

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462418

研究課題名(和文)敗血症時の肝臓における好中球細胞外トラップ形成と抗凝固薬によるその阻害効果の検討

研究課題名(英文)An Effect of anticoagulant agents on NET formation in liver during sever sepsis

研究代表者

下村 泰代 (SHIMOMURA, Yasuyo)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：80534031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞上のトロンボモジュリン(TM)はトロンピンを不活化する抗凝固因子で、リコンビナントヒトTM(rTM)は播種性血管凝固症候群の治療である。本研究において次の結果を得ることができた。(1)リポポリサッカライド(LPS)はヒト好中球と血小板の共培養下で好中球細胞外トラップ(NETs)を形成する。(2)LPS誘導型マウス敗血症モデルにおいて、rTMの後投与は致死率と血清中のサイトカインの上昇を抑えた。(3)さらにマウスの肝臓ではrTMの後投与はLPSで誘導される好中球の浸潤とNETs形成を抑制した。以上のことから、rTMはNETs形成において新たな役割を持つことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Thrombomodulin (TM), an endothelial anticoagulant protein, neutralizes thrombin. Recombinant human thrombomodulin (rTM), anticoagulant agent, has been approved for the treatment of DIC in Japan.

The experiment yielded the following results: (1) LPS induced NET formation in human neutrophils co-cultured with platelets. NET formation was reduced by rTM. (2) In the LPS-induced septic shock model in mice, the lethality and production of serum cytokines, such as TNF α , IL-6, MCP-1, and IL-10 was lower in rTM-treated mice than in control mice. (3) Furthermore, histological studies of mouse liver revealed that rTM reduced the infiltration of neutrophils and NET formation, which was induced by LPS injection. These results suggest that rTM may play a novel role in the NET formation and is effective in the LPS-induced septic shock model by suppressing NETs in liver and level of cytokines in blood, which resulted in the prevention of a decrease in lethality.

研究分野：麻酔蘇生学、免疫学

キーワード：敗血症 播種性血管凝固症候群 好中球細胞外トラップ トロンボモジュリン 肝臓

1. 研究開始当初の背景

敗血症は病態が急速で多臓器不全(MOF)や播種性血管凝固症候群(DIC)へと移行し死に至る。本邦でも年間 38 万人が発症し、死亡率も非常に高い。敗血症が悪化する過程において、凝固因子である Thrombin や血小板の活性化、免疫細胞である好中球の増殖や活性化を認める。

近年、好中球の新たな役割として、2004 年 Science 誌に Brinkman らにより好中球細胞外トラップ(NETs)が報告された¹⁾。NETs は病原体の補足と血栓形成により、病原体を局所に止め殺菌するという自然免疫の一つである。活性化した血小板が好中球を刺激し、ヒストンや MPO などの細胞内物質を含んだ網状の物質 NETs を放出する。

しかし、過剰な NETs 形成は凝固異常を引き起こす可能性がある。

2008 年に本邦でのみ、抗凝固剤であるリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)が DIC 治療として認可された。DIC に対する有効な治療成果も報告されているが²⁾、その作用機序は未解明な部分も多い。

<引用文献>

1) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; 303: 1532-5.

2) Yamakawa K, Ogura H, Fujimi S, Morikawa M, Ogawa Y, Mohri T, Nakamori Y, Inoue Y, Kuwagata Y, Tanaka H, Hamasaki T, Shimazu T. Recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis. Intensive Care Med. 2013; 39: 644-52.

