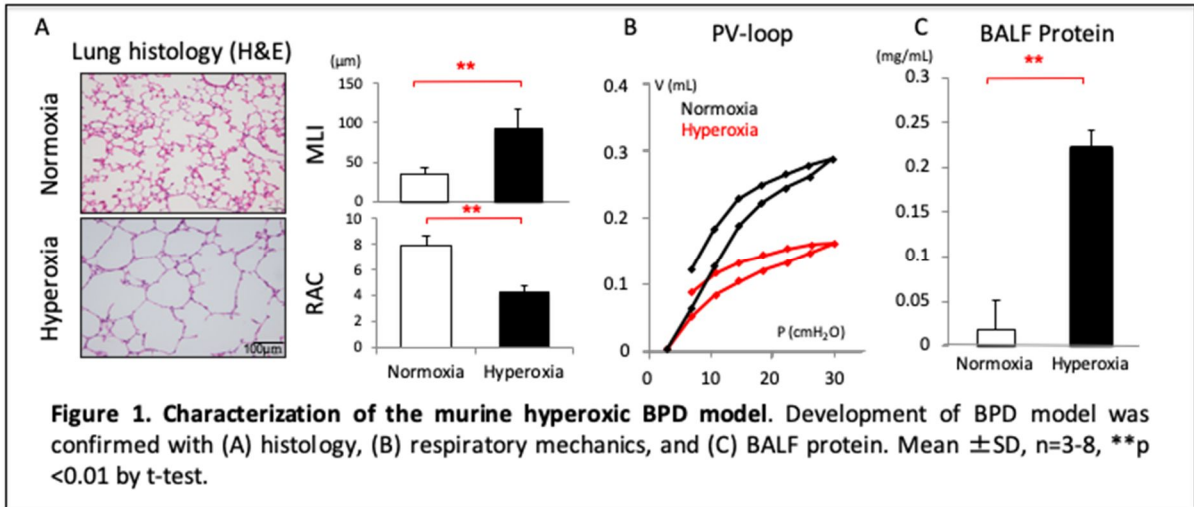
(1) MV解析手法の確立

細胞外小胞の測定は標準手法が世界的に未だ確立されていないことも有り、サンプルの採取手技・保存方法・実験プロトコールなどの確立は重要である。特に本研究においては他施設臨床現場における採血と保存、その後の測定というプロセスによって測定系が大きな影響を受けないことが重要と考えられた。我々はヒトボランティア血液検体を用いて主に好中球由来MVの測定を行い、MV数のカウントに再現性があること、1週間単位の冷凍保存でも大きな影響を受けないことを確かめた。

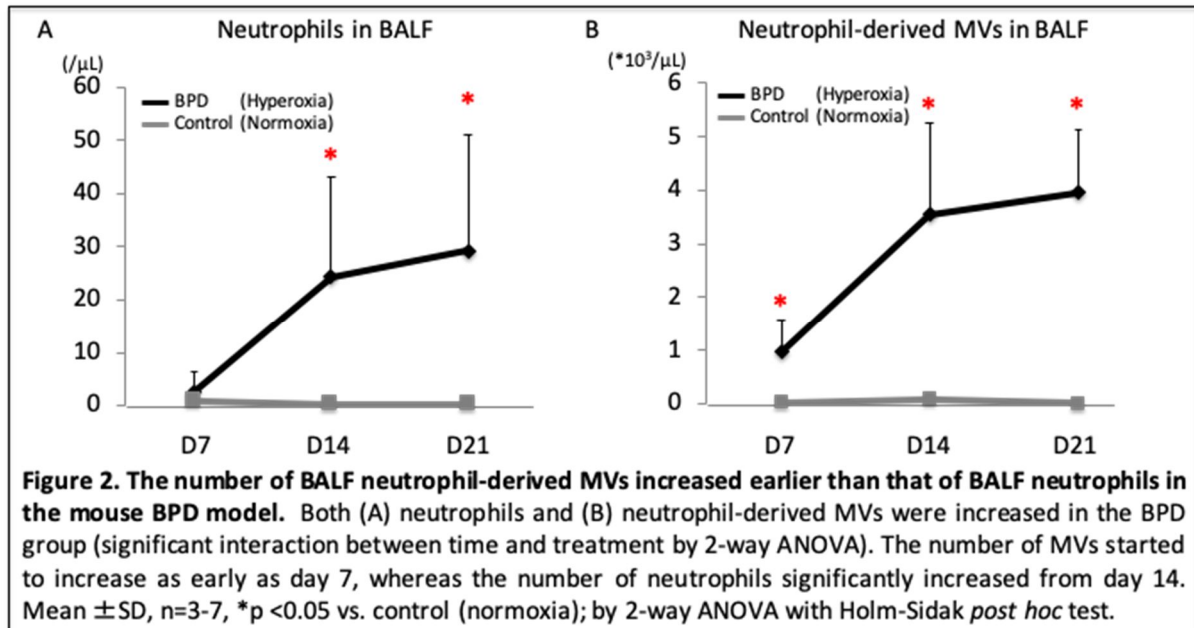
また、検体の種類によって異なる微粒子の存在によって細胞外小胞の測定は影響を受けることが知られている。例えば血液中のリポ蛋白や肺胞洗浄液のサーファクタントはMVと同様の脂質から形成される粒子であるが、FACSによって表面マーカー検出されることをMVの定義として組み入れることで、影響の除外が可能となる。加えて我々は肺胞洗浄液中のMV数についても再現性が得られることを確認した上で、次のステップの実験に進むこととした。

