

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870422

研究課題名(和文)敗血症時の好中球細胞外トラップとアポトーシス抑制の性差についての検討

研究課題名(英文)Gender differences of neutrophil extracellular traps and neutrophil apoptosis in septic patients.

研究代表者

石川 倫子(Michiko, Ishikawa)

神戸大学・保健学研究科・研究員

研究者番号：40566121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：健常人、及び敗血症患者より好中球を抽出し、4時間培養してアポトーシスとneutrophil extracellular trapsを測定した。健常人好中球はlipopolysaccharideで刺激した。患者血漿中の血漿遊離(cf)DNA濃度を測定した。敗血症患者ではcfDNA濃度が増加し、アポトーシスが抑制され、NETs面積が拡大していた。健常人好中球では男性に比べ女性で有意にアポトーシスが抑制されていたが、患者検体では性差は認められなかった。NETs面積は敗血症性ショックにおいて、男性よりも女性で高値の傾向が見られた。従って、好中球機能には性差がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils were isolated from septic patients and healthy volunteers and harvested for 4 hours. The apoptosis were assessed by Annexin V using flowcytometer, and the area of neutrophil extracellular traps (NETs) was assessed by immunofluorescence staining using anti-H1 antibody and anti-neutrophil elastase antibody. Neutrophils from healthy volunteers were stimulated by lipopolysaccharide. And the plasma cell-free DNA was assessed by realtime RT-PCR using human globin gene. Septic patients showed high cell-free DNA concentrations, low neutrophil apoptosis%, larger NETs areas. The apoptosis% of female was significantly lower than that of male in LPS-stimulated healthy volunteers' neutrophils. NETs area of female tended to be higher than that of male in septic shock patients.

研究分野：救急・災害医学

キーワード：NETs 性差 敗血症 アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症などでは女性の予後が良いことが多数報告されている。好中球は侵襲下ではアポトーシスが抑制され、敗血症による早期臓器障害の一因となることが知られているが、我々はエンドトキシンを腹腔内投与したマウス敗血症モデルの好中球アポトーシスが、雄では抑制されるが、雌では抑制されないことを発見しており(Aoyama M. et al. Shock, 32: 401-409, 2009)、好中球機能には性差が存在する可能性を示してきた。一方、近年、好中球の機能として、自らの DNA を血中に網目状に構成し、抗原を捕捉する neutrophil extracellular traps (NETs)の存在が明らかになった。敗血症では好中球由来の DNA が血漿遊離 DNA (cell free DNA; cfDNA) として測定される可能性が示唆され、cfDNA は NETs の指標として考えられている(Margarf S. et al. Shock, 30: 352-358, 2008)。我々は、兵庫医科大学救命救急センター搬入患者の血液検体を用いて、敗血症死亡例では男性よりも女性で cfDNA 濃度が高い可能性を明らかにした(平成 22 年度-24 年度 若手 B 選択課題 22791748)。したがって、cfDNA 濃度が NETs の指標となりうるのであれば、NETs にも性差が存在する可能性が考えられる。性別により、好中球が得意とする感染制御方法が異なるとすれば、好中球機能の過剰亢進による組織障害にも違いがあると考えられ、患者の予後予測や、治療法の選択に影響を及ぼすと考えられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、救命救急センター搬入患者好中球を用いて NETs 形成能力と好中球アポトーシスを測定し、臨床病態との関連を検討することで、好中球機能の性差の有無と、NETs、アポトーシスの測定が患者予後予測に有用であるかを調べた。また、NETs およびアポトーシスの測定方法についても、従来の方法よりも操作手技が簡便で、迅速に測定できる方法を検討した。

### 3. 研究の方法

対象は兵庫医科大学救命救急センターに搬入された症例の中で、敗血症(感染巣に基づく SIRS であるもの)と診断され、インフォームドコンセントが得られた患者に対して採血を行った。また、健常人コントロールとして、インフォームドコンセントの得られた 19 名の成人から静脈血を採取した。

末梢血の EDTA 採血を行い、比重遠沈法または末梢血細胞分離用磁気ビーズを用いたネガティブ分離により好中球を抽出した。好中球は  $1 \times 10^6$  cells/mL に調整し、NETs 測定用は 8 well チャンバースライドに、アポトーシス測定用は 1.5 mL チューブにそれぞれ 150 $\mu$ L、500 $\mu$ L で播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 下で 4 時間培養を行った。健常人好中球には lipopolysaccharide (LPS E.coli O111:B4,

