

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20341

研究課題名(和文) ARDS患者におけるNETs発現と好中球の応答性の評価

研究課題名(英文) The expression of NETs and responsiveness of neutrophils in patients with ARDS

研究代表者

廣瀬 智也 (Hirose, Tomoya)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：70597509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NETs (Neutrophil Extracellular Traps)とは、好中球がDNAを含む網目状の構造物を能動的に放出する現象で、重要な感染防御の役割を担っている。これまでの研究で、患者個々の侵襲に対する好中球の応答性には個人差があるのではないかと考えた。まず低酸素下での健常人の好中球のNETs発現の差について調べることとした。大気中の酸素存在下と低酸素下で5人の健常人の好中球を用いて検討したところ、低酸素条件下でNETsの発現減少率は平均58.7%であり、低酸素下でNETs産生が抑制されることが明らかとなった。今後敗血症患者やARDS患者の好中球を用いて応答性の違いを研究していく。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil extracellular traps (NETs) is one of the immune systems to suppress dissemination of infection by the netted chromatin decorated with antibacterial molecules. We hypothesized that NETs production was differenced by patients and the concentration of oxygen. First, we examined neutrophils in healthy volunteers and compared NETs production under atmospheric oxygen and hypoxia. Blood samples were obtained from healthy volunteers. A total of five volunteers cooperated in this study. NETs was produced by PMA stimulation under both conditions. NETs amount decreased under hypoxia in the four cases and the average reduction rate was 57.8%; however, it was not statistically significant ( $p=0.13$ ). These results indicated that NETs production might be reduced under low concentration of oxygen. Further analysis has to be made to clarify the relations between NETs production and oxygen by neutrophils in patients with sepsis and ARDS.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：NETs 好中球 感染 ARDS 低酸素下

### 1. 研究開始当初の背景

NETsとは、好中球がDNAを含む網目状構造物を能動的に放出する現象で、重要な感染防御の役割を担っている(Science.2004 303:1532-1535)。その一方で、NETsの過剰発現は炎症を誘導し組織損傷を引き起こす可能性も報告されている。これらの発見はin vitroや動物実験モデルでなされてきたが、ヒトにおけるNETsの動態を評価した研究は皆無であった。

その中で我々は、先駆的に臨床検体を用いてNETsの動態を明らかにしてきた(Hirose T, et al. Plos one 2014, Hirose T, et al. Am J Respir Crit Care Med 2012, Hamaguchi S, et al. Eur Respir J. 2014, Hamaguchi S, et al. J Int Med Res 2013, 廣瀬智也ら. 日本 shock 学会雑誌 2014)。さらにNETsの定量的な評価として、従来報告されてきた血液中のcf-DNAやDNA/MPO ELISAの測定手法に加え、独自に免疫組織学的手法を用いた定量方法を開発し、それらを用いて急性呼吸器感染症患者の喀痰や重症患者の血液を用いたNETsの定量に成功して報告してきた。同時に、NETs発現の前段階と言われるヒストンH3のシトルリン化を免疫組織学的手法で評価し、重症患者においてヒストンH3のシトルリン化がNETsより前段階で認められることを明らかにした。

ARDSは救命センターに搬送される患者の予後を決定する主要な要因の1つである。しかしARDS発症のメカニズムは解明されておらず、重症症例に対する有効な治療法は確立されていない。NETsの過剰発現は組織損傷に寄与する可能性が動物実験で示唆されており(PloS one. 2012;7(2):e32366, Nature medicine. 2009;15(11):1318-21)、ARDSの病態においては、肺におけるNETsの発現が関与しているのではないかと推測した。そして、平成25年から26年度の研究において、ARDS症例の喀痰中ではNETs発現量とステロイド投与に対する反応性は症例により異なることを明らかにした。ARDS症例における喀痰中のNETs発現のパターン(図1)は、

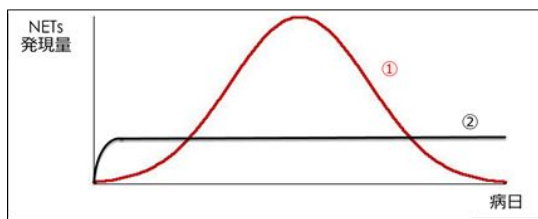


図1: ARDS症例における喀痰中のNETs発現のパターン

NETs発現が少なく、ステロイド投与によりNETs発現量が増量し、その後消褪していく。

ステロイド投与に関わらずNETs発現量はほとんど変化しない。この2つに大きく分けられ、ステロイド投与が

ARDS症例に著効することは臨床現場では度々経験されるが、その著効例はのパターンに多く、死亡例はのパターンが多かった。

これらのことから、患者個々の侵襲に対する好中球の応答性には個人差があるのではないかと我々は考えた。そこで本研究ではARDS患者の喀痰や血液中の好中球の応答性をin vitroにおいて種々のNETs発現刺激やステロイドを用いて評価すること、およびNETsの制御をターゲットにしたARDSに対する新たな治療戦略の構築を目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究は、臨床において各種病態・重症度の好中球を採取し、それを用いて、種々のNETs刺激因子を用いて好中球の応答性(好中球への刺激の違いによりNETsの発現もしくは消褪を誘導できるか、個体差や病態によりその反応に差はあるか、など)やNETs発現が抑えられている好中球の細胞特性(走化能や貪食能、NETs誘導シグナルの問題点はどこか、など)を明らかにし、ARDSにおける好中球の応答性に着目した新たな治療戦略を確立することを目標としている。

### 3. 研究の方法

今回、健常人の血液検体を用いて低酸素条件下での好中球のNETs発現の差について調べた。

#### (1) 健常人血液からの好中球分離

EDTA採血管(7ml)4本にヒト血液を採取する。そのうちの一部を用いて、血球数の測定を行う。falcon tube(15ml)2本にそれぞれ6mlのHistoplaque-1119を入れ、その上に6mlのヒト全血を重層させ、遠心分離(800g、20分間)を行う。上層の黄色・透明の層を破棄し、ピンク色の層(顆粒球を含む)を4-5mlを取り出し、PBSを加え約10mlとし、細胞を洗浄する。遠心分離(300g、10分間)を行い、細胞のみ採取する。100% Percollと1×PBSを混和し、85%、80%、75%、70%、65% Percoll gradient溶液を作成し、2mlずつ重層していく。先ほど採取した細胞溶液を重層させ、遠心分離(800g、20分間)を行う。遠心分離後に最上層と65% (PBMC[Peripheral blood mononuclear cell]が含まれている)層を取り除き、残った層で白濁している部分を取り出し、細胞をPBSで洗浄した後培養液を加えて好中球懸濁液を得る。

#### (2) NETsの培養と同定

低酸素環境を再現するために、アネロパックを用いた。酸素はすぐに吸収され、0.1%以下の濃度が保たれるようにした(図2)。

好中球を約 $4.0 \times 10^5$ /mlになるように調整し、ウェルに投与後、低酸素条件下で1時間培養を行う。PMA(phorbol myristate

acetate)を投与による好中球刺激を行い、さらに3時間培養を行う。ウェルをホルマリン固定のうえ sytox orange による染色を行い免疫組織学的に NETs の発現を確認する(図3)

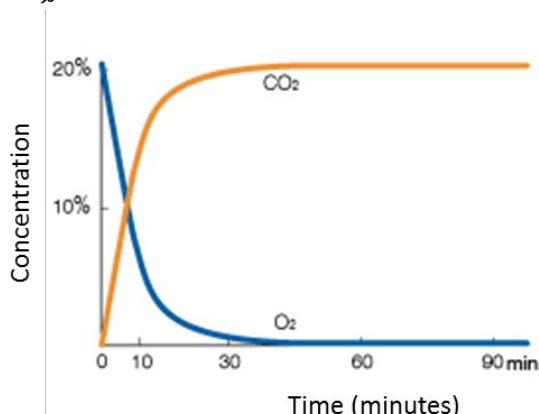


図2：アネロバックを用いた嫌気環境における酸素と二酸化炭素濃度

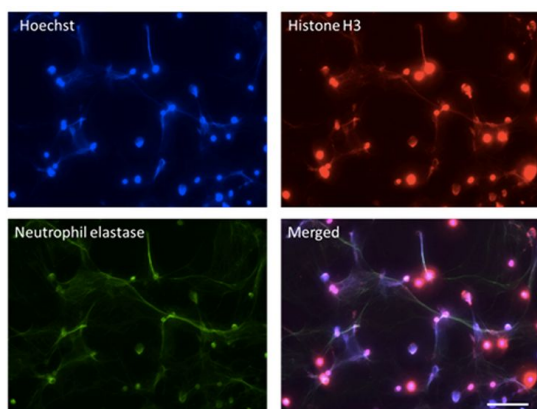


図3：健常人から採取された血液から好中球をPMAにより刺激され発現したNETs

Blue, Hoechst 33342; Red, histone H3; Green, neutrophil elastase

好中球を300個以上カウントするために少なくとも4つの視野でスライドを観察した。NETs-好中球は、特有の網目様の構造物によって同定され、NETsを放出していない正常な好中球とは区別された。大気状態と低酸素状態との間のNETsの割合を、Wilcoxon符号付順位試験によって分析した。

#### 4. 研究成果

健常人5人より協力を得て実験を行った。それぞれの患者の大気下・低酸素下でのNETsの発現は以下のものであった。

##### 被験者1

・大気下

Normal PMNs 220 pieces  
NETs-PMNs 81 pieces  
Percent of NETs 26.9%

・低酸素下

Normal PMNs 289 pieces  
NETs-PMNs 40 pieces

Percent of NETs 12.1%  
低酸素下におけるNETs発現減少率 53.6%

##### 被験者2

・大気下

Normal PMNs 167 pieces  
NETs-PMNs 143 pieces  
Percent of NETs 46.1%

・低酸素下

Normal PMNs 313 pieces  
NETs-PMNs 36 pieces  
Percent of NETs 10.3%

低酸素下におけるNETs発現減少率 77.4%

##### 被験者3

・大気下

Normal PMNs 276 pieces  
NETs-PMNs 29 pieces  
Percent of NETs 9.5%

・低酸素下

Normal PMNs 279 pieces  
NETs-PMNs 34 pieces  
Percent of NETs 10.8%

低酸素下におけるNETs発現減少率 -11.0%

##### 被験者4

・大気下

Normal PMNs 249 pieces  
NETs-PMNs 70 pieces  
Percent of NETs 21.9%

・低酸素下

Normal PMNs 284 pieces  
NETs-PMNs 17 pieces  
Percent of NETs 5.6%

低酸素下におけるNETs発現減少率 74.4%

##### 被験者5

・大気下

Normal PMNs 255 pieces  
NETs-PMNs 54 pieces  
Percent of NETs 17.4%

・低酸素下

Normal PMNs 271 pieces  
NETs-PMNs 39 pieces  
Percent of NETs 12.6%

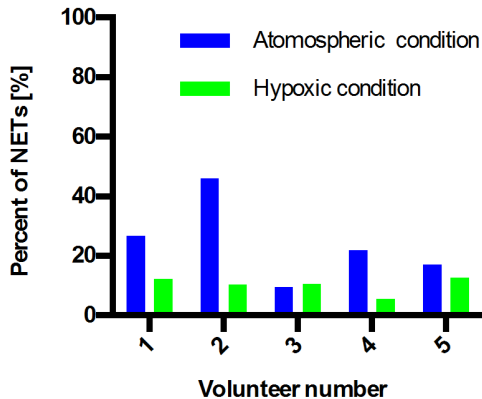
低酸素下におけるNETs発現減少率 26.1%

これらをまとめると、低酸素条件下では4人でNETsの発現減少を認めた。減少率は平均で58.7%であったが、 $p=0.13$ と統計学的な有意差は認めなかった(図5)。

今回、低酸素条件下においては健常人の好中球においてNETs産生が抑制されている可能性があることが示唆された。平成25年から26年度の研究において、ARDS患者では肺においてNETsが適切な時期に発現しない、適切な時期に消失しない症例は予後が悪いことが臨床上明らかになっており、実際の臨床上においても低酸素条件下では好中球からNETsが放出されていないことが考えられ

る。

図 5：大気下と嫌気下における健常人の好中球における NETs 発現の違い



現在は敗血症患者や ARDS 患者の好中球を用いた好中球の応答性の違いを研究しており、敗血症患者や ARDS 患者では好中球の質自体が変化しており、NETs の発現についても健常人と比べて何らかの差を認める可能性がある。

これらのことから ARDS 患者における具体的な将来の治療戦略としては、NETs の発現が認められない場合は NETs 発現を誘導するために、ステロイドを投与する、ステロイド投与の反応性が悪い患者に対しては、その阻害因子を明らかに除去する、NETs 発現が遷延し、消褪しない場合には NETs を分解する DNase などを投与する、などが考えられる。今後も、NETs に着目した新たな ARDS の治療戦略を構築するために研究をすすめていきたい。

#### 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3件)

廣瀬智也, 細菌感染症における NETs の役割 臨床整形外科(査読無) 50:894-897:2015

廣瀬智也, 濱口重人, 敗血症とヒストン H3 のシトルリン化 医学のあゆみ(査読無) 255:895-898:2015

廣瀬智也, 山本倫久, 小島将裕, 他, 敗血症における NETs の位置づけとその対策 ICU と CCU (査読無) 40:619-624:2016

[学会発表](計1件)

Norihisa Yamamoto, Masahiro Ojima, Shigeto Hamaguchi, Tomoya Hirose, et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) production under hypoxic condition. 36<sup>th</sup> International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (2016.3 Brussels, Belgium)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣瀬 智也 (HIROSE, Tomoya )  
大阪大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号：70597509

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )