

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17072

研究課題名(和文) NETs形成抑制による敗血症性多臓器不全の新たな治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for septic multiple organ failure by suppressing NET formation

研究代表者

加藤 由布 (KATO, YU)

藤田医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：50773412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、敗血症の病態悪化にNeutrophil Extracellular Traps (NETs) の関与が注目されている。本研究では多臓器におけるNETs の形成とリコンビナントトロポモジュリン(rTM) によるその抑制効果を検討した。敗血症モデルマウスにrTMを投与した結果、72時間後の生存率は100%に改善し、臓器内のNETs形成を防止、サイトカイン濃度の上昇は抑制された。TMが臓器内でのNETs形成を抑制したことにより、immunothrombosisの拡大を防止、組織障害と微小血管閉塞を防ぐことで、炎症を抑え、生存率が改善された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NETs が過剰に産生されたり、うまく分解されないなどの制御不全がおこると様々な炎症性疾患、自己免疫疾患、血栓性疾患につながる事が報告されている。NETs の放出を適切に制御することは、様々な炎症性疾患や病態に対する新たな治療戦略として注目されている。rTM が臓器内のNETs 形成を阻害する可能性を解明することにより、凝固反応と炎症反応といったrTM の免疫機構への新たな作用機序を明らかにし、rTM 製剤の投与タイミングや抗炎症作用などを明確にできれば臨床の現場において新たな治療戦略をもたらすと考えている。

研究成果の概要(英文)：Innate immune system, neutrophil extracellular traps (NETs) formation is also associated with thrombogenesis and vascular endothelial injury. Circulatory disorders due to microvascular thrombogenesis are one of the principal causes of organ damage. NET formation in organs contributes to the deterioration of sepsis. Here, we aimed to show that thrombomodulin (TM)-mediated suppression of NET formation protects against organ damage in sepsis. In the LPS-induced murine sepsis model, extracellular histones, which are components of NETs, were observed in the liver and lungs. In addition, serum cytokine levels increased. Administration of recombinant human soluble thrombomodulin (rTM) to this model prevented NET formation in the organs and suppressed the increase in the levels of cytokines. Furthermore, the survival rate improved. We provide a novel role of TM to treat of inflammatory and NETs in organs during sepsis.

研究分野：敗血症

キーワード：NETs 敗血症 リコンビナントトロポモジュリン(rTM) 臓器障害 多臓器不全 DIC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は世界中の国や地域において主要な死因となっており、有効な治療法の確立が急がれている。敗血症とは、細菌・ウイルス・真菌が引き起こす感染症による全身炎症に臓器障害が加わった病態である。重症化し、多臓器不全や播種性血管内凝固症候群 (DIC) に移行すると死に至る。多臓器不全の病態として、壊れた組織や炎症細胞から放出される細胞外ヒストンによる内皮細胞の傷害や血小板凝集がその原因ではないかといわれている。(文献 2)

近年、好中球の新たな機能である好中球細胞外トラップ (NETs) が注目されている。NETs は、血小板により活性化された好中球が放出するヒストンや DNA を含んだ網目状の構造物で、病原体を捕捉・殺菌し、病原体が全身に広がるのを防いでいる(文献 1)。重度の感染症では、過度の NETs 形成が臓器不全の原因ではないかと考えられている(文献 2)。私たちは最近、DIC 治療薬であるリコンビナントトロンボモジュリン (rTM) が、敗血症モデルマウスにおける肝臓での過剰な NETs 形成を抑制することを発見した。(文献 3)

【参考文献】

1. Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532-1535.
2. J. Xu, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15, 2009:1318-1321.
3. Shimomura Y, Suga M, Kuriyama N, Nakamura T, Sakai T, Kato Y, Hara Y, Yamashita C, Nagasaki H, Kaneki M, Nishida O. Recombinant human thrombomodulin inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro. *J Intensive Care* 2016; 4:48.

2. 研究の目的

敗血症の国際的な定義が 2016 年に改訂され、「臓器障害」を重視した新定義となった。近年新たに発見された、好中球の自然免疫機構の 1 つである NETs が、過剰形成されることが敗血症の重症化、多臓器不全に関与しているといわれている。我々は、in vitro のヒト好中球・血小板培養実験において、rTM が LPS 誘導性の NETs 形成を抑制することを報告した。この成果をもとに、本研究では多臓器における NETs の形成と rTM によるその抑制効果を検討することを目的とする。rTM が臓器内の NETs 形成を抑制するという着想は全くなく、本研究は敗血症治療において新たな治療戦略として期待される。

3. 研究の方法

敗血症による過剰な NETs 形成が原因で、多臓器不全に移行するのを防ぐのに rTM が有効であることを次の 3 つの研究により調べる。

敗血症モデルマウスへの rTM 投与による各臓器内の NETs の確認
敗血症モデルマウスの肝臓、肺、腎臓などの臓器を NETs の構成成分である Histone と Myeloperoxidase (MPO) で免疫蛍光染色する。

