

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09253

研究課題名(和文)敗血症性急性腎障害モデルにおける好中球細胞外トラップの役割の解析

研究課題名(英文)NETs in septic AKI

研究代表者

安田 日出夫 (Yasuda, Hideo)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60432209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：目的は、敗血症性急性腎障害における好中球細胞外トラップ(Neutrophil Extracellular Traps:NETs)の動態と役割を明らかにすることである。腹膜炎による敗血症マウスで腹水中にNETsは検出され、腎臓では検出されなかった。NETsの代替マーカーとしての好中球とミトコンドリアDNAは腹膜炎後の腹水に増加しTLR9ノックアウトでさらに増加した。これはTLR9経路によって感染巣のNETsが制御され、感染巣のNETs形成が細菌の除去に寄与していることを示唆した。以上より敗血症性急性腎障害において感染巣NETsの制御によって急性腎障害及び死亡を制御できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify dynamics and roles of neutrophil extracellular traps (NETs) in septic acute kidney injury (AKI). NETs were detected in ascites but not kidney during sepsis. Neutrophils and the mitochondrial DNA as the surrogate markers of NETs increased in ascites after the peritonitis and increased by TLR9 knockout. NETs formation in ascites was controlled by TLR9. It could improve septic AKI to control NETs in ascites.

研究分野：腎臓内科

キーワード：好中球細胞外トラップ 敗血症 急性腎障害

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害(Acute Kidney Injury ; AKI)の罹患率は近年増加の一途を辿り、集中治療室で発生した AKI は多臓器不全を伴い、死亡率は 60-70%にも及ぶ。敗血症は集中治療室での AKI の原因で最も多く、予後不良である。以上のことから、敗血症による AKI は現代の AKI の最重要課題でありその対策は急務である。

我々は Toll-like Receptor (TLR)9 ノックアウトによって盲腸結紮穿孔(cecal ligation and puncture:CLP)腹膜炎による死亡率や AKI を軽減されることを報告してきた。さらに CLP では過剰なミトコンドリア(mt)DNA が全身循環し、内因性のダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs)として TLR9 と結合し炎症を誘発することによって AKI 進展に大きな役割を担っていることを明らかにした。しかしながら、敗血症時に見られる mtDNA の起源は分かっていない。

好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs)は、好中球が細胞外にクロマチン(DNA)で構成される網目状の構造物を放出する現象で核内蛋白、MPO、エラスターゼなどが付着しており、微生物を取り込んで抗菌作用を示す。mtDNA は NETs や細胞死などにより DAMPs として作用するかもしれない。mtDNA 放出の上流に NETs 形成が関わっているかもしれない。NETs の動態を知れば、mtDNA を制御できるかもしれない。敗血症の治療ターゲットになりうる。

2. 研究の目的

敗血症性 AKI における NETs の動態を明らかにする。

3. 研究の方法

1)組織凍結切片にて NETs は MPO、シトルリン化ヒストンの多重染色共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価。技術的な確立を目的にヒト腎生検検体を用いて NETs の描出、定量を行う

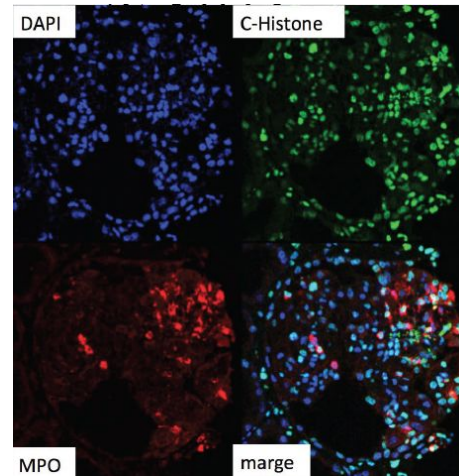
2)マウス CLP モデルにおいて腹腔内にある腹水を回収し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて核染色にて形態学的に NETs をきたしているかを評価。確認できた場合定量化を行う

3)NETs を直接的に定量することが困難な場合、mtDNA と好中球を定量化して mtDNA と好中球の動態から NETs の動態を検討する。

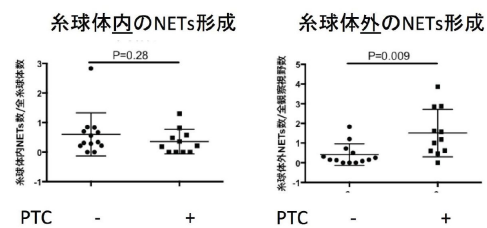
4. 研究成果

1)NETs の検出

NETs は、MPO、シトルリン化ヒストンの多重染色共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。DAPI、ヒストンと MPO が重なって白く写っている箇所を NETs として同定した。



