

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293366

研究課題名(和文)「ネッツ」の制御による重症患者に対する新しい治療戦略の提案

研究課題名(英文) New strategy for critically ill patients by control of NETs

研究代表者

田崎 修 (TASAKI, Osamu)

長崎大学・病院(医学系)・教授

研究者番号：90346221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、重症患者におけるNETsの動態を明らかにした。まず、吸引痰中のNETsの長さが感染症発症日(0病日)から1病日にかけて有意に増加し、6～8病日では1病日と比較して有意に減少することを明らかにした。また、挿管された重症患者の集中治療室入室時の血液を採取し、NETs、およびNETsの形成過程でみられるシトルリン化ヒストンH3(Cit-H3)の存在を評価した。NETsあるいはCit-H3は、吸引痰中に細菌がみられた症例で高頻度に認められた。上記の結果は、臨床病態においてNETsが感染制御に関連していることや、NETsあるいはCit-H3の制御による重症病態の治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified dynamic changes of NETs in critically ill patients. First, length of NETs significantly increased on day 1 compared to day 0(the day of infection), and decreased on day 6-8 compared to day 1. In the other study, we took blood samples from intubated patients on admission to Intensive Care Unit, and determined the existence of NETs or citrullinated histon H3(Cit-H3), which is involved in NETs formation. The existence of NETs or Cit-H3 was observed more often in patients with the presence of bacteria in tracheal aspirates. These results are suggesting that NETs are associated with infection control, and the possibility of treatment by control of NETs or Cit-H3 in patients with critically ill condition.

研究分野：救急医学

キーワード：NETs

1. 研究開始当初の背景

救命センターには、重度外傷をはじめ、熱傷、中毒、敗血症等様々な重症病態に陥った患者が搬送される。急性期を乗り越えた患者の死亡原因のほとんどは、感染症からの多臓器不全である。我々は、これまで様々な感染制御を行い重症患者の予後改善に取り組んできた。その過程で、感染症の第一線で機能する好中球の新規感染制御システムである Neutrophil Extracellular traps (NETs) に着目するに至った。NETs とは、感染により活性化された好中球が自らの DNA や granule protein を含む網目状の構造物を能動的に放出するという現象であり、Brinkmann らにより初めて報告された (Science, 2004)。NETs の放出により細菌を捕獲しながら能動的に細胞死を起こす現象は、apoptosis や necrosis とは異なる細胞死の機序として NETosis と呼ばれ、またこの反応は tissue damage に寄与するとも考えられている。しかし、NETs の臨床病態との関連は、全く明らかにされていなかった。我々は予備的検討において、呼吸器感染を起こした患者の喀痰中の NETs を経時的に追跡し、感染の顕在化とともに NETs の発現量が増加し、感染の鎮静化とともに NETs が減少する、ということを確認した (Am J Respir Crit Care Med 185:1130-1131, 2012)。また、感染症だけでなく外傷、熱傷、心停止、出血性ショック等の重篤な病態の血液にも NETs が発現することを見出した (J Int Med Res. 41:162-168, 2013)。従って NETs は感染症以外の重症病態にも関与している可能性があった。

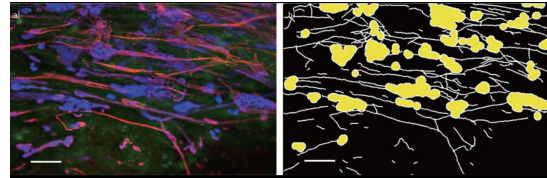
2. 研究の目的

本研究においては、重症患者における NETs の動態を明らかにし、新しい治療戦略の提案を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

吸引痰における NETs の定量化 (発表論文)
集中治療室に入院して気管挿管された 9 例の患者を対象とした。吸引痰は呼吸器感染の発症日 (0 病日)、1 病日、3~5 病日、そして 6~8 病日に採取した。NETs は DNA、好中球エラスターゼ、ヒストン H3 を免疫蛍光染色で可視化することにより同定し、その長さをコンピュータソフトウェア (NeuroLucida [MBF Bioscience, Williston, VT, USA]) で定量化した。この解析ソフトは、元々神経細胞の突起の長さや太さ等を解析するために用いられてきた。神経細胞突起を NETs に、神経細胞体を好中球に見立てて NETs の定量化に応用した。標本を免疫染色した後、蛍光顕微鏡にて 200 倍の視野でランダムに 5 箇所画像を取り込み、NeuroLucida により各画像の全視野における総 NETs 量をデジタル解析した。

図は実際の NETs と NeuroLucida で定量化した画像である (a (左): 免疫染色した喀痰中の好中球および NETs、b (右): NeuroLucida で定量化した画像。線状の構造物を NETs として検出した)。NETs 長は、線状の構造物の長さの和を線状の長さの数で除した長さ