(2) マウス新生児慢性肺疾患モデルにおけるMVの動態

マウス新生児慢性肺疾患モデルの特性をFig.1に示すが、組織学的・呼吸生理学的・肺傷害の程度何れも認めており、我々のプロトコールにて高い再現性を持った病態モデルを形成することが示された。



本モデルを用いて肺胞洗浄液 (BALF)中のMVを測定したところ (Fig.2)、BALF中肺胞マクロファージ由来 (AM-derived) MVは、全ての週においてBPD群とCtrl群で有意差を認めなかったが (図b)、好中球由来 (PMN-derived) MVは1週時点からBPD群で有意に増加していた (図a)。



上記の結果より、BPD群において高酸素暴露後早期から継続して肺胞内PMNの著明な活性化が認められた。BALF中のPMN由来MVは新規バイオマーカーとして臨床応用できる可能性に加え、その内容物の解析を通してBPD発症機構を明らかにできる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tatham Kate Colette, O'Dea Kieran Patrick, Romano Rosalba, Donaldson Hannah Elizabeth, Kenji Wakabayashi, Patel Brijesh Vipin, Thakuria Louit, Simon Andre Rudiger, Sarathchandra Padmini, Marczin Nandor, Takata Masao.	4. 巻 73
2. 論文標題 Intravascular donor monocytes play a central role in lung transplant ischaemia-reperfusion injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 THORAX	6. 最初と最後の頁 350-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 若林健二	4. 巻 29
2. 論文標題 肺傷害は多臓器不全を励起する？	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 救急・集中治療	6. 最初と最後の頁 385, 390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wilson MR, Wakabayashi K, Bertok S, Oakley CM, Patel BV, O'Dea KP, Cordy JC, Morley PJ, Bayliffe AI, Takata M	4. 巻 8
2. 論文標題 Inhibition Of TNF Receptor p55 By A Domain Antibody Attenuates The Initial Phase Of Acid-Induced Lung Injury In Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2017.00128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 若林健二	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 肺傷害は多臓器不全を惹起する？	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 救急・集中治療 多臓器不全 -その常識は正しいか？-	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoichi Iki, Shotaro Matsumoto, Michiko Abe, Kieran P. O'Dea, Hidenobu Shigemitsu, Masao Takata, Kenji Wakabayashi
2. 発表標題 Microvesicles are absorbed on the surface of extracorporeal membrane oxygenation circuit tubing
3. 学会等名 Annual Meeting of International Society of Extracellular Vesicles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本正太郎、壹岐陽一、阿部迪子、重光秀信、高田正雄、若林健二
2. 発表標題 高酸素慢性肺疾患モデルにおいて肺胞洗浄液中の好中球由来microvesicleは増加している
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若林健二
2. 発表標題 Translational research in critical care - Ventilator-induced lung injury and beyond -
3. 学会等名 第6回救急・集中治療・家庭医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Mishima, K. Wakabayashi, H. Shigemitsu
2. 発表標題 A Ten-minute Lecture Impacted the Interpretation of Do-Not-Attempt-Resuscitation Order in Resident Physicians in Japan
3. 学会等名 American Thoracic Society Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsui Y, O' Dea KP, Uchida T, Takata M, Wakabayashi K
2. 発表標題 Pro-inflammatory Activity of Granulocyte-derived Microvesicles is Potentiated by Endotoxin Pre-stimulation
3. 学会等名 American Thoracic Society Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若林健二
2. 発表標題 人工呼吸関連肺傷害における炎症の役割
3. 学会等名 第8回新生児科指導医教育セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若林健二
2. 発表標題 基礎からはじめる人工呼吸器関連肺傷害 -過去から現在、そして未来へ -
3. 学会等名 第45回日本集中治療医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 若林健二
2. 発表標題 Biotraumaの観点から見た肺傷害と多臓器不全のメカニズム
3. 学会等名 第38回日本呼吸療法医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kenji Wakabayashi, Tomoy Tateishi, Yushi Adachi, Naohiko Inase, Koichi Nakazawa
2. 発表標題 Ventilator settings and outcome of noninvasive and invasive ventilation for patients with acute respiratory failure on chronic interstitial lung disease
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水敬樹、若林健二 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 719
3. 書名 ICU実践ハンドブック改訂版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者詳細 http://reins.tmd.ac.jp/html/100009240_ja.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森丘 千夏子 (Morioka Chikako)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高田 正雄 (Takata Masao)		
連携研究者	重光 秀信 (Shigemitsu Hidenobu) (50265782)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
連携研究者	内田 篤治郎 (Uchida Tokujiro) (40262183)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
連携研究者	滝 敦子 (Taki Atsuko) (20614481)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	