

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861718

研究課題名(和文) ARDS患者におけるNETsの動的変化と新たな治療戦略の確立

研究課題名(英文) The expression of NETs in bronchial aspirate of patient with ARDS

研究代表者

廣瀬 智也 (Hirose, Tomoya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：70597509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NETs(Neutrophil Extracellular Traps)とは、好中球からDNAを含む網目状構造物を放出する現象で、感染防御の役割を担っている。一方で、NETsの過剰発現は炎症を誘導し、組織損傷を引き起こす可能性も報告されている。ARDS(急性呼吸促迫症候群)において、NETsの過剰発現が肺組織損傷を誘導していると仮説をたて、検証した。

本研究において、すべてのARDS患者の喀痰中にNETsは発現しており、生存例においてはNETs発現とともに呼吸不全の目安となるP/F ratioが改善し、その後NETsは消褪した。一方、死亡例においてNETs発現が持続し全例呼吸不全で死亡した。

研究成果の概要(英文)：NETs are fibrous structures that are released extracellularly from activated neutrophils in response to infection. NETs rapidly trap and kill pathogens as a first-line defense for infection. On the other hands, it was reported that the overexpression of NETs had harmful effects to tissue. The purpose of this study is to evaluate whether NETs are produced in bronchial aspirate of patient with ARDS.

In this study, NETs formation was observed in bronchial aspirates of all of the patients diagnosed as ARDS. In survivors, the expression of NETs was observed and the P/F ratio improved gradually. After that, NETs were fragmented. On the other hands, in non-survivors, the expression of NETs was observed too, but the expression of NETs persisted. NETs formation seems to be a predictive factor of prognosis of these conditions.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：NETs ARDS 好中球 集中治療 呼吸不全

1. 研究開始当初の背景

ARDS(acute respiratory distress syndrome: 急性呼吸促進症候群)は救命センターに搬送される患者の予後を決定する主要な要因の1つである。しかしARDS発症のメカニズムは解明されておらず、重症症例に対する有効な治療法は確立されていない。

我々は、ARDSの病態において、NETsが関与しているのではないかと推測し、本研究を計画した。NETsとは、感染により活性化された好中球が自らのDNAやgranule proteinを含む網目状の構造物を能動的に放出する現象であり、Brinkmannらにより初めて報告された(Science.2004 303:1532-1535)。NETsの放出により細菌を捕獲しながら能動的に細胞死を起こす現象は、apoptosisやnecrosisとは異なる細胞死の機序としてNETosisと呼ばれ、感染に対する生体防御として重要な役割を担っている。これらの発見はin vitroや動物実験モデルでなされてきたが、ヒトにおけるNETsの動態を評価した研究は皆無であった。その中で我々は、先駆的に臨床検体を用いてNETsの動態を明らかにしてきた。

呼吸器感染を起こした患者の喀痰中のNETsを経時的に追跡した研究では、感染の顕在化とともにNETsの発現量は増加し、感染の鎮静とともにNETsが減少するという事実を確認した(Hirose T, et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2012; 185: 1130-1131)。さらに、そのNETsをコンピューター解析により客観的に定量化することに成功している(Hamaguchi S, Hirose T, et al. Eur Respir J. 2014; 43(6): 1709-18)。これらの結果から、実際にヒトにおいても、NETsが肺における防御機構として恒常的に作用しており、呼吸器感染発症時にはさらにその発現が誘導されて、局所免疫において重要な役割を果たすことが示された。

一方で、NETsの過剰発現は組織損傷に寄与する可能性が最近の動物実験で示唆されている(PloS one. 2012;7(2):e32366、Nature medicine. 2009;15(11):1318-21)。我々は救命センターに入院中の患者の血液から蛍光顕微鏡を用いた免疫学的手法を用いてNETsを同定する手法を開発し、SIRS患者において有意にNETsが発現していることを解明した(p=0.0265)(Hamaguchi S, Hirose T, et al. J Int Med Res 2013;41(1):162-8)。このことから、NETsが生体侵襲に反応して血液中に誘導され、SIRSを基礎とする臓器障害に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

我々はこれらの一連の研究過程により、ARDSの誘因として肺におけるNETsの発現が関与しているのではないかという発想に到った。ARDS患者において、喀痰に細菌が存在しないにも関わらず、好中球が肺に浸潤する症例をしばしば経験する。好中球から放出される因子がARDSに関与している可能性があり、さらには肺におけるNETsの過剰発現が肺上皮細胞、血管内皮細胞の損傷を誘導

し、ARDSを引き起こしている可能性を我々は考えた。さらに、近年様々な研究で、ARDS早期より低用量 mPSL (methylprednisolone)を投与することで、ARDSの予後が改善するとの報告がある。ステロイドが好中球の活動性を抑制し、NETs産生を抑えることで病態が改善している可能性がある。ステロイド投与前後での、痰や血液中のNETsの動的变化およびマーカーの変化をみることで、ARDSの病態解明および治療につながる可能性がある。現時点で、ARDSとNETsの関係性を調べた研究は我々が知る限りない。

そこで、本研究では、ARDSにおける痰・血液中NETs発現の動的变化、ステロイド投与によるNETs発現への影響を、臨床病態、生物学的マーカーと共に評価し、ARDSの病態解明に役立たせることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、ARDSにおける痰・血液中NETs発現の動的变化、ステロイド投与によるNETs発現への影響を、臨床病態、生物学的マーカーと共に評価し、ARDSの病態解明および治療に役立たせることを目的としている。

3. 研究の方法

(1)組織学的評価(蛍光染色)

採取した喀痰・血液におけるNETsを、免疫組織化学的手法により同定する。Histon-H1もしくはH3、Neutrophil Elastaseに対する抗体、及びDNAを染色するDAPIを用いて、三重染色された細胞外成分がNETsである。また、NETs放出の前段階であるヒストンH3のシトルリン化を評価するため、シトルリン化ヒストンH3(Cit-H3)抗体を用いた。

ARDSの患者の喀痰・血液をそれぞれ採取し、スライドガラス上に塗布して風乾の上、-30にて保管する。

PBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。

PBSで再度洗浄し、20% Block Ace(大日本住友製薬)/0.005%サポニン/0.1M PBでブロッキングを行う。

mouse anti-Histone H1抗体(Abcam; ab71549)もしくはH3抗体(MABI Institute Inc.; MABI0001)、rabbit anti-Neutrophil Elastase抗体(Calbiochem; 481001)をそれぞれ100倍、50倍に希釈した上、室温下で90分間反応させる。また同時にシトルリン化ヒストンH3を評価するため、anti-human Cit-H3抗体(Abcam; ab5103)を用いた。

0.005%サポニン/0.1M PBにて洗浄後、gout anti-mouse Alexa546(Molecular Probes; A11030)、gout anti-rabbit Alexa488(Molecular Probes; A11034)をいずれも1000倍に希釈した上、室温下で60分間反応させる。

0.005%サポニン/0.1M PBにて洗浄後、DAPI(Molecular Probes; D1306)を300nMに

希釈した上、室温下で5分間反応させる。
 (*一次抗体、二次抗体および DAPI の希釈は、5% Block Ace / 0.005% サポニン / 0.1M PB にて行う。)

0.005% サポニン / 0.1M PB にて洗浄の上、EverBrite (Biotium; 23001) で包埋し、蛍光顕微鏡 (Keyence; BZ-9000) にて観察する。得られた画像はデジタル保存する。

NETs の定量化は画像処理ソフト NeuroLucida®を用いて、NETs の長さを測定し、評価する。

(2)免疫学的手法を用いた NETs 評価と文献的に報告されている血液中 NETs 定量方法の比較検討

ARDS 患者の血液中の NETs の評価方法を確立するために、我々が開発した免疫学的手法を用いた NETs 評価と従来文献的に報告されている NETs の定量方法としての cf-DNA 値と MPO-DNA ELISA の結果を 2011 年 4~6 月に当センターで入院時に挿管された重症患者の血液を用いて評価した (n=49)。cf-DNA 値は Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて評価し、MPO-DNA ELISA は Cadrillier らの方法 (J Clin Invest 122: 2661-2671, 2012.) を用いて行った。

(3) NETs と ARDS 臨床病態との関連性の評価

ARDS を発症した患者を対象に、経時的に喀痰・血液を採取し免疫染色により NETs を検出する。検体採取は、ARDS 発症時、ARDS の Grade が変わったとき (24 時間以上の間変動を認めなかった時に Grade が変わったと判断) とする。臨床病態の評価として、年齢、性別、ARDS の原因、重症度スコア (APACHE、SOFA、MODS、DIC、Lung injury score)、痰・血液の培養検査およびグラム染色、サイトカインや DAMPs、採血データ所見 (CRP、プロカルシトニン、白血球数、凝固機能など)、人工呼吸器換気日数、人工呼吸器換気設定、生命予後 (入院 28 日目の生存の有無) などの診療情報を収集し検討する。また、治療としてステロイド投与治療を行った場合は、NETs のステロイド治療の前後での変化、ステロイドが著効した症例と著効しなかった症例の違いを詳細に検討する。NETs 発現の観点からステロイド投与が有効な疾患群が存在するか検討する。NETs の定量化は、急性呼吸器感染症に関する NETs の研究で用いた

NeuroLucida®を用いて測定し、定量化した。

4. 研究成果

(1)免疫学的手法を用いた NETs 評価と文献的に報告されている血液中 NETs 定量方法の比較検討結果

対象患者 49 人のうち、免疫学的手法を用いたところ、NETs を 5 人、Cit-H3 を 11 人で認めた。

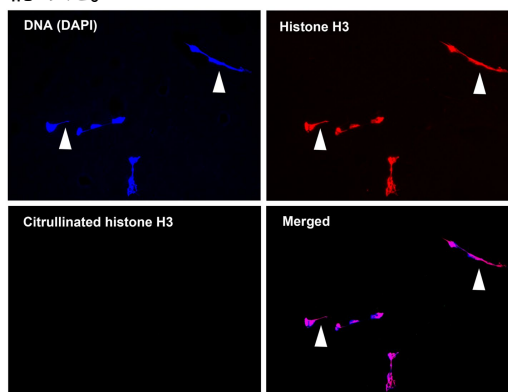


図 1: 免疫学的手法を用いた NETs の同定 (矢印: NETs)

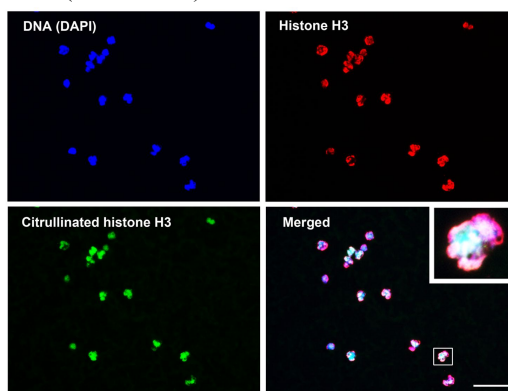


図 2: 免疫学的手法を用いた Cit-H3 の同定

免疫学的手法を用いた NETs の有無の評価と血中 cf-DNA の関係

	NETs and/or citrullinated histone H3		
	Positive	Negative	p
cf-DNA (ng/mL)	1038.3 (744.9-1329.7)	1072.7 (828.6-1770.7)	n.s.

表 1: NETs and/or citrullinated histone H3 有無別に見た cf-DNA の値

NETs and/or citrullinated histone H3 の有無別に cf-DNA の値を見たが、統計学的に有意差はなかった。

免疫学的手法を用いた NETs の有無の評価と血中 MPO-DNA ELISA 値との関係

	NETs and/or citrullinated histone H3		
	Positive	Negative	p
MPO-DNA ELISA	0.076 (0.067-0.100)	0.078 (0.070-0.111)	n.s.

表 2: NETs and/or citrullinated histone H3 の有無別に見た MPO-DNA ELISA 値

NETs and/or citrullinated histone H3 有無別に MPO-DNA ELIZA 値を見たが、統計学的有意差はなかった。

今回、NETs and/or citrullinated histone H3 有無別に cf-DNA や MPO-DNA ELIZA の値に有意差がないことは、以前呼吸器感染症にて感染の極期に NETs が出現した後にそれらが断片化するという結果とあわせて考えると、cf-DNA や MPO-DNA ELIZA は NETs の一部もしくは断片化された一部を見ている可能性が示唆された。このことから、ARDS 患者の血液中の NETs の評価には免疫学的手法を主に用いて行うことが妥当であることが判明した。

(2)NETs と ARDS 臨床病態との関連性の評価

対象の ARDS 患者は 7 例(男性 4 例、女性 3 例)であった。年齢の中央値は 69 歳(IQR: 61.0-72.5)であった。全例挿管され、人工呼吸器管理を要し、吸引痰から NETs を検出した。生存例は 2 例、死亡例は 5 例であった。

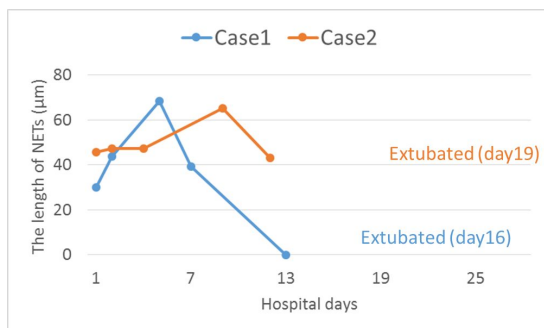


図 3:ARDS 生存例における NETs の継時的変化

Case1

病日	1	2	5	7
P/F ratio	95	172	372	393

Case2

病日	1	2	4	9
P/F ratio	60	185	173	216

生存例においては、NETs 発現とともに P/F ratio が改善し、その後 NETs は消褪した。

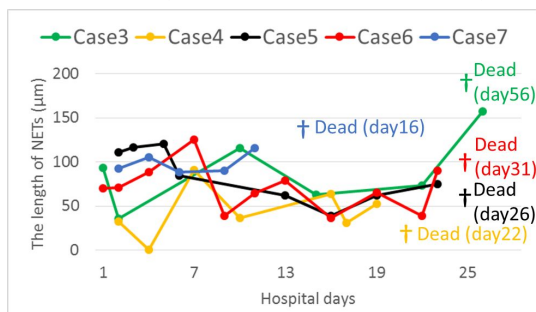


図 4:ARDS 死亡例における NETs の継時的変化

Case3

病日	1	10	22	26
P/F ratio	65	196	318	122

Case4

病日	2	7	16	19
P/F ratio	72	127	104	79

Case5

病日	1	2	4	9
P/F ratio	126	125	119	78

Case6

病日	1	2	7	23
P/F ratio	84	116	125	58

Case7

病日	2	4	9	11
P/F ratio	117	92	104	95

死亡例においては NETs 発現は認められるものの、その発現が持続し、全例呼吸不全で死亡した。

ステロイド投与における NETs 発現形成への影響に関しては、本研究における 7 症例からは明らかにできなかった。今後症例数を蓄積し検討していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

廣瀬智也、濱口重人、松本直也、他. 重症病態における NETs(Neutrophil Extracellular Traps) 日本 Shock 学会雑誌 (査読無) 28:55-60:2013

Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, et al. Presence of Neutrophil Extracellular Traps and Citrullinated Histone H3 in the Bloodstream of Critically Ill Patients. PLoS One (査読有) 9: e111755: 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111755

〔学会発表〕(計 5 件)

廣瀬智也、濱口重人、松本直也、他. 重症病態における NETs(Neutrophil Extracellular Traps) 第 28 回日本 Shock 学会総会 (2013 年 5 月、東京)

廣瀬智也、濱口重人、松本直也、他. 重症患者における血液中の NETs(Neutrophil Extracellular Traps)とシトルリン化ヒストン H3 第 41 回日本救急医学会総会・学術集会 (2013 年 10 月、東京)

Hamaguchi S, Hirose T, Seki M, et al. Neutrophil Extracellular Traps under critical condition. The 91st Annual Meeting of the Physiology Society of Japan(2014 年 3 月、鹿児島)

小島将裕、山本倫久、廣瀬智也、他. ARDS 患者における喀痰中の Neutrophil Extracellular Traps (NETs)形成と臨床経過の検討第 42 回日本救急医学会総会・学術集会(2014 年 10 月、

福岡)

Ojima M, Yamamoto N, Hirose T, et al. The presence of neutrophil extracellular traps in bronchial aspirate of patients diagnosed as ARDS or acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. 35th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine (2015.3 Brussels, Belgium)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

廣瀬 智也 (HIROSE, Tomoya)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：70597509

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：