

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591870

研究課題名(和文) TRAILの好中球排除によるSIRSの制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Regulation of systemic inflammatory response syndrome by TNF-related apoptosis inducing ligand which affect neutrophils exclusion and its potential clinical application

研究代表者

蒲原 英伸 (kamohara, hiddenobu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90398222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：好中球からTRAILとその受容体が発現しTNF およびIFN により発現制御を受け、最終的に好中球のアポトーシスに関与することを明らかにしてきた。今回、SIRS病態における血液中とドレーン廃液中の白血球を分離した。TRAILの発現はドレーン中で高かった。TRAIL R1、R2(Death Receptor)もドレーン中で高く、TRAIL R3、R4(Decoy Receptor)はドレーン中で低い傾向にあった。炎症局所ではサイトカイン発現と同様にTRAILとR1、R2は増強し、好中球の活性化と細胞死を惹起しやすい状況にある。TRAILがSIRS制御の標的となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have been identified that neutrophils express TRAIL and TRAIL-R which were induced by IFN γ and reduced by TNF α . Finally, TNF α induced the neutrophils apoptosis and IFN γ reduced. In the present study, leukocytes were isolated in peripheral blood and local exudates from post-operative drain in SIRS. The level of TRAIL, TRAIL-R1, and -R2 (death receptor) mRNA were significant higher and the level of TRAIL-R3 and -R4 (decoy receptor) mRNA were significant lower in leukocytes from exudates than leukocytes from peripheral blood. Up- or down-regulation of TRAIL receptor expression by TNF α or IFN γ can affect the susceptibility of neutrophils to TRAIL. In local inflammatory field, neutrophils are activated by high amount of cytokines and neutrophils expressing TRAIL, -R1 and -R2 can transit to be apoptosis. TRAIL signaling pathway could potentially regulate the fate of tissue-infiltrating neutrophils during SIRS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：SIRS TRAIL TRAIL受容体 好中球 TNF IFN アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

SIRS(Systemic inflammatory response syndrome)は1991年にATS/ACCMにより、生体に過大侵襲が加わった時に生じる全身性の炎症反応として定義される。MODS,MOFに陥らないために早期診断。早期治療を行い、予後を改善させるためにこのSIRSの概念が提唱された。実際、予後やICU滞在日数など臨床データとよく相関し、SIRSのcriteria(体温、脈拍数、呼吸数、白血球数など)はベッドサイドで容易に判断ができ、早期診断・治療を開始することができ、その後もSIRSの制御を目標に治療するなど簡便かつ有効な指標である。

TRAIL(TNF related apoptosis inducing ligand)はTNF familyに属し、種々の細胞(正常T細胞、単球、樹状細胞、NK細胞など)から発現されている。腫瘍細胞やウイルスに感染した細胞にアポトーシスを惹起する。一方で正常細胞に対してはアポトーシスを誘導しないとされてきた。TRAILの受容体は5種類存在する。TRAIL-R1/DR4とTRAIL-R2/DR5からのシグナルはアポトーシスを誘導させるように機能し、一方、TRAIL-R3/DcR1とTRAIL-R4/DcR2は、下流のシグナル伝達が欠落し、Decoy receptorとして作用する。TRAIL-R3と-R4は、実際多くの細胞に発現が確認され、アポトーシスを負に制御している。さらに、OsteoprotegerinはTRAILの可溶性受容体であり、Decoy receptorとして作用する。TRAILのアポトーシスの感受性はこれらの受容体の発現のバランスにより調整されている。腫瘍の局所環境における防御機構として、T細胞やNK細胞から産生されたTRAILにより腫瘍細胞がアポトーシスにより、生体から排除される免疫的監視機構により監視されている(Immunity, 2003)。また、自己免疫疾患の発症の制御に胸腺細胞のTRAILによるアポトーシスが関与していることが報告されている(Lamhamedi-

Cherradi S-E, Nature Immunol. 2003)。以上、腫瘍とTRAILの研究が多く、innate immunityに関する研究はまだ少ない。

