

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18363

研究課題名（和文）老化による好中球機能低下と易感染性の関連、その改善に関する研究

研究課題名（英文）Research on the relationship between neutrophil dysfunction due to aging and immunocompromised status and its restoration

研究代表者

栗原 智宏（KURIHARA, TOMOHIRO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：40338174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000 円

研究成果の概要（和文）：nicotinamide mononucleotide(NMN)を老化マウスおよびラットに投与することでどのような効果が得られるかの検討を行った。結果として、好中球の個々の動きを把握できるデバイスを用いて遊走能が改善すること、盲腸結紮による敗血症ストレスに対する生存率が改善すること、臓器障害が改善すること、最後に好中球内の代謝状況を確認するためにメタボローム解析を施行し、好中球内のエネルギーの状態が改善している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は現在でも世界的に致死率の高い疾患であり、高齢者の罹患率が高い。日本でも高齢化社会が進むにつれ、敗血症が現在以上に臨床的にも社会的にも問題となることが予想される。すなわち、高齢患者は容易に感染症に罹患し重篤化し、長期に及ぶ困難な治療に伴い高額な医療費が必要となり医療経済を圧迫する。本研究の成果によって、高齢ラットでは好中球の遊走能が低下しており易感染性をもたらす原因の一つとなっていることが考えられた。さらには、その機能を回復することで敗血症に対する抵抗力が改善する事も確認できた。将来的に高齢者の敗血症予防・治療に寄与できる研究成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of administration of nicotinamide mononucleotide (NMN) to aged mice and rats. As a result, (1) improvement of migration ability using a device that can measure individual migration of neutrophils (2) improvement of survival rate against septic event of cecal ligation (3) improvement of organ damage (4) to confirm the metabolic status of the neutrophils, a metabolome analysis was performed and it was revealed that the energy status in the neutrophils was improved.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 老化 好中球 易感染性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

敗血症は現在でも世界的に致死率の高い疾患であり、高齢者の罹患率が高い。日本でも高齢化社会が進むにつれ、敗血症が現在以上に臨床的にも社会的にも問題となることが予想される。すなわち、高齢患者は容易に感染症に罹患し重篤化し、長期に及ぶ困難な治療に伴い高額な医療費が必要となり医療経済を圧迫する。

高齢者で好中球機能が低下していることは断片的にいくつかの論文において報告されている。しかし、高齢者の易感染性に注目して動物とヒトの両者において網羅的に好中球機能を評価し、さらにその改善を模索した研究は検索し得る限り認められない。本研究の目的は、自然免疫の first line である好中球の機能と老化の関連を評価し、好中球機能の回復により高齢者の易感染性、敗血症発症を回避する積極的な予防および治療法の基盤を作り上げることにある。

2．研究の目的

高齢者の好中球機能低下に注目した論文はいくつか断片的に報告されているのみである。敗血症に関しても様々な側面から診断および治療の研究が進められているが、現在も自然免疫を回復させる臨床応用された有効な治療方法は存在しない。レゾルビン・プロテクチン・リポキシンの炎症の早期終息をもたらす lipid mediator を用いた薬剤を用いた治療で敗血症抵抗性が改善した報告は研究代表者の論文（T.Kurihara, et al. FASEB J. 2013）を含めて数編認められるのみで、今回我々は全く違った側面から好中球機能の回復と敗血症抵抗性を改善させる薬剤を模索し、メトホルミンを用いた予備動物実験において良好な成果を得ている。好中球機能を回復させることで、高齢者の感染症発症の予防のみならず、すでに感染症を発症した患者の治療にも応用が期待できる。本研究は敗血症患者の集中治療管理に大きな進歩をもたらすものである。

3．研究の方法

研究代表者は前述の論文において、重症熱傷ラットモデルを用いて好中球遊走能に着目し、熱傷後には経時的に好中球遊走能が低下し敗血症抵抗性が低下すること、レゾルビン D2 を用いた治療により好中球遊走能が保持され敗血症抵抗性が改善することを示した。本研究では高齢ラットを用いて好中球機能を、遊走能のみならず貪食能・殺菌能においても評価し、前述の報告とは全く別の薬剤であるメトホルミンを用いて好中球機能・敗血症抵抗性が改善することを確認する。

