

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08247

研究課題名(和文) 新生児慢性肺疾患における好中球由来microvesiclesの臨床的意義

研究課題名(英文) Clinical significance of neutrophil-derived microvesicles in bronchopulmonary dysplasia

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・教授

研究者番号：20723795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は過去の研究において好中球由来のmicrovesicle(MV)が高酸素を用いた新生児慢性肺疾患モデルにおいて増加する結果を踏まえ、本研究を計画した。当初は全く予想されなかった新型コロナウイルスのパンデミックによって、研究計画の大きな変更を余儀なくされ、本プロジェクトは「酸化ストレスに伴う」小児科疾患における、「血液検体」を用いた好中球由来MVの役割の研究へとシフトした。結果的には好中球由来MVに関するin vitro実験系における基盤ツールを研究室内で樹立し、小児肝不全患者におけるMVの役割におけるproof of conceptを得るに至り、新たな発展的展開へ向けた道筋が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児慢性肺疾患(CLD)はNICU退室児の主要な合併症で、社会経済的に重大な影響を及ぼす。申請者はCLD研究に長年取り組み、好中球由来のmicrovesicle(MV)が実験的CLDモデルにおいて増加するという結果を得た。本プロジェクトは多施設共同研究によって、好中球由来MVの実臨床における意義の探索を見据えていたが、コロナ禍の各種制限もあり、本領域の新規研究ツール開発に加え、小児肝不全患者におけるMVの意義についての研究にシフトし、興味深い結果を得た。現在、原因不明の小児急性肝炎症例が公衆衛生的課題として重要性を増しており、これらの方向性にも沿う形でプロジェクトは発展的展開を得た。

研究成果の概要(英文)：Neonatal chronic lung disease (CLD) is a major complication in neonatal ICU and has significant socioeconomic impacts. We originally aimed to investigate the clinical significance of neutrophil-derived microvesicles (MVs) based on our previous findings that neutrophil-derived MVs are increased in a mouse neonatal chronic lung disease model. The COVID-19 pandemic forced a major change in our research plan thus we shifted the project aim to the study of the role of neutrophil-derived MVs in pediatric diseases associated with oxidative stress using blood samples. Nevertheless, we developed some important tools in our laboratory for in vitro experiments on neutrophil-derived MV, and obtained a proof-of-concept for the role of MVs in pediatric patients with liver failure, paving the way for future projects.

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

新生児慢性肺疾患 (CLD) は NICU 退室児の主要な合併症であり、社会経済的にも重大な影響を及ぼす病態である。申請者は過去の研究において好中球由来の microvesicle (MV) が実験的 CLD モデルにおいて重要な役割を果たす可能性を示唆する興味深い結果を得た。本研究プロジェクトは以上の背景を基にして、好中球由来 MV の CLD における役割について、更に実験モデルでの研究を深める事に加え、臨床検体を用いた実証的実験を行うことで将来的な臨床応用を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究計画は上記の背景を基にして、好中球由来 MV の CLD における役割について更に研究を深め、臨床応用を目指す。具体的には以下を目的とした。

- 1) 臨床検体を用いた MV 測定
- 2) 子宮内感染を始めとした異なる実験的 CLD モデルの確立と MV 測定
- 3) 高酸素下における好中球由来 MV の役割と機序の解明

## 3. 研究の方法

過去の科研費支援下での研究によって、研究室内でマウスとヒト検体を用いた、FACS による MV 測定手技確立に加え、採取・保存条件による安定性の評価は完了しており、本研究における MV 検出法は過去のプロトコールに原則沿う形で行った。

In vitro の好中球に関する実験は HL-60 に対して DMSO と ATRA を使い、分化度に関しては顕微鏡的な分葉核の確認と、FACS による表面マーカー (CD45, CD11b, CD66b) を確認した。

日本赤十字社から提供された研究用全血製剤を用いた実験においては、各種生体パラメーターが生理的範囲内に収まるように全血製剤を調製した後、通常濃度の酸素投与群と高酸素投与群で MV 産生能の比較を行った。

小児急性肝不全に関する実験においては、臨床検体は成育医療研究センターからの共同研究にて検体を解析し、実験室においてはアセトアミノフェン過量投与を用いたマウスモデルを作成した上で、血液中の MV 測定を行った。

## 4. 研究成果

本研究は 1) 臨床検体を用いた MV 測定、2) 実験的子宮内感染モデルの確立と MV 測定、3) 高酸素化における好中球由来 MV の役割を主な目標として開始された。しかしながら、当初は全く予想されていなかった新型コロナウイルスのパンデミックによって、大きな研究計画の変更を余儀なくされた。実験面では 2020 年度における動物実験施設を初めとした研究施設への影響による実験の一時停止があった。加えて、気道由来の臨床検体採取を目的とした多施設臨床研究計画については、移動制限や気道由来検体の取り扱いに関する制度整備に時間を要する点があるため、実質的に凍結せざるを得なかった。実務面としても、コロナ重症患者の診療体制整備の国内における中心的な役割を担った、東京医科歯科大学病院の集中治療担当の病院長補佐として就任した研究代表者を始めとした、関係者の臨床・管理業務が多忙になり、臨床検体採取・測定を進めることが実質的に非常に困難であった。

