

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16577

研究課題名（和文）好中球NETsを標的とした敗血症の新規治療法確立のための基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental research to establish novel therapies for sepsis targeting neutrophils

研究代表者

高井 淳（Takai, Jun）

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：90813890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症は感染症を基盤とする全身性炎症により多臓器不全をきたす疾患である。近年、白血球の1種である好中球の細胞外トラップが炎症を惹起することで敗血症を増悪することが報告された。一方、研究代表者は好中球がヒスタミン高産生好中球と通常の好中球の2つに分類できることを発見したが、ヒスタミン高産生好中球が敗血症の病態に關与するかは未解明であった。本研究では、ヒスタミン高産生好中球の遺伝子発現解析や病態モデルでの解析を行った。その結果、ヒスタミン高産生好中球はアレルギー・炎症関連遺伝子の発現が高く、敗血症時に炎症誘導を行う可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで好中球は単一の細胞系列と考えられてきたが、本研究や他のグループの研究から、リンパ球やマクロファージのようにサブタイプが存在することが報告されている。したがって、ヒスタミン高産生好中球が敗血症病態の増悪に寄与することをさらに詳細な実験で示すことで、過剰な炎症を誘導する好中球のみを除去して通常好中球を残存させることで、生体防御能を維持させながら炎症状態を改善させる新規治療法の分子基盤を確立できると考える。

研究成果の概要（英文）：Sepsis is a multi-organ failure caused by infection-based systemic inflammation.

Recently, neutrophil extracellular traps have been reported to exacerbate sepsis by inducing inflammation. Meanwhile, we found that neutrophils can be divided into two distinct populations: histamine-producing and normal neutrophils. However, whether histamine-producing neutrophils are involved in the pathogenesis of sepsis remains largely unexplored.

In this study, we examined gene expression patterns of histamine-producing neutrophils and pathological analysis in a murine model of sepsis. We found that histamine-producing neutrophils showed higher gene expression levels related to allergy and inflammation. These results suggest that histamine-producing neutrophils induce inflammation during sepsis.

研究分野：医化学

キーワード：好中球 ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症を基盤とする全身性炎症により多臓器不全をきたす疾患であり、その致死率は25-30%と非常に高い (Vincent et al, *Lancet Respir Med.* 2014)。主な発症機序として、病原体感染または組織障害時に細胞内から放出される炎症性物質による炎症性サイトカインの発現誘導が挙げられる (Vincent et al, *Lancet.* 2013)。敗血症の治療には抗菌薬投与や輸液などが対処療法的に行われるが、原因療法開発のために病態のさらなる理解が必要である。好中球は病原微生物に対する生体防御の最前線で働く白血球の一種であり、ミエロペルオキシダーゼやエラスターゼなどの抗菌物質を含んだ網目状の構造物 (neutrophil extracellular traps; **NETs**) を細胞外に放出することで病原微生物を補足・処理する (Brinkmann et al, *Science.* 2004)。近年、NETs 由来の物質が炎症を惹起することで敗血症を増悪することが報告され、治療標的としても注目を集めている (Denning et al, *Front Immunol.* 2019)。

研究代表者はマウスのヒスタミン産生細胞を可視化することを目的に、ヒスタミン合成酵素のヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の遺伝子座に GFP レポーターを挿入し、ヒスタミン産生細胞可視化マウス (*Hdc-GFP* マウス) を樹立した。そして、*Hdc-GFP* マウスを解析する過程で、好中球がヒスタミン高産生好中球と通常的好中球の2つに分類できること、ヒスタミン高産生好中球が LPS 投与敗血症モデルにおいて主要なヒスタミン産生細胞として末梢血と肺へ集積することを発見した (図1; Takai et al, *Sci Rep.* 2019)。しかし、ヒスタミン高産生好中球が敗血症の病態に関与するかは未解明であった。

2. 研究の目的

ヒスタミン高産生好中球が NETs を介して敗血症病態を増悪させる可能性を検討する。そして最終的にはヒスタミン高産生好中球を特異的に除去する方法を開発することで、敗血症の新規治療法の分子基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

①ヒスタミン高産生好中球の可塑性の検討

定常状態の好中球はケモカイン等の刺激を受けて活性化し、サイトカインを産生する。したがって、ヒスタミン高産生好中球は一時的に活性化した好中球をヒスタミン高産生好中球と定義している可能性も考えられた。そこで、ヒスタミン高産生好中球が可塑性のない異なる好中球細胞集団であるかどうかを検討するため、*Hdc-Cre* マウスと ROSA26-Td-tomato (TdT; 赤色蛍光) マウスを交配させ、ヒスタミン産生細胞を赤色蛍光でトレースするフェイトマッピング実験を行った。