動物を用いた研究

(1) 好中球機能評価

3ヶ月齢と12ヶ月齢のラットから好中球を分離し、遊走能・貪食能・殺菌能・細胞内エネルギーを測定し比較する。好中球遊走能の評価には microfluidic device を用い、個々の好中球の動きを観察する。これは顕微鏡用スライドガラスとシリコンで作成した微小なトンネル内で好中球を遊走させることで、その遊走速度・指向性が評価可能なデバイスである(下記イメージ参照)。

(2) 敗血症抵抗性の評価（生存実験）

老化マウスモデルおよびコントロールマウスに、メトホルミンもしくは溶媒を投与するため胃瘻を作成する。胃瘻チューブは皮下を通してマウス背部に導き、薬剤投与を無麻酔下で容易に行えるようにする。1週間メトホルミンもしくは溶媒を投与し、盲腸結紮または Lipopolysaccharide（以下 LPS）投与の敗血症ストレスを追加し生存率を比較検討する。

(3) 組織学的評価

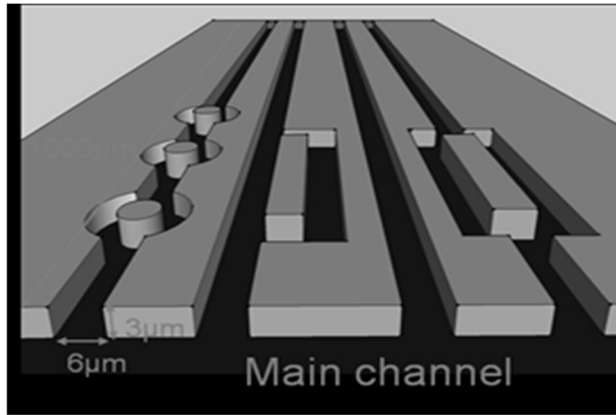
(2)のマウスにおいて、肺・腎臓の障害を病理組織学的に比較検討する。

（(1)と(2)で動物種が異なる理由：げっ歯類では血液中の好中球が少なく、好中球を分離するのにマウスでは血液量が足りない。そのためではラットを使用する。一方、ラットでは老化モデルが存在せず、の生存実験ではマウスを使用する予定である。）

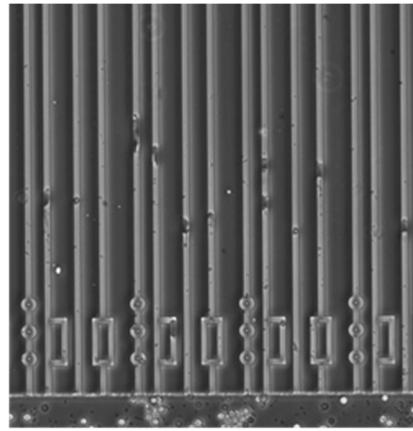
(4) メタボローム解析

3ヶ月齢と12ヶ月齢のラットおよび NMN 投与を行ったラットから好中球を分離し、メタボローム解析を施行し比較検討する。

好中球遊走能評価デバイス



デバイス模式図



好中球遊走能実験の顕微鏡写真

4. 研究成果

研究実施計画に記載を行ったメトホルミンを用いて各実験を実施したが、予想された敗血症抵抗性を確認する結果は得られなかった。

そのため、代替薬として老化研究に対して多くの報告が認められる nicotinamide mononucleotide (NMN) を使用することで実施計画に記載した効果が得られる可能性を考え、NMN を用いて各実験を遂行した。

NMN を老化マウスおよびラットに投与することでどのような効果が得られるかの検討を行った。結果として

- (1) 好中球の個々の動きを把握できるデバイスを用いて遊走能が改善すること
- (2) 盲腸結紮による敗血症ストレスに対する生存率が改善すること
- (3) 臓器障害が改善すること
- (4) 最後に好中球内の代謝状況を確認するためにメタボローム解析を施行し、好中球内のエネルギーの状態が改善している事を明らかにした。

本研究の成果によって、高齢ラットでは好中球の遊走能が低下しており易感染性をもたらす原因の一つとなっていることが考えられた。さらには、その機能を回復することで敗血症に対する抵抗力が改善する事も確認できた。将来的に高齢者の敗血症予防・治療に寄与できる研究成果が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 栗原智宏, 佐藤幸男, 前島克哉, 佐々木淳一 .
2 . 発表標題 老化敗血症動物モデルにおけるニコチンアミドモノヌクレオチドの好中球遊走能と敗血症抵抗性の改善効果 .
3 . 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4 . 発表年 2020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
---------	---------