1 $\mu$ g/mL) で刺激を加えた。培養終了後、NETs 測定用はパラホルムアルデヒドで固定し、抗ヒストン H1 抗体及び抗好中球エラスターゼ抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。核染色には DAPI を用いた。100 倍視野で 5 か所を撮影し、Image J を用いて NETs 形成面積を測定した。アポトーシス測定用は遠心後上清を除き、アポトーシスの指標となる Annexin V とヨウ化プロピディウムで染色を行い、フローサイトメーターを用いて測定した。Annexin V 陽性細胞をアポトーシス細胞として解析を行った。患者血漿中の cfDNA は血漿用の DNA 抽出キットを用いて抽出した。抽出後の DNA は定量リアルタイム RT-PCR を用いてヒト b-globin 遺伝子発現の定量を行い、標準ヒト DNA で検量線を引いて濃度を測定した。臨床検体の血液生化学データは検体採取日の電子カルテに記載されている血液データを用いた。結果は平均値±標準偏差で示した。

### 4. 研究成果

研究期間全体で登録された患者数は 46 名であった。検体採取条件などから、cfDNA 濃度は 38 名、アポトーシスは 13 名、NETs は 10 名について測定を行った。

#### 1) 血漿遊離 DNA (cfDNA) 濃度について

健常人 19 名の cfDNA 濃度は  $0.6 \pm 0.87$   $\mu$ g/mL であり、男性(14 名)では  $0.8 \pm 0.98$   $\mu$ g/mL、女性(5 名)では  $0.2 \pm 0.18$   $\mu$ g/mL で、統計学的に有意な性差は見られなかった(図 1)。

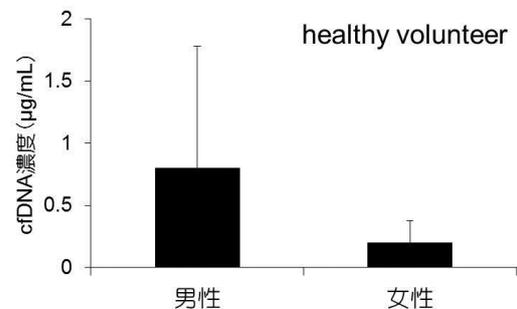


図 1. 健常人における血漿中 cfDNA 濃度

患者検体での cfDNA 濃度は非敗血症(non sepsis 9 名)で  $18.8 \pm 24.24$   $\mu$ g/mL、敗血症患者(sepsis 11 名)で  $114.68 \pm 282.04$   $\mu$ g/mL、敗血症ショック患者(septic shock 15 名)で  $87.1 \pm 249.10$   $\mu$ g/mL、外傷患者(3 名)で  $5.1 \pm 1.28$   $\mu$ g/mL であった。敗血症、敗血症性ショックでは cfDNA 濃度が非敗血症、外傷、健常人に比べ高い値を示す傾向が見られたが、個人差が大きく、統計学的に有意な差は認められなかった(図 2)。また、それぞれの病態における性別の cfDNA 濃度は非敗血症:男性(4 名)で  $25.2 \pm 31.13$   $\mu$ g/mL、女性(5 名)で  $13.6 \pm 19.33$   $\mu$ g/mL、敗血症患者:男性(11 名)で  $139.6 \pm 309.14$   $\mu$ g/mL、女性(2 名)で  $2.1 \pm 2.71$   $\mu$ g/mL、敗血症ショック患者:男性(9 名)で

29.1±78.51 µg/mL、女性（2名）で 246.8±471.86 µg/mL（図 3）、外傷患者；男性（2名）で 4.8±1.58 µg/mL、女性（1名）で 5.8 µg/mL であった。病態別、性別での年齢、APACHEII スコアは表 1 の通りであった。

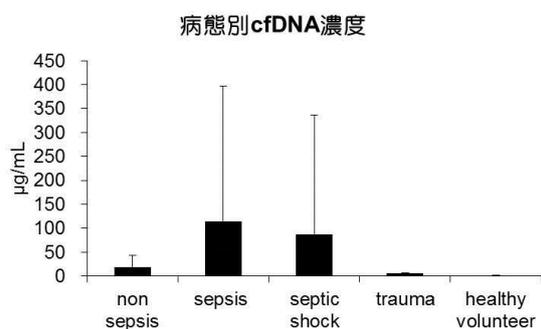


図 2.病態別での cfDNA 濃度の比較

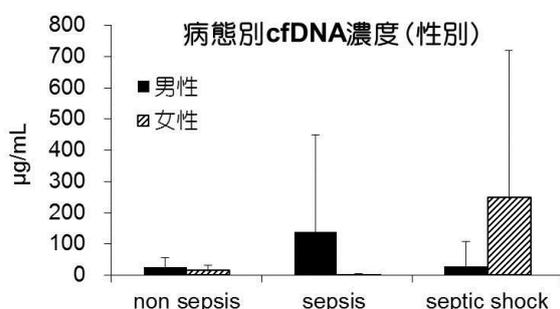


図 3.非敗血症、敗血症、敗血症性ショックにおける性別の cfDNA 濃度の比較

表 1. 各病態での性別の年齢及び APACHEII スコア

	男性	
	年齢	APACHE II
healthy volunteer	22.3±1.86	-
non sepsis	76.5±11.47	23.0±4.36
sepsis	65.8±17.26	18.9±6.95
septic shock	67.6±17.82	35.0±9.40
trauma	45.0±5.66	14.0±9.90

	女性	
	年齢	APACHE II
healthy volunteer	21.6±0.55	-
non sepsis	79.6±11.30	20.2±5.89
sepsis	86.0±1.41	39.0±13.44
septic shock	74.0±9.20	31.8±2.63
trauma	51	23

以上より、cfDNA は健常人では非常に少なく、敗血症病態で増加することが明らかとなった。また、男性では敗血症で、女性では敗血症性ショックで、より多くの cfDNA が存在する傾向が見られた。

## 2) 好中球アポトーシスについて

健常人好中球（14名）は男性（9名）で 60.5±16.21%、女性（5名）で 45.2±13.71% であった（図 4）。女性の方が男性よりも好中球のアポトーシスは少ない傾向であった。

一方、患者好中球（13名）では 16.6±13.04% のアポトーシスがみられ、健常人に比べ有意にアポトーシスが少なかったことが明らかとなった ( $p < 0.01$  by student t-test) が、性別では男性（8名）で 17.4±11.90%、女性（5名）で 15.3±16.10% であった（図 4）。患者検体について、病態別では、非敗血症（3名）で 8.8±6.88%、敗血症（4名）で 22.6±10.65%、敗血症性ショック（6名）で 16.5±16.0%、であり、敗血症、敗血症性ショックでは非敗血症に比べ若干高い傾向が見られた（図 5）が、有意な差ではなかった。また、敗血症または敗血症性ショックにおいて男性 6名、女性 4名の検体が得られたことから、性別によるアポトーシス%を検討したが、男性で 19.1±13.42%、女性で 18.6±16.43%、であり、有意な差は認められなかった。

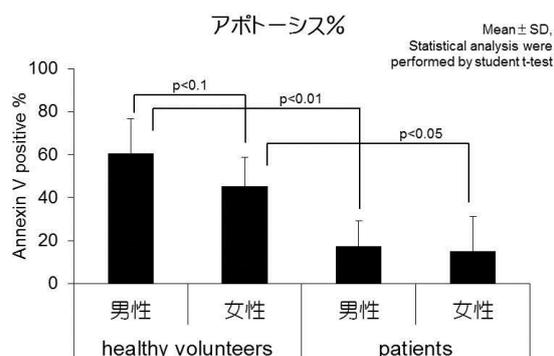


図 4.健常人及び患者好中球の性別でのアポトーシス割合の比較

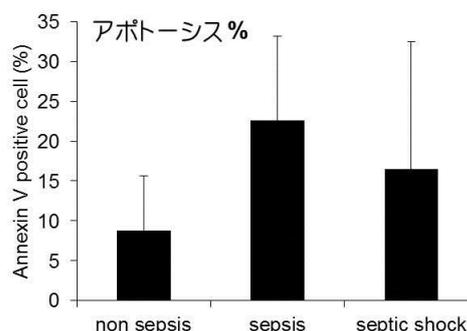


図 5.病態別のアポトーシス割合の比較

以上より、健常人検体においては LPS 刺激でアポトーシスが男性よりも女性で少ない傾向が見られたが、患者検体では今回検討した n 数で有意な結果は得られなかった。