2. 研究の目的

rTM は Thrombin と結合し、複合体を形成することで Thrombin を不活化する。

Thrombin は血小板の活性化因子の一つであり、敗血症性 DIC のような Thrombin 産生が増加する凝固障害では、血小板と好中球の活性化を促進し、NETs を過剰に形成することで全身性の凝固異常、免疫異常を引き起こしている可能性がある。

本研究の目的は、rTM に NETs 形成の抑制効果があるか検討し、rTM だけでなく、

3. 研究の方法

【ヒト末梢血を使用した in vitro study】

ヒト末梢血における血小板活性化による NETs 形成と rTM による NETs 形成阻害作用の検討。

方法: 免疫細胞化学と免疫組織化学

ヒト末梢血から Polymorphprep

(Axis-Shield, Dundee, Scotland, UK)で好中球を分離・精製した。血小板は遠心法で platelet-rich plasma を分離し、さらに遠心して血小板を沈殿させ、回収した。

これら精製した好中球と血小板を共培養し、LPS (E. coli 0111, 125-05201, 和光純薬工業株式会社) 0.2 μ g/mL、recombinant Thrombomodulin (rTM : ART-123、旭化成ファーマ株式会社) 2 μ g/mL を添加した。培養後の細胞はスライドに移し、洗浄・乾燥させ、1 次抗体として、anti-myeloperoxidase (MPO) (Abcom, ab45977)、Histone H2A.X antibody (M-20) (sc-54607, santa cruz biotechnology inc.) を添加、その後各種 1 次抗体に反応する 2 次抗体と、DAPI (D1306, Invitrogen) で染色を行った。共焦点顕微鏡 (Model LSM 710 confocal microscope; Carl Zeiss MicroImaging, Jena) を使用し NETs 形成を確認した。

【マウス敗血症モデルでの in vivo study】

rTM の有効性の検討: マウスの腹腔内に LPS を投与し、敗血症を発症させた。

(1) 生存率の検討

方法: LPS 10mg/kg の腹腔内投与により、72 時間後生存率が 50% になる LPS 敗血症モデルマウスを確立した。

このモデルに、LPS 投与 1 時間後から rTM6mg/kg/day を投与し、rTM 非投与群 (LPS のみ) と rTM 投与群 (LPS + rTM) で比較した。

(2) 敗血症マウスの肝臓での NETs 形成の確認と rTM による NETs 形成阻害。

方法: HE 染色と IHC

(3) マウス敗血症時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。

方法: Cytometric Bead Array (CBA) システム

4. 研究成果

【ヒト末梢血を使用した in vitro study】

好中球と血小板のみの共培養では、NETs の形成は認められなかった (図 1A)。

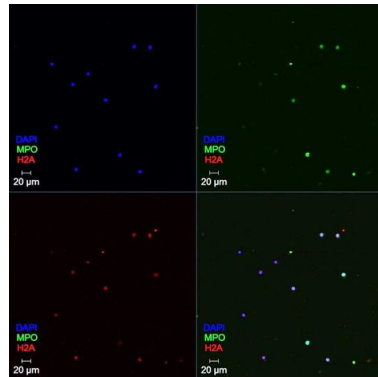


図 1A

この共培養に LPS を添加群では好中球の破砕像と好中球から放出された DNA と MPO、ヒストンが共在した NETs 形成を認めた(図 1B)。

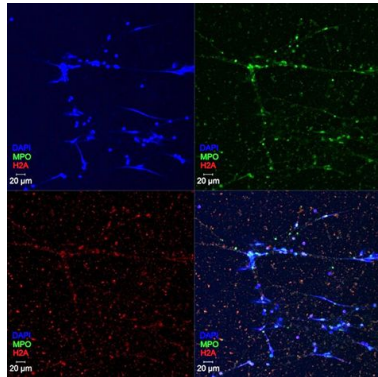


図 1B

LPS 刺激により誘導された NETs 形成は、rTM を加えることにより、抑制できた(図 1C)