定義した。

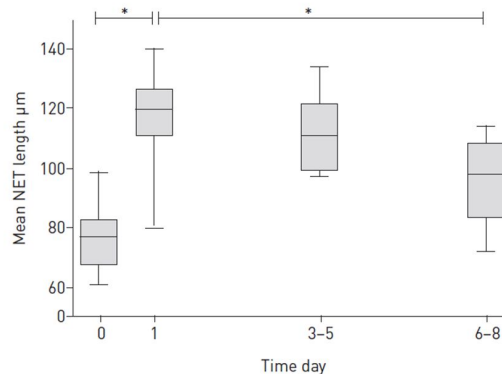
重症患者における NETs およびシトルリン化ヒストン H3 (Cit-H3) (発表論文)

挿管された重症患者 49 例を対象とした。疾患は、外傷 (n=7)、感染症 (n=14)、心停止蘇生後 (n=8)、急性中毒 (n=4)、心疾患 (n=4)、脳卒中 (n=8)、熱中症 (n=2)、およびその他 (n=2) であった。集中治療室入室時に血液を採取し塗抹標本作製した。前述の方法で NETs、および特殊な抗体を用いて NETs 産生過程に重要と考えられている Cit-H3 の存在を評価した。血液中の NETs あるいは Cit-H3 の存在と臨床病態 (吸引痰中の細菌の存在、診断名、血液中の白血球、IL-8 濃度、TNF-濃度、等) との関連を多重ロジスティック回帰で解析した。

4. 研究成果

吸引痰における NETs の定量化 (発表論文)

図に示すように、NETs 長は、0 病日から 1 病日にかけて有意に増加し (*p<0.05)、6~8 病日では 1 病日と比較して有意に減少していることが明らかとなった (*p<0.05)。これをグラム染色、および免疫蛍光染色のスライドと

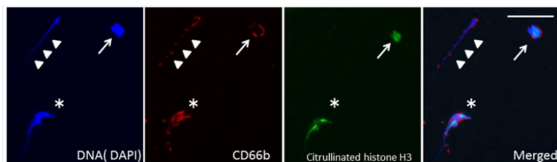


合わせてみると、感染発生時の吸引痰には極少数の NETs しか認められないが、1 病日には好中球の浸潤とともに NETs の拡がり認められ、そして適切な抗菌薬の投与後呼吸器感染の改善に伴い NETs 長が減少している様子が観察された。本研究より、臨床例においても NETs が感染制御に深く関連していることが示唆された。

重症患者における NETs および Cit-H3 (発表論文)

次ページの図は血液中の好中球 (), NETs を

放とうとしている好中球(*)、そして放たれた NETs(矢頭)を免疫染色で示したものである。前2者には Cit-H3 が含まれているが(と*)、放たれた NETs には含まれていないことがわかる。この結果は、NETs の放出に先立って Cit-H3 が出現していることを示唆して



いる。従って、NETs および、Cit-H3 の存在は、同じ NETs の生成過程をみていると判断した。本研究においては、49 例中、NETs の発現がみられたのは 5 例であり、Cit-H3 が認められたのは 11 例であった。下表は、血液の免疫蛍光染色で NETs もしくは、Cit-H3 が陽性であった症例の疾患毎の割合を示す。心停止蘇生後 (62.5%)、脳卒中 (37.5%)、感染症 (28.6%) 等の陽性頻度が高い。多重ロジスティック回帰分析で NETs もしくは Cit-H3 が陽性であることとの関連因子を解析した結果、「気管吸引痰における細菌の存在」が最も関連があることが判明した。このことは、既に感染症を起こしている症例だけでなく、心停

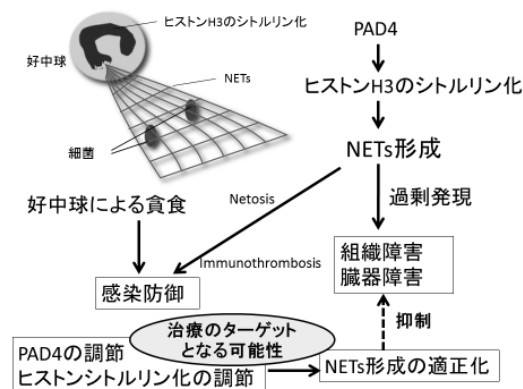
Diagnosis	NET positive (n)	Cit-H3 positive (n)	NET and/or Cit-H3 positive (%)
Trauma (n=7)	0	0	0/7 (0)
Infection (n=14)	3	2	4/14 (28.6)
Resuscitated from cardiopulmonary arrest (n=8)	2	3	5/8 (62.5)
Acute poisoning (n=4)	0	1	1/4 (25.0)
Heart disease (n=4)	0	0	0/4 (0)
Brain stroke (n=8)	0	3	3/8 (37.5)
Heat stroke (n=2)	0	1	1/2 (50.0)
Others (n=2)	0	1	1/2 (50.0)
Total (n=49)	5	11	15/49 (30.6)

