

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15564

研究課題名(和文) CHDF・ECMO使用時の回路内血栓形成における好中球細胞外トラップの寄与

研究課題名(英文) Contribution of neutrophil extracellular traps in the thrombus formation during the management of CHDF/ECMO

研究代表者

篠田 健 (SHINODA, Ken)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30727243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要(和文)：好中球細胞外トラップ(NETs)の形成が過凝固状態を誘導し、CHDF/ECMOにおける回路内血栓形成の一因になっているのではないかと考え、ラットを用いた実験で検討することを計画した。採血検体から分離した好中球をイオノマイシンで活性化してNETs形成を誘導し、さらに、小動物用ダミーカラムを用いた体外循環モデルを作成してNETs溶液を静注したが、回路内に血栓形成を得ることはできなかった。また、CHDF患者における血栓形成におけるNETsの寄与に関する検討も計画したが、NETs形成の定量に導入しようとしたフローサイトメトリーを用いた方法に問題があることが判明し、研究期間内で結果を得ることを断念した。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a rat model to study the contribution of neutrophil extracellular traps (NETs) in hypercoagulable state in the management of extracorporeal circulation. Neutrophils were isolated from blood sample from rats, and ionomycin was added to induce NETs. After the cannulation of the femoral vein and the carotid artery, a dummy column was connected to them, and NETs solution was injected intravenously. However, intracolumn thrombus formation was not observed during 4h period after the start of this extracorporeal circulation. We also tried quantification of NETs using flow cytometry (Gavietti et al. Am J Hematol 90: 1155), to apply this method to the prospective clinical studies. However, NETs formation induced change in the pattern of FSC-SSC plot, which resulted in difficulty in definition of cell population for measurements. Further methodological improvement might be needed to study the relationship between NETs formation and hypercoagulable state.

研究分野：集中治療医学

キーワード：CHDF 好中球 血栓形成

## 1. 研究開始当初の背景

好中球は、外傷による組織の損傷や、感染が起きた際に、DNA・ヒストンタンパクを含む自身の核成分を細胞外に放出し、粘性のある網目状の構造を形成し、血中の病原体を捕捉してプロテアーゼにより攻撃する性質を持つ。好中球から放出される二重鎖 DNA を骨格とする構造を好中球細胞外トラップ (NETs) と呼び、自然免疫の一つの過程であると考えられているが、NETs が過度に形成されることが、血管内皮傷害を起こしたり、凝固機能を修飾したりすることにより、肺傷害、腎傷害、血栓塞栓症を引き起こすとの指摘がある。我々は、先行する研究で、心臓血管手術における NETs 形成の指標として、血清中の二重鎖 DNA (dsDNA) 濃度を、麻酔導入直後 (Baseline)、手術直後 (PostOp)、手術の翌日 (POD1) の 3 点で計測し、手術に伴う二重鎖 DNA 濃度の変化と臓器傷害との関連について検討したところ、手術を受けた患者において、術直後に DNA 分解酵素の活性が低下し、二重鎖 DNA の濃度が上昇し、術後 D - ダイマー高値を示す患者は、術直後や手術翌日の血清中二重鎖 DNA 濃度が高い傾向があることが暫定的な結果として得られた (図 1)。

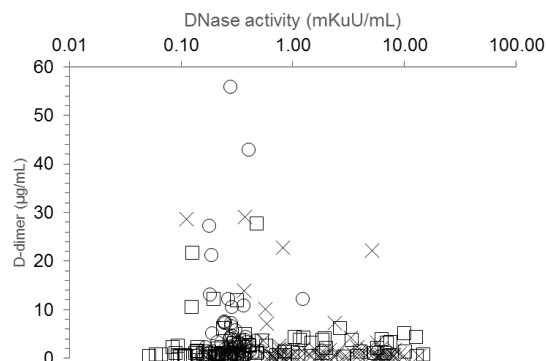


図 1：術前から手術翌日にかけての D - ダイマー値と血清 DNase 活性の相関。心臓手術を受けた患者 80 名における検討結果。術前 (x) 術直後 (o) 手術翌日 (□) のプロットを重ねたもの。D - ダイマーが高値となる症例では、DNase 活性が 1mKuU/mL 以下のレベルに分布し、低い傾向が示された。(未発表データ)

これらの結果より、周術期には、組織への外科的操作等により、好中球が活性化を受け、NETs が放出され、同時に、一時的に NETs が分解を免れるような機構が働くが、炎症の遷延などにより、これらの状態が継続すると過凝固状態になりやすくなり、特に持続血液濾過透析 (CHDF) や膜型人工肺 (ECMO) などにおける体外循環使用時における回路内血栓形成の一因になっているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 集中治療室で CHDF または ECMO 管理が行われている患者において、血清およびクエン酸 Na 採血管を用いた血漿採血を行い、血中二重鎖 DNA 濃度および DNA 分解酵素活性を測定し、回路内凝固の発生の有無、CHDF の背景となる基礎疾患との関係や、凝固系検査の指標との相関について検討する。(2) ラットを用いた実験モデルにおいて、別な個体から採血した血液から分離した好中球を刺激して NETs を形成させた状態で投与し、凝固系がどのように変化するかを検討し、DNA 分解酵素やトロンボモジュリンなど、NETs 形成に伴う血栓形成への治療的介入の可能性について検討する、という二つの目的を設定して研究計画を立てた。長時間の体外循環管理を行う際、ヘパリン化を適切に行っていても血栓が形成されるケースをしばしば経験するが、この現象に NETs 形成が関与していることが明らかにできれば、血栓形成を防ぐための治療的介入のターゲットを設定することができ、体外循環管理の安全性の向上につながると思われる。また、NETs 血症そのものが過剰な炎症反応の表れであるならば、その制御により、全身状態の改善にもつながると考えられる。

## 3. 研究の方法

<ラットを用いた NETs 投与による NETs 血症モデルの作成及びラット体外循環モデルにおける血栓形成性の検討>

- (1) ラットを、ペントバルビタール麻酔による深麻酔下に安楽死させ、心室穿刺により、ヘパリン加シリンジに採血し、Histopaque1077 を等容量加えて 400g × 45 分間遠心し、上層を廃棄し、下層を 6% デキストラン添加 0.15M NaCl に懸濁する。37 °C で 20 分間インキュベーションした後、270g × 20 分間遠心し、ペレットに塩化アンモニウム溶液 (Veritas#07800) を加えて氷上で 15 分間処理することで溶血させ、480g × 10 分間の遠心により、細胞成分を回収し、HBSS 溶液で洗浄した後、270g × 10 分遠心し、ペレットを 1mL HBSS 溶液で懸濁し、好中球溶液とする。
- (2) (1) で作成した好中球懸濁溶液に 4µM Ionomycin を加え、2 時間 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置し、NETs 形成を誘導する。
- (3) (2) の好中球懸濁溶液を一部サンプリングし、細胞外 2 重鎖 DNA 量を Pico-Green 法で測定する。
- (4) NETs の投与量を細胞外二重鎖 DNA 量で規定し、3 段階の投与量を決定する。

- (5) SD ラットの総頸動脈と大腿静脈にカニキュレーションを行い、小動物用エンドトキシン吸着カラムに対するダミーカラムを用いた体外循環モデルを作成する。
- (6) 別なラットの外頸静脈より NETs 形成好中球懸濁液を投与し、NETs 血症 (NETosis モデル) を作成する。
- (7) 投与後 1 時間後、2 時間後、4 時間後、8 時間後に総頸動脈カテーテルより採血し、血算、フィブリノーゲン、D-ダイマー、von Willebrand 因子および血清二重鎖 DNA 濃度、DNase 活性、DNaseI 抗原濃度、サイトカイン濃度、エンドトキシン濃度の測定を行い、体外循環回路内の血栓形成に関する所見とともに記録する。
- (8) 以下の 8 群で (1) から (7) までのプロトコルを施行し、比較検討する。

A	Sham 群		n=8
B	Sham 群		n=8
C	NETosis (1)	カラム (-)	n=8
D	NETosis (1)	カラム (+)	n=8
E	NETosis (2)	カラム (-)	n=8
F	NETosis (2)	カラム (+)	n=8
G	NETosis (3)	カラム (-)	n=8
H	NETosis (3)	カラム (+)	n=8

<CHDF、補助人工心臓などの体外循環装置装着中の患者における血栓形成における NETs の寄与に関する検討>

東京医科歯科大学医学部附属病院 ICU ならびに ER-ICU で持続血液ろ過透析 (CHDF) (40 例) または膜型人工肺 (ECMO) 管理が必要となった患者 (20 例) について、これらの体外循環を開始する直前 (臨床研究エントリー時)、開始後 24 時間後、48 時間後、72 時間後に採血を行い、血清およびクエン酸処理による血漿を採取する。炎症性サイトカイン、D-dimer、フィブリノーゲンおよび、抗凝固薬の投与状況について測定・記録し、回路内凝固の有無及び予後との相関について、検討する。

#### 4. 研究成果

<ラットを用いた NETs 投与による NETs 血症モデルの作成及びラット体外循環モデルにおける血栓形成性の検討>

SD ラット安楽死後の心腔内採血により得られた血液から得られた細胞懸濁液を Cell counter でカウントした場合の細胞数は血液 1mL に換算して 90-100 万個程度であった。

これを遠心してペレットとし、最終濃度が 4 $\mu$ M となるように Ionomycin - RPMI を加えて、37 5%CO<sub>2</sub> 下に 2 時間インキュベートしたものを NETs 溶液として調整した。

さらに、SD ラットの総頸動脈および大腿静脈にカニキュレーションを行い、小動物用エンドトキシン吸着カラムに対するダミーカラムを用いた体外循環モデルを作成し、NETs 溶液を外頸静脈より静注投与したが、4 時間経過後にも血栓形成を得ることはできなかった。(n = 4) 好中球としての収量が安定していなかったことや、より長時間安定化させたモデルを作成しないと血栓形成に至らない可能性があることが示唆された。ここで動物実験は中止とし、臨床研究の実施を計画した。

<CHDF、補助人工心臓などの体外循環装置装着中の患者における血栓形成における NETs の寄与に関する検討>

持続血液ろ過透析 (CHDF) 40 例または膜型人工肺 (ECMO) 管理が必要となった患者 20 例について、これらの体外循環を開始する直線、開始後 24 時間後、48 時間後、72 時間後に採血を行い、血清 (血清分離用採血管による)、血漿 (クエン酸 Na 採血管による) を分離し、PT, APTT, フィブリノーゲン, AT-III、可溶性フィブリンモノマー複合体、FDP, D ダイマー、二重鎖 DNA, MPO-DNA, ELISA アッセイ、DNase 活性、トロンボモジュリン、IL-6, IL-8 について測定を行い、回路内凝固の有無との関係を調べる予定であった。

しかし、東京医科歯科大学医学部附属病院集中治療部における人事異動等に伴い、施行体制の再編を余儀なくされて、計画を見直すこととなった。

この間、好中球細胞トラップの定量法として、Gavieff M らの方法 (Am J Hematol 90: 1155-88) に基づき、NETs 形成を定量的評価する方法の導入を検討した。

ボランティアから採血した血液 4 mL に対して 1 mL の Hetasep を加え、90g で 4 分間遠心し、上清を 5 mL ラウンドチューブに移す。回収した液量の 5 倍の RPMI に懸濁し、120g で遠心し、注意深く上清を破棄した。得られたペレットを用いて、4 $\mu$ M となるように Ionomycin を加えて、37 5%CO<sub>2</sub> 下に 30 分間インキュベートし、4%パラホルムアルデヒドで固定した。2 %BSA-DPBS で洗浄ののち、2 %BSA-DPBS100 $\mu$ L に懸濁し、抗ヒストン H3 抗体、抗 MPO 抗体による染色を行い、フローサイトメトリーを行って、Histone H3 - MPO のに重要性の割合をもって、NETs 形成を定量することとするというものだった。

ところが、Ionomycin 処理を行った細胞と行っていない細胞との間で FSC-SSC プロットにおける分布パターンに違いが生じ、対象とする細胞のゲートの設定が難しいことが判明した。大まかにゲートを設定すると、イオノマイシン処理により、HistoneH3 - MPO の二重

陽性となる細胞がある程度の割合で検出されたが、ゲートの設定により、ネガティブな細胞の数が変化してしまうため、この方法をもって、定量評価を行うことは困難と判断した。

以上の状況により、NETs の定量評価する方法が困難もあり、研究期間内に臨床研究の成果を得ることは困難と判断し、計画を中止することとした。

今後、安定した NETs 形成を可能なものとする事ができれば、NETs 形成と血栓形成の間の因果関係を明らかにする実験系を構築できると考えられる。また、臨床的にも再現性に優れた NETs の定量法を導入することで、この領域での研究を進められるのではないかと考えられた。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

篠田 健 (SHINODA, Ken)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30727243

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし