

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461919

研究課題名(和文)好中球のCXCR1/2の細胞内輸送分子を用いた新たなSIRSの診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Innovation of diagnosis and treatment for SIRS by intracellular trafficking of CXCR1 and CXCR2 in neutrophils.

研究代表者

蒲原 英伸 (Kamohara, Hidenobu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：90398222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SIRSによる全身性炎症反応の初期過程は好中球の遊走である。NF-kappa Bの阻害剤であるCurcuminは濃度依存性に好中球の遊走を抑制する。今回の研究にて、好中球の遊走活性作用を有するCXCL-8の受容体であるCXCR-1/2の病表面への発現回復(recycle)に依存しており、Curcuminにより抑制された。CXCL-8とCXCR-1/2の結合体がinternalizationされendosomeにて処理を受けるが、細胞内輸送蛋白のRab-11はCXCR-1/2と結合し、Recycleの調整に寄与していた。SIRSにおいて細胞内輸送分子は新たな標的と成り得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils migration is the early process of systemic inflammatory response by SIRS. Curcumin, an inhibitor of NF-kappa B, inhibits neutrophils migration in a dose dependent manner. In this study, it depended on the recovery (recycle) on the surface of CXCR-1/2 which was a receptor of CXCL-8. Its recycling activity of CXCR-1/2 was suppressed by Curcumin. Although the binding of CXCL-8 and CXCR-1/2 was internalized and desensitized in endosome. Rab-11 which was the intracellular transport protein bound to CXCR-1/2. Rab-11 contributed to the recycle regulation of CXCR-1/2. These results suggested that intracellular trafficking molecules could be novel targets in treatment of SIRS.

研究分野：Critical Care Medicine

キーワード：neutrophil CXCL-8 CXCL-1 CXCL-2 SIRS cellular trafficking Rab

1. 研究開始当初の背景

SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)は全身性の炎症反応として認識され、重篤な臓器不全に至る前段階としての早期診断・早期治療へとつなげる為に提唱された。手術、外傷など種々の要因から SIRS が惹起されるが、感染を合併すると敗血症から多臓器不全の重症化をきたす。その重症化の過程を牽引しているのは活性化好中球である。

炎症の初期過程は好中球の遊走反応であり、CXCL-8 はその中心的なサイトカインであり、その受容体の CXCR1 と CXCR2 は互いに 77% のホモロジーを有している 7 回膜貫通 GPCR(G-Protein Coupled Receptor)である。好中球に主に存在し、CXCR1 は CXCL6,8 と結合するに対して、CXCR2 は CXCL1,2,3,5,7,8 と複数のケモカインと結合する。中でも CXCL8 は high affinity であり、遊走・接着、脱顆粒、貪食作用など Innate Immunity において重要な役割を担っている。CXCR1 と CXCR2 の相違点として CXCR1 は低親和性、CXCR2 は高親和性受容体であり、低濃度の CXCL8 に CXCR2 が反応し高濃度で CXCR1 が反応する。CXCR1 は CXCR2 と比して、Internalization の速度が遅く、完全に recycle され、シグナル活性の継続性が長いために、CXCR1 は好中球の活性化を強く誘導する。活性の遷延化は respiratory burst(活性酸素産生)を促進し細菌等の微生物殺傷能を促進し生体防御に貢献するが、一方 protease や granule による周囲組織損傷も惹起することもある。CXCR2 は主に遊走活性に作用している可能性がある。つまり、高濃度環境である炎症局所に遊走した後は、CXCR2 は down-regulation され遊走性を停止させ、CXCR1 の強い好中球活性へと橋渡ししていることが示唆されている。CXCR1 と CXCR2 は細胞内シグナル伝達に関与する分子の一部が異なっている。細胞内シグナル伝達は GTP-binding protein の $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ の phosphorylation(Inactive GDP Active GTP)による活性化から下流標的分子 PI3K、PLC、PKC、PLD に作用する。特に Ca^{2+}

