

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11593

研究課題名(和文)敗血症における好中球高齢化とその病態解明に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of aged neutrophil population in sepsis

研究代表者

平野 洋平 (Hirano, Yohei)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70621895

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)：動物実験レベルで確認されている高齢好中球の敗血症病態への関与であるが、我々はヒトにおいて高齢好中球が敗血症病態に関与している可能性を証明した。健常者と比較し敗血症患者においては血中の好中球年齢のマーカーであるCXCR4の発現が上昇していることを確認した。また、敗血症患者全血中の高齢好中球の割合と、重症度スコア(SOFAスコア)は有意な逆相関を示していた。これらの観察結果は、高齢好中球の炎症組織への血管外遊走能の高さ、すなわち敗血症が重症化した場合の組織浸潤する好中球において、高齢好中球が代表的な表現型である可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症の死亡率は依然として高く、新たな治療戦略の開発は急務である。我々はヒトにおいて高齢好中球が敗血症病態に関与している可能性を証明した。敗血症の重症度と血中高齢好中球割合は逆相関関係があったという観察結果に加え、高齢好中球が組織浸潤における好中球の主要なサブタイプである可能性があるという結果は、将来的には、高齢好中球の遊走能を調節することによる敗血症の重篤な組織障害を是正するという新たな治療戦略につながる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The involvement of aged neutrophils population in the pathology of sepsis has already been shown previously. In this study, we have demonstrated that aged neutrophils also might be involved in the pathology of sepsis in humans. It was confirmed that the expression of CXCR4, which is a marker of aged neutrophils, was increased in septic patients compared with healthy subjects. In addition, the percentage of aged neutrophils population in the whole blood of septic patients and the severity score (SOFA score) showed a significant inverse correlation. These observations indicate that aged neutrophils might be typical phenotype during transmigration of neutrophils into inflamed tissues.

研究分野：救急集中治療

キーワード：好中球 敗血症 多臓器不全 遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は、感染に対する宿主生体反応の調整不全で、生命を脅かす臓器障害と定義される。世界では年間 2700 万人が敗血症を発症しており、そのうち約 800 万人もが死亡している。その罹患率は近年劇的に増加しているにも関わらず、未だ確立した治療法は存在せず、その病態解明や新治療の開発が急務である。

(2) 好中球は、感染微生物の生体侵入に応じて、感染部位にいち早く到達し、サイトカインや活性酸素種などを放出することで微生物を排除する機能をもつが、一方で過剰な好中球機能亢進は、自己の組織自体を障害し、敗血症の多臓器不全の病態形成につながっていると考えられている。そのため、好中球機能をコントロールすることは、敗血症の治療戦略の一つとなり得る。

(3) 近年、好中球にも多様な表現型 (subtype) や機能が存在することが明らかになってきている。中でも表面レセプターである CXCR4 の発現は、好中球の加齢とともに上昇するといわれており、この「高齢好中球」の敗血症に代表される急性炎症における過剰炎症促進作用への関心が高まっている (Zhang D, et al. Nature.2015)。

(4) 我々は前実験として、マウス腹膜炎敗血症モデルを作成し、20 時間後での血中で、高齢好中球 (CXCR4^{hi}好中球) の割合が sham 群 (非敗血症群) と比較して優位に増加していることを確認している。

(5) 現在までに、ヒト敗血症における高齢好中球の動態を報告した研究はない。

2. 研究の目的

本研究の当初の研究目的は以下に示す通りである。

(1) ヒト高齢好中球マーカーを同定する。

マウスにおいては高齢好中球のマーカーとして CXCR4、さらに L-selectin (CD62L) が有用なマーカーであるという報告がある。ヒト好中球における有用なマーカーは未だ明らかではないため、その同定が必要である。

(2) 高齢好中球の敗血症患者血中での経時的変化を明らかにする。

(1) で得られた高齢好中球マーカーを用いて、敗血症患者血中における高齢好中球の数や全好中球に対する割合を継時的に測定し、刻一刻と変化する敗血症病態において、高齢好中球がどのような動態を示すのかを明らかにする。

(3) 好中球の寿命に関わるタンパク質の探索を行う。

動物実験において既に好中球の寿命を延長させると考えられている種々のタンパク質を測定し、ヒト敗血症における高齢好中球の増減に関わる因子を明らかにする。

(4) 高齢好中球と炎症、臓器障害、重症度や転帰との関連を明らかにする。

高齢好中球の数や全好中球に対する割合と、炎症や重症度、臓器障害との相関を明らかにし、好中球の加齢が敗血症においてどのような病態形成に寄与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト高齡好中球マーカーを同定する

健常人の全血液を採取。Polymorphprep™を用いて好中球を分離。

得られた好中球を0, 2, 4時間培養後、それぞれ蛍光標識抗体を用いて細胞表面CXCR4またはL-selectinの発現をフローサイトメトリーで定量評価し、培養時間経過(好中球の加齢)に相関する表面マーカーを同定する。

(2) 高齡好中球の敗血症患者血中での経時的变化を明らかにする

入院敗血症患者の全血液を入院後時系列変化をつけて採取し、それぞれPolymorphprep™を用いて好中球を分離する。

上記高齡好中球表面マーカーを用いてフローサイトメトリーにより高齡好中球の数と全好中球に対する割合を測定し、経時比較する。

(3) 好中球の加齢(寿命)に関わるタンパク質の探索を行う

敗血症患者における血清を用いて、好中球のアポトーシスを阻害する作用で知られる種々のタンパク質(JAM-C, ICAM-1, VCAM-1など)を測定し、血中高齡好中球数/割合との関連をみる。

(4) 高齡好中球と炎症、臓器障害や重症度との関連を明らかにする

敗血症患者の臨床パラメーター(血中の臓器障害マーカー、酸素化能など)や重症度と、高齡好中球数/割合との関連をみる。具体的には下記の項目を測定し、高齡好中球数や割合との相関を検討する。

重症度の評価 : SOFA score

血液ガスデータ : pH, PaCO₂, PaO₂, Lactate, BE, P/F ratio

末梢血・生化学検査項目 : WBC, Plt, CRP, AST/ALT, BUN/Cre

凝固機能検査項目 : PT, APTT, FDP, DD, 急性期DIC score

4. 研究成果

(1) ヒト高齡好中球マーカーの同定

マウスにおいて高齡好中球表現型を示すと考えられているCXCR4およびL-selectin(CD62L)がヒトにおいても有用なマーカーであるかどうかの評価のため、健常者から血液サンプルを採取し、好中球を分離後、0, 2, 4時間と時間を分けて細胞培養を行い、それらを蛍光標識抗体(CXCR4)を用いてフローサイトメトリー法を用いて測定した。結果として、CXCR4の発現は、無刺激でも培養時間が長くなればなるほど増加を示しており、マウスと同様、ヒト好中球においても時間経過、すなわち高齡化でCXCR4が増加することが明らかとなった。一方、L-selectin(CD62L)は時間経過のみで増加することはなかった。本結果は、ヒトにおいてはCXCR4が好中球年齢マーカーとして最も有用であることを、初めて突き止めたものである。

(2) 高齡好中球の敗血症患者血中での経時的变化を明らかにする。

当初、敗血症患者の血中高齡好中球の経時的变化を明らかにするために、入院24時間以内に採取した血液中の高齡好中球割合と、入院から数日経過した敗血症患者から採取した血液中の高齡好中球割合を比較する予定であったが、人的資源の問題や優先度の観点から、まずは入院24時間以内に採取した血液中の高齡好中球割合と臨床パラメーターとの相関関係の評価する((4)の目的)を行うことを優先した。現在この目的に関する実験系は、患者サンプル数を増加してい

る段階だが、十分なサンプルサイズがこれまで得られておらず、解析はまだ行われていないのが現状である。

(3)好中球の加齢(寿命)に関わるタンパク質の探索を行う。

(4)の目的である高齢好中球と炎症、臓器障害や重症度との関連を明らかにすることに多くの研究時間を割く必要があったため、(3)に関する研究を行っていないのが現状である。しかし、(4)の結果から、高齢好中球の敗血症における重症度への関連が明らかになったことから、今後の好中球の加齢(寿命)の調節に携わるタンパク質やシステムの証明は、今後の創薬開発にもつながる可能性があり、今後の検討課題であろう。

(4) 高齢好中球と炎症、臓器障害や重症度との関連を明らかにする

我々は、健常者と敗血症、敗血症性ショック患者(受診72時間以内)から血液サンプルを採取し、好中球を分離後、蛍光標識抗体(CXCR4)を用いて高齢好中球の蛍光強度、及び全血液中对する割合をフローサイトメトリー法を用いて測定した。結果として、健常者と比較して、敗血症、敗血症性ショック患者において有意にCXCR4発現好中球(高齢好中球)のMFIは増加していた。また、健常者と比較して、敗血症、敗血症性ショック患者において有意にCXCR4発現好中球(高齢好中球)割合が増加していることを突きとめた。興味深いことに、敗血症性ショック、すなわち敗血症が重症になった場合は、高齢好中球の蛍光強度は増加する一方、高齢好中球の割合は減少傾向にあった。動物実験レベルでは、高齢好中球表現型は好中球の組織遊走の主役と考えられており(Uhl B, et al. Blood.2016)、我々は今回の敗血症重症化における循環高齢好中球減少は、高齢好中球の遊走能亢進の結果ではないかと推察している。さらに、敗血症患者の高齢好中球の割合と重症度スコア(SOFAスコア)や種々の臓器障害マーカーや臨床パラメーターとの相関関係を解析した。結果として、高齢好中球割合は重症度スコア(SOFAスコア)、腎機能障害(BUN、Cr)、プロカルシトニン値と逆相関関係にあることを突き止めた。これらの研究成果は、血中高齢好中球割合が、敗血症患者病態に密接に関与している可能性を示唆するものであり、高齢好中球の制御による敗血症病態の制御の可能性を示している。

最後に我々はヒト高齢好中球の遊走能評価を目的とし、好中球遊走を促進することで知られるATPの好中球細胞膜発現を、蛍光プローベを使用して定量化した。すると、高齢好中球においては、幼若好中球と比較して、ATP発現は増加していた。今後も継続して高齢好中球の敗血症病態における役割を証明することで、将来的な新薬開発につなげたいと考えている。

(引用文献)

・Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang JE, Scheiermann C, Merad M, Frenette PS. Nature. 2015 Sep 24;525(7570):528-32. doi: 10.1038/nature15367.

・Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. Uhl B, Vadlauer Y, Zuchtriegel G, Nekolla K, Sharaf K, Gaertner F, Massberg S, Krombach F, Reichel CA. Blood. 2016 Nov 10;128(19):2327-2337. doi: 10.1182/blood-2016-05-718999.

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 平野 洋平
2. 発表標題 高齢好中球制御による敗血症治療の試み 体内での免疫細胞高齢化社会問題
3. 学会等名 日本救急医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takaaki Kawasaki, Yohei Hirano, Yutaka Kondo, Miki Morikawa, Shinsuke Karatsu, Yoko Kuroda, Ken Okamoto, and Hiroshi Tanaka
2. 発表標題 SDF-1 STIMULATION SUPPRESSES DEFORMABILITY OF AGED NEUTROPHILS THAT MIGHT EXAGGERATE THE SEVERITY OF HUMAN SEPSIS.
3. 学会等名 Annual Conference on Shock (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	岡本 健 (Okamoto Ken) (40347076)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	田中 裕 (Tanaka Hiroshi) (90252676)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	