

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03784

研究課題名（和文）ヒト高齢好中球サブタイプ機能評価による新規敗血症治療探索研究

研究課題名（英文）Exploratory Research for Novel Sepsis Therapy by Evaluating Human Aged Neutrophil Subtype Function

研究代表者

平野 洋平（HIRANO, YOHEI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70621895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,700,000円

研究成果の概要（和文）：免疫細胞である好中球のうち、時間の経過した高齢好中球グループでは、炎症の強度や移動する能力が増強しており、敗血症のような致死的な急性炎症において代表的なグループであることが確認された。好中球の炎症や移動に関わる遺伝子や表面のタンパク質がこのグループでは増加していることがその根拠であり、実際の敗血症患者でも同様の結果は確認された。さらに、高齢好中球では、炎症病態で増加するSDF-1と呼ばれるタンパク質の存在する環境下では、血液中の流動性が低下していた。高齢好中球グループは、流動性の低下と移動能力の増強が合わさることで、血液中に流れ続けることなく、炎症の起こっている組織へ移動することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代においても多くの死者を出している敗血症において、好中球が励起する過剰な炎症や組織浸潤の病態への影響が示唆されている。今回の研究成果によって、好中球の中の特殊なグループである高齢好中球グループで組織浸潤や炎症が増強していることが、これまで証明されてきた動物実験レベルのみならず、ヒトにおいても同様であることが証明された。本研究成果を基盤として好中球高齢化の制御因子の解明を進めていくことで、好中球の「年齢」をコントロールし炎症を制御するという、敗血症のこれまでにない画期的治療戦略につながる可能性がある。引き続き敗血症による患者死亡の減少を目指して、社会的意義の高い研究を継続していく。

研究成果の概要（英文）：The aged neutrophil population showed enhanced inflammation intensity and ability to migrate, confirming that this subtype is representative in lethal acute inflammation such as sepsis. This is based on the fact that genes and surface proteins involved in neutrophil inflammation and migration are increased in the aged neutrophils, and similar results were confirmed in actual sepsis patients samples. Furthermore, in the aged neutrophils, fluidity in circulatory blood was reduced in the presence of a protein called SDF-1, which is increased in inflammatory conditions. The combination of reduced fluidity and enhanced migratory capacity in the aged neutrophil group suggested that they do not continue to flow in the blood, but rather migrate to tissues where inflammation is occurring.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：救急、集中治療

キーワード：好中球 遊走 敗血症 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1)敗血症は、感染に対する宿主生体反応の調整不全で、生命を脅かす臓器障害と定義されている。その罹患率は近年劇的に増加しており、世界で年間 2700 万人もの人々が毎年敗血症を発症している。しかし、未だ確立した治療法は存在せず、その病態解明や新治療法の開発は急務である。

(2)好中球は、感染微生物の生体侵入に応じて、血中に動員される免疫担当細胞である。感染部位にいち早く到達し、サイトカインや活性酸素種などを放出することで微生物を排除する機能をもつが、一方で過剰な好中球機能亢進は、自己の組織自体を障害し、敗血症の多臓器不全の病態形成につながっていると考えられている。そのため、好中球の炎症能や組織遊走・浸潤をコントロールすることは、敗血症の治療戦略の一つとなり得る。

(3)これまで、好中球の寿命は約 5 時間と短く、それ故、他の免疫担当細胞と異なり単一の細胞系であると考えられていた。しかし近年、少なくとも急性炎症病態では好中球はより長い寿命(数日)を持つとの報告が数多く報告され、その為、好中球にも多様な表現型(サブタイプ)や機能が存在することが明らかになってきている。中でも表面レセプターである CXCR4 の発現は、好中球の加齢とともに上昇するといわれており、CXCR4 を高発現する「高齢好中球」サブタイプは、敗血症に代表される急性炎症における過剰炎症促進作用から、近年関心が高まっているサブタイプである(Zhang D, et al. Nature.2015)。

(4)申請者は、マウス骨髄由来好中球およびヒト健常者の血液から分離した好中球において、時間経過とともに表面 CXCR4 の発現を増加させることを確認している。また、健常者群と比較して、敗血症、敗血症性ショックと重症度が増すにつれ、循環血液中の好中球における CXCR4 の発現量は増加していくが、CXCR4 陽性好中球(高齢好中球)の血中割合は減少していた。これらの結果は、ヒト高齢好中球サブタイプが、敗血症の重篤化をもたらす過剰な好中球組織遊走や炎症の主役であることを示唆しており、死亡率の高い敗血症の新たな治療戦略につながる可能性を内包している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト高齢好中球機能やその制御因子を評価・探索することである。

