

敗血症性凝固異常における好中球細胞死の関与と DAMPs測定によるそのモニタリング

順天堂大学医学部 救急・災害医学 射場敏明

キーワード：敗血症，細胞死，DAMPs，ヒストン，NETs

連絡先：〒113-0033 東京都文京区本郷2-1-1

はじめに

2013年のThe New England Journal of Medicineに掲載された，Angusとvan der Pollによる“Severe Sepsis and Septic Shock”と題された総説には，敗血症の重症化に関するメカニズムがまとめられている¹⁾．この総説によると，病原体が体内に侵入すると，まず自然免疫を担当する細胞が活性化されて炎症反応が活性化されると同時に，炎症を沈静化する反応も発現することが示されている．炎症を活性化する生体反応には，1) 白血球活性化，2) 補体系活性化，3) 凝固活性化，4) necrotic cell deathの亢進などがあり，炎症を沈静化する反応としては，1) 自立神経系の反応，2) apoptotic cell death，3) 抗炎症性サイトカインの産生をはじめとするタンパク質合成や受容体発現などが含まれている．本稿ではこれらの各メカニズムに関して解説を行なう．

1. プロテオミクスによるタンパク質発現の解析

敗血症症例における血清中のタンパク質発現をプロテオミクスによって解析すると，挙動が2倍以上のものだけに限っても，ゆうに50種類以上のタンパク質量が増加していることがわかる．そして質量分析によってそれぞれのタンパク質の同定を行なうと，変化率が特に大きいタンパク質は以下の4つのカテゴリーに分類することができる．1) 急性相タンパク質：CRPやtransthyretinなどのタンパク質合成が誘導される．そして後述するように，それぞれのタンパク質は何らかの役割の担って増加している．2) 凝固系タンパク質：prothrombinやvon Willebrand factorなどの産

生誘導や血中レベルの増加がみられる．そして凝固の亢進は自然免疫系において重要な役割を担っている．3) 補体系タンパク質群．いうまでもなく，病原体処理において必須の因子である．そして第4のタンパク質群として，これまで炎症時の挙動があまり注目されてこなかった．4) 鉄関連タンパク質：ヘモグロビンベータ，ハプトグロビンの産生誘導がある．ハプトグロビンとヘモペキシンについては，敗血症における死亡率と密接に関連していることが報告され，最近注目されている²⁾．また赤血球から逸脱して出てきているヘモグロビンは心筋障害をはじめとする組織障害にも関与しており，ハプトグロビンはその傷害性を緩和すると考えられている³⁾．そしてこれらのタンパク質の一連の挙動は，それぞれ独立したのではなく，生体防御を目的として互いにリンクしたものであることが認知されるようになってきた．

2. 白血球の活性化とNETs

前述のAngusらの総説によると，necrosisによる細胞死は炎症反応を増強することが示されている¹⁾．そしてnecrosisとともに，好中球の向炎症性細胞死として最近注目されているのがneutrophil extracellular traps (NETs)である．NETsは活性化された好中球から細胞外に射出される構造体であり，病原体処理に役立っているが，それとともに血小板や凝固系を活性化して血栓形成を強力に促進することが知られている．これらは，感染制御を目的とする合目的的反応であるが，その反作用として組織の低循環を招いて臓器不全を進行させることも事実である．NETsの

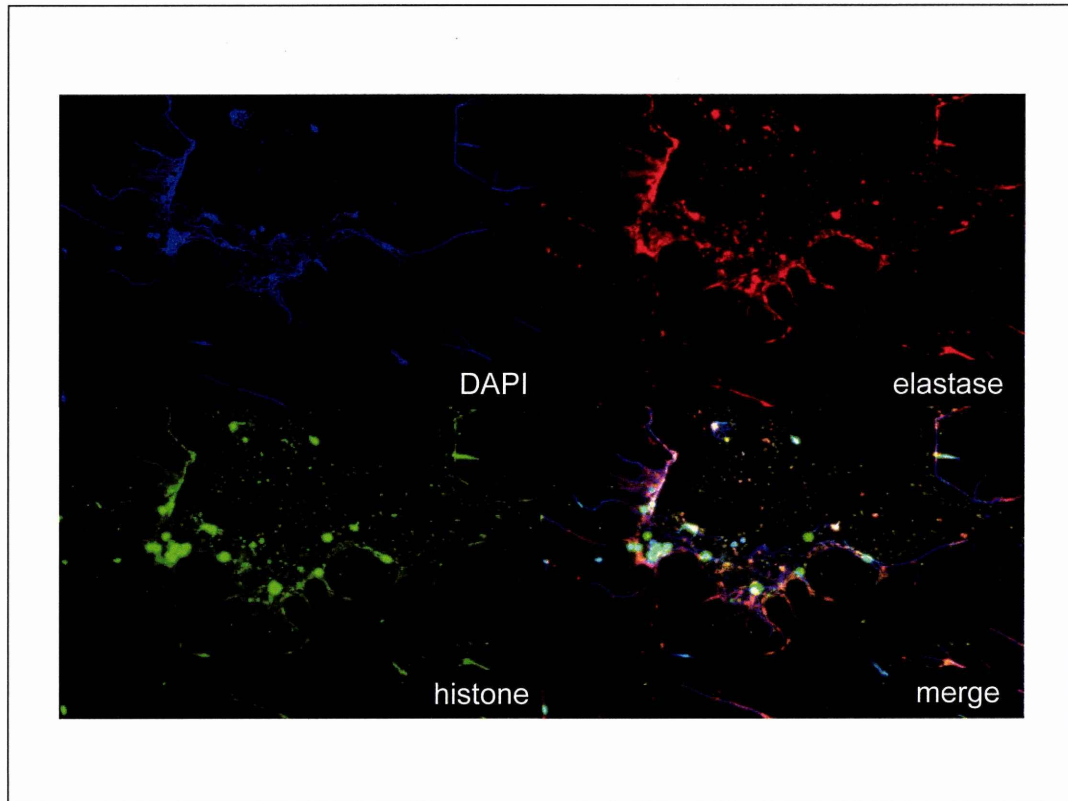


Fig. 1 Immunofluorescent staining of the neutrophil extracellular traps (NETs)

文献 6 より転載

存在をはじめて報告したのは、Brinkmannらであるが⁴⁾、彼らの報告では、好中球に刺激を加えると核内のクロマチンと細胞質内に存在する顆粒タンパク質が一緒になって細胞外に射出され、この構造物 (NETs) がグラム陽性菌やグラム陰性菌を絡め取って殺処理することが示されている。そしてこの現象を電子顕微鏡下に観察すると、無刺激状態では球形を呈する好中球が、刺激によって扁平化し、一部の好中球からクモの巣状に NETs を放出することが確認できる。さらに詳細に観察を行なうと、NETs を構成する構造物のうち網目状のものは DNA であり、これに顆粒状にみえるヒストンやエラスターゼなどのタンパク質が結合して NETs が構成されていることを確認することができる。Fig. 1 には DNA、ヒストン、エラスターゼをそれぞれ蛍光免疫染色して描出した NETs を示す。

3. 病原体処理に機能する血栓—Immunothrombosis

Immunothrombosis という概念が最近注目されている。敗血症の際に生じる微小血栓は、循環障

害の原因となるため生体にとって不利に作用すると考えられているが、そもそもは体内に侵入してくる病原体を処理するための生体防御反応である。バクテリアや真菌、ウイルスなどの病原体が体内に侵入すると、免疫担当細胞に発現しているレセプターに結合しこれらの細胞を活性化する。たとえば単球が刺激されると、組織因子を表面に発現して外因系凝固がスタートして最終的にフィブリンが析出し、血栓が形成される。この際、単球が産生する炎症性サイトカインは凝固を活性化するとともに血小板や好中球などの血球も活性化し、これらが一塊となって血管内に微小血栓が形成される。実験動物で作成した敗血症モデルにおいて生体顕微鏡下に観察を行なうと、血管内に形成される血球塊が観察され、これは白血球をコアとして多数の凝集血小板によって形成されるハイブリッド血栓であることがわかる。このようにして生じる血栓はバクテリアをはじめとする病原体をその中に取り込み、貪食処理や NETs 放出によって殺処理していることが知られている。Engelmann らは、このように病原体処理を目的

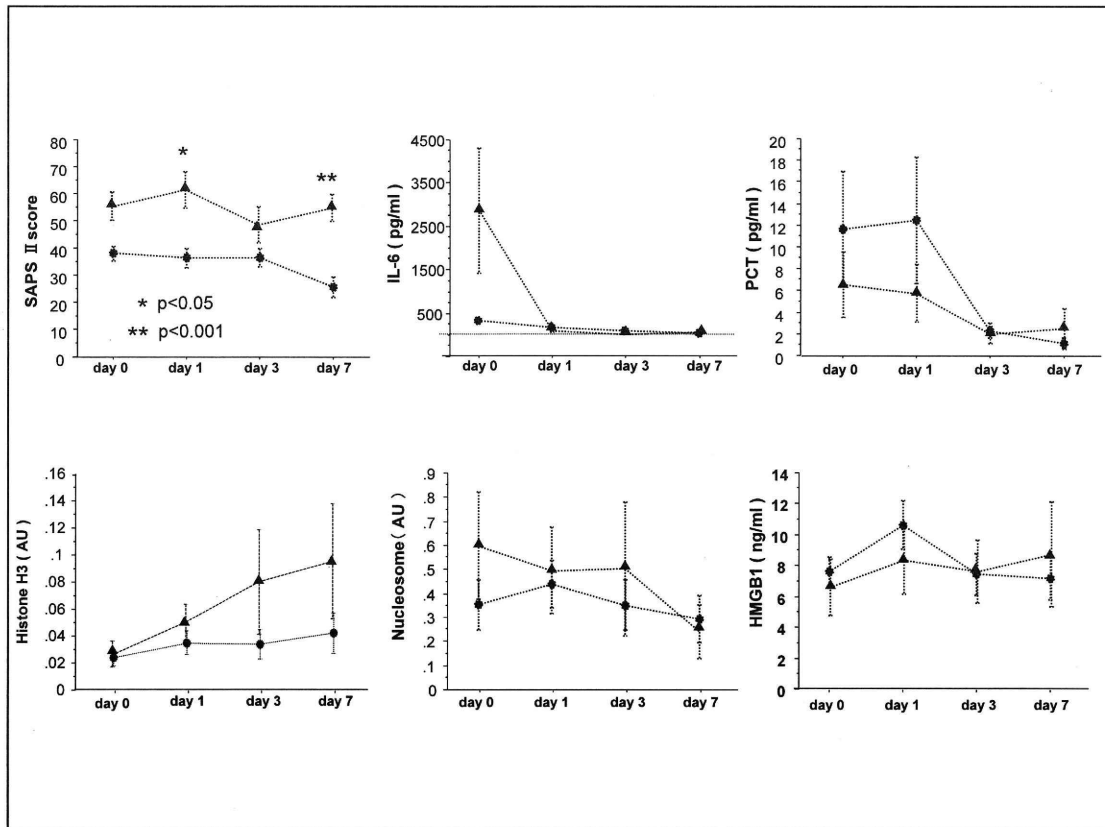


Fig. 2 The time courses of each biomarkers and SAPS II in survived group and non-survived group
文献7より転載

として形成される血栓をimmunothrombosisと命名して紹介している⁵⁾。

4. 細胞死による炎症反応の調節

Angusらは¹⁾, necrotic cell deathは炎症を増強する反応であり, apoptotic cell deathは炎症を沈静化する細胞死であることを紹介している。好中球を高濃度のlipopolysaccharide (LPS)で刺激すると短時間の間にネクロシスによる細胞死をきたす。Time-lapseによる観察を行なうと、風船が膨らむように細胞が膨大する現象がみられるが、これは細胞膜の破断にともなう容積の増大を反映している。この際、核も球状に膨大し、処理されない状態で細胞内に遺残することがわかる。これに対し、比較的少量のLPSで好中球を刺激すると、はじめに核の処理が行なわれて消失し、続いて細胞質が小胞状に分裂するアポトーシスで死亡する様子が観察される。この細胞死は24時間程度かかる能動的かつプログラムされた細胞死であり、受動的にアクシデントとして生

じるネクロシスとは対照的である。ネクロシスは炎症を増幅する核が細胞死完了の時点で処理されていない点が最大の特徴であり、よって核内や細胞質から炎症を増強するdamage-associated molecular patterns (DAMPs)が逸脱して炎症反応を増幅させることになる⁶⁾。DAMPsはToll-like receptorをはじめとする特異的受容体, pattern recognizing receptors (PRRs)を介して認識され、炎症反応の活性化をきたす。実際の感染症ではネクロシスとアポトーシスはどちらかだけがみられるわけではなく、両者は混在して存在し、刺激が強いほどネクロシスの割合が増えることになる。またこれらの細胞死スタイルはそれぞれ独立したものではなく、アポトーシスは途中からネクロシスに移行する様子もしばしば観察される。従来ネクロシスは障害が高度である際にみられる、回避不能な受動的死と考えられてきたが、最近ではプログラムされた能動的なネクロシスも存在することが明らかとなり、生体は細胞死の種類を選択することによって意図的に

炎症を制御しているのではないかと考えられる。

5. バイオマーカーとしてのDAMPsの評価

DAMPsは敗血症のバイオマーカーとして注目されている。敗血症症例において発症から経時的にDAMPsを測定すると、病態の変化にリンクして変動することが明らかとなった⁷⁾。Fig. 2は平均SAPSスコアが40以上の敗血症症例30名におけるDAMPsの変動を示したものであるが、従来からバイオマーカーとして測定されているIL-6やプロカルシトニンなどの生体反応を反映するマーカー類は重症病態が持続しているにもかかわらず、1-3日以内にみられるピークを過ぎるとその後は低下するという挙動を示す。これに対して、ヒストンやヌクレオソーム、HMGB1などの障害細胞から逸脱するDAMPs類は上昇が持続的し、一週間程度は高値のままで推移する。さらに生存例と死亡例の間で比較してみても、SAPS高値が持続する死亡例ではDAMPsも高値が持続し、このような推移から重症例の鑑別により有用であることが期待される。

6. ヒストンの組織障害性とそのスカベンジャー

DAMPsの中でも特に組織障害性が強いのはヒストンである。ヒストンは本来核内でDNAを効率よく収納するために機能している核タンパク質であり、H1, H2A, H2B, H3, H4の5種類が重型として存在する。そして、このうちH3, H4には特に強力な傷害性がみられることが知られている。たとえばマウスにヒストンを投与すると、用量依存性に死亡率が増加する。そして剖検では、肺を中心に出血や血栓形成、そして浮腫性変化などの敗血症でみられる組織障害と同様の所見が観察される⁶⁾。

このようにヒストンは細胞外に逸脱すると、強力な組織障害作用を発揮するため、生体はこれに拮抗するための手段を備えている。代表的なものはアルブミンやフィブリノゲンなどの血漿中にみられるタンパク質であり、最近注目されているものに血管障害マーカーとして知られるpentraxin 3(PTX3)がある。Pentraxinファミリーに属す

るCRPは、炎症の際の急性相タンパクとしても知られており、CRPの機能としてヒストン障害緩和作用がみられることは興味深い。上記以外の生理的ヒストンスカベンジャーとしては、活性化プロテインCが知られている。Xuらは⁸⁾、生理的な抗凝固物質である活性化プロテインCによるヒストン障害緩和効果を有することを報告しているが、敗血症において活性化プロテインC量は著しく減少することが知られており、その効果は限られたものであると予想される。

生理的物質以外では、ヘパリンにヒストンの障害緩和作用がみられる。もともとヒストンはDNAと結合するために強い陽性荷電を帯びているが、ヘパリンはその構造として存在する硫酸基が陰性荷電しているため、ヒストンと結合しやすく、ヒストンを凝集することによって傷害性を緩和すると考えられている。実際に培養血管内皮細胞を用いて検討を行なうと、ヘパリンや低分子ヘパリンによるヒストン障害緩和効果が確認された。将来的にはヒストンの傷害性を調整する物質の治療への応用が期待できるだろう。

おわりに

敗血症においては病原体由来の炎症活性化物質であるpathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、あるいはこれと受容体を共有する生体由来の炎症活性化物質であるDAMPsによって自然免疫系が活性化される。これと呼応して凝固をはじめとする生体反応が活性化され、生体防御において有利に作用すると考えられているが、これらの反応は制御を失えば致命的な臓器不全の誘因ともなり得る。このような両刃の剣である炎症反応を抗凝固物質や治療薬を用いて適正に制御することにより、敗血症の転帰を改善させることが可能になるかもしれない。

引用文献

1. Angus, von der Poll. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369 : 840-51, 2013.
2. Janz DR, Bastarache JA, Sills G, et al. Association between haptoglobin, hemopexin and

- mortality in adults with sepsis. Crit Care 17 : R272, 2013.
3. Baek JH, Zhang X, Williams MC, et al. Extracellular Hb enhances cardiac toxicity in endotoxemic guinea pigs: protective role of haptoglobin. Toxins 6 : 1244-59, 2014.
 4. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303 : 1532-5, 2004.
 5. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol 13 : 34-45, 2013.
 6. Iba T, Murai M, Nagaoka I, et al. Neutrophil extracellular traps, damage-associated molecular patterns, and cell death during sepsis. Acute Medicine & Surgery 1 : 2-9, 2013.
 7. Miki T, Iba T. Kinetics of Circulating Damage-Associated Molecular Patterns in Sepsis. J Immunol Res. 2015 ; 2015 : 424575.
 8. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. Nat Med. 15 : 1318-21, 2009.

凡 例

Fig. 1 Immunofluorescent staining of the neutrophil extracellular traps (NETs)

ヒトの好中球を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激すると、NETsの放出が観察される。NETsはDNAやエラスターゼ、ヒストンなどで構成されているため、それぞれの染色を行なうとNETsを描出することができる。

Fig. 2 The time courses of each biomarkers and SAPS II in survived group and non-survived group

敗血症の重症度を表すSAPS (simplified acute physiology score) II scoreと炎症マーカーの関連をみると、interleukin (IL)-6やprocalcitonin (PCT) は、SAPS IIの上昇が持続しているにもかかわらず低下がみられる。これに対し、histone や nucleosome, High Mobility Group

Box 1 (HMGB-1) といったdamage-associated molecular patternは比較的高値が持続し、従来型のバイオマーカーとは異なる変動を示すことがわかる。

(竹下) 射場先生、どうもありがとうございます。非常に貴重な動画をたくさん見せていただいたと思います。10分まで、もう少し時間がございまして、この機会です。ご質問をお受けいただけると聞いていますので、フロアの先生方、ご質問はございませんでしょうか。

(中尾) 近畿大学麻酔科の中尾と申します。非常に貴重なご講演をどうもありがとうございました。非常に勉強になりました。

二つ教えていただきたいのですが、私は脳虚血や高血糖の方からHMGB1 (high mobility group box 1) とRAGE (receptor for AGEs) を少し研究しようと思っているのです。先生が先ほどおっしゃったように、DAMPsが出てくるときはネクローシス細胞からしか出てこないのです。私は、ネクローシスというのは非常に特殊な状況で、アポトーシスが普通であって、また、その区別もつかないネクロプトーシスというような概念があるのではないかと考えていたので、その辺が一つです。

それからもう一つ、アラミン (alarmin) のところに入っているHMGB1もそうですが、初めは細胞障害に働くのですが、その後、神経再生に働いたり、二面性があるのです。また、アラミンにはHSP (heat shock protein) も入っていますが、DAMPsが必ず細胞障害に働くのか、それともまたその二面性があるのかということを教えていただきたいと思います。

(射場) ありがとうございます。このネクローシスという状態が非常に特殊なもので、細胞は一般的にはネクローシスで死ぬことはないのではないかとご質問ですが、どうなのでしょう。先生がご研究なさっておられる、いわゆる脳虚血、脳梗塞をはじめとして血流が途絶した際には、細

胞死の形態はネクローシスという形を取るようになりますが、いかがでしょう。

(中尾) そうですね。混ざっている、いろいろな形態があるのですが、完全にATPが途絶すると、例えばカスパーゼなどは動けないので、ネクローシスにすぐ行ったりします。ただ、デスシグナルが動きときはアポトーシス。いろいろな考え方があると思いますが、一般に何かそのような感じがあるのですけれども、いかがでしょう。

(射場) はい。侵襲が加わり、細胞死はやむを得ないという状態となっても、細胞はアポトーシスでできるだけ死のうとします。恐らく、生体にとってそれが負担が少ない細胞死であるから、何とか一つ一つの細胞は頑張っ自分でアポトーシスに行こうとするわけですが、途中でATPが切れて、電池切れのような状態になってしまうと、エネルギーを必要とするアポトーシスでは死ねずに途中からネクローシスに変わってしまうことになります。

ネクロプトーシスという状態ですが、これは最近どうもアポトーシスと同じようなProgrammed cell deathにおいても生体はアポトーシスではなくて、何かの意図を持ってネクローシスで細胞を殺すということがあるらしいです。その目的は、恐らくアラームサインの発信です。ここに病原体が侵入して、たくさん好中球をはじめとする免疫担当細胞が必要である、敵をやっつけてほしいというときのシグナルを出すためには、むしろアポトーシスではなくて、ネクロプトーシスという形

態を取って、応援を要請しているのだらうと思います。ですから、そのあたりで、programmed cell deathにおいては、生体は何らかの意図を持って、この両者を使い分けているというように私は考えています。

ネクローシスは、いわゆるパッシブな、プログラムされていない細胞死ですので、急に血流が途絶えたり、莫大な量のトキシンが侵入してきたりすると、そういう意図を働かせる間もなくネクローシスを起こしてしまうと考えています。

二つ目のご質問の、DAMPsは必ずしも生体障害的なものばかりではないのではないかというお話ですが、それはそのとおりで、多くのDAMPsは組織修復に働いています。HSPとおっしゃいましたが、そのHSPもその一つです。ですので、「アラミン」という用語を用いて、DAMPsのうちの特に生体保護的、あるいは組織修復に働くような物質に関しては、別のネーミングを付ける。DAMPsの中にアラミンと呼ばれるカテゴリーがあって、そちらの方はむしろ生体保護的に働いているというものらしいです。

(中尾) はい、どうもありがとうございました。

(射場) ありがとうございました。

(竹下) きっとたくさん聞きたいことがおありだらうと思いますが、時間が来ましたので、これで終了させていただきたいと思います。射場先生、どうもありがとうございました。

(射場) ありがとうございました。