敗血症モデルマウスの炎症性サイトカインの血中濃度と rTM 投与によるその変化
敗血症モデルマウスにおいて、rTM 投与群と rTM 非投与後で変化がみられるサイトカインを発見し、それらが rTM 投与によって変化するか検討する。

敗血症患者における血中の NETs 形成量と rTM 投与によるその変化
敗血症患者に rTM 製剤を投与することにより、NETs 形成抑制効果があるかを患者サンプルを使用して検討する。

4. 研究成果

マウスに LPS を投与し、72 時間生存率が 50% となる敗血症モデルマウスを確立した。このモデルに、LPS 投与後、rTM を投与した。rTM を投与した群は敗血症モデルマウスの 72 時間後の生存率を 100% に改善した。

敗血症モデルマウスにおける rTM 投与群と rTM 非投与群の肝臓、腎臓、肺を各経過時間 (8、24、36 時間) に採取し、免疫蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡で画像を撮影を行った。NETs の構成物質は好中球から放出される DNA とヒストンであるため、DNA (DAPI) と抗ヒストン (Histone H2A) 抗体、抗 MPO (myeloperoxidase) 抗体で染色し、各 1 次抗体に対応した Alexa Fluor 系の二次抗体で染色した。結果は、各臓器によって、NETs 形成時期が異なることがわかった。また、免疫蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡で画像を撮影後、同一箇所を走査電子顕微鏡で観察した。走査電子顕微鏡で観察することによって、今まで見えなかった NETs の線維を観察することができるようになった。免疫蛍光染色による NETs の構成成分であるヒストンと MPO の観察と NETs の形態を同一箇所でも撮影することに成功した。

血中サイトカイン濃度は Cytometric Bead Array (CBA) で測定した。敗血症モデルマウスの血中サイトカインの濃度上昇を確認した。このモデルに rTM を投与すると、サイトカイン濃度の上昇は抑制された。

TM が臓器内での NETs 形成を抑制したことにより、immunothrombosis の拡大を防ぎ、組織障害と微小血管閉塞を防ぐことで、炎症を抑え、生存率が改善された可能性が示唆された。

敗血症患者における血中の NETs 形成量と rTM 投与の効果の検討を 3 例行った。結果は、病態により NETs の発現時期に差異がみられた。まだ n 数が少なく、統計学的に意義のある検討数に達していない為、今後も継続して基礎及び臨床サンプルの収集を行い、検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Moriyama Kazuhiro, Kato Yu, Hasegawa Daisuke, Kurimoto Yasuyoshi, Kawaji Takahiro, Nakamura Tomoyuki, Kuriyama Naohide, Shimomura Yasuyo, Nishida Osamu	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Involvement of ionic interactions in cytokine adsorption of polyethyleneimine-coated polyacrylonitrile and polymethyl methacrylate membranes in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 2020 May 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-020-01173-0	査読の有無 有
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 Hiraiwa Toshihisa, Moriyama Kazuhiro, Matsumoto Kana, Shimomura Yasuyo, Kato Yu, Yamashita Chizuru, Hara Yoshitaka, Kawaji Takahiro, Kurimoto Yasuyoshi, Nakamura Tomoyuki, Kuriyama Naohide, Shibata Junpei, Komura Hidefumi, Morita Kunihiko, Nishida Osamu	4. 巻 49
2. 論文標題 In vitro Evaluation of Linezolid and Doripenem Clearance with Different Hemofilters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Purification	6. 最初と最後の頁 295 ~ 301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000504039	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 -
1. 著者名 Nakamura Tomoyuki, Moriyama Kazuhiro, Shimomura Yasuyo, Kato Yu, Kuriyama Naohide, Hara Yoshitaka, Yamada Shingo, Nishida Osamu	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Adsorption kinetics of high mobility group box 1 protein in a polyacrylonitrile hemofiltration membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 2020 Mar 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.13489	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 -
1. 著者名 Takahashi Nozomi, Nakada Taka-aki, Sakai Toshikazu, Kato Yu, Moriyama Kazuhiro, Nishida Osamu, Oda Shigeto	4. 巻 23
2. 論文標題 A CO2 removal system using extracorporeal lung and renal assist device with an acid and alkaline infusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 54 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-019-01136-0	査読の有無 有
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 森山和広, 加藤由布, 長谷川大祐, 栗本恭好, 川治崇泰, 下村泰代, 西田修	4. 巻 10
2. 論文標題 Cytokine-adsorbing hemofiltersによるサイトカイン吸着特性の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日急性血浄化会誌	6. 最初と最後の頁 5-9
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 有
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 Kawaji Takahiro, Sakai Toshikazu, Moriyama Kazuhiro, Hara Yoshitaka, Nakamura Tomoyuki, Kuriyama Naohide, Shimomura Yasuyo, Kato Yu, Komura Hidefumi, Yamashita Chizuru, Kurimoto Yasuyoshi, Hasegawa Daisuke, Nishida Osamu	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of Blood Purification and Differential Injection Sites of Cold Saline on Transpulmonary Thermodilution Values	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 290 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12696	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 -