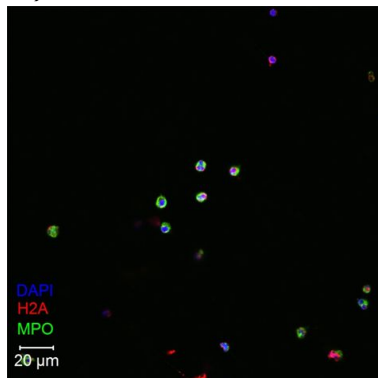


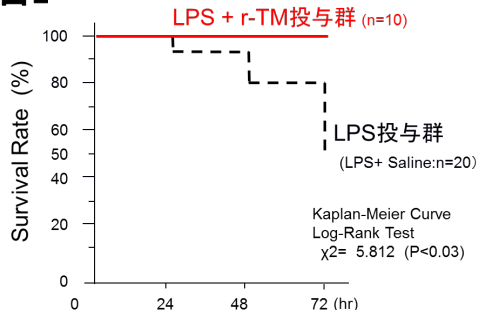
図 1C

【マウス敗血症モデルでの in vivo study】

(1) 生存率の検討

LPS 投与群は 24 時間後から死亡し始め、72 時間後の生存率は、LPS 投与群が 50%、LPS+rhs-TM 投与群では 100 % と、LPS+rhs-TM 投与群で有意に改善した(図 2)。

図 2



(2)敗血症マウスの肝臓での NETs 形成の確認と rTM による NETs 形成阻害。

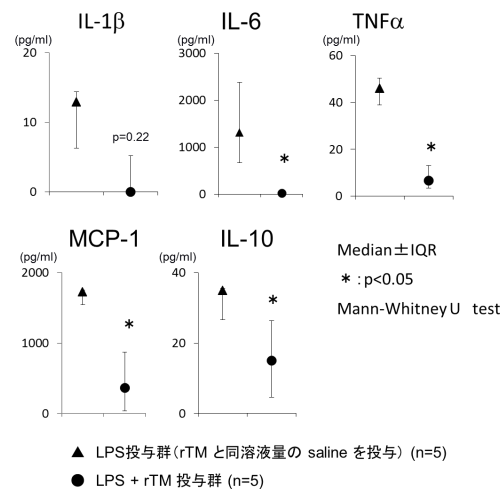
LPS 誘導性敗血症モデルマウスへの rTM の後投与では、致死率の改善と血中のサイトカインの産生抑制、肝組織内の好中球の増殖と浸潤、NETs 形成抑制を確認した。

本研究において、rTM が NETs 形成を抑える機序までは解明できなかった。rTM はトロンピンと結合してトロンピンを不活化させる作用や LPS と結合して LPS を中和する作用がこれまでに報告されていることから、このような作用、もしくは新たな作用により rTM が NETs 形成抑制に関与しているのかもしれない。

(3) マウス敗血症時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。

LPS 投与群と比較して、LPS+rhs-TM 投与群では IL-6、TNF α 、MCP-1 などの炎症性サイトカイン、および抗炎症性サイトカインである IL-10 の上昇を有意に抑制した。炎症性サイトカインである IL-1 の上昇も抑制する傾向にあった。(図 3)

図 3



【まとめ】

今回の結果からトロンピンの活性化と産生が進行した敗血症性 DIC の治療において、rTM の有効性が期待できそうである。本研究成果は、国内外の学会で発表した。うち、平成 25 年と平成 26 年の日本麻酔麻酔科学会では優秀演題に選出され、Society of Critical Care Medicine's Annual Congress (米国集中治療医学会総会)でも平成 27 年に Top 64 Abstracts、平成 28 年には Star Research Achievement Award を受賞した。

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 1 件)

Hara Y, Yamashita C, Shimomura Y, Kato Y, Moriyama K, Nakamura T, Miyasho T, Kuriyama N, Sakai T, Nishida O. The Novel Blood Purification System for Regulating Excessive Immune Reactions in Severe Sepsis and Septic Shock: an ex

vivo pilot study. *Ther Apher Dial*,
2015;19(4):308-315
DOI:10.1111/1744-9987.12338.査読有

〔学会発表〕(計 35 件)