## 3) NETs について

NETs 計測方法については、簡便法として

DAPI のみの染色と、ヒストン H1、好中球エラスターゼ、DAPI の 3 重染色の結果とを比較したが、DAPI のみでは十分な NETs 形成を確認することは難しかった。従って、3 重染色で得られた結果を用いて解析を行った。健康人好中球 (19 名) での NETs 面積は  $34.5 \pm 31.06 \mu\text{m}^2$  であった。男性 (14 名) は  $37.5 \pm 35.06 \mu\text{m}^2$ 、女性 (5 名) は  $26.0 \pm 15.00 \mu\text{m}^2$  であり、性別による有意な差は認められなかった。一方、患者好中球による NETs 面積は  $130.6 \pm 177.99 \mu\text{m}^2$  であり、患者検体において健康人よりも NETs が増加している傾向が見られたが、個体差が大きく、有意な差は無かった。また、性別でも、男性 (6 名) は  $69.7 \pm 92.63 \mu\text{m}^2$ 、女性 (4 名) は  $221.9 \pm 249.44 \mu\text{m}^2$  であり、健康人よりも大きい傾向があったが、有意な差は認められなかった (図 6)。

病態別での NETs 面積は非敗血症 (2 名) で  $49.5 \pm 23.13 \mu\text{m}^2$ 、敗血症 (2 名) で  $124.0 \pm 167.57 \mu\text{m}^2$ 、敗血症性ショック (6 名) で  $159.8 \pm 218.23 \mu\text{m}^2$  であった。敗血症性ショックについて性別での解析を行うと、男性 (3 名) で  $34.8 \pm 5.37 \mu\text{m}^2$ 、女性 (3 名) で  $284.8 \pm 263.78 \mu\text{m}^2$  であり、女性の方が NETs が多い傾向が見られたが、有意な差は認められなかった (図 7)。

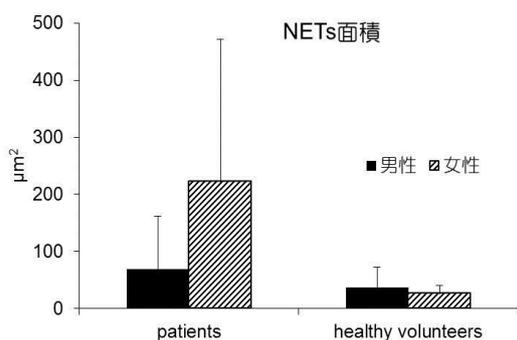


図 6. 健康人及び患者好中球の性別での NETs 面積の比較

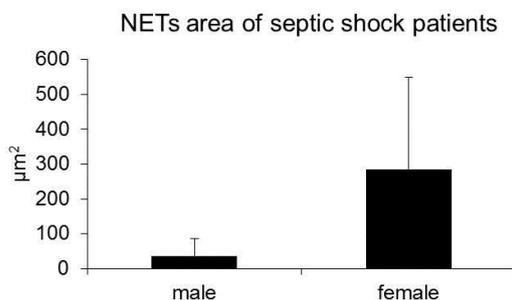


図 7. 敗血症性ショック患者における性別の NETs 面積の比較

以上より、患者好中球では健康人よりも NETs 面積が増加する可能性が考えられ、これは血漿遊離 DNA の結果と一致する。また、血漿遊離 DNA 及び NETs 面積の測定の結果、

敗血症性ショックにおいては男性よりも女性の方が NETs 形成が多い可能性が考えられるが、統計学的な有意差は得られていないため、十分な n 数を確保し、さらに詳細に検討する必要がある。

これらの結果より、血漿遊離 DNA の測定結果と抽出した好中球の NETs 形成能力を免疫染色で解析した結果はよく似た傾向を示したため、血中の NETs 形成の指標として血漿遊離 DNA は有効かもしれない。また、敗血症性、敗血症性ショックにおける性差は統計学的な有意差は認められなかったが、女性はアポトーシスが少なく、NETs 形成が多い傾向が見られたことから、今後も性差について研究を進める余地があるのではないかと考えている。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Aoyama-Ishikawa M, Yamashita H, Oka N, Usami M, Nakao A, Kotani J. Antithrombin III reduced neutrophil extracellular traps of lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. 8<sup>th</sup> Asian Conference for Emergency Medicine Taipei International Conventional Centre (Taipei, China), Nov. 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2015.
2. 石川倫子、山下勇人、宇佐美眞、中尾篤典、小谷穰治 敗血症病態における好中球アポトーシスへのアンチトロンビン III の効果について 第 30 回日本 shock 学会総会、京王プラザホテル八王子 (東京都 八王子市)、2015 年 5 月 22 日～23 日

[図書] (計 0 件)

[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

石川 倫子 (ISHIKAWA Michiko)

神戸大学大学院・保健学研究科・保健学研  
究員

研究者番号：40566121

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：