

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07822

研究課題名(和文) 血清中シトルリン化フィブリノゲン測定による好中球細胞外トラップ検出の検討

研究課題名(英文) Detection of neutrophil extracellular traps by measuring citrullinated fibrinogen in serum

研究代表者

樋口 由美子 (Higuchi, Yumiko)

信州大学・医学部・講師(特定雇用)

研究者番号：40757241

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)：血清中に増加したシトルリン化フィブリノゲン(Cit-Fbg)が好中球細胞外トラップ(NETs)の指標となりうるかを検証した。好中球とFbgの共培養下でNETsを誘導したところ、経時的なNETsの増加に伴いCit-Fbgが増加した。感染症患者血清中のCit-Fbgは健常群と比して有意に増加しており、敗血症群ではNETsマーカーの有意な増加も認められた。がん患者群のCit-Fbgは健常群と比して有意に増加していたが、NETsマーカーの増加は認めなかった。血清中Cit-Fbgの増加は感染症ではNETsを含めた炎症病態を反映すると考えられたが、がんにおける増加原因についてはさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シトルリン化フィブリノゲン(Cit-Fbg)濃度の上昇が好中球細胞外トラップ(NETs)に起因することをin vitroで定量的に示した。感染症患者の血清中Cit-Fbgは有意に上昇しており、特に敗血症においてはNETsの増加も認められたことから、Cit-FbgはNETsを含めた炎症病態を反映することが示唆された。がん患者の血清中Cit-Fbg増加原因については、Cit-FbgやNETsの低濃度域での検出の開発を含めさらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate whether quantification of serum citrullinated fibrinogen (Cit-Fbg) could be used to detect neutrophil extracellular traps (NETs). First, Cit-Fbg levels in supernatants of phorbol 12-myristate 13-acetate-stimulated neutrophils co-cultured with fibrinogen significantly increased in vitro. Next, serum Cit-Fbg levels significantly increased in patients with infectious disease compared to healthy control (HC), and NETs marker levels also increased in patients with sepsis. Although serum Cit-Fbg levels also significantly increased in patients with cancer compared to HC, there was no increase in NETs markers in these patients. The increase in serum Cit-Fbg in infectious diseases may reflect inflammatory pathology, including NETs. Further investigation is needed to clarify the cause of the increase in Cit-Fbg in cancer patients.

研究分野：病態解析学

キーワード：シトルリン化フィブリノゲン 好中球細胞外トラップ 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

末梢白血球の40~70%を占める好中球は、感染や組織損傷による炎症部位に遊走し、貪食、殺菌、免疫細胞の誘導など、生体防御において主要な役割を担っている<sup>1)</sup>。多様な好中球機能のひとつとして、好中球細胞外トラップ形成(NETosis)がある。これは、好中球が自らの核内物質を、neutrophil extracellular traps (NETs)と呼ばれる網のような構造物として細胞内顆粒や酵素とともに細胞外へ放出することにより、体内に侵入した病原体を捕捉、殺菌する仕組みである<sup>2,3)</sup>。NETosisは感染防御の役割を果たすが、一方でその過剰な形成が様々な炎症性疾患に関与することが明らかになってきている。

血清中に存在するシトルリン化フィブリノゲン(Cit-Fbg)は、Peptidylarginine deiminase (PAD)の作用によってフィブリノゲン(Fbg)から産生される。このPADはNETosisによって好中球から放出される酵素の一つである。ゆえに、Cit-Fbgを測定することによって、間接的にNETsを検出するかどうか検証したいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が構築した高感度Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法によるCit-Fbg測定系を用いて患者血清検体を測定し、健常人と比較してCit-Fbgが有意に高値となるか、また病気の進行段階に関連してどのように変動するか、現在使用されているNETsマーカーと比較することによってCit-FbgがNETsのマーカーとなりうるかを検証することである。

## 3. 研究の方法

### (1) NETosis誘導に伴うFbgのシトルリン化の検証

recombinant Fbg(rFbg)、DithiothreitolおよびMicrococcal nuclease加RPMI assay bufferで調整した健常人好中球を、24 wellプレートに播種した。その好中球を37℃ 5% CO<sub>2</sub>の条件下で、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)の存在または非存在下で培養した。PMAの添加前にNADPH oxidase阻害剤としてdiphenylene iodonium (DPI)を加えた。1、4、6時間の培養後、各培養上清を回収しEDTAを添加して反応を止めた。得られた上清を用いて、Cit-Fbg、Myeloperoxidase complex (MPO-DNA)測定を行った。

### (2) 患者血清を用いたCit-Fbgの測定

- ① 血液培養陽性の菌血症患者13症例(59検体)における血清中Cit-Fbg濃度をELISA法で測定した。対照として健常人(38名)の血清を用いた。また、Cit-Fbg、シトルリン化ヒストン(Cit-H3)濃度と他の炎症マーカー(白血球数; WBC、好中球数、C反応性蛋白; CRP、プロカルシトニン; PCT、Fbg)との関係性を評価した。
- ② 敗血症、あるいは敗血症性ショックと診断され、血液培養陽性日(day1)のPCTが10.0 ng/mL以上であった21例45検体の血清中Cit-Fbg濃度、MPO-DNA複合体(MPO-DNA)濃度をELISA法で測定した。対照として健常人(16名)の血清を用いた。①と同様に、Cit-Fbg濃度と他の臨床検査項目との関係性を評価した。
- ③ 肝細胞がん(HCC、58症例)、消化管がん(胃4・食道4・大腸8症例)のがん患者血清を用いてCit-Fbg濃度、MPO-DNA濃度をELISA法で測定した。対照として健常人(各16名、26名)の血清を用いた。Cit-Fbg濃度と他の臨床検査項目との関係性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) NETosis誘導に伴うCit-Fbg濃度の上昇

培養開始1、4、6時間後の培養上清中のMPO-DNA量を測定し、PMA刺激を受けた好中球がNETsを形成することを確認した。好中球の培養液に添加したrFbgは、PMA刺激によるNETs形成にともない経時的にシトルリン化され、培養上清中のCit-Fbg濃度は培養後6時間の時点で、非刺激のものに比して有意に上昇した( $p < 0.01$ )。また、この上昇は、NETosis誘導を阻害する目的で使用したNADPH oxidase阻害剤の添加により阻害剤未添加のものに比して有意に抑制されることが示され( $p < 0.01$ )、*in vitro*ではCit-Fbg濃度の上昇がNETsに起因することを明らかにした。

### (2) 患者血清を用いた検討

#### ① 菌血症症例での検討

菌血症群におけるCit-Fbg濃度は、健常(HC)群に比して有意に高値を示した( $p < 0.001$ ) (図1)<sup>4)</sup>。一方、NETsマーカーとされるCit-H3濃度はHCに比して有意な上昇は認められなかった。しかし、Cit-H3は不安定蛋白であることから、血清保存条件が測定に適さなかった可能性も考えられた。

菌血症を WBC 数と好中球の核左方移動の程度によって II～V の phase に分類し(各 n=3、15、27、8 例)<sup>5)</sup>、各 phase と HC 群を比較したところ、好中球数が高値である phase III と IV において患者群の Cit-Fbg 濃度が有意に高値を示した ( $p < 0.001$ )。また、炎症マーカーと Cit-Fbg 濃度の相関を解析したところ、Cit-Fbg 濃度は WBC ( $r = 0.541$ ,  $p < 0.001$ )、好中球数と有意に正の相関を示した ( $r = 0.533$ ,  $p < 0.001$ )。一方で CRP や PCT とは相関はなく、Fbg とは弱い正の相関を示した ( $r = 0.34$ ,  $p < 0.05$ )。さらに、重回帰分析の結果から、炎症マーカーの中では好中球が Cit-Fbg の増加に最も寄与する因子であることが明らかとなり ( $p < 0.01$ )、菌血症において Cit-Fbg 濃度の上昇には好中球数の増加が関係していることが明らかになった。

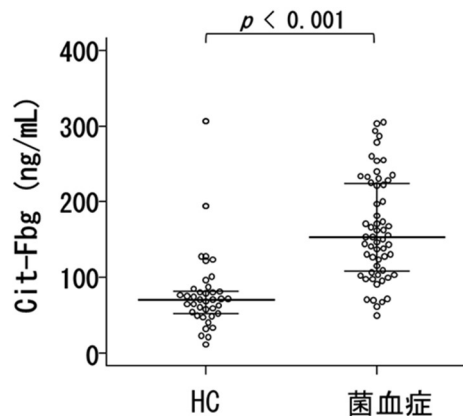


図1. 菌血症患者血清中のCit-Fbg濃度

## ② 敗血症症例での検討

敗血症群各採取日 (day1:20 例、day4:13 例、day7:12 例)における Cit-Fbg 濃度は、HC 群に比して有意に高値となった ( $p < 0.001$ )。さらに、MPO-DNA は HC 群 16 例全てで陰性を示した一方で、敗血症群 day1 は 20 例中 15 例、day4 は 13 例中 10 例、day7 は 12 例中 6 例で陽性であった。このことから、敗血症において Cit-Fbg は NETs との関連が示唆された。また day1 における炎症マーカー (CRP、Fbg) は基準値よりも高値であったが、Cit-Fbg との相関はなかったことから、Cit-Fbg が CRP とは異なる炎症バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

## ③ HCC、消化管がんにおける検討

HCC、消化管がん(胃、食道、大腸)血清を用いて Cit-Fbg と NETs との関連性を検討した。HCC 群の Cit-Fbg は HC 群に比して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。HCC を背景疾患(アルコール性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、非アルコール性肝炎) ( $p = 0.052$ )、腫瘍サイズ(1-1.9 cm、2-11 cm) ( $p = 0.880$ )、腫瘍個数(1、2、3-10 個) ( $p = 0.101$ )、up-to seven (2.9 以下、3-3.9、4-5.9、6 以上) ( $p = 0.106$ ) でそれぞれ分類し群間比較を行ったが有意差はなかった。一方で、生化学的検査データ (Total Bilirubin、Albumin) を用いたスコアリングシステムである ALBI 分類では、Grade1 と 2 の間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。また、Cit-Fbg と腫瘍マーカーである CEA とは弱い相関が認められたが ( $r = 0.31$ )、CA19-9 との間には相関は認められなかった。

消化管がん(胃、食道、大腸)群の Cit-Fbg は HC 群に比して有意に高く ( $p < 0.01$ )、疾患別群間比較では食道がん群 ( $p < 0.05$ ) と大腸がん群 ( $p < 0.01$ ) で HC 群との間に有意差を認めた。一方で、胃がんは、HC 群との間に有意差はなく、がん腫による違いが認められた。今回、早期がんである食道がんでは Cit-Fbg の上昇を認めたことは興味深い、飲酒や喫煙者に多い疾患であることから、呼吸器系や消化器系の慢性的な炎症を反映している可能性も考えられた。

HCC・消化管がんでは MPO-DNA の増加は認められず、がんにおける血清中 Cit-Fbg 濃度の上昇原因についてはさらなる検討が必要である。そのためには、現行の Cit-Fbg および MPO-DNA 測定法では健康人、がん患者ともに検出感度以下である検体が多く、さらに低濃度域での評価が必要と考える。Cit-Fbg に関しては、新たに化学発光を用いた測定系を検討中である。

## <引用文献>

1. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-175.
2. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006;8(4):668-676.
3. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front Immunol*. 2016;7:302.
4. Fujimura S, Higuchi Y, Usami Y, Yamaura M, Higuchi T, Terasawa F, Okumura N. Changes in serum citrullinated fibrinogen concentration associated with the phase of bacteremia patients. *Clin Chim Acta*. 2021 Jan;512:127-134.
5. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta*. 2016 Jun 1;457:46-53.

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<br>Fujimura S, Higuchi Y, Usami Y, Yamaura M, Higuchi T, Terasawa F, Okumura N.                               | 4. 巻<br>512           |
| 2. 論文標題<br>Changes in serum citrullinated fibrinogen concentration associated with the phase of bacteremia patients. | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Clin Chim Acta .   | 6. 最初と最後の頁<br>127-134 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.cca.2020.10.038   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>市川友喜、須江 翼、藤村哲士、宇佐美陽子、樋口由美子                      |
| 2. 発表標題<br>好中球細胞外トラップ検出のためのMyeloperoxidase-DNA複合体測定法の基礎的検討 |
| 3. 学会等名<br>第40回日本臨床化学甲信越支部総会                               |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoki Ichikawa, Tsubasa Sue, Satoshi Fujimura, Yoko Usami, Tsukasa Higuchi, Nobuo Okumura, Yumiko Higuchi           |
| 2. 発表標題<br>Validation of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to determine serum citrullinated fibrinogen concentration |
| 3. 学会等名<br>The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (ASCPaLM) (国際学会)                    |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tsubasa Sue, Tomoki Ichikawa, Satoshi Fujimura, Tsukasa Higuchi, Nobuo Okumura, Yumiko Higuchi    |
| 2. 発表標題<br>Citrullinated fibrinogen for detection of neutrophil extracellular traps                          |
| 3. 学会等名<br>The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (ASCPaLM) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大谷ひかる、市川友喜、藤村哲士、須江翼、服部周生、樋口由美子       |
| 2. 発表標題<br>新型コロナウイルス感染症における血中シトルリン化フィブリノゲン濃度の検討 |
| 3. 学会等名<br>第46回長野県臨床検査学会                        |
| 4. 発表年<br>2022年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>服部周生、須江翼、市川友喜、大谷ひかる、藤村哲士、樋口由美子 |
| 2. 発表標題<br>がん細胞株におけるフィブリノゲンのシトルリン化とPAD発現  |
| 3. 学会等名<br>第46回長野県臨床検査学会                  |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤村哲士、樋口由美子、伊澤 淳、宇佐美陽子、山浦 洵、奥村伸生 |
| 2. 発表標題<br>急性大動脈解離におけるシトルリン化フィブリノゲンの動態     |
| 3. 学会等名<br>第68回 日本臨床検査医学会 学術集会             |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤村哲士、宇佐美陽子、山浦 洵、樋口 司、樋口由美子          |
| 2. 発表標題<br>菌血症患者における血清中シトルリン化フィブリノゲンと炎症マーカーの関連 |
| 3. 学会等名<br>第67回 日本臨床検査医学会 学術集会                 |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤村哲士、宇佐美陽子、樋口由美子、伊澤 淳、、山浦 洵、寺澤文子、奥村伸生 |
| 2. 発表標題<br>急性大動脈解離におけるシトルリン化フィブリノゲンの測定意義         |
| 3. 学会等名<br>第71回 日本医学検査学会 学術集会                    |
| 4. 発表年<br>2022年                                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 奥村 伸生                     | 信州大学・学術研究院保健学系・特任教授   |    |
|               | (Okumura Nobuo)           |                       |    |
|               | (60252110)                | (13601)               |    |

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 |
|---------|---------|