TRAILは自己免疫疾患の関節炎(Tsokos GC, JCI, 2005, Song K, I Exp Med 2000)、脳髄膜炎(Hilliard B, J Immunol. 2001)、甲状腺炎(Wang SH, Endocrinology 2009)を制御することが報告されている。TRAIL R1(DR5)はdeath domainを有しているため、caspaseを介して細胞にアポトーシスを惹起させるが、DR5のノックアウトにおいて、慢性炎症と腫瘍形成が促進されることより

DR5は炎症を負に制御していることが示唆された(Finnberg N, JCI, 2007)。

細菌性脳髄膜炎のモデルでTRAILは抗炎症的に作用し、生存率を改善させることが報告されている(Hoffman O, JCI, 2008)。大腸穿孔の腹膜炎のマウスモデルにおいて、TRAIL投与により、脾臓や局所リンパ節に浸潤した好中球の数はアポトーシスにより減少し、生存率も改善させた(Cziupka K, Crit Care Med, 2010)。この2つの動物実験モデルから、TRAILは急性炎症を負に制御し生体防衛的に作用している可能性を示唆している。SIRSを契機に増悪したARDS患者のBAL中には好中球が多数存在し、その溶液中においてTRAILが健常者より有意に産生し、ARDSの生存群においてTRAILが高い傾向を示した(Lee KS, Resp Medicine)。SIRSに起因する臨床患者の報告は現在これのみである。以上のように、TRAILの好中球や単球を主体としたinnate immunityおよびリンパ球を主体としたadaptive immunityにおよぼす影響は、慢性炎症と急性炎症において役割が異なっているようであるが、詳細はまだ不明である。

我々は健常者から分離した好中球からTRAIL蛋白およびmRNAが発現していることを初めて明らかにした。IFN γ はTRAILの発現を促進し、TNF α はTRAILの発現を抑制した。また、受容体の発現はIFN γ によりTRAIL-R2が低下し、TRAIL-R3が増強した(アポトーシス低感受性)。一方、TNF α によりTRAIL-R2が増加し、TRAIL-R3が低下した(アポトーシス高感受性)。TRAILの好中球に対しての生物学的意義を解明するために、Anti-TRAIL Ab存在下でのAnnexin-Vによるアポトーシス誘導性を検討した。TNF α が最も好中球のアポトーシスを誘導したが、TRAIL中和抗体存在下で、アポトーシスは抑制された。MediumとIFN γ においても同様の傾向であった。TRAILは好中球にアポトーシスを誘導させ寿命を調整していることが示唆された(Kamohara, Immunology, 2004)。

SIRSにおけるTRAILの研究において、臨床検体を用いた検証は、まだほとんど行われていない。病態との相関性を検証し、TRAILが存在することが、本当に病態に関連しているか検討していく。

2. 研究の目的

SIRSは生体に重大な危険が及ぶ前兆であり、特に敗血症は容易に多臓器不全を呈し、致命的な経過を辿ることを救急・集中治療の

臨床現場でよく遭遇する。こうした SIRS 状態にある患者の血液や体液(胸水、腹水、浸出液、尿、痰など)と TRAIL に関する研究はない。本研究では臨床検体を採取し、TRAIL や各種 cytokines のデータの検証から始め、さらに検体中に多数存在する白血球(特に好中球)を分離し、TRAIL とその受容体の発現を確認する。以上の発現 profile と臨床データの相関性を検証し、SIRS 病態における TRAIL を標的とした臨床応用(診断・治療)の可能性について明らかにしていく。

3. 研究の方法

健常者と SIRS (敗血症) の患者からの血液や体液(胸水、腹水、浸出液、尿、痰など)を採取し、TRAIL や各種 cytokines を定量する(ELISA もしくは Bioplex array)。また、lymph prep を用いて白血球(neutrophil, monocyte, lymphocyte)を分離する。分離した細胞は in vitro でのサイトカイン刺激など各種解析に使用していく。

mRNA は、Trizol を用いて RNA まで精製し、TRAIL および TRAIL 受容体(R1, R2, R3, R4)に対する probes もしくは primers を作製し、Northern blotting または PCR にて解析する。蛋白は lysis buffer を用いて、Western blotting にて解析する。細胞表面の発現については FACS を用いる。