上記を踏まえ、止む無く計画の方向性を「酸化ストレスに伴う」小児科疾患における、「血液検体」を用いた好中球由来 MV の役割という観点で再構成し、異なる角度からの研究進捗を図った。

### (1) 細胞株を用いた好中球由来 MV の産生手法の確立

好中球由来の細胞株はその他の血球系細胞に比べると遥かに少なく、本領域における基礎的研究を進めるに当たってのボトルネックの1つである。本プロジェクトにおいて、我々はHL-60を用いて分化法について検索を進めた。具体的にはDMSOとATRAを比較して分化の程度に関しては顕微鏡下で視覚的に分葉核を確認し、それに加えてFACSによる表面マーカー(CD45, CD11b, CD66b)を確認した結果、ATRA刺激が分化手法として最も優れていると考えられた。

本分化法を用いて好中球由来MVの産生について検討を行い、Ca ionophoreによる刺激に対して1細胞あたり概ね2.2個のCD11b+MV産生を認めた。結果的に、in vitroにて各種刺激を加えた際のMV産生数や内容物の変化、といった基礎的検討を進めるに当たって重要なツールの樹立を得られた。

### (2) 高酸素投与下における好中球由来 MV 産生についての検討

コロナ禍における各種研究活動の制限がある事を踏まえ、研究用ヒト全血製剤を用いた高酸素のMV産生に対する影響を調べた。ヒト血液の研究は一般的には健常ボランティアから採血した新鮮血を用いることが多いが、研究用製剤での実験が可能であれば、バイオアッセイの際に使用できる血液検体量(MVの量)などの面で有利な点が多い。各種生体パラメーターが生理的範囲内に収まるように全血製剤を重炭酸製剤や5%CO<sub>2</sub>の添加などで調製した後、通常濃度の酸素投与群と高酸素投与群でMV産生能の比較を行った。

初期のpilot dataでは高酸素曝露に伴う好中球由来MV数増加を示唆する所見を得ていたが、その後生理的条件を調整した上で検体数を増やして再測定したところ、高酸素曝露の効果は限定的であると考えられ、生理学的環境を整える事が実験結果に与える影響を改めて確認するに至った。

### (3) 小児肝不全患者における MV 産生についての検討

国立成育医療研究センター病院移植外科との共同研究において、血液検体を用いた小児急性肝不全の研究プロジェクトを立ち上げ、肝不全下では好中球由来MVを始めとした多くのMVが大きな変化を見せることが確認され、これと同様な結果がマウスの肝不全実験モデルにおいても再現されることが分かった。Proof-of-conceptを得た事を踏まえて、小児手術におけるMV数の推移と役割(本学麻酔科遠山准教授、小児外科岡本講師、成育医療研究センター麻酔科との共同研究が2022年度に開始予定)、急性肝不全におけるさらなるプロジェクト、といった発展的研究が計画され、現在準備を進めている。報告書執筆現在において、原因不明の小児急性肝炎症例が公衆衛生的課題として重要性を増しており、こういった観点から考えても時代の方向性に合った形でプロジェクトは発展的展開を迎えるに至った。

新型コロナウイルスのパンデミックは期間中に留まることなく、成人を中心とした集中治療室における責任者として各種診療体制整備を進めていた研究代表者の臨床・管理業務は多忙を極めたが、増員した研究チームメンバーなどの尽力にもよって、本研究は新たな発展的展開へ向けた道筋がつけられた上で期間終了となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai T, Hoshino C, Okawa A, Wakabayashi K, Shigemitsu H	4. 巻 5
2. 論文標題 The Safety and Effect of Early Mobilization in the Intensive Care Unit According to Cancellation Criteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in rehabilitation medicine	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2490/prm.20200016	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4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Iki Y, Matsumoto S, Abe M, O'Dea KP, Shigemitsu H, Takata M, Wakabayashi K
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 Neutrophil-Derived Microvesicles as a Novel Biomarker in Hyperoxic Bronchopulmonary Dysplasia in Mice
2. 発表標題 Matsumoto S, Iki Y, O'Dea KP, Shigemitsu H, Takata M, Wakabayashi K
3. 学会等名 American Thoracic Society Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若林健二
2. 発表標題 重症疾患におけるmicrovesiclesの役割と意義
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者詳細 <a href="https://reins.tmd.ac.jp/html/100009240_ja.html">https://reins.tmd.ac.jp/html/100009240_ja.html</a>
--

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	高田 正雄  (Takata Masao)		
研究協力者	阪本 靖介  (Sakamoto Seisuke)		
研究協力者	馬場 千晶  (Baba Chiaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------