

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11585

研究課題名(和文)急性アルコール中毒時のNETs形成に及ぼす影響-敗血症増悪機構の解明-

研究課題名(英文)Influence of acute ethanol intoxication for NETs formation

研究代表者

粕田 承吾 (KASUDA, SHOGO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70434941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エタノールがNETsの産生・放出を増強することを明らかにした。好中球をPMAで刺激し、上清中のcell-free DNA (cfDNA:NETsの構成成分)を測定したところ、エタノールの添加によりcfDNA放出が増強された。また、NETsの産生および放出に必須のreactive oxygen species (ROS)とシトルリン化ヒストン(Cit-H3)もエタノール添加により増強した。エタノール単独ではこれらの産生を促すことはなかった。急性アルコール中毒モデルマウスにCLP法で敗血症を惹起したところ、アルコール非投与群と比較して、血中のcfDNAおよびcit-H3は有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性アルコール中毒時には、敗血症が増悪することが知られているが、その詳細な機構についてはいまだ不明である。今回の研究で、エタノールは、neutrophil extracellular traps (NETs)の産生・放出に影響を及ぼしていることが明らかとなった。NETsは好中球が細菌を捕獲するために放出するDNAやヒストンを主成分とする網目状構造物であり、細菌をトラップすることで感染の進展を抑制する。しかし、過剰な放出は血管内皮細胞傷害などを引き起こし、敗血症増悪に寄与すると考えられる。エタノールが、NETs産生を増大させることが明らかとなり、今後の敗血症治療の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that ethanol intensified the production of release of NETs.

Addition of ethanol enhanced cfDNA (cfDNA, major component of NETs) release from neutrophils stimulated with PMA. Ethanol also enhanced production of reactive oxygen species (ROS) and citrullinated Histon (Cit-H3), which are essential for NETs production and release respectively. Ethanol alone did not produce NETs, ROS and Cit H3.

Polymicrobial sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) in acute ethanol intoxication. Plasma levels of cfDNA and Cit-H3 was elevated significantly in ethanol-treated mice compared with control mice.

研究分野：血栓止血学

キーワード：急性アルコール中毒 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルコール摂取後の外傷による死亡率の高さは、医療現場で重大な問題である。さらに、敗血症の発症率および死亡率は深刻な問題となっているが、アルコールによる敗血症増悪機構はいまだ不明瞭な部分が多い。我々は、アルコールが白血球の機能に何らかの影響を及ぼしていると仮定し、特に自然免疫の最前線に立つ好中球に対するアルコールの影響を検討する必要があると考えた。そこで2004年にBrinkmanらによって新たに発見された好中球の細菌排除機構である Neutrophil Extracellular Traps (NETs) に注目した。病原体やその関連物質からなる pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) や障害を受けた細胞から放出される内因性物質 (alarmin) などの細胞死関連物質は、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) により免疫応答を惹起する。ここで好中球は、従来の necrosis や apoptosis とは異なる、NETosis と呼ばれる細胞死形態をとる。NETs はクロマチン (DNA) で構成される網目状構造物内に、核内タンパクであるヒストンやミエロペルオキシダーゼ・エラスターゼなどの抗菌タンパクを有する。NETs は粘着性の高い構造体であり、微生物を捕獲し殺菌する。一方で、遊離したヒストンは血管内皮細胞傷害性が高く、血小板活性化と凝固反応を促進し微小血栓形成を誘導する。すなわち、NETs は生体にとって両刃の剣であり、最近ではむしろ敗血症の増悪因子としての面が注目されている。以上のことから、アルコールは NETs 形成を促進することによって、敗血症を増悪させているのではないかと仮説を立てた。近年、凝固と炎症との相互作用が注目されており、凝固反応の異常亢進は炎症反応を増大させ、敗血症を増悪させることが知られている。NETs はまさに凝固と炎症を結びつける反応のひとつであることから、研究を開始することとなった。

2. 研究の目的

大量のアルコール摂取によって生じる様々な問題は社会的関心事である。特に、アルコール摂取時における敗血症の死亡率の高さは大きな問題である。本研究では、急性アルコール中毒時の敗血症増悪機構を解明することを目的とした。アルコールが NETs の産生・放出に及ぼす影響を明らかにし、今後の敗血症治療に応用可能な知見を得るための研究である。アルコールは NETs の産生および放出を促進させることによって、敗血症を増悪させていると予想した。

3. 研究の方法

(1) ヒト好中球の分離

インフォームドコンセントを得た健常成人より採血し、多核球分離溶液 (DS ファーマ) を用いて好中球を単離する。好中球を RPMI-1640/10% FBS でインキュベートし、エタノールで処理する (終濃度 0~100 mM)。前処置後、phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 10 nM) で4時間刺激する。NETs の構成成分である cell free DNA (cf-DNA) 量を PicoGreen Quanti-iT dsDNA assay kit (Invitrogen) を用いて測定する。また、NETs の放出を免疫染色 (neutrophil elastase; NE および DAPI) によって観察する (Glass cover slips 使用)。

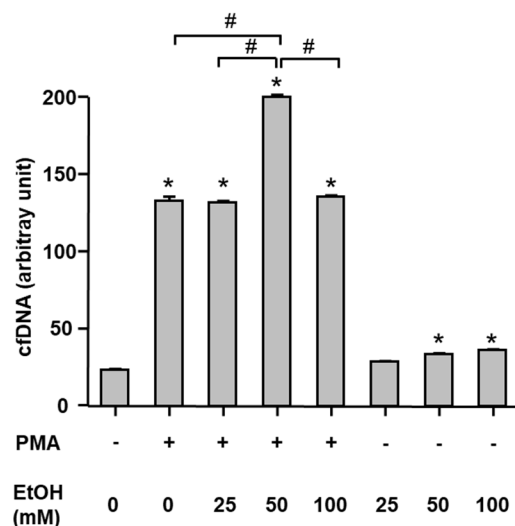
(2) マウス敗血症モデルの作製

32%アルコールを用いて、6 g/kg のアルコールをマウスにゾンデを用いて経口投与し急性アルコール中毒マウスを作製する。コントロール群には生理食塩水を投与する。投与30分後に既報に従い、イソフルラン麻酔科で Cecal ligation and puncture (CLP) 法にて穿孔性腹膜炎による敗血症モデルを作製する。その後、マウスより採血し、血中の NETs 量および CitH3 を測定してコントロール群と比較する。

4. 研究成果

(1) アルコールは PMA 刺激による NETs の放出を増大させる。

ヒト好中球を PMA で刺激したところ、cfDNA の放出が確認できた。また、この効果はエタノール濃度が 50 mM の時に最大となった。一方で、エタノール単独では cfDNA の放出にほとんど影響を及ぼさなかった。エタノールは、何らかの機構を介して NETs の産生あるいは放出を増大させることが明らかとなった。