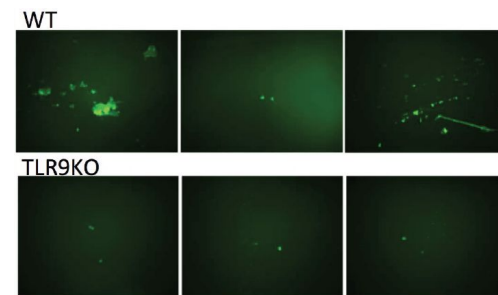
2)糸球体障害による AKI のヒト腎生検における NETs の動態の評価



傍尿細管毛細血管炎(PTC)陽性群では、PTC 陰性群と比較し、糸球体 1 個あたりの NETs 数は有意差なく、一視野あたりの糸球体外の NETs 数は有意に多かった。以上より傍尿細管毛細血管炎を認めた ANCA 関連血管炎では、糸球体外を主体に NETs が形成される。PTC による尿細管間質障害に NETs が関与している可能性が示唆された。

3)CLP における NETs の同定

共焦点レーザー顕微鏡にて CLP 腹水から回収した炎症細胞の DAPI による核染色から形態学的に NETs を同定。しかしながら定量評価は困難であった。



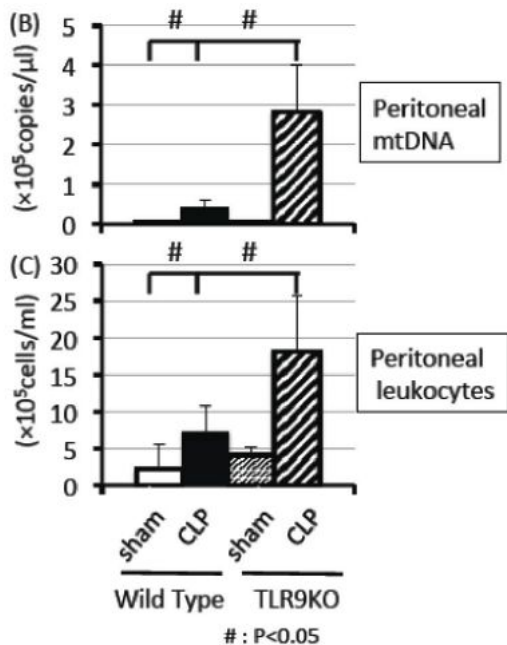
4)CLP における腎臓内 NETs

免疫蛍光染色にて評価したが、腎臓内では検出されなかった。

5)腹膜炎敗血症における腹水中の mtDNA 定量と好中球数

NETs の定量が困難であったため腹水中の mtDNA と好中球数を評価。

CLP で腹水中の mtDNA と好中球が増え、TLR9



ノックアウトでさらに増加した。このことは腹水中のNETsがCLPで増え、TLR9ノックアウトによってさらに増加していることを示唆する。

以上より、CLPで腹腔内でNETsが増え、TLR9ノックアウトでさらに増加することで感染制御に関わっている可能性がある。

TLR9経路によって感染巣のNETsが制御され、TLR9ノックアウトで感染巣のNETs形成が増強され細菌の除去に寄与していることが示唆された。

以上より敗血症性急性腎障害において腎臓においてでなく感染巣に見られるNETsの制御によって敗血症に伴う急性腎障害及び死亡を制御できる可能性がある

一方で腎臓などの臓器でのNETsの役割は現時点で明らかでないこと、NETsの同定方法が十分でなかったことに課題を残した。

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 4件)

1. 安田日出夫 AKI次世代バイオマーカーの可能性 日本透析医学会雑誌 2018; 51(2): 129-34
2. Iwakura T, Fujigaki Y, Fujikura T, Tsuji T, Ohashi N, Kato A, Yasuda H. Cytoresistance after acute kidney injury is limited to the recovery period of proximal tubule integrity and possibly involves Hippo-YAP signaling. *Physiol Rep*. 2017;5(11). pii: e13310.
3. Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, Kato A, Fujigaki Y, Yasuda H: Role of mitochondrial DNA in septic AKI via toll-like receptor 9. *J Am Soc Nephrol* 27(7): 2009-2020, 2016.
4. Iwakura T, Fujigaki Y, Fujikura T,

Ohashi N, Kato A, Yasuda H. Acquired resistance to rechallenge injury after acute kidney injury in rats is associated with cell cycle arrest in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 310(9):F872-84. 2016

〔学会発表〕(計 4件)

1. 安田日出夫 急性腎障害早期診断マーカーの最新知見と臨床的意義 第25回医療薬学フォーラム 2017年7月 鹿児島
2. 辻尚子, 佐藤太一, 内藤善隆, 辻孝之, 大橋温, 加藤明彦, 安田日出夫 傍尿細管毛細血管炎を伴うMPO-ANCA関連血管炎におけるneutrophil extracellular trapsの腎臓組織内分布の特徴 第59回日本腎臓学会学術総会 2016年6月 横浜
3. 辻孝之, 辻尚子, 安田日出夫, 加藤明彦, AKIに対する尿中KIM-1のバイオマーカーとしての近年の評価と生物学的役割について、第27回急性血液浄化学会 2016年10月 東京
4. 安田日出夫 辻尚子 辻孝之 加藤明彦 敗血症性AKIの新たな治療票的 第61回日本透析医学会学術集会・総会、2016年6月 大阪

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ
<https://www.hama-1st-med.jp>

6. 研究組織
(1)研究代表者

安田日出夫 (Yasuda Hideo)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60432209

(2)研究分担者

辻孝之 (Tsuji Takayuki)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：30464126