②ヒスタミン高産生好中球の遺伝子発現パターン解析

ヒスタミン高産生好中球に特異的に発現する受容体や表面抗原を同定することができれば、生体内での機能予測や、特異的受容体に対する抗体を用いた細胞枯渇実験が可能になると考えられる。そこで、骨髄中の細胞集団からヒスタミン高産生好中球と通常的好中球を単離し、RNA-seq 解析を実施した。

③盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを用いたヒスタミン高産生好中球の解析

CLP 敗血症モデルではヒト敗血症と類似した組織障害や菌血症が観察される。そこで、*Hdc-GFP* マウスで CLP 敗血症を誘導し、ヒスタミン高産生好中球が増加するかどうか検討した。

4. 研究成果

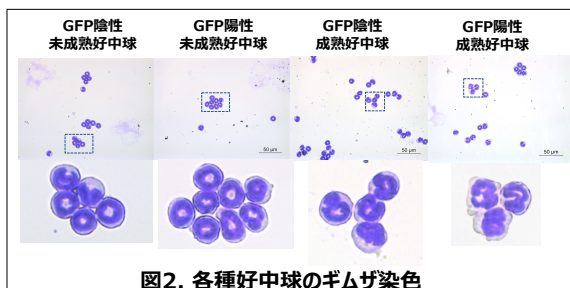
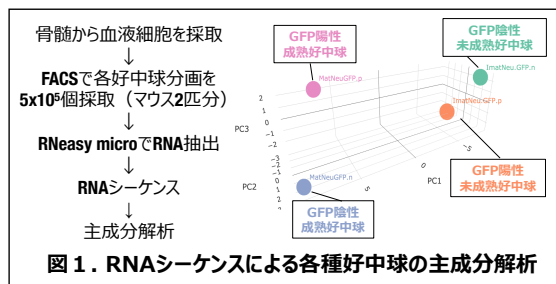
①ヒスタミン高産生好中球の可塑性の検討

Hdc-Cre マウスと ROSA26-Td-tomato マウスを交配させ、フローサイトメトリーにより赤色蛍光を解析した。その結果、末梢血の成熟好中球に加え、骨髄でも好中球が赤色蛍光陽性と陰性に分かれること (可塑性がない) を発見した。この結果から、ヒスタミン高産生好中球は一時的にヒスタミンを産生した細胞集団ではなく、好中球の分化段階において可塑性のない別の細胞集団として存在すると考えられた。

②ヒスタミン高産生好中球の遺伝子発現パターン解析

骨髄中の好中球 (CD115⁻SiglecF⁻c-Kit⁻Gr1⁺CD11b⁺Ly6G⁺) をフローサイトメトリーで Immature Neutrophil (CXCR2⁻) と Mature Neutrophil (CXCR2⁺) を *Hdc-GFP* 陽性と陰性の4画分に分類し、RNA-seq 解析を実施した。主成分解析の結果 GFP 陽性ヒスタミン高産生好中球と GFP 陰性的好中球の集団が離れた座標に存在しており、異なる機能を持つ集団である可能性が考えられた (図1)。

また、GFP 陽性ヒスタミン高産生好中球ではアレルギー・炎症関連遺伝子である *Protease serine34*, *mast cell protease8*, *Fcer1a* などの遺伝子発現が高かった。これらの遺伝子はマスト細胞でも発現が高いため、GFP 陽性の細胞集団にマスト細胞が紛れている可能性を検討するため、マスト細胞マーカーの *Kit* 遺伝子の発現を解析した。その結果、GFP 陽性と GFP 陰性の集団で *Kit* 遺伝子の発現は同程度であった。また、フローサイトメトリーで採取した GFP 陽性の集団でディフクイック染色を行ったが、細胞集団は好中球の特徴を有していた (図 2)。これらのことから、マスト細胞の混入は否定されると考えた。以上の結果より、ヒスタミン高産生好中球はアレルギー・炎症関連遺伝子の発現が高く、敗血症においては炎症誘導に働く機能を有する可能性が考えられた。



③盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを用いたヒスタミン高産生好中球の解析

Hdc-GFP マウスに盲腸結紮穿孔を行い、腹腔内の GFP 陽性好中球の割合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、Sham コントロールと比較して、CLP 処理群では腹腔内に GFP 陽性のヒスタミン産生好中球が蓄積することを確認した。この結果から、ヒスタミン産生好中球は敗血症などの細菌感染に起因する重篤な炎症状態において病態に関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高井淳
2. 発表標題 HDCレポーターマウスの樹立と炎症刺激に応答して増加するヒスタミン産生好中球の解析.
3. 学会等名 第23回ヒスタミン学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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