4. 研究成果

健常者から分離した白血球を用いて、好中球、単球、リンパ球の表面における TRAIL が発現を FACS にて検証したところ、好中球、単球の表面に TRAIL が発現していたが、リンパ球は発現を認めなかった。また 6 時間培養した好中球表面の TRAIL の解析により、TNF alpha の存在下では、TRAIL の表面の発現は減少した。IFN gamma の存在下では TRAIL の発現が増強することが確認できた。Western blotting による解析により、好中球の lysate 中に僅かに発現を認めるのみであった。FACS との data の乖離から、培養上清中に産生されている可能性を考慮し、IP-Western blotting にて検討した。IFN gamma の存在下において、発現が増強していることが蛋白レベルで確認された。FACS にて TRAIL の発現が確認されたが、TNF alpha や IFN gamma などのサイトカインが存在することにより、TRAIL は細胞表面から Shedding されることが示唆された。

以前報告した Northern blotting 同様に、TNF alpha は TRAIL の発現抑制的に作用し、IFN gamma は TRAIL の発現促進的に作用していることが改めて確認できた。

感染症や手術野の局所の炎症が全身に影響

し、SIRS を惹起している可能性がある。我々は手術後の血液中と術野の局所に挿入された drain からの廃液を回収し、その中の種々のサイトカインを Bioplex array にて測定した。TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IFN gamma など種々のサイトカインやケモカインが血清中と比して drain からの廃液が有意に高いことが分かった。局所においては白血球が活性化されている可能性があることを明らかにするため、leukocytes を分離し、術後 1 日目の TRAIL と IL-8 mRNA の発現を検証した。蛋白レベルと同様に、局所に浸潤した白血球において循環血液中の TRAIL と IL-8 mRNA の発現が亢進していた。

我々はこれまで、健常者から分離した好中球から TRAIL 受容体の発現を検討し、IFN gamma により TRAIL-R2 が低下し、TRAIL-R3 が増強し、一方、TNF alpha により TRAIL-R2 が増加し、TRAIL-R3 が低下した。R2 はアポトーシスを誘導し、R3 はアポトーシスを抑制する。また、R1 と R2 は微弱であった(Northern blotting)。以上を踏まえて、本研究において、消化器外科手術後の血中と drain 中の白血球上の TRAIL 受容体を RealTime RT-PCR にて解析した。Drain 中の TRAIL 受容体の R2 亢進し Decoy 受容体の R3 が減少していた。つまり、過剰な炎症反応を示す局所において TRAIL を主体とした細胞死による白血球の排除機構が存在することを示唆していると思われる。

好中球において high dose TNF alpha は、細胞死を惹起し、IFN gamma はそれを抑制されるが、Anexin-V を用いた FACS の解析により Anti-TRAIL の存在下において、TNF alpha によるアポトーシスが抑制されたことから、TNF family である TRAIL を用いることにより、好中球を標的としてアポトーシスを惹起することにより、炎症局所における過剰反応を抑制し、SIRS への重症化を制御できる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) 重症患者における早期経静脈栄養の影響. 救急医学. Vol138(3), 2014, 363-369. 蒲原英伸, 木下順弘. 査読無
- 2) Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell

carcinoma. Cancer, 119 (6), 2013, 1159-1167. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H. 査読有

3) Rapid Response Team (RTT)は院内急変に有用である？, 25, 1220-1230, 2013, 救急・集中治療, 木下順弘. 査読有

4) Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer, 106 (1), 2012, 182-188. Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Kamohara H, Baba Y, Mimori K, Baba H. 査読有

5) Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Journal of Surgical Oncology, 106 (2), 2012, 188-192. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H. 査読有

6) 術前%肺活量が待機的手術後のICU管理に影響する. ICUとCCU, 36 (2), 2012, 129-134. 廣佐古進, 境恵祐, 鷺島克之, 蒲原英伸, 興相博次, 木下順弘. 査読無

7) MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma. Annals of Surgical Oncology, 19 (Suppl 3), 2012, S656-S664. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H. 査読有