具体的には、以下を評価することを目的とする。

- 1) ヒト高齢好中球の炎症性、遊走能、接着能評価
- 2) ヒト高齢好中球の遺伝子レベルでの発現状態に関する評価
- 3) ヒト高齢好中球の毛細血管流動性の評価

3. 研究の方法

- 1) ヒト高齢好中球の炎症性、遊走能、接着能評価

ヒト健常者から採取された血液から好中球を分離後、0h または 4h 培養したものの 2 群に分けたのち、それぞれの群で PBS または CXCR4 のリガンドである SDF-1 を投与した場合の好中球表面の LFA1(インテグリンレセプター、接着に関与)、PMAP1(細胞表面の ATP、遊走能に関与)、及び TLR4(炎症性に関与)の発現レベルをフローサイトメトリーによる蛍光強度により評価する。

2) ヒト高齡好中球の遺伝子レベルでの発現状態に関する評価

ヒト健常者から採取された血液から好中球を分離後、0h (新鮮好中球) または 4h 培養したもの (高齡好中球) の 2 群に分けたのち、それぞれの群で microarray による遺伝子発現解析、Gene Ontology(GO)解析を行う。

3) ヒト高齡好中球の毛細血管流動性の評価

ヒト健常者から採取された血液から好中球を分離後、0h (新鮮好中球) または 4h 培養したもの (高齡好中球) の 2 群に分けたのち、CXCR4 の ligand である SDF-1 あるいは PBS 刺激を加え、microchannel array flow analyzer で流動性を測定する。

4 . 研究成果

1) ヒト高齡好中球の炎症性、遊走能、接着能評価

4h 培養された好中球では LFA1, PMAP-1, TLR4 全てで発現量が増加傾向にあったが、統計学的な有意差を認めることはできなかった。しかし、SDF1 で刺激した場合、PMAP-1 の発現量は PBS のみの刺激に対して有意に増加していた。また、4h (高齡好中球) においての方が、より発現量の増加は有意に顕著であった。さらに、0h 好中球群において、CXCR4 陽性群と陰性群にわけ、それぞれの発現量を比較したが、PMAP-1 の発現量は CXCR4 陽性群において有意に増加していた。敗血症患者から採取した好中球でも同様の実験を行い、健常者好中球と敗血症患者両者において CXCR4 陽性好中球と CXCR 4 陰性好中球の比較を行なったところ、CXCR4 陽性好中球で、PMAP-1 発現は有意に増加していた。CXCR4 陽性群において全てのレセプターが CXCR4 陰性群と比較して増加を示していた。すなわち、SDF 存在下において、高齡好中球の PMAP-1 発現量は顕著に増加しており、ATP の関与するシグナル伝達の関与による、高齡好中球の遊走能亢進の可能性が示唆された。また、敗血症患者でも同様の結果を得られており、炎症病態においても高齡好中球は同様の反応を示している可能性があった。

2) ヒト高齡好中球の遺伝子レベルでの発現状態に関する評価

高齡好中球群では、特に細胞の運動や遊走に関わる遺伝子群で発現レベルの上昇を認めていた。前実験の結果を受け、APT のレセプターである P2Y2 遺伝子発現に関して注目したところ、P2Y2 発現レベルの上昇を確認した。

3) ヒト高齡好中球の毛細血管流動性の評価

ヒト好中球は加齢ともに毛細血管流動性を亢進していたが、一方で SDF- 1 刺激によって加齡好中球の毛細血管流動性は低下していた。この結果から、敗血症のようなケモカイン上昇を伴う急性炎症病態では、加齡好中球の微小循環捕捉が増加し、組織遊走も加わり、循環血液中では加齡好中球割合が減少する可能性が示唆された。本研究を遂行する背景となった申請者らの実験結果である敗血症患者における血中高齡好中球割合の重症化に伴う逆相関関係を支持する結果を得ることができた。

(引用文献)

・ Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang JE, Scheiermann C, Merad M, Frenette PS. Nature. 2015 Sep 24;525(7570):528-32. doi: 10.1038/nature15367.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	岡本 健 (Okamoto Ken) (40347076)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	田中 裕 (Tanaka Hiroshi) (90252676)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	
研究分担者	近藤 豊 (Kondo Yutaka) (90642091)	順天堂大学・大学院医学研究科・准教授 (32620)	
研究分担者	末吉 孝一郎 (Sueyoshi Koichiro) (90648297)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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