

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11403

研究課題名(和文) アンチトロンピンは敗血症時の好中球細胞外トラップ形成を制御できるか

研究課題名(英文) Antithrombin III attenuates the formation of neutrophil extracellular traps during sepsis

研究代表者

石川 倫子 (Ishikawa, Michiko)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40566121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスエンドトキシン血症においてアンチトロンピン(ATIII)はエンドトキシン(LPS)による好中球細胞外トラップ(NETs)形成を抑制し、肺障害を軽減して生存率を改善した。また、ATIIIは健常人好中球のLPS刺激によるNETs形成を抑制し、敗血症性ショック患者検体においては抑制する傾向が認められた。LPS刺激時または敗血症性ショック時にNETs面積が小さい場合、ATIIIによるNETs抑制効果が得られない可能性が示唆された。ATIIIによるNETs抑制効果はPKCを介しており、早期の生体防御に利用されるNETs形成ではなく、臓器障害の原因となる過剰なNETs形成を抑制する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はATIIIの投与が過剰なNETs形成を抑制し臓器障害を抑制する可能性を示した。また、感染制御が確立していない状態での早期のATIII投与は、必要なNETs産生を抑制し、生体免疫にとって不利となるが、LPSによるNETs形成が不十分な検体にはATIIIの抑制作用が認められなかったことから、感染防御反応と過剰免疫の境界が不明瞭な病態においても有用なツールとなる可能性があると考えられた。敗血症患者におけるATIII投与は播種性血管内凝固(DIC)治療を主眼としているが、本研究結果より、ATIIIの抗炎症効果にNETs抑制も存在し、NETs由来臓器障害の抑制に効果的である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Administration of AT III after the onset of endotoxemia improved outcomes in a mouse model. AT III treatment attenuated several changes induced in the lungs by endotoxemia including cxcl-2 mRNA expression, HMGB-1 protein expression, neutrophil accumulation, alveolar septal thickening, and NET formation. In cultures of neutrophils from healthy volunteers, lipopolysaccharide (LPS)-induced NET formation was significantly decreased by AT III treatment. A subset of cultures (7/22, 32%) generated few NETs in response to LPS stimulation, and AT III did not decrease NET formation in these cultures. AT III treatment tended to decrease NET formation by cultured neutrophils from septic patients. The protein expression of protein kinase C (PKC), but not PKC β , was increased by AT III treatment. Treatment of the cultures with PKC inhibitors blocked the effects of AT III on NET formation.

研究分野：外科侵襲学

キーワード：好中球細胞外トラップ アンチトロンピン 敗血症 臓器障害 エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

アンチトロンビン(Antithrombin; AT)は抗凝固剤であるが、ヘパリン様物質を持つ Syndecan-4 をレセプターとして血管内皮のプロスタサイクリン合成を促進し、好中球の接着や遊走を抑制するといった抗炎症作用の報告()もなされている。

好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps; NETs) は白血球の一つである好中球が自身の DNA を網目状に放出することで血管や組織で外来抗原を捕捉し、殺菌除去を行う自然免疫機能である。感染防御には重要な機能である反面、血管内で過剰に産生されると血管内皮を障害し、凝固異常や臓器障害を引き起こす(Camicia G et al. Shock 42 (4) :286-94,2014.)。NETs は新しく発見された好中球機能として注目されるだけでなく、敗血症病態における、凝固と炎症の複雑な相互作用の一端を担う可能性が指摘されているが、意外にも ATIII 製剤のような抗凝固、抗炎症のどちらにも効果を持つ薬剤が NETs とどのように関連しているのかはほとんど検討されていない。

研究代表者はこれまでに、lipopolysaccharide (LPS) 刺激後の健常人好中球に ATIII を添加した *in vitro* の実験系で、ATIII が NETs 形成やアポトーシスに直接作用する可能性を発見したが、その機序や、実際の敗血症患者における NETs 形成への影響については明らかではない。

2. 研究の目的

健常人好中球を用い、*in vitro* の系において活性化好中球への ATIII 製剤添加が NETs 形成とアポトーシスにどのような影響をもたらすのか、機序を含め明らかにする。

