

機関番号： 32620
研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21390485
研究課題名 (和文) アデノシンレセプターを標的とした好中球機能の調節と急性肺障害に対する治療法の開発

研究課題名 (英文) Novel trial to control acute lung injury by regulating neutrophil function targeting for A3 adenosine receptor

研究代表者

井上 貴昭 (YOSHIAKI INOUE)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：60379196

研究成果の概要 (和文)：本研究は、好中球 (Polymorphonuclear Leukocyte; PMN) 機能の発現の trigger として注目されている Adenosine Receptor (ADR) の内、特に PMN 機能に negative feedback を発現する A3ADR に注目し、全身性炎症反応症候群 (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) 患者を対象に、治療標的としての Biomarker としての可能性を模索するものである。

研究成果の概要 (英文)：We focused on Adenosine Receptor that has been reported as a trigger of Polymorphonuclear Leukocyte (PMN) activation on the scene of inflammation, especially for A3 subtype (A3ADR) that works as a negative feedback for PMN activation. Through measuring A3ADR expression on PMN for the patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), we tried to evaluate the possibility of A3ADR as a target of SIRS and Acute Lung Injury (ALI).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
平成 22 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
平成 23 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：救急医学

科研費の分科・細目：

キーワード：A3 adenosine receptor, 好中球、高張塩化ナトリウム溶液、Systemic Inflammatory Response Syndrome, 急性肺障害

1. 研究開始当初の背景

ALI は、重症外傷や広範囲熱傷、あるいは SIRS に続発する合併症の一つであり、救急医学領域において生命予後を左右する重要病態である。しかし、ALI についてはこれまでその発症機序は十分に解明されておらず、確立された治療法も未だ不十分であった。我々はこれまでにラット ALI モデルを用いて、ALI の発症には白血球機

能が亢進して、肺微小循環障害が生ずる機序を報告した(Inoue et al. *CCM* 2005)。また臨床研究においても ALI 患者の白血球機能は亢進してその変形能が低下し、微小循環モデルにおいて循環障害をきたすことを明らかにした (Inoue et al. *J Trauma* 2006)。一方白血球機能亢進のメカニズムについて、近年 PMN 表面に発現する ADR の関与が注目されている (Chen et al. *Science* 2006)。この報告による

と、PMN の遊走能の発現やエラスターゼ脱顆粒機能の発現に ADR の亜型である A3 adenosine receptor (A3ADR) が trigger となることが証明されている。我々は、この PMN 表面の ADR を調節することにより、ALI の発症原因となる PMN の活性化を抑制できる可能性に注目している。1980 年代より出血性ショックの治療法として注目されてきた高張塩化ナトリウム溶液 (Hypertonic Saline; HS) は、循環作動作用のみならず、immunomodulator としての作用が注目され、特に PMN 表面の ADR の発現を介した作用であることが報告された (Junger et al. *J Clin Invest* 1998)。我々はマウス ALI モデルにおいて、ADR をノックアウトしたマウスでは通常マウスに比較して ALI の発症が抑制されていることを報告した (Inoue et al. *Shock* 2008)。しかし、HS は投与タイミングによっては全く逆に PMN 機能を亢進させることが既に報告されており (Murao et al. *Shock* 2002, Hashiguchi et al. *J Trauma* 2006)、現状臨床応用には至っていない。我々もマウス ALI モデルに対して異なるタイミングで HS を投与してその効果を検討したところ、sepsis 発症前に HS を投与した群では ALI 発症は抑制され、生存率が control に比べて有意に改善したのに対し、sepsis 発症後に HS を投与した群は逆に ALI が増悪し、生存率が悪化することを報告した (Inoue et al. *CCM* 2008)。この ADR を調節する HS の作用機序に我々は注目し、臨床的には使用困難な HS に代わって、この ADR を調節する拮抗剤や adenosine 細胞内取り込み阻害剤などの adenosine 代謝を調節する薬剤の投与により、PMN 機能をコントロールして ALI 合併症例の予後を改善させることを発案した。

本研究はまず A3ADR が ALI の前病態ともいえる SIRS の重症度評価となりうるかどうかを評価し、HS の投与によって A3ADR 発現及び PMN 機能が調整できるかどうかを検討した。A3ADR を治療標的として、HS などの A3ADR 発現調節効果が SIRS、ALI の治療薬としての有用性の可能性を探ることである。

2. 研究の目的

- (1) ヒト全血液を用いた A3ADR の測定系を確立すること。
- (2) SIRS の重症度と A3ADR 発現率との相関を明らかにすること。
- (3) 臨床的に簡易的に評価が可能な biomarker として、白血球変形能、酸化ストレス・抗酸化能と A3ADR の相関性を明らかにすること。
- (4) In vitro において HS の投与タイミングと A3ADR 発現の変化を明らかにし、SIRS 患者における変化を評価すること。

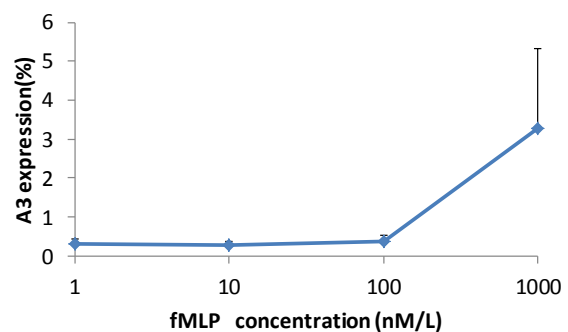
3. 研究の方法

- (1) 当院救命センターに入院する患者のうち、SIRS 診断基準を満たす患者について全血液を採取する。該当患者に対して以下の項目を測定・評価し、重症度判定を行う。
 - ・患者重症度評価スケール：APACHE II score,
 - ・末梢血・生化学検査項目：WBC, CRP
- (2) 同時に採血した患者全血液に関して、FACS を用いて、A3ADR 発現率及び信号強度を測定した。
- (3) 同様に SIRS 患者全血液を用いて、Micro channel flow analyzer (MCFAN) PMN 変形能を測定した。
- (4) 更に対象患者の血清を用いて、簡易式活性酸素・抗酸化能測定機器 (FRAS4) を用いて、活性酸素 (dROM) 及び抗酸化能 (BAP) を測定した。
- (5) in vitro において HS (40mM) を SIRS 患者血液に投与し、A3ADR 発現率の変化を測定した。

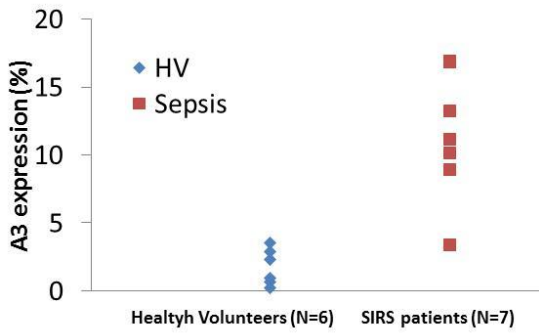
4. 研究成果

A. 炎症、SIRS の重症度評価 biomarker としての A3ADR の臨床的有効性とその他炎症性マーカー

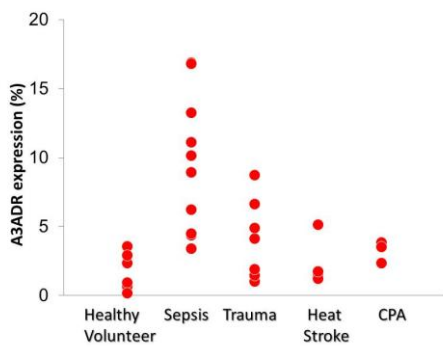
- (1) ADR 測定法の確立：ヒト全血液に対して、A3 adenosine receptor (rabbit) を第 1 抗体、Alexa488 を第 2 抗体として FACS を用いて健常人好中球表面の ADR の測定を行った (各 n=3)。健常ボランティアを用いた実験結果では、 $0.44 \pm 0.23\%$ であった。また fMLP を 0, 1, 10, 100 nM/L の異なる濃度にて刺激したところ、濃度依存性に好中球表面 ADR 発現率は増加した。



- (2) SIRS 患者における ADR 発現率の検討：pilot study において、SIRS 患者 (N=7) では健常人 (N=6) に対して有意な ADR 発現率の上昇を認めた ($p < 0.0001$)。

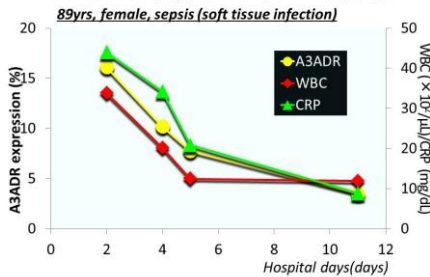


(3) 各傷病における A3ADR 発現率：健常人 6 名、敗血症患者 5 名、外傷患者 5 名、熱中症 2 名、CPA3 症例について、FACS を用いて A3ADR を測定敗血症群は有意に健常人と比較して有意に高値であり (p<0.01)、外傷群では受傷後 7 日以内では明らかな有意差を認めないが、受傷後 7 日以降では有意な上昇を認めた (p<0.05)。
 (4) 従来の炎症マーカーと ADR 発現率の変

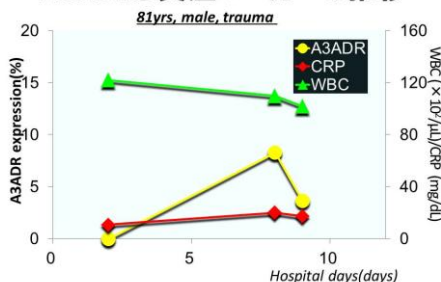


化：CRP 及び WBC の経時的変化とほぼ平行に A3ADR 発現率は変化が見られ、従来の炎症マーカーとの相関性が明らかであった。

Sepsis患者における A3ADRと炎症マーカーの推移

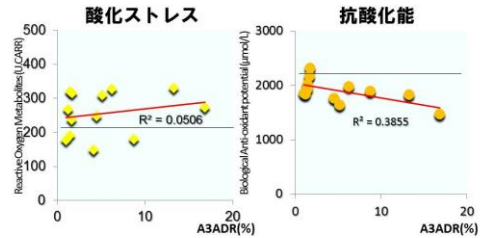


Trauma患者における A3ADRと炎症マーカーの推移

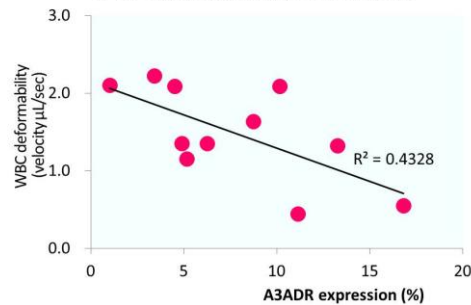


また、フリーラジカルと有意な相関を認めないが、白血球変形能、抗酸化能と有意な相関を認めた。更に、A3ADR は APACHE2score と有意な相関を認めた。

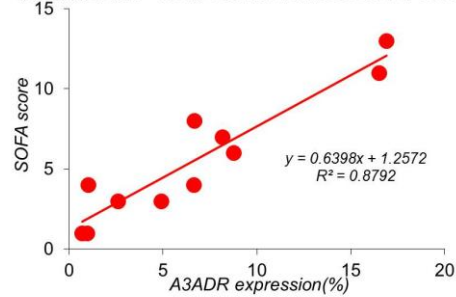
酸化ストレス・抗酸化能とA3ADR



白血球変形能とA3ADR

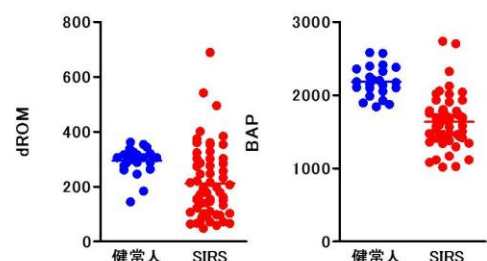


外傷患者におけるA3ADRとSOFA score



(5) SIRS 群 (N=24, 59samples) は健常人 (N=23) と比較して、有意に dROM/BAP の低下、白血球変形能の低下、及び A3ADR 発現の増強、を認めた。

- ① 酸化ストレス/抗酸化能
 dROM; p<0.0001, BAP; p<0.05



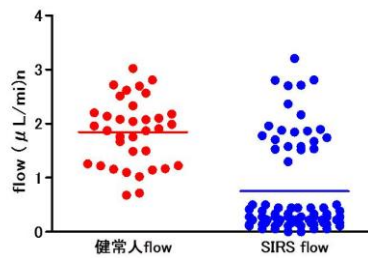
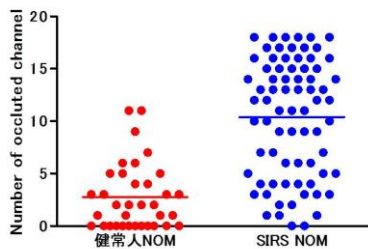
② 白血球変形能

白血球変形能は、100 μ Lのサンプル血液のマイクロチップを通過する流速 (flow μ L/min) と、1視野あたりのチャンネル閉塞数で定量評価した。

SIRS患者では、健常人と比較して有意な低下を認めた。従来の炎症マーカーと負の相関を認めた。つまり、炎症が波及するにつれ、白血球変形能が低下し、流速は低下した。

NOM ; $p < 0.0001$

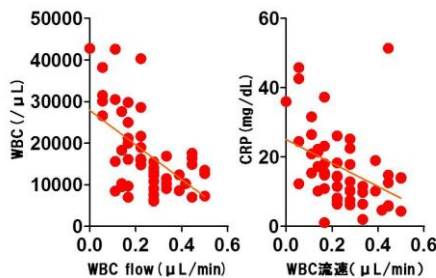
Flow ; $p < 0.0001$



③ A3ADR

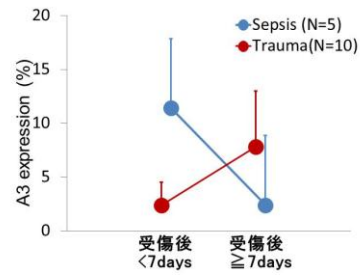
A3発現率原疾患によってその経日的変化は異なった。Sepsisでは早期に高値であり、経日的に低下したが、外傷では早期は低値であり、経日的に増加した。

vs.SIRS $p < 0.05$



B.A3ADR 発現コントロールと Hypertonic Saline

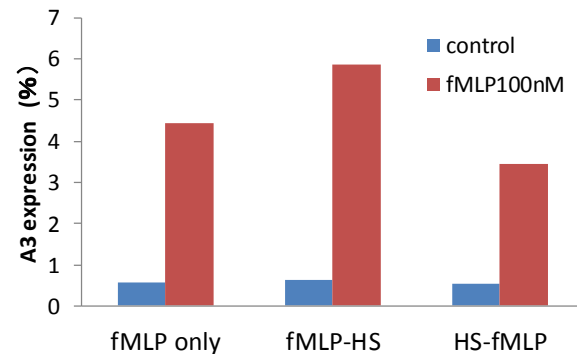
(1)HS 投与タイミングと ADR 発現率の変化 : 健常人ボランティアから採取した全血液に、



f MLP 刺激後 HS 投与、HS 投与後 f MLP 刺激、及び f MLP 単独刺激時と好中球表面の ADR 発現率を比較した。

fMLP 単独刺激時 $6.58 \pm 0.83\%$ に対して、fMLP \rightarrow HS $8.61 \pm 3.99\%$ 、HS \rightarrow fMLP $4.37 \pm 1.32\%$ であり、好中球に対する fMLP 刺激前の HS 投与によって ADR 発現率は抑制され、f MLP 刺激後の HS 投与によって、ADR 発現率は亢進することが明らかになった。

(2)SIRS 患者の全血液を用いて、In vitro において HS 投与すると、A3ADR 発現率を有意に低下した (HS- vs. HS+ : $130 \pm 48\%$, $158 \pm 95\%$, $p < 0.05$)。



本研究の成果は、これまでその生理学的機能があまり明らかにされていなかった A3ADR を SIRS 患者において測定したことにより研究意義がある。理論的には PMN 機能発現の trigger となる A3ADR であるが、SIRS の診断基準を満たす様々な救急疾患のうち、Sepsis では早期から高値を示し、治療経過と共に経日的に改善する経過が明らかとなったが、逆に Trauma では、当初は低値であるが、病状の進行と共に発現が上昇する過程が明らかとなった。その観点からは、A3ADR は炎症の過程において早期のマーカーというよりも、炎症が進行した段階で細胞質から細胞膜表面に発現するという、これまでの生理学的機序を裏付ける側面ももち、infection や sepsis など、むしろ炎症でも晩期の biomarker として機能する可能性が示唆された。その観点

からは、今後 A3ADR よりも侵襲早期に Adenosine と結合する A2a サブタイプの ADR 発現性を確認する必要があると思われる。

また本研究においては、PMN 機能として臨床の現場で簡易的に測定可能な項目として、専用機器を用いた白血球変形能、及び過剰酸素・抗酸化能を合わせて測定した。これまでにいずれも SIRS 患者において数多く測定した報告はなく、この観点からも重要な研究と思われる。更にこれらの白血球変形能や、過剰酸素・抗酸化能といった PMN 機能は、A3ADR 発現と密接な関係を保有することが明らかにされ、極めて重要な知見を得たと考えられる。

本研究で SIRS 患者に対して測定した A3ADR は HS の投与によって in vitro では A3ADR 発現の抑制が認められた。しかしながら、健康人の vitro study では、HS を fMLP 刺激、つまり PMN が活性化される前に投与すると、A3ADR 発現が抑制される一方で、fMLP 刺激後に HS を投与するとむしろ A3ADR 発現は増悪することが明らかにされた。今後 A3ADR を治療標的として、HS などの ADR 調整薬剤を SIRS あるいは ALI の治療薬に応用する可能性は示唆されるが、投与タイミングなど臨床的にクリアされるべき課題は多く、今後更なる研究を要すると考えられる。

【結語】

- a. PMN 表面に発現する A3ADR の測定を、ヒト全血液を用いて行った結果、fMLP 濃度依存性に発現が増強した。
- b. SIRS 患者では、健康人に比べて有意に A3ADR 発現が上昇した。
- c. SIRS 患者において A3ADR は従来の炎症反応マーカーと相関して、炎症反応を密接に反映した。
- d. SIRS 患者では、抗酸化能の低下、白血球変形能の低下が合わせて認められ、A3ADR と共に炎症反応を反映する biomarker としての有用性が示唆された。
- e. HS は A3ADR 発現に影響を与え、早期に投与した場合、A3ADR 発現を抑え、SIRS 患者の治療に有効である可能性が示唆された。

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)

- ① Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG: Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. FASEB J 23:1685-1693. 2009.
- ② Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhali A, Inoue Y, Woehrle T, Zhang Q, Hauser C, Junger WG. Purinergic signaling: a fundamental

mechanism in neutrophil activation. Science Signaling 125: ra45, 2010.

- ③ Inoue Y, Ikegawa H, Ukai I, Yoshiya K, Sumi Y, Ogura H, Kuwagata Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. Spontaneous occlusion of splenic and renal pseudoaneurysm after blunt abdominal trauma: A case report and literature review. Journal of Emergency Medicine 38; e17-22, 2010.
- ④ Sumi Y, Woehrle T, Yao Y, Li A, Junger WG. Adrenergic receptor activation involves ATP release and feedback through purinergic receptors. Am J Physiol Cell Physiol 299: 1118-1126, 2010.
- ⑤ Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger WG, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature 464:104-108, 2010.
- ⑥ Inoue Y, Tanaka H, Sumi Y, Woehrle T, Chen Y, Hirsh MI, Junger WG: A3 Adenosine receptor inhibition improves the efficacy of hypertonic saline resuscitation. Shock 35: 178-183, 2011.

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 井上貴昭. 血管透過性亢進の制御: slit と lobo4 receptor. 救急医学 35; 800-802, 2011.
- ② 角 由佳. ミトコンドリアとバクテリア・細胞共生説からみる. 救急医学 35; 788-790, 2011.
- ③ 田島吾郎, 田中 裕. 敗血症における免疫状態・過剰炎症反応と免疫不全. 救急医学 35; 765-768, 2011.
- ④ 小倉裕司, 松本直也, 島崎淳也, 室谷卓, 鎌方安行, 井上貴昭, 田中 裕, 杉本壽. DIC の診療 now and future - 敗血症(sepsis)と DIC. ICU と CCU 34; 603-613, 2010.
- ⑤ 井上貴昭. 救急臨床検査・初療時に必要な救急臨床検査 外傷初期診療. 救急医学 34; 875-880, 2010.
- ⑥ 井上貴昭, 田中 裕: ショック管理 Q&A 迅速で、的確な対応のために・ショック治療の実際 蛋白質分解酵素阻害薬の適応は?いつ始めるか?. 救急・集中治療 21: 903-909, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 角 由佳, 井上貴昭, 松田 繁, 岡本 健, 田中 裕, Junger WG. Damage associated molecular patterns (DAMPs) としての ATP. 第 39 回日本救急医学会総会, 東京 (2011)
- ② 井上貴昭. 好中球表面 A3 adenosine receptor; SIRS 患者における新たな biomarker の開発. 第 25 回日本外傷学会 (2011.5 大阪)
- ③ 井上貴昭, 田中 裕: A3 adenosine receptor 測定による好中球機能の評価と臨床応用 第 31 回炎症再生学会, 東京, 2010 (Inflammation and Regeneration 30 巻 4

- 号 Page338(2010.07)
- ④ 井上貴昭、黒田洋子、福本祐一、森川美樹、李 哲成、林 伸洋、竹本正明、大出靖将、角 由佳、松田 繁、岡本 健、山田至康、田中 裕：好中球表面 A3 adenosine receptor ・SIRS 患者における新たな biomarker の開発. 第 38 回日本救急医学会総会，東京（2010）
- ⑤ 角 由佳、田中 裕、岡本 健、松田 繁、井上貴昭、大出靖将、李 哲成、竹本正明、福本祐一．敗血症における血漿 ATP 濃度と好中球機能活性の関係. 第 38 回日本救急医学会総会，東京（2010）
- ⑥ 井上貴昭，李 哲成，竹本正明，大出靖将，松田 繁，岡本 健，山田至康，田中 裕：ARDS の救命率向上を目指して 高張塩化ナトリウム溶液とアデノシン代謝調節薬を用いた急性肺障害の治療戦略．第 37 回日本救急医学会総会、シンポジウム，岩手．（日本救急医学会雑誌 20：426，2009）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 貴昭 (INOUE YOSHIKI)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：60379196

(2) 研究分担者

田中 裕 (TANAKA HIROSHI)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号：90252676

(3) 研究分担者

岡本 健 (OKAMOTO KEN)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：40347076

(4) 研究分担者

松田 繁 (MATSUDA SHIGERU)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号：00317471

(5) 研究分担者

角 由佳 (SUMI YUKA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：40403084

(6) 研究分担者

岩渕 和久 (IWABUCHI KAZUHISA)
順天堂大学・医療看護学部・教授
研究者番号：10184897

(7) 研究分担者

山田 至康 (YAMADA YOSHIYASU)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号：30459028

(8) 研究分担者

大出 靖将 (OODE YASUMASA)
順天堂大学・医学部・講師
研究者番号：70437424

(9) 研究分担者

竹本 正明 (TAKEMOTO MASA AKI)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：60551801