8) MEK1 and MEK2 isoforms regulate distinct functions in pancreatic cancer cells. Oncology Report, 24 (1), 2011, 251-255. Zhou L, Tan X, Kamohara H, Wang W, Wang B, Liu J, Egami H, Baba H, Dai X. 査読有

〔学会発表〕(計 19件)

1) 敗血症性ショックに対する胸骨圧迫が原因と思われた肝損傷性の出血性ショックの一例. 第41回日本集中治療医学会, 2014年2月27日, 京都国際会議場, 京都, 蒲原英伸, 新森大祐, 田代貴大, 鷺島克之, 木下順弘

2) 当院ICUにおける人工呼吸管理中の経腸栄養チューブ留置についての検討(特に薬物不応性の胃内栄養残存例について). 第41回日本集中治療医学会, 2014年2月28日, 京都国際会議場, 京都, 蒲原英伸, 新森大祐, 田代貴大, 鷺島克之, 木下順弘

3) The interaction of discoidin domain receptor 1 (DDR1) with collagen contribute to leukocytes migration and adhesion in systemic inflammatory response syndrome. Society of Critical Care Medicine 43rd Annual Congress, 2014年1月12日, Moscone Center South, San Francisco, USA.

Hidenobu Kamohara, Daisuke Niimori, Takahiro Tashiro, Katsuyuku Sagishima, Yoshihiro Kinoshita

4) SIRS患者における高タンパク質消化態流動食の有効性の検討. 第41回日本救急医学会, 2013年10月21日, 東京フォーラム, 東京. 蒲原英伸, 新森大祐, 田代貴大, 鷺島克之, 木下順弘

5) Curcumin protects the chemotaxis of neutrophils through CXCR1 and CXCR2 in systemic inflammatory response syndrome. European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress, 2013年10月6日, Palais des Congres, Paris, France.

Hidenobu Kamohara, Daisuke Niimori, Takahiro Tashiro, Takamitsu Johno, Katsuyuku Sagishima, Yoshihiro Kinoshita

6) APRVとVolume Viewが有効であった輸血関連循環負荷(TACO)の一例. 第35回日本呼吸器療法医学会. 2013年07月20日, 京王プラザホテル, 東京. 蒲原英伸, 新森大祐, 田代貴大, 城野剛充, 鷺島克之, 河野宏明, 木下

順弘

7) 肝移植術後に発症したMRSA による難治性肺化膿症に対して、多剤抗菌薬が有効であった一例。第61回日本化学療法学会，2013年6月5日，パシフィコ横浜，横浜。蒲原英伸，新森大佑，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，河野宏明，木下順弘

8) 高所墜落による重症頭部外傷から救命できた学生の2症例の検討。第27回日本外傷学会，2013年5月23日，ホテルマリターレ創生久留米，久留米，福岡。蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，河野宏明，木下順弘

9) 食道癌術後、上行結腸の単純潰瘍から敗血症を呈した診断_治療に苦慮した一例。第40回日本集中治療医学会，2013年3月2日，松本市総合体育館，松本。蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，河野宏明，木下順弘

10) The Role of TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) in Systemic Inflammatory Response syndrome.: The Impact of TNF-alpha and IFN-gamma in Human Neutrophils. Society of Critical Care Medicine 42nd Annual Congress, 2013年1月27日, Puerto Rico Convention Center, San Juan, Puerto Rico, USA. Hidenobu Kamohara, Takahiro Tashiro, Takamitsu Johno, Katsuyuki Sagishima, Yoshihiro Kinoshita

11) 難治性全身硬直による呼吸不全から重症化し、臨床的に驚愕病が疑われた一例。第40回日本救急医学会，2012年11月14日，京都国際会議場，京都。蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，松本史郎，木下順弘

12) Edwardsiella tarda, E.coli の混合感染による肝膿瘍から敗血症_多臓器不全へと重症化した症例の検討。第86回日本感染症学会，2012年4月25日，長崎ブリックホール，長崎。蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，木下順弘

13) 生体侵襲によるIFNgamma とIP-10 の推

移とその意義について，第39回日本集中治療医学会，2012年2月29日，幕張メッセ，千葉，蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，馬場秀夫，木下順弘

14) 食道癌術後の膿胸によるARDS 合併に対してドレナージ・集中治療管理により救命できた症例の検討。第24回日本外科感染症学会，2011年12月1日，合歡の郷 Hotel & Resort, 三重。蒲原英伸，前川愛，徳永竜馬，岩槻政晃，渡邊雅之，城野剛充，鷺島克之，馬場秀夫，木下順弘

15) Imipenem / Cilastatin による腎障害と薬剤熱をきたした重症急性肺炎の検討。第59回日本化学療法学会西日本支部会，2011年11月24日，奈良県新公会堂，奈良。蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，木下順弘

16) 急性・慢性炎症病態下における血清中と白血球中のmicroRNA-21 の発現とその意義。日本救急医学会，2011年10月20日，京王プラザホテル，東京。蒲原英伸，田中洋平，城野剛充，鷺島克之，馬場秀夫，木下順弘

17) IL-6 による大腸癌細胞の増殖_浸潤機構とlet7a_ miR146a 発現の意義。第66回日本消化器外科学会，2011年7月13日，名古屋。蒲原英伸，蔵重淳二，木下浩一，田中洋平，馬場秀夫

18) OTC 薬(アセトアミノフェンとプロムワレリル尿素) の大量服薬による劇症肝炎に対し、血漿交換・急性血液浄化による救命例の検討。第33回日本中毒学会，2011年7月31日，ソフトピアジャパン，岐阜(大垣)，蒲原英伸，田代貴大，城野剛充，鷺島克之，木下順弘

19) SIRS におけるCXCL-8 の発現の意義とその受容体(CXCR1, CXCR2) を標的とした治療戦略。第111回日本外科学会，2011年5月25日，震災のため紙上開催。蒲原英伸，高橋将史，石河隆敏，境恵祐，廣佐古進，鷺島克之，木下順弘，馬場秀夫

〔図書〕(計 8 件)

- 1) 脳死下臓器提供, 163-164, 2014, 目でみる救命救急医療 杉本侃 監修, 日本臨床社 大阪, 木下順弘.
- 2) 心停止後症候群と蘇生後脳症, 7-8, 2014, 目でみる救命救急医療 杉本侃 監修, 日本臨床社 大阪, 木下順弘.
- 3) 救急医療における終末期医療のあり方に関する提言(ガイドライン), 254-257, 2014, Emergency Care, メディカ出版, 木下順弘.
- 4) 尿の異常. 214-217, 2013, 標準救急医学改定第5版, 医学書院 東京, 木下順弘.
- 5) 呼吸困難. 38-41, 2013, 救急検査指針・救急検査認定技師テキスト, へるす出版, 木下順弘.
- 6) 救急医療における治療方針の決定, 70-78, 2013, シリーズ生命倫理学「救急医療」有賀徹・手島豊 編, 丸善出版 東京, 木下順弘.
- 7) 除草剤・殺虫剤中毒, 636-641, 2013, 集中治療専門医テキスト(電子版), 総合医学社 東京, 木下順弘.
- 8) 脊髄損傷, 48-49, 2013, 今日の治療指針2013, 医学書院 東京, 木下順弘.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲原 英伸(KAMOHARA, Hidenobu)
熊本大学・生命科学研究部・准教授
研究者番号: 90398222

(2) 研究分担者

木下 順弘(KINOSHITA, Yoshihiro)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号: 30195341
鷺島 克之(SAGISHIMA, Katsuyuki)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40336235

廣佐古 進(HIROSAKO, Susumu)
熊本大学・生命科学研究部・助教
研究者番号: 70432995
境 恵祐(SAKAI, Keisuke)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10433038

(3) 連携研究者

荒川 博文(ARAKAWA, Hirofumi)
独立行政法人国立がん研究センター・生物物理部・部長
研究者番号: 70313088
下里 修(SIMOZATO, Osamu)
千葉県がんセンター・がん治療耐性克服研究・研究員
研究者番号: 30344063