1. 著者名 Yamashita Chizuru, Moriyama Kazuhiro, Hasegawa Daisuke, Kato Yu, Sakai Toshikazu, Kawaji Takahiro, Shimomura Yasuyo, Kurimoto Yasuyoshi, Nagata Mariko, Nishida Osamu	4. 巻 46
2. 論文標題 In Vitro Study of Endotoxin Adsorption by a Polymyxin B-Immobilized Fiber Column	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Purification	6. 最初と最後の頁 269 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000489920	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yu Kato, Yasuyo Shimomura, Takanori Onouchi, Takahiro Kawaji, Daisuke Hasegawa, Yasuyoshi Kurimoto, Kazuhiro Moriyama, Osamu Nishida.
2. 発表標題 Effects of Recombinant Human Thrombomodulin on NET Formation in Organs of Septic Mice
3. 学会等名 Society of Critical Care Medicine 48th Critical Care Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takahiro Kawaji, Tatsuhiko Harada, Yu Kato, Daisuke Hasegawa, Mariko Nagata, Tomoyuki Nakamura, Osamu Nishida.
2 . 発表標題 The Cause of Underrating Cardiac Output via Transpulmonary Thermodilution During Blood Purification
3 . 学会等名 Society of Critical Care Medicine 48th Critical Care Congress (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Naohide Kuriyama, Osamu Nishida, Yasuyo Shimomura, Yu Kato.
2 . 発表標題 Nafamostat mesylate inhibition of LZD metabolism via its antioxidant effects
3 . 学会等名 The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Apheresis (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tomoyuki Nakamura, Takahiro Kawaji, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Moriyama, Yu Kato, Tatsuhiko Harada, Osamu Nishida.
2 . 発表標題 The mechanism of the decrease in cardiac output measurement by transpulmonary thermodilution has been elucidated.
3 . 学会等名 The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Apheresis (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takahiro Kawaji, Toshikazu Sakai, Yu Kato, Sohta Uchiyama, Kotaro Kawata, Seiko Hayakawa, Satoshi Komatsu, Osamu Nishida
2 . 発表標題 The Influence of Blood Purification on Transpulmonary Thermodilution Measurements
3 . 学会等名 Society of Critical Care Medicine 47th Critical Care Congress (SCCM2018) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 森山和広、加藤由布、長谷川大祐、川治崇泰、下村泰代、西田修
2. 発表標題 Cytokine-adsorbing hemofiltersによるサイトカイン吸着特性
3. 学会等名 第29回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原嘉孝、森山和広、加藤由布、栗本恭好、長谷川大祐、下村泰代、西田修
2. 発表標題 免疫制御血液浄化システムの臨床応用に向けての取り組み
3. 学会等名 第29回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川治崇泰、原嘉孝、加藤由布、原田達彦、栗本恭好、長谷川大祐、下村泰代、西田修
2. 発表標題 血液浄化施行時の心拍出量測定値（経肺熱希釈法）低下は返血温度の低下が原因であった！
3. 学会等名 第29回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村 泰代、加藤 由布、酒井 俊和、川治 崇泰、永田 麻里子、栗本 恭好、柴田 純平、山下 千鶴、幸村 英文、西田 修
2. 発表標題 敗血症マウスの肝臓内細胞外ヒストンと Recombinant human thrombomodulin の効果の検討
3. 学会等名 第44回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井 俊和、原 嘉孝、加藤 由布、川治 崇泰、下村 泰代、山下 千鶴、柴田 純平、幸村 英文、森山 和広、西田 修
2. 発表標題 アダカラム血球吸着能の血液流量による違い
3. 学会等名 第44回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原 嘉孝、森山 和広、酒井 俊和、加藤 由布、勝田 賢、磯部 恵里、竹田 彩香、山添 泰佳、中村 藍、柳 明男、小松 聖史、河田 耕太郎、下村 泰代、西田 修
2. 発表標題 重症病態における顆粒球除去カラムの可能性～我々の知見および海外の動向を含めて～
3. 学会等名 第28回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井 俊和、森山 和広、原 嘉孝、下村 泰代、加藤 由布、川治 崇泰、栗本 恭好、長谷川 大祐、西田 修
2. 発表標題 敗血症モデルブタにおける顆粒球除去カラム通過時のサイトカイン濃度の変化
3. 学会等名 第55回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----