止蘇生後や脳卒中等の意識障害患者において、気管内に細菌が侵入することが NETs 形成の引き金になっていることを示唆しており、生体が感染の危機にさらされる早期の段階から NETs が感染制御に関わっていることを推測させる結果であった。

今後の展開

上記の研究結果より、NETs が臨床病態の感染制御に関わっていることが推測されたが、NETs 形成が生体に有益に働いているとは限らない。近年、NETs が重症病態において、生体へ悪影響を与える可能性があることが報告されるようになった(NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, 2013)。Pathogen-associated molecular patterns(PAMPs)や damage-associated molecular patterns(DAMPs)に反応して、好中球は DNA やヒストンを含む NETs を放出し病原体を捕獲するが(図)、この時同時に凝固系 pathway を亢進させ血栓形成を促す(immunothrombosis)。生理的範囲内では、NETs が誘導する immunothrombosis は、病原体を局所に閉じ込めるといった感染防御の役割を果たすが、これが生理的範囲を超えて病的なまでに進行すると、動静脈の血栓形成や Disseminated intravascular coagulation を引き起こし多臓器不全の原因となる可能性

が指摘されている。逆に言えば、NETosis をコントロールすることにより、新たな治療展開が生まれる可能性もある。我々は、吸引痰を Deoxyribonuclease(DNase) I で処理すると NETs が短くなり消失することを確認した(発表論文)。NETs の過剰形成により血栓形成等の有害事象が起こるとすれば、それを DNase I を用いて制御できる可能性がある。また、本課題研究の過程で、Cit-H3 が NETs 形成に重要な役割を果たすことを示唆する結果を得た。従って、ヒストン H3 のシトルリン化に必須の酵素である Peptidylarginine deiminase 4(PAD4)の阻害薬も治療応用できる可能性がある。NETs は自己免疫疾患の抗原になるとも報告されており(Nature medicine, 2014)、Cit-H3 を介した炎症反応のメカニズムの解明が進めば、感染症や、熱傷、外傷等の急性期疾患だけでなく、SLE やリウマチ疾患等の慢性疾患に対する治療への応用も可能となり、その



恩恵は極めて広範囲に及ぶことになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)
高橋健介, 田崎修 人工呼吸器関連肺炎 マネジメントとその予防 medicina 54 巻 24-27, 2017. (査読無)

田崎修 気道熱傷の病態と治療 長崎市医師会報 50 巻 12-16, 2016. (査読無)

【敗血症の病態生理 2016-私はこう考える -】 敗血症における NETs の位置づけとその対策 廣瀬智也, 山本倫久, 小島将裕, 竹川良介, 明田幸宏, 田崎修, 朝野和典, 嶋津岳土 ICU と CCU 40 巻 9 号 619-624(2016.09). (査読無)

Low total cholesterol and high total bilirubin are associated with prognosis in patients with prolonged sepsis. Yamano S, Shimizu K, Ogura H, Hirose T, Hamasaki T, Shimazu T, Tasaki O. J Crit Care. 2016 Feb;31(1):36-40. (査読有) doi: 10.1016/j.jcrc.2015.09.033. Epub 2015 Oct 17.

最新基礎科学 知っておきたい細菌感染症における NETs の役割 廣瀬智也 臨床整形外科 50 巻 894-897, 2015.(査読有)

[蛋白のシトルリン化-生理的意義と病態における役割] 敗血症とヒストン H3 のシトルリン化 廣瀬智也, 濱口重人 医学のあゆみ 255 巻 895-898, 2015.(査読有)

悪寒戦慄を伴う高熱、全身性皮疹で来院した日本紅斑熱の 1 例 猪熊孝実, 長谷敦子, 泉野浩生, 山野修平, 田島吾郎, 平尾朋仁, 山下和範, 山梨啓友, 齊藤信夫, 田崎修 日本臨床救急医学会雑誌 17 巻 3 号 481-485(2014.06) (査読有)

感染症における好中球活性化の意義 Neutrophil Extracellular Traps(NETs)を中心に 関雅文, 廣瀬智也, 濱口重人, 山本倫久, 小島将裕, 松本直也, 明田幸宏, 田崎修, 嶋津岳土, 朝野和典 感染症 44 巻 4 号 132-134, 141, 137-138(2014.07). (査読無)

Neutrophil extracellular traps in bronchial aspirates: a quantitative analysis. Hamaguchi S, Hirose T, Matsumoto N, Akeda Y, Irisawa T, Seki M, Hosotsubo H, Yamamoto K, Tasaki O, Oishi K, Shimazu T, Tomono K. Eur Respir J. 2014 Jun;43(6):1709-18.(査読有) doi: 10.1183/09031936.00139813.

Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Tasaki O, Hosotsubo H, Yamamoto N, Yamamoto K, Akeda Y, Oishi K, Tomono K, Shimazu T. PLoS One. 2014 Nov 13;9(11):e111755 (査読有). doi: 10.1371/journal.pone.0111755. eCollection 2014.

重症病態における NETs(Neutrophil Extracellular Traps) 廣瀬智也, 濱口重人, 松本直也, 竹川良介, 山本倫久, 小島将裕, 入澤太郎, 関雅文, 田崎修, 山本紘司, 小倉裕司, 朝野和典, 嶋津岳土 Shock 28:55-60, 2013 (査読無)

[学会発表](計 13 件)

田島吾郎(発表者) 全身炎症における自然免疫受容体発現パターンによる感染症診断法 第 44 回日本救急医学会総会 2016 年 11 月 18 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

Tajima G (発表者) Infection diagnosis in systemic inflammation by innate immune expression pattern. 75th Annual Meeting of

the American association for the surgery of trauma and clinical congress of acute care surgery. 2016 年 9 月 14 日 ワイコロア(米国)

田崎修(発表者) 気道熱傷の病態と治療、そして今後の展望について 第 42 回日本熱傷学会総会・学術集会 2016 年 6 月 3 日 シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県・浦安市)

Takegawa R (発表者) Analysis of Neutrophil by Hyper Spectral Imaging-a preliminary report-. 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency. 2016 年 3 月 15 日 ブリュッセル(ベルギー)

Yamamoto N (発表者) Neutrophil extracellular traps(NETs) production under hypoxic condition 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency. 2016 年 3 月 15 日 ブリュッセル(ベルギー)

Yamamoto N (発表者) The Role of Extracellular Traps against Soft Tissue Infections. 35th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. 2015 年 3 月 17 日 ブリュッセル(ベルギー)

Ojima M(発表者) The Presence of Neutrophil Extracellular Traps in Bronchial Aspirate of Patient Diagnosed as ARDS or Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 35th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. 2015 年 3 月 17 日 ブリュッセル(ベルギー)

小島将裕(発表者) 重症呼吸不全を乗り切るために ARDS 患者における喀痰中の Neutrophil Extracellular Traps(NETs)形成と臨床経過の検討 第 42 回日本救急医学会総会 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Tasaki O(発表者) Pharmacologic Therapy for Inhalation Injury. 17th Congress the International Society of Burn Injuries. 2014 年 10 月 14 日 シドニー(オーストラリア)

濱口重人(発表者) Neutrophil Extracellular Traps under critical condition 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 18 日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

廣瀬智也(発表者) 敗血症・重症感染症の生存率向上に向けた研究と取り組み 第 41 回日本救急医学会総会 2013 年 10 月 22 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

Hamaguchi S(発表者) Neutrophil extracellular traps in acute respiratory infection: a quantitative analysis in sputum. The 109th International Conference of the American Thoracic Society. 2013 年 5 月 20 日 フィラデルフィ

ア(米国)

廣瀬智也(発表者) ショック領域のトランスレーショナル・リサーチ 重症病態における NETs(Neutrophil Extracellular Traps) 第28回日本 Shock 学会総会 2013年5月18日 北里大学薬学部コンベンションホール(東京都・港区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

長崎大学病院救命救急センター

<http://www.mh.nagasaki-u.ac.jp/emc/>

大阪大学医学部附属病院高度救命救急センター

<http://www.osaka-u-tacc.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田崎 修(TASAKI, Osamu)

長崎大学・病院(医学系)・教授

研究者番号: 90346221

(2) 研究分担者

嶋津 岳士(SHIMAZU, Takeshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 50196474

朝野 和典(TOMONO, Kazunori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40202204

小倉 裕司(OGURA, Hiroshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 70301265

関 雅文(SEKI, Masafumi)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80432970

田島 吾郎(TAJIMA, Goro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号: 00437427

山野 修平(YAMANO, Shuhei)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号: 60570538

松本 直也(MATSUMOTO, Naoya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 50359808

廣瀬 智也(HIROSE, Tomoya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 70597509

萩谷 英大(HAGIYA, Hideharu)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30718531

入澤 太郎(IRISAWA, Taro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 50379202

濱口 重人(HAMAGUCHI, Shigeto)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 20735360

竹川 良介(TAKEGAWA, Ryosuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 30759577

小島 将裕(OJIMA, Masahiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 70721091

(3) 連携研究者: なし

(4) 研究協力者

山本 倫久(YAMAMOTO, Norihisa)