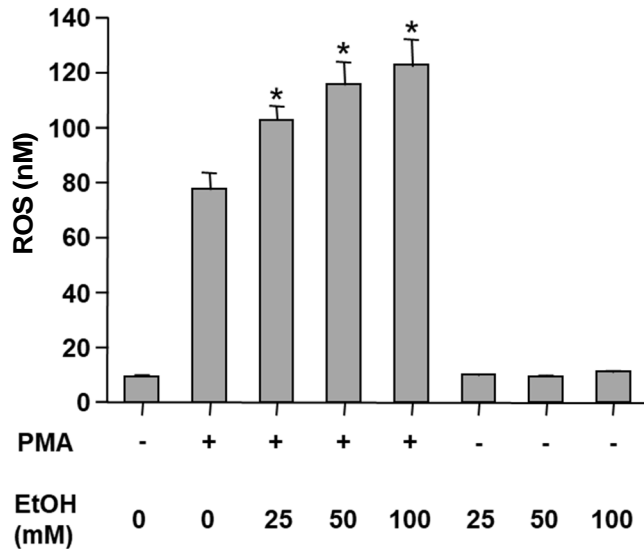
(2) アルコールは PMA 刺激時の ROS 産生を亢進させる。

NETs の産生は、細胞内での ROS 産生が最初のトリガーとなる。

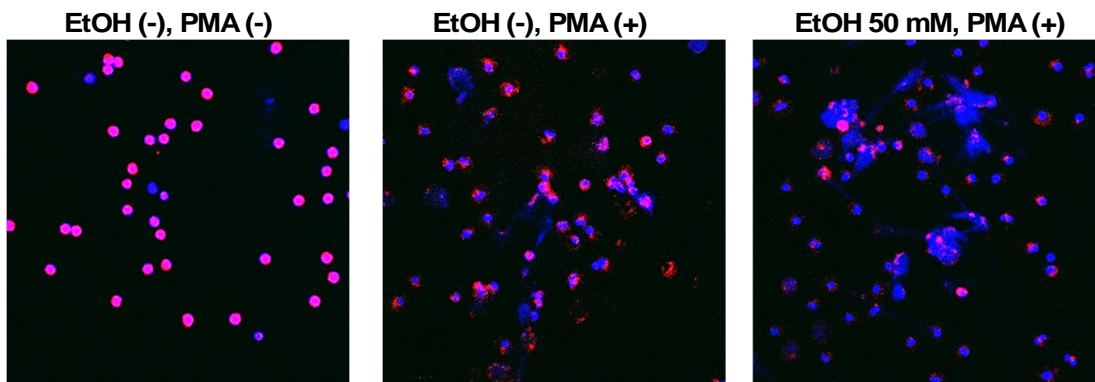
好中球を PMA で刺激したところ、刺激後わずか 1 時間で ROS 産生が有意に上昇した。

エタノールは濃度依存性に ROS 産生を増大させ、この点は NETs 放出(cfDNA 量)がエタノール濃度 50 mM で最大になる点と相違が生じた。しかし、cfDNA と同様にエタノール単独では ROS を産生させなかった。

エタノールは NETs 産生の最初期のステージに影響を及ぼして、NETs 産生を増大させることが明らかとなった。



(3) アルコール暴露は、PMA 刺激による neutrophil elastase の放出を促進する。



好中球を PMA で刺激し、NETs の主要構成成分である NE および DNA を免疫染色および DAPI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

PMA 単独刺激時と比較して、エタノール添加時には明らかに NE および DNA の放出量が増大した。

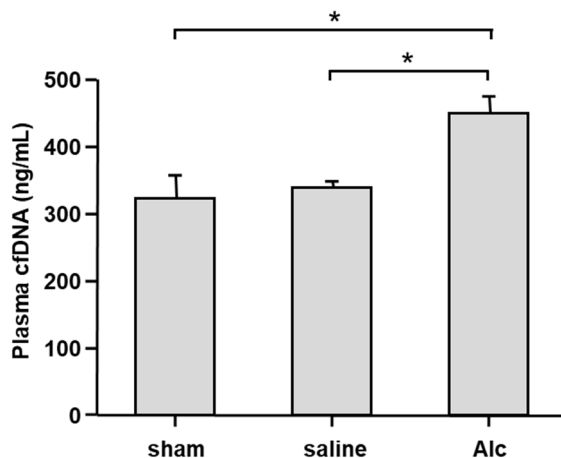
(4) 急性アルコール中毒下では、敗血症時の血中 NETs 量は早期に増大する。

急性アルコール中毒モデルマウスに CLP 法で敗血症を惹起し、4 時間後に血漿中の cfDNA を測定した。

コントロールとして生理食塩水を投与したマウスでは、sham 群と比較しても血中の cfDNA は上昇していなかった。

一方、急性アルコール中毒モデルマウスでは sham 群およびコントロール群と比較して有意に cfDNA が上昇した。

急性アルコール中毒時には、発症後 4 時間という、本来ならばまだ NETs が放出されていないような早期のタイミングで NETs が放出されることが明らかとなった。

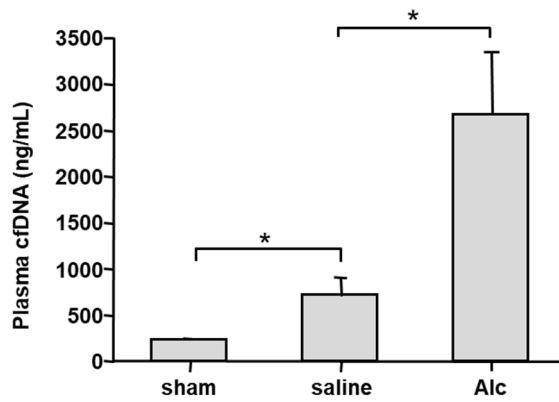


(5) 急性アルコール中毒下では、敗血症時の血中 NETs 量は時間経過とともに増大していく。

(4)と同様に CLP 後 8 時間でも採血し、血漿中の cfDNA を測定した。

生理食塩水を投与したコントロール群でも sham 群と比較して cfDNA 量は増大していた。しかし、急性アルコール中毒群では、はるかに高濃度の cfDNA 値を示した。

アルコール投与後 8 時間を経ても、NETs の放出は軽減するどころか増大しており、NETs の産生・放出に対するアルコールの影響は持続的であることが示された。

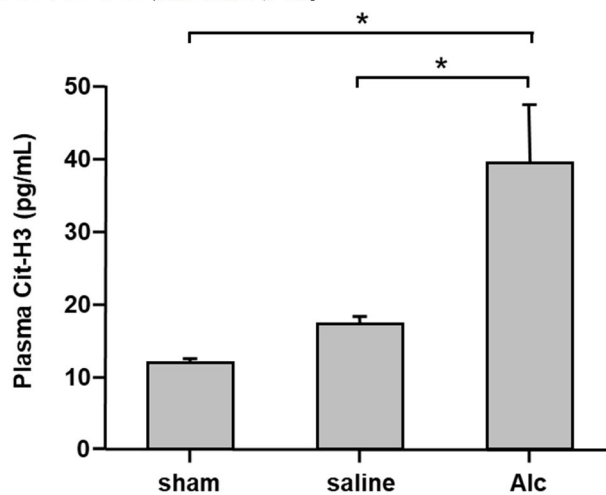


(6) 急性アルコール中毒時には、ヒストンのシトルリン化が亢進する。

NETs の放出にはヒストンのシトルリン化が必須である。

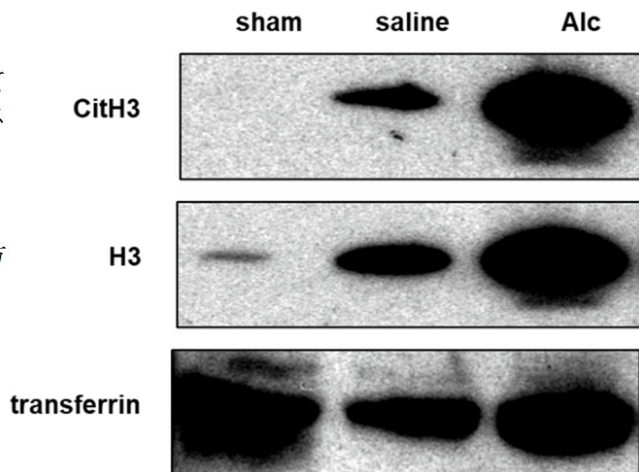
CLP 作製後 4 時間で採血を行い、血漿中の Cit-H3 の解析を行った。

ELISA 法で測定したところ、CLP 後わずか 4 時間にも関わらず、急性アルコール中毒群では Cit-H3 が有意に増大していた。生理食塩水を投与したコントロール群では増加は見られなかった。このことは、血中の cfDNA が CLP 後 4 時間で増加した(4)の結果と一致している。



また、同様に Western blot 法を用いて血中の Cit-H3 および非シトルリン化ヒストン量を評価した。トランスフェリンを Loading control として用いた。

急性アルコール中毒群では、上記と同様に Cit-H3 が顕著に増加していた。一方で、非シトルリン化ヒストンも急性アルコール中毒群で増加しており、細胞内から放出されたヒストンが血管内皮細胞傷害などを通じて敗血症の増悪に関与している可能性が示唆された。



(7) まとめ

本研究では、アルコールは何らかのトリガーによって惹起された NETs の産生および放出の双方を増大させることが明らかとなった。またその作用は NETs 産生の最初期から長時間にわたって持続することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 粕田承吾 工藤利彩 勇井克也 森本真未 羽竹勝彦
2. 発表標題 エタノールは敗血症時のneutrophil extracellular traps の放出を増大させる
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shogo Kasuda, Risa Kudo, Katsuya Yuui, Katsuhiko Hatake
2. 発表標題 Acute ethanol intoxication intensifies the release of neutrophil extracellular traps
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----