

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17837

研究課題名（和文）造血器腫瘍治療における敗血症性ARDS/ALIの新たな治療戦略とバイオマーカー

研究課題名（英文）The suppressive effects of Mer inhibition on inflammatory responses in the pathogenesis of LPS-induced ALI/ARDS

研究代表者

古川 未希（Furukawa, Miki）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80722537

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：Gas6は、TAMファミリー受容体型チロシンキナーゼであるTyro3、AxlおよびMerとの相互作用を介し、止血に顕著な影響を及ぼし、炎症を軽減する。我々は重症敗血症または敗血症性ALI/ARDSの患者において、Gas6と可溶性Merの血漿中濃度が有意に高値であることを見出した。LPS誘発急性肺障害マウスにおいて、Mer阻害剤であるUNC2250の静脈内投与は、Gas6およびMerタンパク量増加を伴う好中球と単球の肺への浸潤、高度肺障害、活性酸素種（ROS）量の増加を顕著に抑制した。ALI/ARDSにおける炎症反応の治療薬として、Mer阻害剤は有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液腫瘍の化学療法や造血幹細胞移植は、造血障害と免疫不全を伴い、重症感染症に対して極めて脆弱である。重症感染症に続発するALI/ARDSは生命予後を左右する。しかし、未だ治療法が確立されていない。これまで、Gas6とその受容体Merが、多発性骨髄腫の進行（J Biol Chem. 2017;292:4280）や、造血幹細胞移植における急性GVHD及びTMA（Blood Adv. 2009;3:2128）に関与していることを報告した。本研究では、ALI/ARDSにおけるGas6-Mer経路に着目した解析を行い、ALI/ARDSの治療薬として、Mer阻害剤が有用であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of sepsis-induced ALI/ARDS has not yet been fully elucidated. Gas6 has significant effects on hemostasis and inflammation through its interaction with receptor tyrosine kinases of the TAM family; Tyro3, Axl, and Mer. The plasma Gas6 and soluble Mer levels are higher in patients with severe sepsis and/or septic ALI/ARDS. To determine whether the Gas6-Mer axis is critical in the pathogenesis of ALI/ARDS, mouse models after 5 mg/ml LPS inhalation were used, and we further investigated the effects of intravenous administration of 2 mg/kg UNC2250, a selective Mer inhibitor, on LPS-induced ALI in the mouse models. UNC2250 markedly inhibited increased infiltration of neutrophils and monocytes overexpressing Gas6 and Mer proteins, severe lung damage, and increased levels of reactive oxygen species in LPS-induced ALI in the mouse models. Our study provides critical insights into Mer inhibition as a therapeutic target for inflammatory responses in ALI/ARDS.

研究分野：敗血症誘発性の急性肺傷害（ALI）／急性呼吸窮迫症候群（ARDS）

キーワード：急性呼吸窮迫症候群（ARDS） 急性肺傷害（ALI） Gas6 Mer 敗血症

1. 研究開始当初の背景

造血器悪性腫瘍に対する新規抗癌剤及び同種造血幹細胞移植(HSCT)の進歩により、造血器悪性腫瘍の治療成績は向上している。しかしながら、治療が強度になれば骨髄抑制はより高度となり、敗血症等の重篤な感染症を発症しやすくなる。また、強力抗癌剤治療によって、多量の腫瘍細胞が短時間に崩壊することにより多臓器不全を呈する腫瘍崩壊症候群(TLS, tumor lysis syndrome)も問題となる。敗血症や TLS に併発する敗血症誘発性の急性肺傷害(ALI, acute lung injury) / 急性呼吸窮迫症候群(ARDS, acute respiratory distress syndrome)は、肺胞・毛細血管関門に生じる炎症性傷害により肺血管透過性亢進型の非心原性肺水腫を呈し、重篤な呼吸不全に至り、予後は不良である。ALI/ARDS の分子機序は未だ不明な点が多く、治療は確立されていない。ALI/ARDS の病態には、病原微生物由来の外因物質、死細胞や組織傷害により発生する成分やサイトカイン等によって誘導される肺血管内皮障害が重要な役割を担う。また、肺内皮障害が起因となる凝固・線溶調節機構の破綻も ALI/ARDS の病態・進展に關与する。我々は Growth arrest-specific 6 (Gas6) と Gas6 をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼ TAM (Tyro3, Axl, Mer) である可溶性 Mer の血漿濃度が、重症敗血症または敗血症性 ALI/ARDS の患者において健常者と比較して高いこと、Mer の選択的阻害剤が、lipopolysaccharide (LPS) 吸入で作成された ALI マウスモデルの気管支肺胞洗浄液の好中球及びマクロファージ増加を抑制し、高度な肺障害を改善される興味深い結果を得た。本研究では、ALI/ARDS の病態における肺内皮障害、活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)産生増加高サイトカイン血症が關与する ALI/ARDS の分子機序に、Gas6-Mer 経路が寄与することを明らかにし、Gas6-Mer 経路が ALI/ARDS の新規治療候補となることを証明する。

2. 研究の目的

ALI/ARDS の発症機序はまだ十分に解明されていない。Gas6 は TAM ファミリーの受容体型チロシンキナーゼである Tyro3、Axl 及び Mer との相互作用を介して、止血に顕著な影響を及ぼし、炎症を軽減する。本研究では、Gas6 と可溶性 Mer の血漿濃度が、重症敗血症または敗血症性 ALI/ARDS の患者において健常者と比較して高いことを見出した。ALI/ARDS の発症機序において Gas6-Mer 経路が重要な役割を担うか否かを明らかにするために、下記に記載の実験を施行する。

3. 研究の方法

1) 当院及び関連施設で発症した敗血症及び ARDS 症例の血漿を用いて、MGas6 及び可溶性 Mer の血漿濃度を ELISA 法で測定する。ARDS 症例における Gas6 及び可溶性 Mer の血漿濃度増加と ARDS の臨床経過との相関関係を検証する。

2) LPS 吸引で作成した ALI マウスモデルの障害肺組織及び肺浸潤細胞動態を組織学的に調べ、肺浸潤細胞の Gas6 及び Mer の発現を免疫染色で検証する。さらに、選択的 Mer 阻害剤 UNC2250 静脈内投与の障害肺組織及び肺浸潤細胞動態に対する効果、Gas6 及び Mer 発現への影響を検証する。

3) ALI/ARDS の病態において ROS 産生増加は重要な役割を演じている。ALI マウスモデルを用いて、マウスモデルの障害肺組織の ROS 産生をジハイドロエチジンで測定し、UNC2250 静脈内投与が障害肺組織及び肺浸潤細胞の ROS 産生、Gas6 及び Mer 発現への影響を検証する。

4) 培養ヒト肺動脈血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験を行い、ALI/ARDS の肺内皮障害が寄与する病態を明らかにするために、内皮障害バイオマーカーであるトロンボモジュリン、内皮型一酸化窒素合成酵素、血管内皮カドヘリン発現を検証する。さらに、Mer 阻害剤がそれら内皮障害

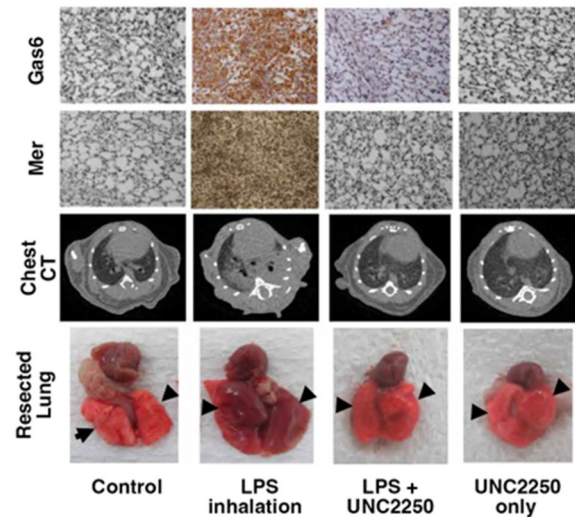
バイオマーカーの発現変化に対する抑制効果を有することか否かを明らかにする。

5) ヒト好中球様細胞株の HL-60 細胞と、マウス単球/マクロファージ細胞株の RAW264.7 細胞を用いて、Mer 阻害剤が LPS 依存性の細胞増殖及びアポトーシスに及ぼす影響を MTT アッセイ、フローサイトメトリーにて検証する。

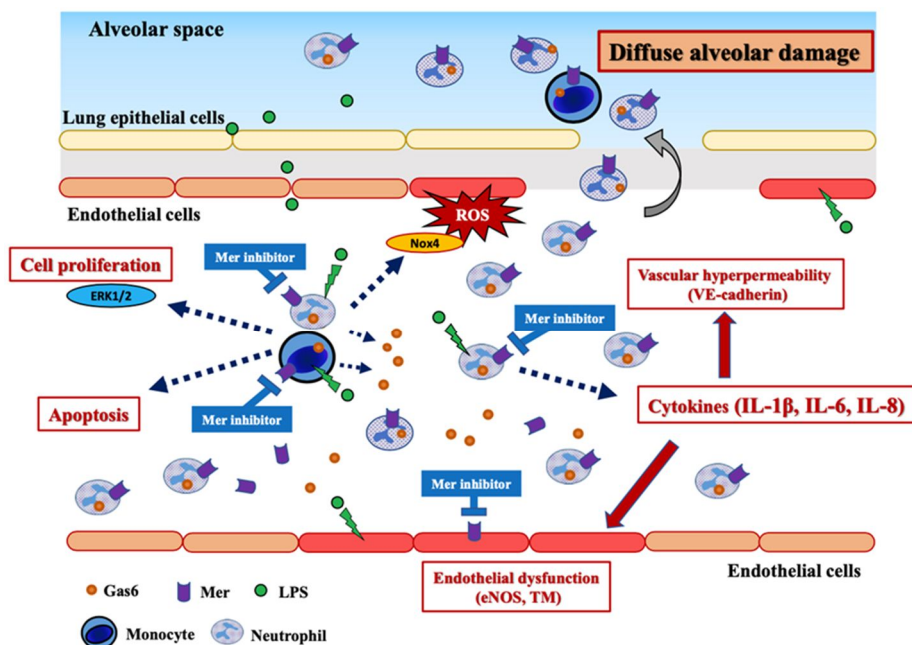
6) ヒト血管内皮細胞を微小孔フィルター培養プレートで培養し、ヒト好中球を使用したトランスウェルアッセイを用いて、ALI/ARDS の病態に重要な血管透過性亢進についての実験を行う。LPS 添加により誘導された内皮細胞の透過性亢進が、Mer 阻害剤によって抑制されるか否かを明らかにする。

4. 研究成果

我々は基礎実験で、重症敗血症または敗血症性 ARDS の症例において、Gas6 と可溶性 Mer の血漿濃度が、有意に高値であることを見出した。Gas6-Mer 経路が ALI/ARDS の発症機序において重要かどうかを明らかにするために、LPS を吸入させた ALI マウスモデルにおいて、選択的 Mer 阻害剤である UNC2250 を静脈内投与した際の効果を検討した。UNC2250 は、マウスの LPS 誘発 ALI において、Gas6 及び Mer タンパク量の増加を伴う好中球と単球の肺への浸潤、高度肺障害、ROS 産生増加を顕著に抑制した。ヒト肺大動脈内皮細胞では、LPS によって内



皮型一酸化窒素合成酵素、トロンボモジュリン、血管内皮カドヘリンの発現が低下したが、この発現低下は UNC2250 での処理により拮抗された。UNC2250 はさらに、ヒト好中球様細胞株の HL-60 細胞と、マウス単球/マクロファージ細胞株の RAW264.7 細胞において、LPS 依存性の細胞増殖を抑制し、アポトーシスを促進させた。これらのデータは、Gas6-Mer 経路が ALI/ARDS の病態に寄与することを示し、ALI/ARDS における炎症反応の治療薬として、Mer 阻害剤がもたらす様々な有益な効果について知見を与えるものである。



様々な有益な効果について知見を与えるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukatsu M, Ohkawara H, Wang X, Alkebsi L, Furukawa M, Mori H, Fukami M, Fukami SI, Sano T, Takahashi H, Harada-Shirado K, Kimura S, Sugimoto K, Ogawa K, Ikezoe T	4. 巻 15
2. 論文標題 The suppressive effects of Mer inhibition on inflammatory responses in the pathogenesis of LPS-induced ALI/ARDS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Miki Furukawa, Xintao Wang, Hiroshi Ohkawara, Masahiko Fukatsu, Lobna Alkebsi, Hiroshi Takahashi, Kayo Harada-Shirado, Akiko Shichishima-Nakamura, Satoshi Kimura, Kazuei Ogawa, Takayuki Ikezoe	4. 巻 3(14):
2. 論文標題 A critical role of the Gas6-Mer axis in endothelial dysfunction contributing to TA-TMA associated with GVHD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 2128-2143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深津真彦, 王 新涛, 大河原浩, アルケブシロブナ, 古川未希, 深見美和, 深見伸一, 杉本浩一, 小川一英, 池添隆之
2. 発表標題 Mer阻害を標的とした敗血症性ALI/ARDS治療：LPS誘発モデルにおける炎症反応の抑制効果の検討
3. 学会等名 第83回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川未希, 王新涛, 大河原浩, 深津真彦, Alkebsi Lobna, 小川一英, 池添隆之.
2. 発表標題 RDSの新規治療ターゲット：Gas6-Merシグナル
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会（2019.10.11-10.13, 東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深津真彦
2. 発表標題 Gas6/Mer を目的とした新規ARDS治療法の開発
3. 学会等名 日本血液学会東北地方会主催 血液学シンポジウム (2019.9.28, 青森)
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------