また、実際の敗血症患者においても同じことが証明されるのか、敗血症患者検体を用いて確認する。さらに、マウス敗血症モデルを作成し、ATIII 製剤の投与が NETs 形成に及ぼす影響と臓器障害との関係性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄性 C57BL/6J マウスを用い、腹腔内に Lipopolysaccharide (LPS) を投与するエンドトキシン血症にて敗血症を模擬するモデルを作成し、LPS 投与後 3 時間後に ATIII を投与した。生存率を確認し、サイトカイン値、肝臓と腎臓の生化学データを血漿にて測定した。肺組織についてはパラフィン切片を染色し、好中球集積、NETs 形成、肺胞壁の肥厚を確認し、mRNA 及び蛋白発現により cxcl-1, cxcl-2 と high mobility group box (HMGB)-1 発現を確認した。

(2) 健常人末梢血での検討 本研究は倫理委員会の承認を得て行われた。インフォームドコンセントにより研究参加への同意が確認できた被験者から採血を行った。健常人末梢血より、磁気細胞分離法を用いて好中球以外の細胞を磁気標識で取り除き、無標識の好中球を採取した。1×10⁶ cells/mL に調整した細胞液を コラーゲンコーティングしたスライドガラスまたは培養用 24 well plate に播種し、37 °C 5% CO₂ で 30 分間培養後、Lipopolysaccharide (LPS, O55:B5) を終濃度 1µg/mL となるように添加した。さらに 30 分間培養し、ATIII を終濃度 10 IU/mL で添加した。

(3) 患者検体での検討 救命救急センター搬入患者のうち、研究参加の同意が得られ、敗血症性ショックと診断された患者末梢血から(1)と同様に好中球を分離、培養した。30 分の培養後、LPS ではなく培地を添加し、さらに 30 分培養後に ATIII を添加した。

(4) 阻害剤による検討 Protein kinase C (PKC) 阻害剤として、Gö 6976 (PKCα 及び PKCβI 阻害)、PKCζ myristoylated pseudosubstrate inhibitor (PKCζ 阻害) を各 0.1- 10 µM にて分離した好中球に添加し、30 分間培養後 LPS を添加した。さらに 30 分培養後 ATIII を添加した。

(5) NETs 面積の測定、蛋白、mRNA の測定 NETs の観察はスライドガラスをエラストラーゼ、ヒストンで蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡で 5 視野/検体 (100 倍) を撮影、Image J で NETs 面積を算出した。24 well plate からは蛋白、mRNA の抽出を行い、それぞれ western blot、ELISA、リアルタイム PCR で解析を行った。

(6) 統計学的解析 正規性の検定を用いてパラメトリック、ノンパラメトリックを確認し、パラメトリックな 2 群間比較については F-test により等分散を確認した。2 群間比較にはステューデント t-test、マンホイットニ U-test、paired t-test、多群間比較には Tukey-Kramer's post hoc test、を用いた。いずれも両側検定を行い、p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。生存率には Kaplan-Meier とログランクテストを用いた。

解析には Statcel4 software (OMS, Tokyo, Japan) を用いた。

4. 研究成果

(1) ATIII 投与により、24 時間後の生存率は LPS 群が 53%であったのに対し、84%まで改善した (p<0.05)。また、肺における cxcl-2 mRNA 発現、HMGB-1 のタンパク発現、好中球集積及び NETs 形成(図 1) 肺胞壁の肥厚を抑制した。一方で、血漿サイトカイン濃度の減少は認められなかったことから、免疫状態を大きく変化さ

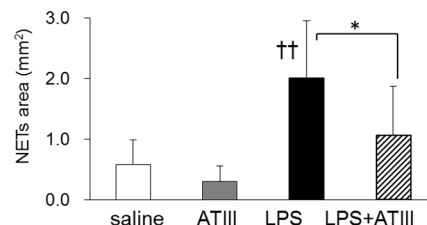


図 1. マウスエンドトキシン血症における肺の NETs 面積

せることなく、肺における好中球の過活性化状態を抑制し、臓器障害を改善する可能性を示唆した。

(2) ATIII は健常人好中球の LPS 刺激による NETs 形成を抑制した。敗血症性ショック患者検体においては抑制する傾向が認められた。このことは、ATIII の投与が過剰な NETs 形成を抑制する可能性を示唆するものである。現在では敗血症患者における播種性血管内凝固 (DIC) 治療を主眼として ATIII 投与が為されているが、臓器障害にも効果的である可能性が示唆される。一方で、感染制御が確立していない状態での早期の ATIII 投与は必要な量の NETs 産生を抑制し、生体免疫にとって不利となる可能性もある。以下 に具体的な結果を示した。

健常人検体による結果 (図 2) 22 名の被験者から得た好中球を用いて NETs 形成を確認した。LPS 刺激により惹起された NETs 面積は $776.2\mu\text{m}^2$ から $7609.5\mu\text{m}^2$ と、個体差が認められた。ATIII 添加で 10% 以上の NETs 面積縮小が認められた検体は 22 検体中 15 検体であり、10% 以上の NETs 面積拡大が認められた検体は 6 検体であった。残り 1 検体については ATIII 投与による変化が認められなかった。NETs 面積縮小が認められた 15 検体については、LPS 単独添加時に $3653.4\pm 1670.2\mu\text{m}^2$ であった面積が $1909.1\pm 691.2\mu\text{m}^2$ まで有意に縮小していた ($p<0.05$)。一方で、NETs 面積が拡大方向に変化した 6 検体については統計学的に有意な増加は認められなかった。

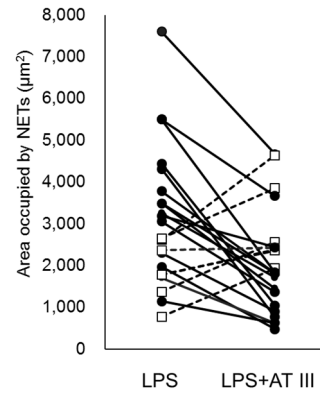


図 2. 健常人好中球の NETs 面積は ATIII により減少した検体は ATIII により増加した検体

敗血症患者検体による結果 (表 1) 6 名の敗血症性ショック患者から得た好中球を用いて NETs 形成を確認した。NETs 面積は $697.7\mu\text{m}^2$ から $77372.7\mu\text{m}^2$ と、健常人検体よりも大きな個体差が認められた。6 名中 5 名の患者で ATIII 添加によって 10% 以上面積が縮小しており、培地添加のみでの平均 NETs 面積 $30155\pm 33430\mu\text{m}^2$ から ATIII 添加時には $17054\pm 20344\mu\text{m}^2$ まで減少が認められたが、統計学的な有意差は得られなかった ($p=0.089$)

(3) LPS 刺激時または敗血症性ショック時に NETs 面積が小さい場合、ATIII による NETs 抑制効果が得られない可能性が示唆された。つまり、ATIII 投与は過剰な NETs 産生のみを抑制することが出来るかもしれない。敗血症など、感染防御反応と過剰免疫による臓器障害の境界が不明瞭な病態において、有用なツールとなる可能性を示唆している。具体的な結果を次の示した。

健常人検体による結果 ATIII により NETs が減少する場合、LPS 単独刺激での平均 NETs 面積 $3653.4\pm 1670.2\mu\text{m}^2$ に対し、増加または変化なしの場合には LPS 単独刺激での平均 NETs 面積が $1685.1\pm 1170.7\mu\text{m}^2$ と有意に小さい ($p<0.01$) ことが明らかとなった。

敗血症患者検体による結果 (表 1) 患者 A-C の 3 名が慢性疾患の治療のためにプレドニゾロンを日常的に内服しており、これらの患者検体における平均 NETs 面積は $2149.7\pm 1649.4\mu\text{m}^2$ と、プレドニゾロン内服が無い残りの 3 名 (D-F) の平均 NETs 面積 $48341\pm 31525\mu\text{m}^2$ に比べ、小さい傾向が認められた ($p=0.064$)。患者 A-C と患者 D-F の末梢血好中球数の平均値には差が認められなかった為、プレドニゾロンの内服により、数の変化は無くとも NETs 形成能力などの好中球機能が低下している可能性が示唆された。さらに、6 名中 1 名 (患者 C) のみ ATIII

表 1. 敗血症性ショック患者好中球の NETs 面積と患者背景

Label	NET Area in Culture (μm^2)		Age, years	Sex	BMI	APACHE II Score	SOFA score	Chronic disease	Steroids ^a	Cause of sepsis	ANC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	Plasma AT, %
	Control	AT III treatment										
A	1808.4	294.2	79	male	26.4	39	12	Chronic renal failure, Diabetes mellitus, Dementia	+	Infection from a bed sore part	181.5	71
B	3943.0	1310.3	70	female	25.7	28	16	Churg Strauss syndrome, Hypothyroidism, Asthma, Hypertension	+	Infection from a cervical soft tissue	259.2	34
C	697.7	1899.0	65	male	17.6	27	7	Rheumatoid arthritis	+	Pneumonia	146.1	43
D	77372.7	45921.2	62	female	21.4	32	4	Schizophrenia	-	Descending necrotizing mediastinitis	116.1	54
E	14807.5	6894.5	63	male	17.2	43	14	N/A	-	Multiple trauma	92.2	77
F	52842.3	30847.3	83	female	17.8	24	4	N/A	-	Strangulated ileus	163.8	68

^a The 3 patients who received steroids were given 5-10 mg/day of prednisolone.

ANC, absolute neutrophil count; AT, antithrombin; APACHE II, acute physiology and chronic health evaluation II; BMI, body mass index; N/A, not available; SOFA, sequential organ failure assessment.

による NETs 抑制が認められなかったが、C の ATIII 非添加時の NETs 面積は $697.7\mu\text{m}^2$ と最も小さく、健常人検体における ATIII による面積低下が認められなかった検体の平均面積 $1685.1\pm 1170.7\mu\text{m}^2$ を下回る面積であった。

(4) ATIII による NETs 抑制効果は PKC を介しており、早期の生体防御に利用される NETs 形成ではなく、臓器障害の原因となる過剰な NETs 形成を抑制する可能性を示唆した。NETs 形成にはいくつか種類が存在し、刺激から 5 分以内に好中球が生存したまま DNA の一部を放出する vital NETs と、刺激から 30 分以上かかってから好中球の DNA の多くを放出し、好中球自体も崩壊する suicidal NETs が有名である。PKC は suicidal NETs の経路の一部として報告されており、今回の実験条件で PKC 経路の関与が確認できたことは、ATIII が suicidal NETs に対して有効であることを示しており、臓器障害の原因となる過剰な NETs 抑制効果が期待できると考えている。具体的な結果を次の に示した。

健常人被験者の内、ATIII への感受性が高く、50%以上の NETs 面積減少が確認できた 3-5 名について、PKC に関する検討を行った。PKC α 、PKC ζ の蛋白量発現を確認したところ、LPS 単独刺激に比べ、ATIII 投与時には PKC α の発現量が有意に増加していることが明らかとなった。一方で PKC ζ の発現量は変化が見られなかった。また、阻害剤を用いた検討では、PKC α 、PKC β I の阻害剤は LPS 単独添加時の NETs 面積を有意に縮小させたが、ATIII を添加してもそれ以上の面積縮小は認められなかった。PKC ζ 阻害剤は LPS 単独添加における NETs 面積に影響しなかったが、ATIII 添加による NETs 面積の抑制は認められなかった。従って、PKC 阻害剤を用いると ATIII による NETs 面積の抑制が認められなくなることから、ATIII による NETs 面積抑制には PKC の経路が関与すると考えられた。

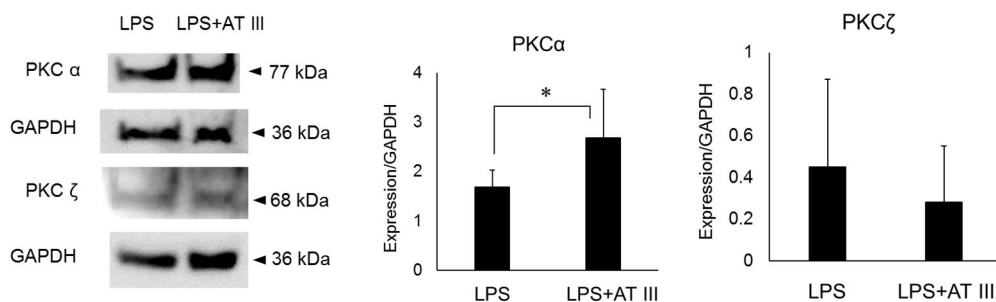


図 3. PKC 蛋白発現

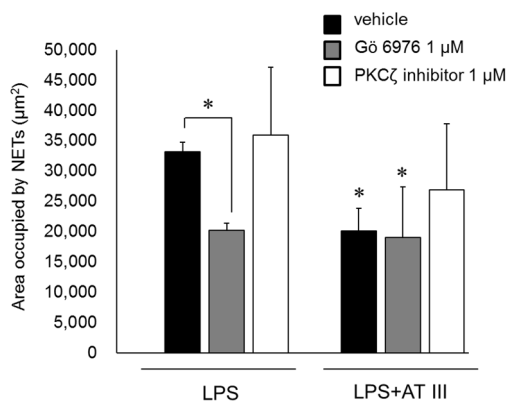


図 4. 阻害剤による検討
Go6979 は PKC α 、PKC β I 阻害剤

が存在していると考えられるため、この個体差を生じる原因を追究する必要がある。本研究成果を国内外の救急医療従事者に広く開示することで、敗血症における臓器障害改善に ATIII 投与が及ぼし得る影響を臨床的に実証できるような大規模研究へとつながる第一歩となることを期待している。

<引用文献>

Sun H.M, Hong L.Z, Shen X.K, et al. Antithrombin- without concomitant heparin improves endotoxin-induced acute lung injury rats by inhibiting the activation of mitogen-activated protein kinase. Chin Med J. 2009; 122: 2466-2471.

Dunzendorfer S, Kaneider N, Rabensteiner A. et al. Cell-surface heparan sulfate

(5) 今後の展望 現在、(1)の成果は既に英文雑誌に掲載されており、(2) - (4)の成果を英文雑誌に投稿中である。敗血症における ATIII 投与については、これまでに大規模臨床検討がなされている()。敗血症性 DIC においては生存率の改善に寄与する可能性が示唆されたものの、敗血症における効果は限定的とされ、本邦以外では積極的な投与は推奨されていない。しかし、本研究が示すように、ATIII の抗炎症作用は投与タイミングによっても効果が異なると考えられ、生存率に貢献するためには ATIII 投与時にある程度の感染制御が出来ている状態であるかどうかも重要な点であると考えられる。さらに、ATIII に反応する検体とそうでない検体が認められたように、効果には何らかの個体差

proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin .
Blood. 2001; 97: 1079-1085.

Camicia G, Pozner R, Larrañaga G. Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. Shock.
2014;42(4):286-294.

Warren BL, Eid A, Singer P, et al. the KyberSept Trial Study Group. High-Dose Antithrombin III in
Severe SepsisA Randomized Controlled Trial. JAMA. 2001;286(15):1869-1878.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Michiko Ishikawa, Hayato Yamashita, Nobuki Oka, Takahiro Ueda, Keisuke Kohama, Atsunori Nakao, Joji Kotani	4. 巻 208
2. 論文標題 Antithrombin III Improved Neutrophil Extracellular Traps in Lung After the Onset of Endotoxemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 140-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2016.09.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小濱 圭祐, 石川 倫子, 藤崎 宣友, 山田 太平, 満保 直美, 小谷 穰治, 藤原 智弘, 白井 邦博, 大家 宗彦, 平田 淳一
2. 発表標題 アンチトロンピンによる neutrophil extracellular traps (NETs)抑制 効果についての検討
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 倫子、井上 岳人、藤崎 宣友、満保 直美、山田 太平、上田 敬博、小谷 穰治
2. 発表標題 アンチトロンピンが敗血症性ショック患者におけるNETs形成に与える影響の検討
3. 学会等名 第32回日本救命医療学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川 倫子、山下 勇人、岡 伸樹、山田 太平、満保 直美、井上 岳人、藤崎 宣友、小谷 穰治
2. 発表標題 アンチトロンピンはNeutrophil extracellular traps形成を抑制する
3. 学会等名 第23回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Michiko Ishikawa, Hayato Yamashita, Nobuki Oka, Noritomo Fujisaki, Taihei Yamada, Naomi Manbo, Takahiro Ueda, Joji Kotani
2. 発表標題 The effect of antithrombin III on lipopolysaccharide-induced neutrophil extracellular traps
3. 学会等名 The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----