Yu Kato, Yasuyo Shimomura, Shizuko Nagao, Mika Suga, Naohide Kuriyama, Tomoyuki Nakamura, Yoshitaka Hara, Osamu Nishida. Effects of recombinant human thrombomodulin on NETosis in LPS-induced sepsis in mice. 45th Critical Care Congress (Society of Critical Care Medicine), Star Research Presentations, February 21, 2016, Orland, Florida USA

Star Research Presentations

Awards

加藤 由布、下村 泰代、須賀 美華、酒井 俊和、加藤 大貴、原 嘉孝、中村 智之、柴田 純平、森山 和広、西田 修. マウス敗血症モデルでのリコンビナントトロンボモジュリンによる NETosis の抑制効果、第 43 回日本集中治療医学会学術集会、一般演題 口演 18、多臓器不全・敗血症、2016 年 2 月 12 日、神戸国際展示場、神戸

Yoshitaka Hara, Tomoyuki Nakamura, Saori Takagi, Satoshi Komatsu, Masayosi Akiyama, Kotaro Kawata, Sohta Uchiyama, Chizuru Yamashita, Yasuyo Shimomura, Osamu Nishida Presepsin false-positive rate for invasive surgical invasion is lower than procalcitonin The anesthesiology 2015 annual meeting, Poster, October, 2015, San Diego, USA

Yoshitaka Hara, Yasuyo Shimomura, Tomoyuki Nakamura, Naohide Kuriyama, Chizuru Yamashita, Mika Suga, Yu Kato, Taku Miyasho, Toshikazu Sakai, Shingo Yamada, Kazuhiro Moriyama, Osamu Nishida An ex vivo preliminary study of novel blood purification for modulating excessive immune reactions in sepsis, WFSICCM Seoul 2015, Poster Presentation, August 30, 2015, Seoul, Korea

Toshikazu Sakai, Yu Kato, Yasuyo Shimomura, Tomoyuki Nakamura, Naohide Kuriyama, Yoshitaka Hara, Kazuhiro Moriyama, Takahiro Kawaji, Osamu Nishida A comparison of lps measurement by eaa and lal in an lps-induced pig model, WFSICCM Seoul 2015, Poster Presentation, August 30, 2015, Seoul, Korea
Mika Suga, Yasuyo Shimomura, Osamu Nishida, Naohide Kuriyama,

Tomoyuki Nakamura, Toshikazu Sakai, Yu Kato, Yoshitaka Hara Recombinant human thrombomodulin inhibits neutrophil extracellular traps formation in vitro, Society of Critical Care Medicine 44th Critical Care Congress, January 18, 2015, Arizona USA **Nomination-Based**

Awards(top 64) oral presentation

須賀 美華、下村 泰代、加藤 由布、酒井 俊和、新美 太祐、原 嘉孝、栗山 直英、中村 智之、山下 千鶴、西田 修 NETs (Neutrophil extracellular traps) 形成機序の検討、第 42 回日本集中治療医学会学術集会、一般演題 口演 1、多臓器不全 敗血症、2015 年 2 月 9 日、ホテル日航東京、東京

酒井 俊和、加藤 由布、須賀 美華、原 嘉孝、下村 泰代、西田 修 LPS 刺激下における顆粒球除去カラム使用時のサイトカイン変化、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、ポスターディスカッション、2015 年 5 月 29 日、神戸ポートピアホテル、神戸

下村 泰代、中村 智之、栗山 直英、原 嘉孝、西田 修 リコンビナントヒトトロンボモジュリンによる Neutrophil Extracellular Traps(NETs) 形成の抑制効果、ショックと血液凝固異常、第 30 回日本 Shock 学会総会、パネルディスカッション、2015 年 5 月 23 日、京王プラザホテル八王子、東京

下村 泰代 免疫から考える敗血症性 DIC の治療: DIC と好中球細胞外トラップ (NETs) の関係、第 2 回東京 CE 敗血症セミナー 特別講演、2015 年 6 月 11 日、東京ガーデンパレスホテル、東京
下村 泰代 NETs と敗血症性 DIC 第 3 回姫路 DIC フォーラム、2015 年 2 月 18 日、ホテル日航姫路、兵庫県

下村 泰代 NETs と敗血症性 DIC 第 3 回京都北部 DIC 講演会、2015 年 2 月 21 日、サンプラザ万助、兵庫県
下村 泰代 NETs と敗血症性 DIC 第 2 回昭和臓器不全フォーラム、2015 年 1 月 30 日、シェラトン都ホテル東京、東京

下村 泰代 NETs (Neutrophil Extracellular Traps) と DIC 第 41 回日本集中治療医学会学術集会 教育セミナー 18 2014 年 2 月 28 日、国立京都国際会館、京都

須賀 美華、下村 泰代、加藤 由希、酒井 俊和、中村 智之、栗山 直英、原 嘉孝、内山 壮太、湯本 美穂、西田 修 DIC 治療薬による NETs (neutrophil extracellular traps) 形成抑制効果の検討 第 41 回日本集中治療医学会学術集会 一般演題ポスター 42 2014 年 2 月 27 日、国立京都国際会館、

京都
下村 泰代、須賀 美華、栗山 直英、
原 嘉孝、中村 智之、西田 修 リコ
ンビナントヒトロンボモジュリンに
よる Neutrophil Extracellular Traps
(NETs) 形成の抑制効果の検討 日本麻
酔科学会第 61 回学術集会、優秀演題
(Q08-2) 2014 年 5 月 16 日、パシフ
ィコ横浜、神奈川 **優秀演題**

Yasuyo Shimomura, Mika Suga,
Osamu Nishida, Tomoyuki Nakamura,
Naohide Kuriyama, Yoshitaka Hara,
Yu Kato, Hiroshi Nagasaki, Naoki
Yamamoto, Shingo Yamada. "A Novel
Role of Recombinant Human
Thrombomodulin in the Formation of
Neutrophil Extracellular Traps."
(Abstract presentation number:
A2123) 2013 Annual Meeting of the
American Society of Anesthesiologists
2013.10.12~16, 2013.10.13 Moscone
Convention Center, Room 104-Area A.
San Francisco, USA

Yoshitaka Hara, Suguru Yagi, Osamu
Nishida, Yasuyo Shimomura The
predictive factors related to the side
effect of the opioid by continuous
epidural opioids for postoperative
analgesia. 4th NWAC World
Anesthesia Convention 2013, Pain
medicine, 2013.4.26, Bangkok,
Thailand

須賀美華、下村泰代、長崎 弘、中村智
之、加藤由布、西田 修 リコンビナ
ントヒトロンボモジュリンによる
Neutrophil extracellular traps 形成の
抑制効果と抗炎症作用の検討 第 60 回
日本麻酔科学会学術集会、口演 救急
ICU 優秀演題(基礎) 第 6 救急 ICU、
2013 年 5 月 24 日、札幌市教育文化会館、
札幌 **優秀演題**

下村泰代、須賀美華、中村智之、加藤由
布、山田晋吾、長崎 弘、西田 修 リ
コンビナントヒトロンボモジュリン
と低分子ヘパリンによる NETs 形成抑制
効果の比較検討 第 28 回日本 Shock 学
会、2013 年 5 月 18 日、北里大学薬学部
第 1 会場 コンベンションホール、東京

〔図書〕(計 1 件)

西田 修、下村 泰代. 白血球・血小板
複合体(NETs). 一瀬 白帝、丸山 征
郎、内山 真一郎 編. 新・血栓止血血
管学 血管と血小板. 京都: 金芳堂;
2015. p.237-239. 総ページ数 250

〔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
<http://fujita-accm.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下村 泰代 (SHIMOMURA, Yasuyo)
藤田保健衛生大学医学部 麻酔・侵襲制御
医学講座 講師
研究者番号: 80534031

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: