慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	NGALの抗炎症効果 : 敗血症治療薬になりうるか
Sub Title	Effect of NGAL on the inflammatory response
Author	井上, 敬(Inoue, Kei)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	「全身性に投与されたNGALがグラム陰性桿菌に対する静菌作用を介さず致死的な過度の炎症反応を抑止し宿主予後を改善する」との仮説を立て、侵襲モデルへの外因性NGAL全身投与による転機と機序を探求することを目的として研究を行った。仮説に対して外因性NGAL投与が内毒素投与または腹膜炎惹起全身性炎症モデル動物の生存率を改善させるという結果は得られなかった。 We tested the hypothesis that NGAL, known as a potent immunomodulator, would improve the outcomes of rats with excessive inflammatory responses. We were unable to show the beneficial influence of NGAL on the outcome.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2017 ~ 2018 課題番号 : 17K17067 研究分野 : 麻酔学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K17067seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

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　元 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１７０６７

研究課題名（和文）NGALの抗炎症効果　-敗血症治療薬になりうるか

研究課題名（英文）Effect of NGAL on the inflammatory response

研究代表者
井上　敬（Inoue, Kei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：９０４６４９３２

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）：「全身性に投与されたNGALがグラム陰性桿菌に対する静菌作用を介さず致死的な過度の炎症反応を抑止し宿主予後を改善する」との仮説を立て、侵襲モデルへの外因性NGAL全身投与による転機と機序を探求することを目的として研究を行った。仮説に対して外因性NGAL投与が内毒素投与または腹膜炎惹起全身性炎症モデル動物の生存率を改善させるという結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により腸管免疫機構以外への全身性のNGALの影響を明らかにし、創薬としての臨床応用への可能性を探求することで、感染症に対して必須なmultimodal approachの重要な柱の一つとなることで敗血症患者の治療戦略に一石を投じることを試みたが期待した結果は得られなかった。今後宿主条件やNGALの投与時期等の条件を検討して更なる探求することで上記を意義を見出していきたい。

研究成果の概要（英文）：We tested the hypothesis that NGAL, known as a potent immunomodulator, would improve the outcomes of rats with excessive inflammatory responses. We were unable to show the beneficial influence of NGAL on the outcome.

研究分野：麻酔学

キーワード：NGAL　敗血症

１．研究開始当初の背景

集中治療医学の目覚しい進歩にも関わらず、敗血症の死亡率は依然として高い（JAMA 2016;315:801)。また緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa) を代表とするグラム陰性菌は抗菌薬治療の遷延化に伴い耐性を獲得し、治療に難渋することも多い。炎症機転により分泌された糖蛋白 NGAL は､細菌の増殖過程において必要である鉄の取り込みに必要な siderophore と結合することにより静菌効果を発揮する（Nat Rev Microbiol 2004;2:946)。NGAL ノックアウトマウスでは大腸菌（Escherichia coli, E coli）感染に対する抵抗性を喪失し、その死亡率が有意に増加する（Nature 2004;432:917)。

当研究室では、敗血症を含む重症患者ならびに擬似モデルで起きる腸内細菌叢の異常増殖に対する NGAL の役割について解析を進め、内毒素（lipopolysaccharide, LPS）投与あるいは腹膜炎惹起全身炎症動物モデルにおいて腸管分泌細胞の NGAL 分泌が炎症反応と相関して亢進し、E. coli の増殖を有意に抑えることを生体内外実験系において見出した（J Gastroenterol Hepatol 2016;31:145)。また、炎症反応を有するラットに一般的な麻酔法である硬膜外麻酔を施し E.coli を創部感染させた研究においては､硬膜外麻酔により血中および皮膚組織内の NGAL 濃度が増強し、創部の E. coli 菌体数を有意に減少させることを明らかにした（Anesth Analg 2015;121:81)。一連の研究成果は、NGAL が宿主の感染防御に重要な役割を果たしていることを示している。

細菌増殖を抑える効果を介する機序以外にも NGAL は細胞の発生分化に関与することが示唆され、造血細胞のアポトーシスを誘導する（Cell 2005;123:1293)。また、NGAL 刺激によるサイトカイン（Interleukin-8, IL-8）誘導（Infect Immunol 2007;75:3160）や好中球の賦活化(PLoS Pathog 2009;5:e1000622) が示されていることから炎症反応を修飾する可能性が高く、その生体内投与には宿主への有害事象を誘発する可能性も潜在している。一方、腹膜炎惹起モデルにおいて NGAL 全身投与が細胞死を抑制することで腎傷害を軽減したとの報告(Nephrology 2015;20:646) や生存率の改善を示唆する報告（PLoS One 2015;10:e0124429)があるが、詳細な機序解明には至っていない。当研究室の研究成果により、腹膜炎モデルへの NGAL 腸管内投与が宿主の生存率を改善しなかったことから、NGAL 全身投与による予後改善は細菌増殖を抑制する効果以外の機序を介する可能性が示唆されている。

NGAL は臨床的には急性腎傷害のバイオマーカーとして有用性が高く、敗血症患者において血中 NGAL 濃度が死亡率や多臓器不全と相関する可能性を示唆する報告（Shock 2015;44:234） や腎機能とは独立して炎症反応の程度により血中 NGAL が相関するとの報告（PLoS One 2015;10:e0124429）が相次いでいる。当研究室においても周術期の血中 NGAL に着目し、腹部大動脈瘤の手術後凝固因子の不均衡と血中 NGAL 急性腎傷害の予測因子となりうることを示している（J Intensive Care 2014;2:46）が、全身性炎症反応症候群を呈する周術期における血中 NGAL の意義は未だに不明な点も多い。

２．研究の目的

これまでの当研究室が発信してきた NGAL の基礎的な研究成果と、NGAL の臓器保護に関する研究成果を基に、グラム陰性桿菌に対する静菌作用の他に“全身性に投与された NGAL がグラム陰性桿菌に対する静菌作用を介さず、致死的な過度の炎症反応を抑制し宿主予後を改善する”との仮説を立てた。具体的には、敗血症における NGAL が過剰な炎症反応抑制を介する臓器保護効果ならびに敗血症において高頻度で認められる生体免疫を担うリンパ球アポトーシスとの関係を明らかにし、敗血症における NGAL の創薬としての可能性を探求する。

３．研究の方法

「実験１．刺激下マクロファージ細胞株における NGAL によるサイトカイン分泌能および細胞障害への影響の探求」

まず生体外実験系にてマクロファージ細胞株（RAW246.7、NR8383、J774.1 等）に LPS もしくは CpG にて刺激を加え、NGAL を濃度別（0，1，10，100 μM，1 mM）に添加し一定時間（LPS では 30 分、CpG では 3 時間）培養後のサイトカイン分泌能をマクロファージ細胞の mRNA 及び培養液中のサイトカイン濃度を測定することで探求する。

測定項目としては、炎症性サイトカインである IL-6、TNF-α、ケモカイン IL-8 とともに抗炎症性サイトカインである IL-10 を予定している。また、培養液中の LDH 測定により細胞毒性も同時に評価する。mRNA レベルの検討はリアルタイム PCR 法を用いて量的変化を基に、蛋白レベルでの検討は ELISA 法を用いて測定する。

「実験２．NGAL 投与に関連する有害事象の有無の探求」

本研究では生体内実験系により NGAL 投与の有害事象発生の有無を検討する。実験モデルとしては、健常マウスの腹腔内に NGAL を投与し 24 時間の時点で、血液を採取後、赤血球、白血球等の血球分画を測定、また血液遠心後の上清中の炎症性サイトカイン TNF-α、IL-1β、IL-6 及びケモカイン IL-8 及び抗炎症性サイトカイン IL-10 をサンドウィッチ抗体 ELISA 法にて解析し、NGAL 投与による炎症反応への干渉を検討する。

アポトーシスを評価するために血液検体の比重遠心によりリンパ球を、腹腔内洗浄法によりマ

クロファージを得て、AnnexinV 及び Popidium Iodine 等のアポトーシス検出試薬を用いてフローサイトメトリーで各細胞のアポトーシスを解析する。マクロファージは、マウス腹腔内に 10-20 mL の冷却したリン酸緩衝液を注入した後、回収する。この作業を繰り返した後、遠心沈殿により、腹腔内マクロファージを得る。

「実験 3．In vivo 腹膜炎惹起敗血症モデルにおける NGAL 静菌作用の探求」
　生体内での NGAL 静菌作用を探求するため、腹膜炎惹起敗血症モデルを作成した後、個体に対する NGAL の静菌作用及び生存期間の解析を行う。

（１）マウス腹膜炎惹起敗血症モデルの作成
マウス敗血症モデルは既に当研究室で確立されている。簡潔に述べると、セボフルラン麻酔下にて腹部を正中切開後、盲腸を取り出し回腸から 1 ㎝の部位で結紮する。18G 針にて 2 回穿孔し、盲腸を腹腔内に戻し閉腹する。皮下に注入用ポンプを植え込んで、生理食塩水 8 μL/hr の輸液負荷を開始する。これにてショックを伴わない高心拍出量敗血症モデルを作成できる。重症度は穿孔部位と穿孔の大きさにより変化することが知られていることから、予備実験を行い個体の生存時間が 24 時間の時点で 50%程度になるよう調整する。その後、マウスを NGAL 非投与群及び NGAL 投与群の 2 群に分け、前者には生理食塩水、後者にはリコンビナント NGAL を投与する。投与濃度としては前年度に行った結果を基に、生体外実験系においてマクロファージのサイトカイン産生抑制効果を認めた濃度で行う。腹膜炎惹起後 24 時間の時点で過剰麻酔によりマウスを安楽死させる。なお、本研究を遂行する上での工夫として、穿孔性腹膜炎において抗菌薬治療は一般的であることから、当モデルにおいても適切な抗菌薬投与下にてより臨床に近い形で実験を行う。

（２）生存時間解析
上記の腹膜炎モデルを用いて腹膜炎惹起から1時間後にNGALもしくは生理食塩水の腹腔内投与を行う。腹膜炎惹起から 24 時間までを観察期間とし、両群での生存率の差を検討する。当初通りに進まない場合には、より個体差が少なく炎症反応を惹起するために内毒素全身投与による炎症モデルを用いて、同様の生存時間解析を行う。

（３）細菌増殖率の定性的および定量的評価
上記の生存時間解析と同様のプロトコールにおいて腹膜炎惹起から 8 時間後における腹水および血液を採取し、寒天上で 24 時間培養しできたコロニーの数を比較することで定性的な評価を行う。効果を認めるようであれば、細菌特異的プライマーを用いた real-time PCR 法で増殖率を経時的に定量的に解析する。

（４）白血球数・乳酸値・サイトカイン解析
同様のプロトコールで腹膜炎惹起から 24 時間後まで生存していた個体につき血液および腹水を採取し、白血球数、乳酸値を測定するとともに、炎症性サイトカインである IL-6、IL-1□、TNF-α とともに抗炎症サイトカインである IL-10 についても評価する。サイトカイン測定は当医学部共同利用研究室に設置されている luminex を用いたビーズ抗体多項目測定法によって行う。

（５）臓器障害（肝臓、腎臓）および凝固系に対する効果
この実験は、上記と同じモデルを用いて同様のプロトコールにて行う。対照群と NGAL 投与群に無作為に分け、24 時間後に肝臓ならびに腎臓を摘出して、同時に採血も行う。血液検体では、血小板数、FDP、肝逸脱酵素、ならびにクレアチニンの値を測定する。さらに、肝臓ならびに腎臓検体においては、電子顕微鏡を用いて微細構造の変化を検討するとともに、実質細胞のアポトーシスに関してもアポトーシス検出試薬を用いたフローサイトメトリー法および TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) にて行う。

４．研究成果
　急性腎傷害のバイオマーカーである細胞増殖抑制因子としても最近注目されている糖蛋白 neutrophil gelatinase-associated lipocalin（ＮＧＡＬ）は種々の炎症機転により増強し自然免疫機構に重要な役割を果たしている。これまでのＮＧＡＬの意義と効果について検討において、腸管内ＮＧＡＬ投与による腸内細菌叢に対する静菌効果について探索するものの、生存率は改善しなかったことから今回「全身性に投与されたＮＧＡＬがグラム陰性桿菌に対する静菌作用を介さず、致死的な過度の炎症反応を抑止し宿主予後を改善する」との仮説を立て、侵襲モデルへの外因性ＮＧＡＬ全身投与による転帰と機序を探求することを目的として研究を行った。
　仮説に対して外因性ＮＧＡＬ投与が内毒素（lipopolysaccharide：ＬＰＳ）投与または腹膜炎惹起全身性炎症モデル動物の生存率を改善させるという結果は得られなかった。当初の計画では生体内実験系と並行して刺激下マクロファージ株に対してＮＧＡＬの投与によるサイトカイン分泌能及び細胞傷害への影響を探求する計画であったが至適濃度を見出せず十分な探索を

するに至らなかった。総括として、今回の研究からはＮＧＡＬの敗血症の治療薬としての可能性は言及できなかったが、今後宿主条件やＮＧＡＬの投与時期等の条件を検討して更なる探求が必要と考える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計０件）

〔学会発表〕（計０件）

〔図書〕（計０件）

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

※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、研究者個人に帰属されます。