mobilization から PLD の活性により遊走、貪食等の種々の機能が発揮される

細胞内輸送とは、細胞内にある一つの膜系(ドナー膜系)から芽が出て形成(budding)され、この小胞がほかの膜系(アクセプター膜系)に移動(targeting)して結合(ththering/docking)し、融合(fusion)する現象である。この細胞内輸送は生命体の homeostasis を維持するための基本的な制御機構であり、この異常は Apoptosis や Autophagy などの細胞死を誘発し、アルツハイマー病、糖尿病など種々の疾患と関連している。細胞内輸送は、Exocytosis & Secretion の現象を考慮すると細胞・組織・臓器間の情報伝達を担っている可能性もある。SIRS 状態においては、Homeostasis を維持するために細胞内で大量の物質輸送(細胞内シグナル伝達過剰)が行われており、病状の進行とも関連していることが予想される。

G 蛋白受容体からのシグナル伝達および受容体そのものの細胞内輸送により生じる Internalization, degradation, recycling, desensitization 等は、これらを支える分子群(Rab family や Rab の作用部位となる SNARE 等)との関連性が報告されている。CXCR1 と CXCR2 の細胞内に取り込まれ、その輸送に関するメカニズムの詳細の解明は SIRS に対する新たな診断・治療の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

SIRS は生体に重大な危険が及ぶ前兆であり、特に敗血症は容易に多臓器不全を呈し、致命的な経過を辿る。こうした SIRS 状態にある患者の血液や体液においては高濃度のサイトカインが産生されている。我々は volunteer からの血液から好中球を分離し、好中球の CXCL8 の遊走性をこれまで検討してきた。CXCL8 の存在下において、CXCR1 および CXCR2 は細胞表面から減少し細胞内への Internalization が確認された。さらに、CXCL8 の非存在下に好中球を戻すと CXCR1 と CXCR2 は細胞表面に回復しており、Recycling のメカニズムが示唆された。また、NF-kappa B は細胞内の種々のシグナルを核内レベルへと伝達さ

せる中心的な標的分子であるが、Curcumin はこの阻害活性効果を有していることを腫瘍細胞の CXCL8 発現と転移活性制御の研究により明らかにしてきた。Curcumin は好中球の遊走活性も抑制しており、その詳細なメカニズムを CXCR1 と CXCR2 の細胞内輸送を標的として明らかにし、SIRS による過剰な炎症反応の制御に貢献するかどうかを提案していくことを目的とする。

3. 研究の方法

好中球の遊走など種々の機能を誘導する CXCL8 の受容体の CXCR1 および CXCR2 の細胞内移動のメカニズムの解明から、好中球の局所から全身へ波及する SIRS の制御へとつなげることを作業仮説として研究をすすめる。

健常者と SIRS の患者からの血液や体液(胸水、腹水、浸出液、尿、痰など)を採取し、polymorphoprep を用いて好中球を分離した(Trypan Blue にて 95% 以上の Purity と 98%以上の Viability を実験毎に確認)。各種検体からの好中球の mRNA は、Trizol を用いて RNA まで精製し、CXCR1 と CXCR2 に対する primers を作製し RT-PCR にて解析した。好中球の培養は RPMI1640 培地に 10%FBS を添加したものを使用した。好中球の遊走活性は Insert chamber well を用いて、上下層の間には 3 μ m pore の membrane にて仕切られている。上層に細胞、下層に遊走因子として CXCL8 を添加し、下層 membrane 側に移動した細胞カウントして遊走活性として比較した。カウントは固定した membrane を複数視野を複数で施行し統計処理した。Curcumin は DMSO にて実験の都度溶解(0.5 - 100 μ M)し、DMSO は 0.1%以下に抑えた。好中球の遊走活性は細胞内の Ca イオンの上昇と関係し、同時に CXCL8 と CXCR1/2 の Internalization と関与することが分かっており、Fura Red-AM を用い Flow cytometry (FACS: fluorescence activated cell sorting)により細胞内 Ca イオンを定量した。Flow cytometry による CXCR1/2 の細胞表面の定量には、好中球を Curcumin(50 μ M)もしくは CXCL8(50ng/ml)の存在および非存在下に於てある

一定時間培養を行い細胞を回収した。細胞はヒト IgG で FcReceptor をブロックし、cell sorter buffer にて洗浄、その後マウス由来ヒト CXCR-1 および CXCR2 抗体を用いて培養。洗浄後、APC-conjugated ラット由来マウス IgG 抗体にて培養した。Curcumin が干渉しない 640-680nm の波長を用いて FACS caliber system を用いた。細胞表面と細胞表面の CXCR1/2 の総数を定量するために、細胞表面を IntraPrep permeabilization reagent にて透過させ固定した。その後の CXCR1/2 の定量は Flow cytometry に準拠した。CXCR1/2 の Recycling の解析においては、新たな蛋白翻訳(de novo protein synthesis)による影響を除外するために、Cycloheximide(10 μ g/ml)を用いて解析した。細胞内移動する CXCR1/2 の解析は、Immunoprecipitation と Western blotting を用いた。目的の条件にて処理された好中球は lysis buffer(種々の蛋白分解阻害酵素含)にて溶解させ、遠沈にて上清を回収し、マウス由来ヒト CXCR-1 および CXCR2 抗体と反応させ、True blot 抗マウス IgG IP beads を用いて免疫沈降を行い、洗浄後、SDS-PAGE を施行。Nitrocellulose membrane へ転写し、enhanced chemoluminescence 測定キットを用いて解析した。

4. 研究成果

健常者および SIRS 検体を用いて好中球を分離した。Real-Time PCR を用いて、好中球中の CXCL8 mRNA の発現解析を行った、CXCL8 mRNA は SIRS 状態にて著明に増加し、SIRS の原因となる局所における炎症部位においてはさらに高値を示していることが明らかにされた。このことは局所における炎症が全身に広がり、SIRS を惹起していることを示唆しており、炎症の初期過程である CXCL8 による好中球の遊走活性のメカニズムの解析を行い、特に CXCL8 の受容体である CXCR1/2 の細胞内移動について焦点を絞った。健常者からの CXCL8 による遊走活性は濃度依存性であり、さらに、その活性は核内移行分子の NF- κ B の阻害活性を有する Curcumin により濃度依存性に抑制された。この Curcumin による

好中球遊走制御のメカニズムの解明は SIRS 治療への応用が推察された。

好中球の受容体の Internalization と細胞内の Ca イオン増加は相関していることが報告されているが、Curcumin の好中球遊走活性の抑制を検証するために、Ca イオンの変化を Curcumin の存在下にて行った。CXCL8 により増加した Ca イオンは Curcumin により抑制された。このことより、Curcumin の internalization に何らかの影響もしくは細胞表面の CXCR1/2 発現分布に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

そこで、我々は、好中球における CXCR1/2 の発現が CXCL8 によりいかに変化するかを検証するために FACS にて細胞表面、細胞内定量により明らかにした。CXCR1 は CXCL8 により細胞表面の発現は減少するが、30 分後にはその発現はほぼ回復した。CXCR2 では約 90 分にて回復した。CXCR1/2 は細胞内に一旦 Internalization され、再度回復する。この反応は Curcumin により濃度依存性に抑制された。また、この反応が蛋白翻訳に影響されることを検証するために、蛋白翻訳阻害剤(Cycloheximide)の存在下にて行った所、CXCR1/2 の各総蛋白量に変化はなく、CXCL8 や Curcumin による直接翻訳に与える影響は否定された。このことより、Curcumin は CXCR1/2 の細胞表面の発現分布を負に制御している可能性が示唆された。

CXCL8 による CXCR1/2 の細胞内への Internalization 後は Endosome にて処理分解されるか、もしくは desensitization により CXCL8 と CXCR1/2 は乖離し、CXCR1/2 はさらに細胞表面へ移動し、Recycling される可能性がある。この過程に Curcumin が関与している可能性を解析するために、好中球を CXCL8 もしくは Curcumin の存在下にて処理し、細胞内の蛋白を精製分離した。細胞溶解抽出液を CXCR1/2 にて免疫沈降し分離し、SDS-PAGE 後に、細胞内分子移動で Recycling に関与している Rab11 にて Western blotting を行った。CXCR1/2 いずれも CXCL8 の存在下において、CXCL8-CXCR1/2 の結合体は増

加した。さらに、Curcumin の存在下ではさらに増加していた。以上のことより、CXCL8 により Internalization された CXCR1/2 は、時間の経過とともに Rab11 の作用により Recycling されていくが、Curcumin によりその Recycling 活性は減少し、細胞内に留まった状態が維持されていることが検証できた。

Curcumin の Rab11 の Recycling の stuck 作用はさらなる解析が必要ではあるが、CXCR1/2 の細胞内輸送を標的とした好中球の遊走活性の一つの制御メカニズムが存在することが示唆された。今後、細胞内輸送分子を標的とした新たな SIRS の治療法の開発につながるものと考えらる。

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 7 件)

1) Aerosoled tobramycin pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome.

Migiyama Y, Hirosako S, Tokunaga K, Migiyama E, Tashiro T, Sagisima K, Kamohara H, Kinoshita Y, Korigi H

Plum. Pharamcol. Ther. 2017 in press. 査読有

2) Hyperammonemia crisis following parturition in a female patient with ornithine transcarbamylase deficiency.

Kido J, Kawasaki T, Mitsubuchi H, Kamohara H, Ohba T, Matsumoto F, Endo F, Nakamura K.

World J, Hepatol. Vol9(6), 2017, 343-348. 査読有

3) 長時間腹臥位が奏功した敗血症性急性呼吸逼迫症候群の 1 例

田代貴大, 長崎愛, 田中貴子, 吉里孝子, 小寺厚志, 鷺島克之, 興梠博次, 木下順弘

人工呼吸, Vol33(1), 2016, 85-90. 査読有

4) Infective endocarditis caused by odontogenic infection with dentinogenesis imperfecta syndrome.

Naito H, Kamohara H, Oshima T, Yamashita J,

Tokunaga K, Niimori D, Kotera A, Sagisima K, Nakayama H, Kinoshita Y.

J. Clin. Case Rep. Vol5, 2015, 604-606. 査読有

5) Healthy baby delivered vaginally from a brain-dead mother.

Kinoshita Y, Kamohara H, Kotera A, Sagisima K, Tashiro T, Niimori D.

Acute Med. Surg. Vol2, 2015, 211-213. 査読有

6) A case of successful weaning from mechanical ventilation after inhaled tobramycin therapy for refractory pseudomonas aeruginosa infection.

Migiyama Y, Hirotsako S, Yamaguchi E, Tashiro T, Sagisima K, Kamohara H, Korigi H, Kinoshita Y.

J. Jpn. Soc. Intensive Care Med. Vol22, 2015, 122-126. 査読有

7) 重症患者における早期静脈栄養の影響
蒲原英伸, 木下順弘

救急医学. Vol38(3), 2014, 363-369. 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

1) Clotted hemothorax を呈した胸部大動脈仮性瘤術後の一例

第 1 回日本集中治療医学会九州支部学術集会
(2017 年 5 月 13 日 長崎ブリックホール)

鷺島克之, 野中俊彦, 江嶋正志, 徳永健太郎, 山下淳二, 早田学, 蒲原英伸

2) 悪性黒色腫に対する抗 PD-1 抗体療法により重症筋無力症を発症し人工呼吸離脱不能となった一例

第 44 回日本集中治療医学会学術集会 (2017 年 3 月 9 日~11 日 ロイトン札幌 他)

蒲原英伸, 山下淳二, 徳永健太郎, 早田学, 江嶋正志, 鷺島克之

3) 抜歯後に脾摘後の侵襲性肺炎球菌感染症を罹患後、両下腿と両手指切断を回避できなかった一例

第 44 回日本集中治療医学会学術集会 (2017 年 3 月 9 日~11 日 ロイトン札幌 他)

蒲原英伸, 山下淳二, 徳永健太郎, 早田学, 江嶋正

志, 鷺島克之

4) 成人敗血症性ショックの初期蘇生にアドレナリンの持続静注併用が有効であった 1 例

第 44 回日本集中治療医学会学術集会 (2017 年 3 月 9 日~11 日 ロイトン札幌 他)

鷺島克之, 江嶋正志, 徳永健太郎, 早田学, 山下淳二, 蒲原英伸

5) 熊本地震で受傷した圧挫症候群の 1 例

第 44 回日本救急医学会総会・学術集会 (2016 年 11 月 17~19 日 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール)

鷺島克之, 江嶋正志, 徳永健太郎, 蒲原英伸

6) 熊本地震における大学病院の急性期対応 (トリアージ本部の視点から)

第 44 回日本救急医学会総会・学術集会 (2016 年 11 月 17~19 日 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール)

蒲原英伸 鷺島克之 江嶋正志 早田学 徳永健太郎 山下淳二

7) 著明な代謝性アシドーシスを呈したアルコール性ケトアシドーシスに大量水分負荷と CHDF が有効であった一救命例

第 26 回日本集中治療医学会九州地方会 (2016 年 6 月 25 日 沖縄科学技術大学院大学)

蒲原英伸, 川崎修二, 山下淳二, 徳永健太郎, 早田学, 鷺島克之, 甲斐祐基

8) 法的脳死判定における無呼吸試験中の PaO₂ 変動の解析

第 43 回日本救急医学会総会・学術集会 (2015 年 10 月 21 日~23 日 東京国際フォーラム)

鷺島克之, 木下順弘

9) アルコール肝障害を有する頸髄損傷の呼吸管理に NAVA を適応した一例

第 29 回日本外傷学会総会・学術集会 (2015 年 6 月 11 日~12 日 札幌コンベンションセンター)

蒲原英伸, 山下淳二, 新森大佑, 田代貴大, 小寺厚志, 鷺島克之, 木下順弘

10) 多発性骨髄腫へのプロテアソーム阻害剤

(Bortezomib) による下痢を契機に敗血症および肺炎をきたした一例

第 42 回日本集中治療医学会学術集会 (2015 年 2 月 9-11 日 東京都)

蒲原英伸 他

11) 炎症局所における血管透過性関連因子が SIRS 病態に与える影響について

第 42 回日本集中治療医学会学術集会 (2015 年 2 月 9-11 日 東京都)

蒲原英伸 他

12) 早期の集中治療介入が奏功したインフルエンザ脳症の 1 例

第 42 回日本集中治療医学会学術集会 (2015 年 2 月 9-11 日 東京都)

鷲島克之 他

13) 食道癌に対する胸骨後胃管再建術後に心タンポナーデを来した 3 症例

第 42 回日本集中治療医学会学術集会 (2015 年 2 月 9-11 日 東京都)

田代貴大 他

〔図書〕(計 1 件)

1) 分かりやすい外科学

蒲原英伸他, 文光堂, 2017, 53-54.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

蒲原英伸(Kamohara Hidenobu)

熊本大学・生命科学研究部・准教授

研究者番号: 90398222

(2)研究分担者

鷲島克之(Sagishima Katsuyuki)

熊本大学・医学部付属病院・助教

研究者番号: 40336235

田代貴大(Tashiro Takahiro)

熊本大学・医学部付属病院・非常勤診療医師

研究者番号: 00613340

新森大祐(Niimori Daisuke)

熊本大学・医学部付属病院・非常勤診療医師

研究者番号: 70635789

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし