様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月　５ 日現在

機関番号：３４５１９
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ０９２９８

研究課題名（和文）女性ホルモン類似物質による敗血症時の過活性化好中球機能制御についての検討

研究課題名（英文）Regulation of hyperactivated neutrophil function during sepsis by a female hormone analogue.

研究代表者

石川　倫子（Ishikawa, Michiko）

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：４０５６６１２１

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）：好中球細胞外トラップ（NET）の過剰発現は敗血症の臓器不全を引き起こす。本研究はヒト好中球（男性由来）のエンドトキシン誘導性NET形成をエクオール（大豆イソフラボン代謝産物）が抑制する可能性を明らかにした。血清エクオール濃度が低い男性由来の好中球では、エクオールはNET形成を有意に減少させたが、血清エクオール濃度が高い男性由来の好中球では、エクオールはNETを減少させなかった。好中球のGPR30発現は、エクオール高血清群よりも低血清群で高く、PAD4 mRNAレベルおよび核内PAD4タンパク質発現も、低血清エクオール群では低下した。エクオールは好中球の貪食能を変化させなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
エクオールは既に更年期障害の緩和などで用いられるが、経口による健康食品としての効果が知られている。エクオールの利点としては、エストロゲン様抗炎症作用を持ち、かつ効果は一過性で速やかに排泄されることがある。敗血症などの病態で好中球機能の過活性は問題であるが、過剰な抑制も生体防御機構を弱めることになるため、一過性の効果が得られるエクオールが臓器障害の悪化に関与する好中球細胞外トラップ（NETs）を抑制できることは、敗血症における女性ホルモン類似物質によるNETs由来臓器障害抑制、という新しい治療アプローチを提示した。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of neutrophil extracellular traps (NETs) causes septic organ failure. This study demonstrated that equol (a soy isoflavone metabolite) may inhibit endotoxin-induced NET formation in human neutrophils (male-derived). Equol significantly reduced NET formation in male-derived neutrophils with low serum equol concentrations, but not in male-derived neutrophils with high serum equol concentrations. GPR30 expression in neutrophils was higher in the low serum group than in the high serum equol group, and PAD4 mRNA levels and nuclear PAD4 protein expression were also lower in the low serum equol group. Equol did not alter the phagocytic capacity of neutrophils.

研究分野：救急・集中治療医学

キーワード：好中球細胞外トラップ　エクオール　女性ホルモン　敗血症　臓器障害

※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

敗血症とは、感染による臓器障害を伴う全身性の炎症状態で、致死率は30%にも及び、病態も様々で画一的な治療は難しく、救急領域における患者予後を著しく悪化させる要因となっている。敗血症による臓器障害は一因として感染に対する好中球機能の過活性化が挙げられる。好中球は自らのDNAを放出して外来抗原を捕らえるneutrophil extracellular traps (NETs)によって病原体を局所へ閉じ込め、全身への波及を抑制して感染制御を果たすが、その一方でNETsにより放出されるDNAやヒストン、好中球エラスターゼといった細胞内物質は血管内皮を障害し、NETsの過剰は臓器障害を引き起こす(Czaikoski PG, et.al. PLoS One.2016. 5;11(2):e0148142)。つまり、感染初期に好中球が十分に働くことが敗血症を回避する重要なポイントである一方で、敗血症病態において好中球機能が過剰となると臓器障害を増悪させることになる。好球機能の抑制はタイミングを誤ると易感染性に繋がり重篤な病態を引き起こすことにもなりうるため、臓器障害の軽減を目的としたNETsの制御は敗血症の予後に重要な因子であるにもかかわらず、有効な方法は見つかっていない。

敗血症の予後には性差が存在し、男性よりも女性で生存率が良いが、男性ホルモンの抑制や女性ホルモンの投与が敗血症の男性生存率を上昇させるかは不明であり、かつ副作用の問題からも課題が多い。我々はこれまでに雌性は雄性よりもNETs産生が少ないことを発見している。

大豆イソフラボンに含まれるダイゼインは代謝されると女性ホルモンに類似した物質であるエクオールを作ることが知られている。エクオールはエストロゲンと競合してエストロゲンレセプター(ER)βに主に結合する。ERβはERαに比べ女性特有の臓器以外に広範に存在し、抗炎症作用にも関連する可能性が示唆されている(Long Xiao, et al. Mol Med Rep. 2019;19(5): 3555-3563) 。また、抗アンドロゲン作用や、抗酸化作用としてNOSの抑制なども知られており(図3)、敗血症病態においてエクオールのもつエストロゲン様作用、抗アンドロゲン効果は、雄性における予後改善をもたらすのではないかと考えられる。また、エクオールはそれ以上代謝されず、安定した物質であり、経口摂取の場合でも投与後2-3時間でピークに達し、2日程度でほぼ 100%が尿中へ排泄される。このような即効性と高クリアランスは敗血症病態でピンポイントにNETs抑制を目的とした投与に都合が良いと考えられる。エクオールは急性期病態への応用が可能かについてはほとんど論じられていない。我々の研究は、エクオールの予防的な投与ではなく、敗血症病態形成後の好中球機能への直接効果を狙う世界初の試みである。本検討により急性期でのエクオールの効果が認められれば、敗血症における好中球機能制御として治療に大きく貢献できる。また、NETs が関与する自己免疫疾患やがんの転移のような病態においても予防だけではなく治療として応用できる可能性がある。

２．研究の目的

女性ホルモン類似物質であるエクオールが過剰となった好中球機能(NETs)を一時的に抑制し、敗血症における好中球起因の臓器障害を軽減する可能性を明らかにすること。

３．研究の方法

インフォームド・コンセントを得た健康なボランティア（n=16；男性10名、女性５名）から血液サンプルを採取した。好中球と血小板を分離し、分離した好中球はlipopolysaccharide (LPS) 055:B5またはLPS刺激血小板によってNETを誘導した。エクオール（0.01-1μM)、17 b-エストラジオール（0.01-1μM)、またはジメチルスルホキシド（DMSO、コントロール）をNETS誘導の15分後に添加し、その後165分間インキュベートした（37℃、5% CO2)。NET形成は免疫染色で評価し、NETが占める面積は視野における陽性色の画素を数えることで評価した。エクオール定量、及びDNA結合エラスターゼ定量は酵素結合免疫測定法(Enzyme-linked immunoassay;ELISA)により定量した。Peptidylarginine deiminase (PAD)4の核内移行を調べるためにウェスタンブロッティングを行い、mRNAの発現量はリアルタイムPCR法を用いた。また、GPR３０の発現量もウェスタンブロッティングにより測定した。好中球貪食能はフローサイトメトリーで評価した。データは平均値±標準偏差で示した。データ分布の正規性はShapiro-Wilk検定を用いて検証した。パラメトリック検定が適切な場合はPaired t-testを用い、ノンパラメトリック検定が正当な場合はWilcoxon signed-rank検定を用いた。検定はすべて両側検定とし、p値＜0.05を統計的に有意とみなした。すべての統計解析はJMPソフトウェアバージョン15.2（SAS Institute, Cary, NC）を用いて行った。

４．研究成果

＜血中エクオール濃度＞

男性10名のうち、9名は血中エクオール濃度がELISAによる検出は出来ていたが、定量限界値（0.7　μM）よりも低く、1名のみが定量限界値よりも高濃度（1.38μM）を示した。女性５名のうち２名は定量限界値以下であったが、３名はそれよりも高濃度（0.89-1.26μM）を示した。

<男性由来好中球におけるエクオールの効果について>

現在、NETsによる細胞死(NETosis)のELISAとして販売されている、DNA結合エラスターゼ量を測定するELISAを用いてNETs定量を行った。男性由来好中球では、エクオール低濃度群において、エクオール添加量が0.01, 0.1 μMの時、有意にNETsを抑制した。一方で、エクオール濃度が1, 10 μMの高濃度では抑制傾向が認められたが、有意ではなかった（図1)。高濃度エクオールを示した1名ではLPSによるNETs誘導が顕著ではなく、エクオール添加におけるNETs抑制作用も認められなかった。この時、好中球のGPR30（エクオール、及びエストラジオールの細胞膜上受容体;抗炎症作用に関連が深いと考えられている）について、発現を確認すると、血中エクオール濃度が低濃度の検体においてはGPR30の発現がしっかりと確認できたのに対し、血中エクオール濃度が高濃度の検体ではほとんど発現が認められなかった。

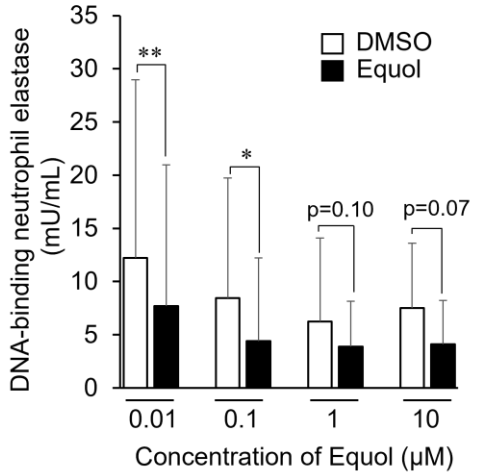

図1. 血中エクオール濃度が低い男性由来好中球におけるDNA結合エラスターゼ量

また、血中エクオール濃度が低い検体を用い、顕微鏡によりNETs形成面積を比較したところ、DNA結合エラスターゼ量と同じくエクオールは0.01, 0.1 μMでNETsを抑制し、1 μMでNETsを抑制する傾向がみられた（図2)。エクオール添加量が高濃度になると効果が減弱することに関しては、おそらく*in vitro*においては好中球のレセプター量に限りがあるため、エクオールとの結合が飽和してしまうことが原因ではないかと考えている。また、エクオールは濃度が高くなるとエストラジオール様の作用も出てくると考えられ、エストロゲンレセプターαへの結合においては炎症惹起する作用も報告されていることから、抗炎症作用との競合により効果が減弱した可能性もある。

さらに、エクオールによるNETs抑制効果が認められた検体について、PAD4のmRNA発現量を調べたところ、培養開始から45分経過した時点でのPAD4mRNA量をエクオールは有意に低下していた。さらに、培養開始から45分後において、核内のPAD4蛋白発現量も有意に低下（図3）しており、エクオールはPAD4の発現量及び核内移行を低下させることで、NETs形成を抑制していると考えられた。

NETs抑制能力があったとしても、同時に細胞貪食能力を損なうようでは治療法としては考えにくいため、我々は不活化E.coliに蛍光標識をしたものを用いて、フローサイトメータで貪食能を検討した。結果、エクオールによりNETsを抑制した検体において、貪食能には変化が無いことが明らかとなった。従って、エクオールは男性由来好中球において、過剰なNETsを抑制できる可能性を示唆した。しかし、血中エクオール濃度によっては効果が明瞭でない可能性も同時に明らかとなった。

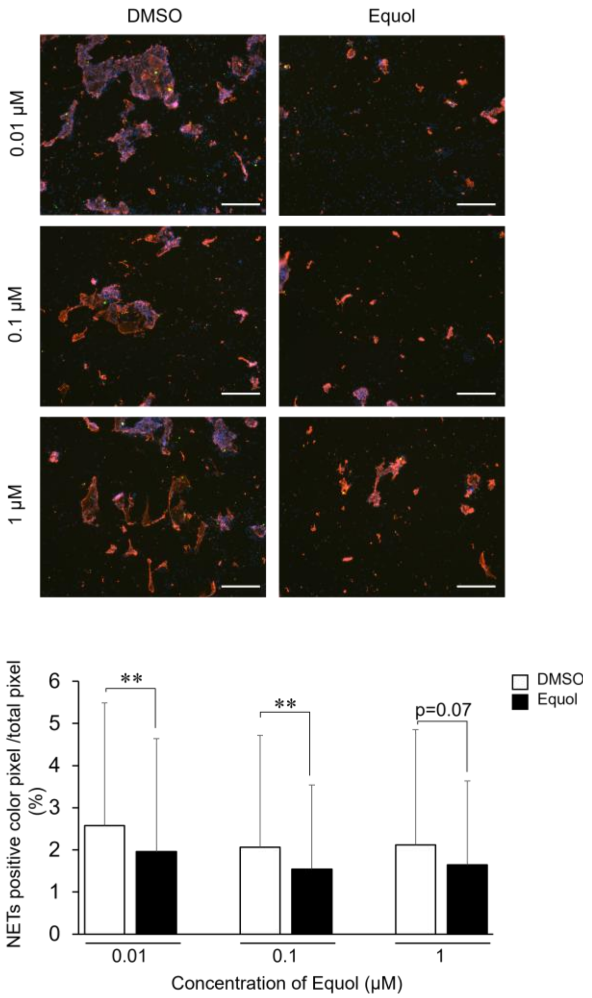

図2. 血中エクオール濃度が低い男性由来好中球における顕微鏡NETs撮影像

赤：ヒストンH1、緑：エラスターゼ、青：核

〈男性由来好中球におけるエクオールの効果について〉

女性由来好中球を用いた場合、エクオールはいずれの濃度においても好中球の NETs 抑制になんの効果ももたらさなかった。血中エクオール濃度が低い検体と高い検体に分けて検討した場合でも変化はなく、女性の場合、女性ホルモンの影響か、もしくは何らかの女性特有の遺伝子背景などによってエクオールの NETs 抑制効果が得られないことが明らかとなった。

しかし、今回の検討では閉経前の女性に限った検討であり、5 名分の検討にとどまったため、性周期における変化などは考えられていない。エクオールの女性由来好中球に対する効果を明確にするためには、今後、閉経後の女性ホルモン値が減少した場合や、性周期による変化についても検討が必要であると考えられた。

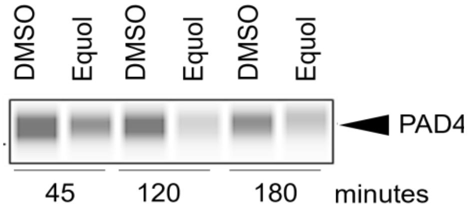

図 3. 男性由来好中球の核における PAD4 蛋白発現

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 Hiromoto Murakami, Michiko Ishikawa, Hideki Higashi, Keisuke Kohama, Taketo Inoue, Noritomo Fujisaki, Jun-Ichi Hirata.	４．巻 61(5)
２．論文標題 Equol, a soybean metabolite with estrogen-like functions, decreases lipopolysaccharide-induced human neutrophil extracellular traps in vitro	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Shock	６．最初と最後の頁 695-704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000002273.	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 －

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 村上博基、石川倫子、高橋知佳子、砂川卓哉、清水美沙、西村壮太、新海貴士、野間光貴、小濱圭祐、平田淳一、井上岳人
２．発表標題 女性ホルモン類似物質の好中球細胞外トラップ（NETs）に対する効果
３．学会等名 第50回日本救急医学会総会学術集会
４．発表年 2022年

１．発表者名 村上 博基, 石川 倫子, 東 英樹, 小濱 圭祐, 井上 岳人, 山田 太平, 白井 邦博, 藤崎 宣友, 平田 淳一
２．発表標題 女性ホルモンおよびエクオールのneutrophil extracellular traps (NETs)抑制作用について
３．学会等名 第50回日本集中治療医学会学術集会
４．発表年 2023年

１．発表者名 村上博基、石川倫子、東英樹、小濱圭祐、井上岳人、山田太平、　白井邦博、藤崎宣友、平田淳一
２．発表標題 Neutrophil extracellular traps (NETs)抑制作用への大豆イソフラボン代謝産物エクオールの可能性について
３．学会等名 第37回日本Shock学会学術集会
４．発表年 2023年

１．発表者名 Hiromoto Murakami, Michiko Ishikawa, Hideki Higashi, Keisuke Kohama, Taketo Inoue, Noritomo Fujisaki, Junichi Hirata
２．発表標題 A female-hormone-like soybean metabolite decreases human neutrophil extracellular traps during lipopolysaccharide treatment.
３．学会等名 ESICM　EuroAsia (欧州アジア集中治療医学会)
４．発表年 2023年

１．発表者名 村上博基、石川倫子、東英樹、小濱圭祐、井上岳人、白井邦博、藤崎宣友、平田淳一
２．発表標題 性ホルモンがneutrophil extracellular traps (NETs)に与える影響の検討
３．学会等名 第51回日本集中治療医学会学術集会
４．発表年 2024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	井上　岳人 (Inoue Taketo) (30772652)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519)	
研究分担者	小濱　圭祐 (Kohama Keisuke) (50595171)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	東　英樹 (Higashi Hideki) (20726509)	姫路獨協大学・医療保健学部・准教授 (34521)	

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