

# Cytokine Adsorption to Polymyxin B-Immobilized Fiber: An in vitro Study

(ポリミキシン B 固定化繊維へのサ  
イトカインの吸着)

氏名 宇都宮 利彰

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用医工学系専攻

令和 2 年 12 月

## 目 次

1.	要約	• • • • 1
2.	緒言	• • • • 2
3.	方法	• • • • 3
4.	結果	• • • • 6
5.	考察	• • • • 8
6.	結語	• • • 1 0
7.	謝辞	• • • 1 0
8.	参考文献	• • • 1 0

## 1. 要約

【背景】特発性肺線維症（IPF）の急性増悪は予後不良で有効な治療法は確立していない。近年 Polymyxin B（PMX）固定化繊維カラム（トレミキシン、東レ）を用いた血液浄化療法（PMX-DHP）が有効との報告があるが本疾患における作用機序は不明である。

【目的】本研究では IPF の病態に係わるサイトカインがトレミキシン繊維で除去されるか調べた。

【方法】ヘパリン存在下でトレミキシン繊維にサイトカインを吸着させ、2M NaCl、また 50mg/ml polymyxinB 硫酸でサイトカインを溶出し、溶出したサイトカイン（IL-1b, IL-6, IL-8, FGF basic, PDGF-bb, RANTES, TNF $\alpha$  は BioPlex、VEGF、TGF- $\beta$  は ELISA で測定）を測定した。またヘパリンとポリミキシン B の結合能を見るために AFFINIX Q4 を用いて PolymyxinB とヘパリンの結合を観察した。

【結果】サイトカインにはトレミキシン繊維の PMX 部位へ著明に結合するものがあること（IL-8, RANTES, PDGF, TGF- $\beta$ ）、更にヘパリンによるプライミングにより PMX 部位にヘパリンが結合し、ヘパリン結合部位を有するサイトカインには吸着が増強されるもの（VEGF, FGF2, IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-12, TNF $\alpha$ ）があることが明らかになった。また AFFINIX Q4 で  $K_d=0.061\pm 0.032\text{mg/ml}$  が得られ、ヘパリンとポリミキシン B の結合が確認された。

【結語】IPF 急性増悪のびまん性肺胞障害に対する PMX-DHP の作用機序として、炎症性、線維性、血管新生サイトカイン、ケモカイン等の吸着・除去が示唆された。

## 2. 緒言

### 1.1. 間質性肺炎急性増悪

間質性肺炎の中でも特発性肺線維症 (**idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF**) は高度の線維化が進行して不可逆性の蜂巣肺形成をきたす予後不良の疾患で<sup>1</sup>, 必ずしも慢性的に病状が進行するだけでなく急性に病状が進行する急性増悪があり、急性増悪は急激な呼吸不全をもたらす発症 1 か月後の死亡率が 90%以上と死亡に至る可能性が極めて高い病態である<sup>2</sup>。間質性肺炎の急性増悪は病理学的には **ALI/ARDS** と同様に **diffuse alveolar damage(DAD)**を呈する<sup>3,4</sup>。ステロイド剤や免疫抑制薬のパルス療法などが施行されるものの有効な治療法として確立したものではなく、予後は極めて不良である。

### 1.2 PMX-DHP (direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fiber column)

ポリミキシン B 固定化線維カラムを用いた直接血液灌流法 (**direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fiber column ; PMX-DHP**) について説明する。PMX は元々、血液中のエンドトキシンを吸着し敗血症を治療することを目的として開発された吸着カラムである。**polymyxinB** は、グラム陰性桿菌に対して強い抗菌作用を有するが、その効果発現機序は細菌の細胞壁外膜成分であるリン脂質や **LPS (lipopolysaccharide)** に結合することにより、細菌細胞膜構造が乱され、溶菌することによるとされている。また、**LPS** との結合部位は **LPS** の活性中心、**Lipid A** であり、**LPS** の有する多彩な生物活性が中和されることが既に報告されている。しかしながら **polymyxinB** は腎毒性や神経毒性のために、血中への直接投与は認められていない。そこで、これを材料表面に共有結合法によって固定化し、吸着剤として応用しようというのが **polymyxinB** 吸着剤の考え方である。東レ株式会社により 1993 年、商品名「トレミキシン® (**PMX-20R**)」として製造承認を取得し「エンドトキシン選択除去用吸着式血液浄化器」として保険適用を受けており、特定保険医療材料としての認可を得ている。

### 1.3 PMX-DHP の臨床効果

**PMX-DHP** はエンドトキシンを発生するグラム陰性桿菌が引き起こす敗血症に対してショックを改善させ血圧を上昇させるなど臨床症状の改善が報告されており、動物実験では **PMX-DHP** によるエンドトキシン吸着により生存率が有意に改善することが示されている<sup>5</sup>。しかしエンドトキシンを持っていないグラム陽性菌や真菌感染による敗血症にも有効性が報告され、**PMX-DHP** 施行中に血行動態や酸素化能の改善が得られることから、エンドトキシン吸着以外の作用も有していると考えられている。呼吸器疾患においては重症肺炎や **ARDS** に対する有用性が報告されており<sup>6</sup>, 最近では間質性肺炎の急性増悪においても有効症例が報告されている<sup>7-9</sup>。現在までに報告されている **PMX** カラムの新たな作用としては、①アナンダマイドや 2-アラキドニルグリセロールなど内因性大麻の吸着<sup>10</sup>, ②活性化

単球の吸着<sup>11</sup>, ③血清 matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) や tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) の抑制<sup>12</sup>, ④血清 interleukin (IL) -8, 好中球エラスターゼ, high mobility group box 1 (HMGB-1) など炎症性メディエーターの除去<sup>13</sup>, ⑤好中球由来の活性酸素の抑制<sup>14</sup>, ⑥腎細胞におけるアポトーシス誘導因子の不活化<sup>15</sup>, ⑦活性化好中球の吸着<sup>16</sup>, などがある。

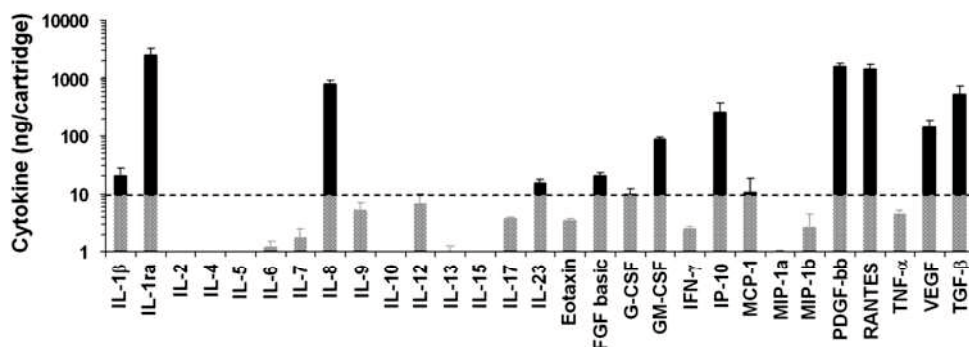


図1：当院で間質性肺炎急性増悪の患者に使用した PMX 繊維の溶出サイトカイン

図1は当院大石先生が間質性肺炎急性増悪の患者12例に使用したPMX繊維の溶離液を検体材料としてBio-Plexで測定した28種類のサイトカイン測定を行った結果<sup>17</sup>である。炎症性サイトカインであるIL-1β, IL-12, IL-17, 抗炎症性サイトカインであるIL-1ra, ケモカインであるIL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), RANTES, PDGF, FGF, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), VEGF, TGF-βなど、様々なサイトカインの吸着を確認したがPMXがどのようにサイトカインを吸着したか判明していない。PMX繊維が直接サイトカインを結合するという報告はない。一方、PMXカラムの前処理に用いるヘパリンはサイトカインを吸着することが知られている。そこで、サイトカインはpolymyxin B固定化繊維へどのように吸着するのか明らかにし、間質性肺炎における治療効果、作用機序を考察する目的に研究を行った。サイトカインは大石先生が測定したサイトカインのうち有意な溶出を認めた7種類のサイトカインと、炎症性サイトカインとして代表的なIL-1β、TNF-αを含めた9種類のサイトカインを選択した。

### 3. 方法

まず、PMX繊維がサイトカインを吸着するかを確かめるために実験を行った。PMX繊維を入れた試験管にサイトカインを入れ、上清を採取しサイトカインを測定した。

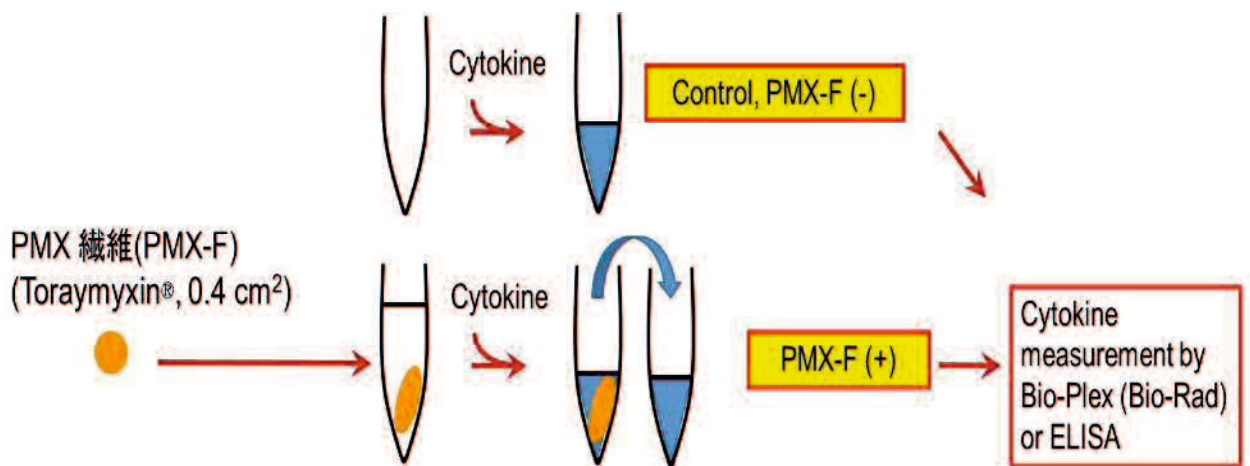
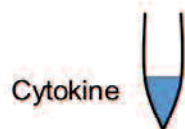


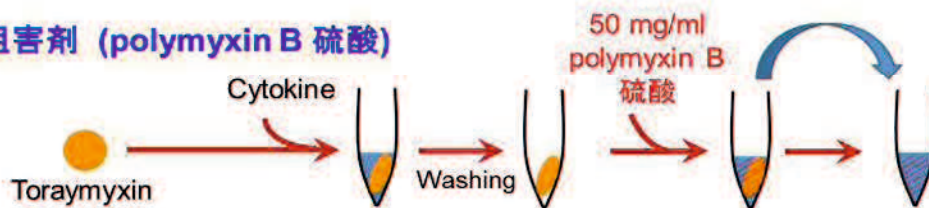
図2：PMXのサイトカインの吸着

また、PMX 繊維へ吸着したサイトカインを 50 mg/ml polymyxin B 硫酸、2 M NaCl で溶出し同様にサイトカインの測定を行った。

**I. 対照, PMX-F (-)**



**II. 阻害剤 (polymyxin B 硫酸)**



**III. 阻害剤 (NaCl)**

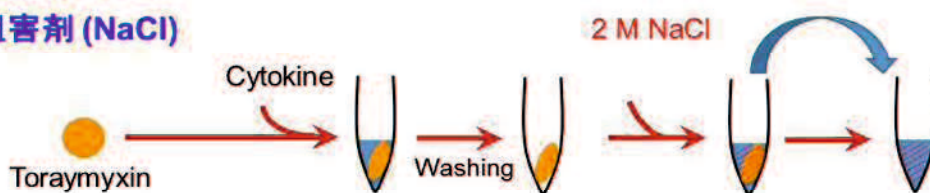
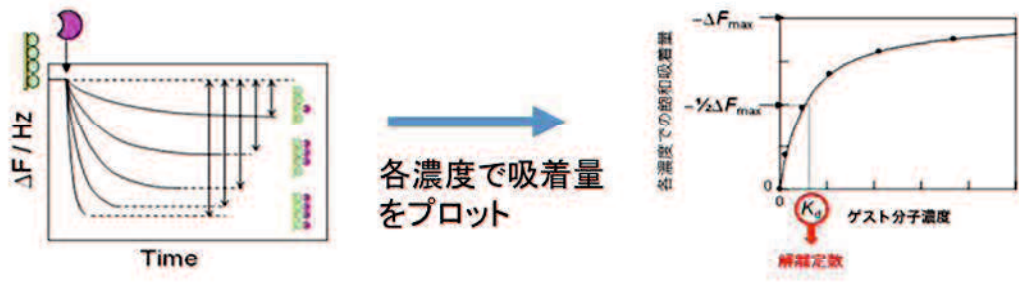


図3:サイトカインの polymyxin 硫酸、NaCl での溶出

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, FGF-basic, PDGF-bb, RANTES, TNF- $\alpha$  は BioPlex で測定、VGEF, TGF- $\beta$  は ELISA で測定した。

ヘパリンと PMX 間の相互作用の有無は振動水晶子マイクロバランス (QCM) で測定した。



センサーセルに polymyxin-B をアミンカップリング反応により結合させ、ヘパリンと結合するか QCM により測定。更にそのヘパリンにサイトカインが結合するか調べた。

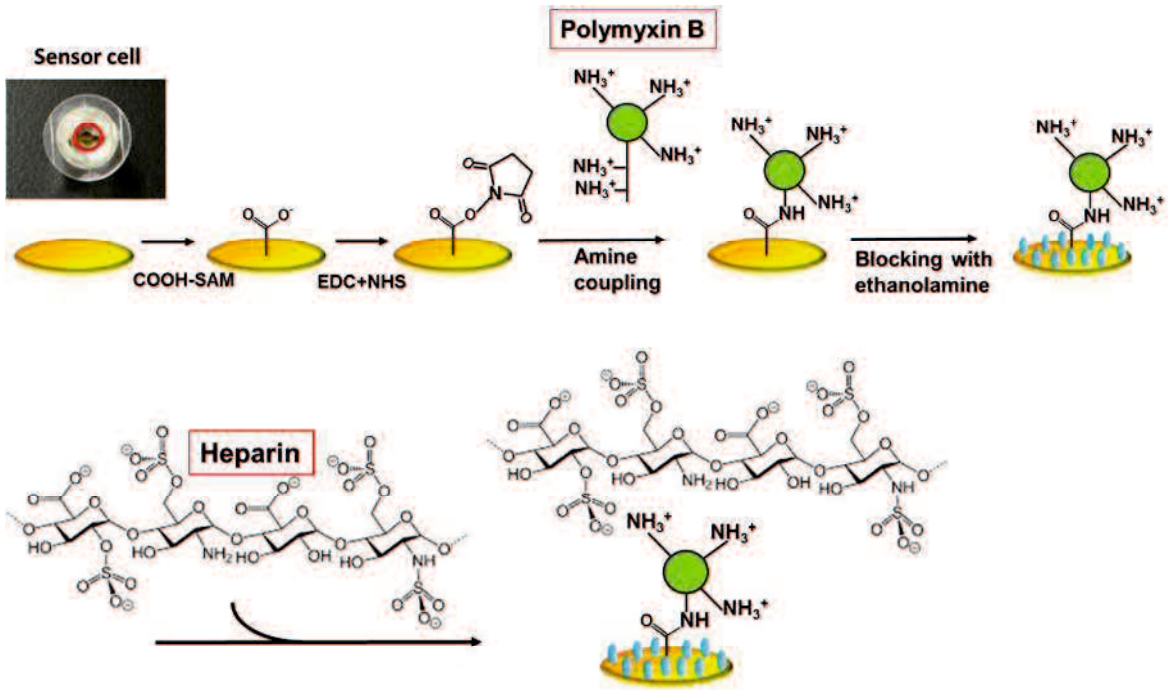


図5：QCMによるPMXとヘパリン結合の手順

また、サイトカインのヘパリン処理したPMX繊維への結合の検討を行った。PMX繊維を4 U/mL または 40 U/mL のヘパリンでプライミングし、1%ウシ血清アルブミンでブロッキング。サイトカインとPMX繊維を37°C、2時間でインキュベーション。上清を採取し2時間インキュベーション。上清を採取しサイトカインを測定した。

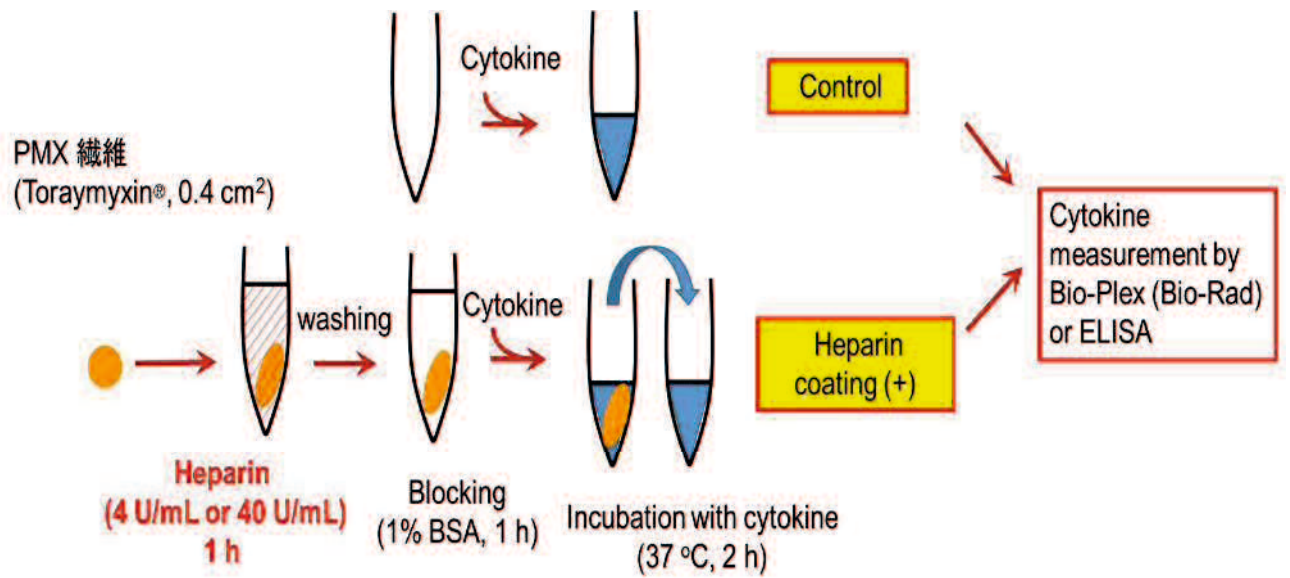


図6:へパリン処理したPMX繊維とサイトカインの結合

#### 4. 結果

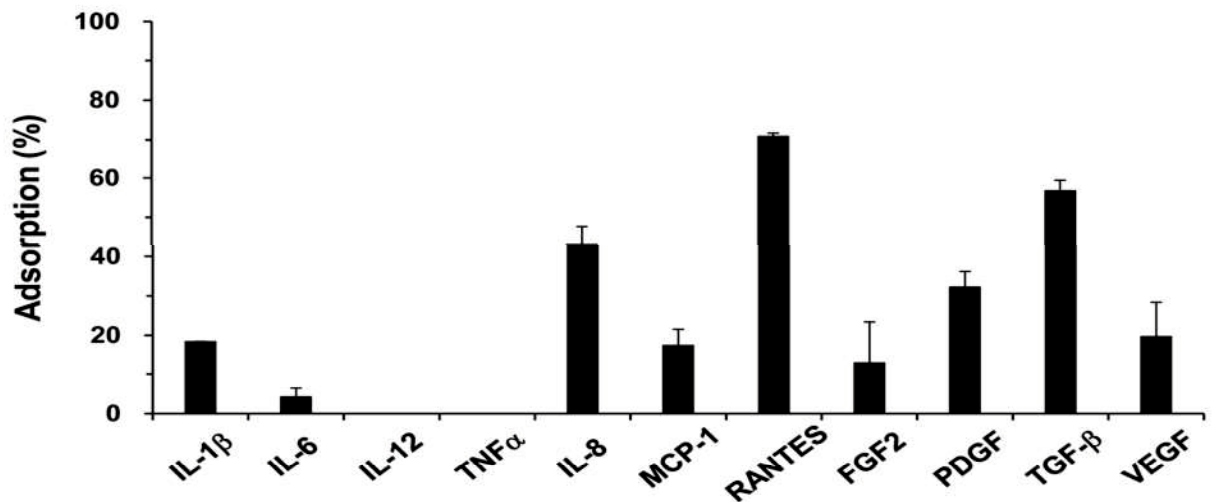


図7: PMX繊維に吸着したサイトカイン.

PMX 繊維は IL-8, RANTES, PDGF, TGF- $\beta$  で吸着が見られ、その他のサイトカインでは吸着が見られず選択的にサイトカインを吸着することが示された。



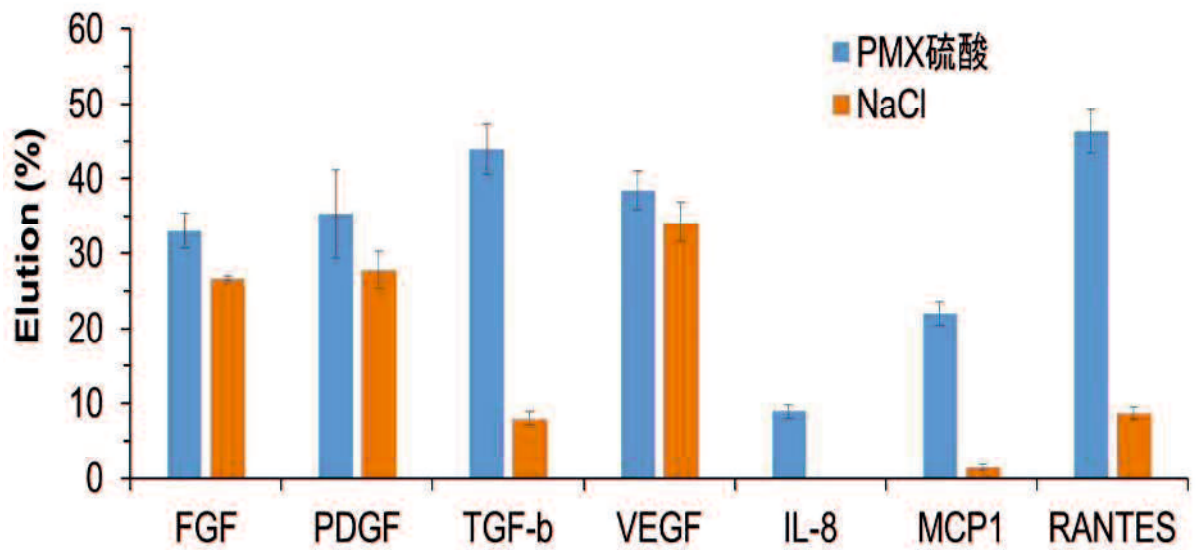


図8：PMX 硫酸、NaCl で溶出したサイトカイン

また、水晶発振子を用いた PMX とヘパリンの相互作用を測定した実験ではヘパリン濃度の増加に伴い、振動数の変化 ( $-\Delta F$ ) の増加が双曲線状に観察された。解離定数  $K_d = 0.061 \pm 0.032$  mg/ml が求められ、Polymyxin B とヘパリン間に相互作用があることが確認された。

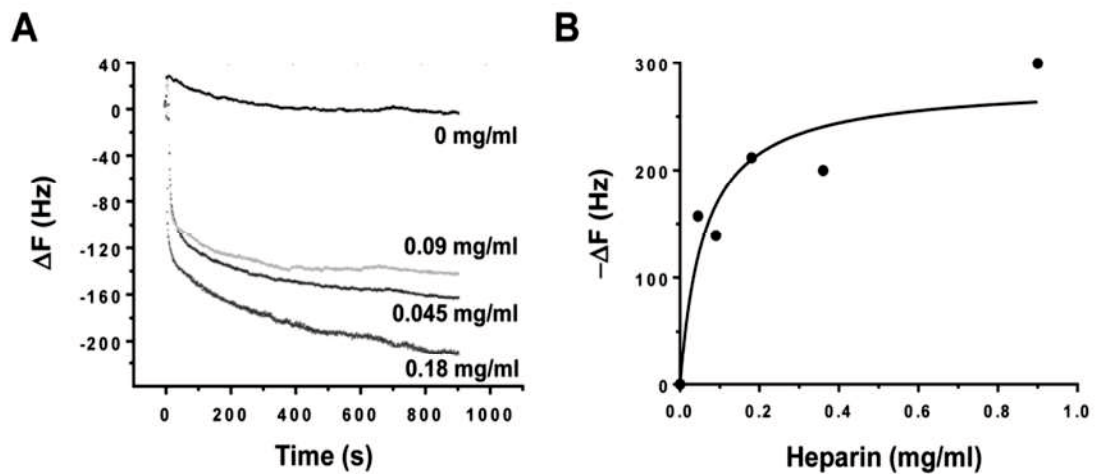


図9:AFFINIX Q4 で測定した polymyxinB とヘパリンとの相互作用

4U/ml のヘパリン下 VEGF,FGF2,IL-6 の吸着が増強された。また 40U/ml でのヘパリンの存在下では IL-1 $\beta$ ,MCP-1,IL-12,TNF- $\alpha$  など吸着がさらに増強された。

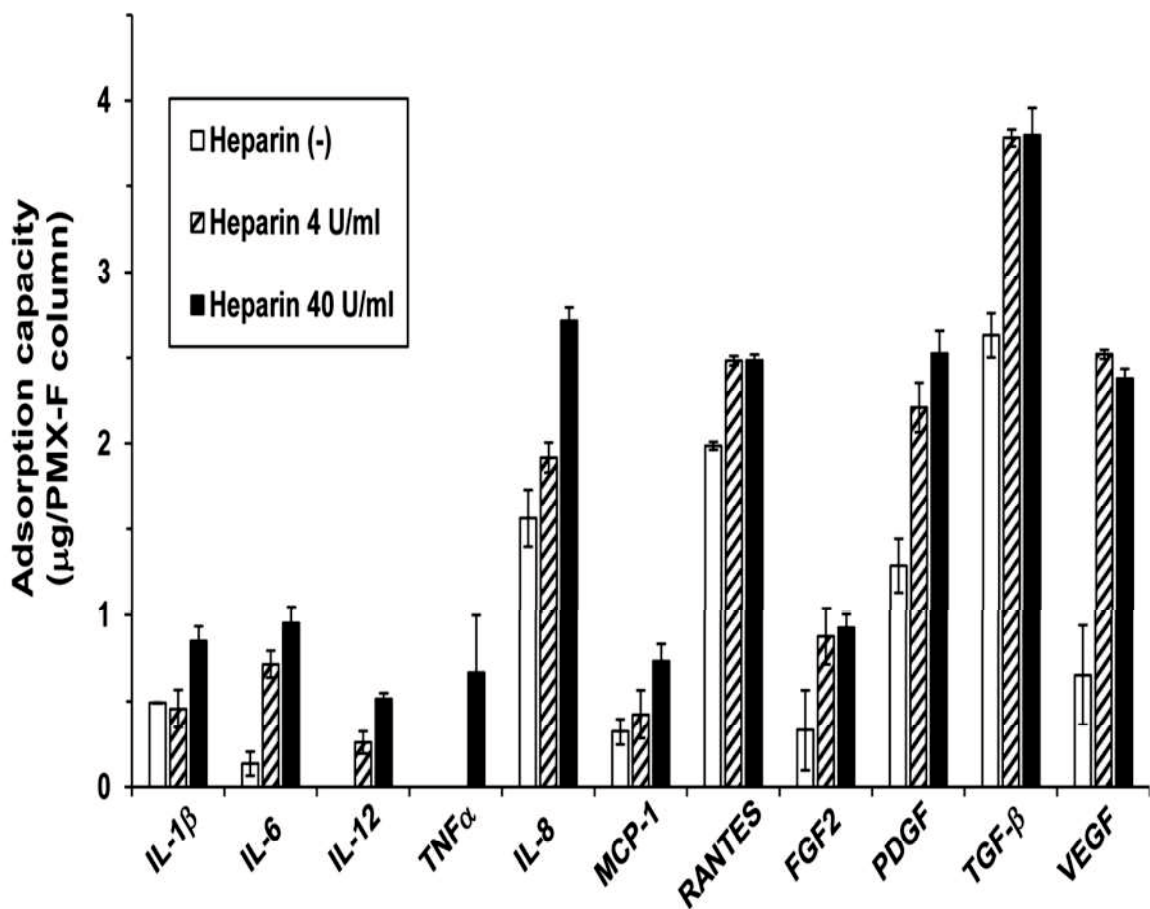


図 10 : ヘパリン処理した PMX 繊維で吸着したサイトカイン

サイトカインにはトレミキシン繊維の PMX 部位へ著明に結合するものがあること (IL-8, RANTES, PDGF, TGF-β) 更にヘパリンによるプライミングにより PMX 部位にヘパリンが結合し、ヘパリン結合部位を有するサイトカインには吸着が増強されるもの (VEGF, FGF2, IL-6, IL-1β, MCP-1, IL-12, TNFα) があることが明らかになった。

##### 5. 考察

今回の実験において、PMX は IL-1β、IL-6、TNF-α などの炎症性サイトカインの有意な吸着は認めなかったが、PDGF-bb、FGF basic、TGF-β などの線維性サイトカインに加え、血管新生サイトカインである VEGF を有意に吸着していることがわかった。間質性肺炎は I 型肺胞上皮細胞を中心とした肺胞を構成する細胞群の障害を契機とし、肺胞上皮の酸化的 DNA 損傷とアポトーシス、II 型肺胞上皮細胞の過形成、上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT)、線維芽細胞増生、筋線維芽細胞増生などを介した末梢肺組織のリモデリングを繰り返す結果、線維化が形成されていくと考えられている。この過程で、大気汚染や粉塵といった外因性のオキシダントのほか、さまざまな細胞から産生される内因性のオキシダントである活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の関与が重

要と考えられている<sup>18</sup>。ROS は肺線維症の炎症の惹起、引き続いて生じる上皮細胞や線維芽細胞の活性化にも関与している。その際、炎症は副次的な位置づけとして関与し、さまざまな炎症細胞ならびに間質細胞から産生される種々のサイトカインおよび増殖因子の作用により病態が修飾されている<sup>19</sup>したがって、PMX が線維性サイトカインや血管新生サイトカインを吸着することで間質性肺炎の改善に寄与していることが示唆される。また間質性肺炎に対する既存の治療として、全身ステロイドや免疫抑制薬の投与が行われているが、ステロイドの作用機序はアラキドン酸カスケード (cyclooxygenase 2)、好中球、好酸球の動員、サイトカイン合成 (IL-1,IL-2,IL-6,IL-8,IFN- $\gamma$ )、蛋白分解酵素の合成、接着分子発現、リンパ球の血中への回帰、マクロファージ、未熟 T 細胞の増殖、化学伝達物質の放出、T 細胞機能を抑制することにより抗炎症作用、免疫抑制作用を発揮する<sup>20</sup>。ステロイドは炎症性サイトカインに関連しているが、線維性サイトカインや血管新生サイトカインへの作用は有していない。このため、ステロイドにて効果の乏しい間質性肺炎にも PMX が効果を示すことが考えられる。

今回の実験では東レ株式会社のトレミキシン® を使用したが、海外では敗血症性ショックや ARDS に対して Cytosorb が使用されている。これは 10~50kDa の範囲の分子量を持つサイトカインを吸着する機序を持っており、8kDa の IL-8,26kDa の IL-6 などのサイトカインを有意に吸着するとされている。その他 High cut off membrane というある分子量のサイトカインを選択的に吸着するものも存在しており、吸着できるサイトカインが異なっている。

今回 PMX で吸着したサイトカインに注目する。まず炎症性サイトカインの中で有意に吸着した IL-8 は IL-1 や TNF といった炎症性サイトカインの刺激により白血球を始めとして、線維芽細胞や内皮細胞など種々の細胞から産生される白血球遊走因子 (leukocyte chemotactic factor) であり好中球、T 細胞、好塩基球に対するさまざまな生物活性が認められている。例えば、好中球への代表的な作用は走化性活性 (chemotaxis) および好中球の脱顆粒・酵素放出 (exocytosis) であり、生体における炎症形成の重要なメディエーターと考えられる。一般的に、Th1 細胞は CCR5/CXCR3 を、Th2 細胞は CCR3/4/8 を、樹状細胞は CCR7 を、好酸球は CCR1/2/3 をその細胞表面に発現していると言われている<sup>21</sup>。

Th1 細胞遊走に関わる、すなわち CCR5 を刺激するケモカインが RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) である。線維性サイトカインでは FGF Basic は血管形成と線維芽細胞の増殖作用を刺激し、創傷治癒の初期段階に傷の空間を埋める肉芽組織を作る。PDGF basic は細胞遊走や形質転換等を引き起こし、胎児の成長や血管新生にも関与していると考えられている。血管や線維芽細胞では炎症および創傷治癒の過程において発現が上昇することも報告されている。また、PDGF はある種の疾患の進行に関与しており、PDGF および PDGFR の過剰発現はアテローム性動脈硬化や線維増殖性疾患の発症と関連がある。TGF- $\beta$  は骨芽細胞の増殖および結合組織の合成・増殖を促進し、上皮細胞の増殖や破骨細胞に対しては抑制的に作用する。血管新生サイトカインの

VEGF は主に血管内皮細胞表面にある血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) にリガンドとして結合し、細胞分裂や遊走、分化を刺激したり、微小血管の血管透過性を亢進させたりする働きをもつが、その他単球・マクロファージの活性化にも関与する。正常な体の血管新生に関わる他、腫瘍の血管形成や転移など、悪性の過程にも関与している。

PMX はこれらのサイトカインを吸着することにより病態の増悪を抑制し、さらにヘパリンと結合することにより、サイトカインの吸着を増強することが示唆された。

## 6. 結語

PMX はサイトカインを吸着し、さらにヘパリンと結合することにより、サイトカインの吸着を増強することが示唆された。PMX カラムはこれらのサイトカインの除去により間質性肺炎急性増悪における酸素化改善や線維化抑制に寄与すると考えられる。

## 7. 謝辞

本論文は筆者が山口大学大学院医学系研究科応用医工学系専攻課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻の矢野雅文教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。また、同専攻の山本健准教授、ならびに山口大学 呼吸器感染症内科 松永 和人教授、大石 景士先生、山口宇部医療センターの青江 啓介先生、亀井 治人先生、ならびに山口宇部医療センターの三村雄輔臨床研究部長、三村由香研究員には終始、ご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

この学位論文は、Toshiaki Utsunomiya, Yuka Mimura-Kimura, Takeshi Yamamoto, Keisuke Aoe, Keiji Oishi, Haruhito Kamei, Kazuto Matsunaga, Masafumi Yano, Yusuke Mimura. Cytokine adsorption to polymyxin B-immobilized fiber: an in vitro study, *Blood Purification* 2020 に原著論文として発表したものからデータを引用して作成した。

## 8. 参考文献

1. Kim DS, Collard HR, King TE, Jr. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006;3:285-92.
2. Al-Hameed FM, Sharma S. Outcome of patients admitted to the intensive care unit

- for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Can Respir J* 2004;11:117-22.2.
3. Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol* 1976;85:209-28.
  4. Kim DS, Park JH, Park BK, Lee JS, Nicholson AG, Colby T. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J* 2006;27:143-50.
  5. Hanasawa K, Tani T, Kodama M. New approach to endotoxic and septic shock by means of polymyxin B immobilized fiber. *Surg Gynecol Obstet* 1989;168:323-31.
  6. Tsushima K, Kubo K, Koizumi T, et al. Direct hemoperfusion using a polymyxin B immobilized column improves acute respiratory distress syndrome. *J Clin Apher* 2002;17:97-102.
  7. Seo Y, Abe S, Kurahara M, et al. Beneficial Effect of Polymyxin B-immobilized Fiber Column (PMX) Hemoperfusion Treatment on Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Internal Medicine* 2006;45:1033-8.
  8. Enomoto N, Suda T, Uto T, et al. Possible therapeutic effect of direct haemoperfusion with a polymyxin B immobilized fibre column (PMX-DHP) on pulmonary oxygenation in acute exacerbations of interstitial pneumonia. *Respirology* 2008;13:452-60.
  9. Abe S, Seo Y, Hayashi H, et al. Neutrophil adsorption by polymyxin B-immobilized fiber column for acute exacerbation in patients with interstitial pneumonia: a pilot study. *Blood Purification* 2010;29:321-6.
  10. Wang Y, Liu Y, Sarker KP, et al. Polymyxin B binds to anandamide and inhibits its cytotoxic effect. *FEBS Lett* 2000;470:151-5.
  11. Tsujimoto H, Ono S, Hiraki S, et al. Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16+ CD14+ monocytes in patients with septic shock. *J Endotoxin Res* 2004;10:229-37.
  12. Nakamura T, Kawagoe Y, Matsuda T, et al. Effect of polymyxin B-immobilized fiber on blood metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in acute respiratory distress syndrome patients. *Blood Purif* 2004;22:256-60.
  13. Kushi H, Miki T, Okamoto K, Nakahara J, Saito T, Tanjoh K. Early hemoperfusion with an immobilized polymyxin B fiber column eliminates humoral mediators and improves pulmonary oxygenation. *Critical care* 2005;9:R653-61.
  14. Naka T, Shinozaki M, Akizawa T, Shima Y, Takaesu H, Nasu H. The effect of continuous veno-venous hemofiltration or direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber on neutrophil respiratory oxidative burst in patients with sepsis and septic shock. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the*

International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy 2006;10:7-11.

15. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, et al. Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive care medicine* 2008;34:1638-45.

16. Vourlekis JS, Brown KK, Schwarz MI. Acute interstitial pneumonitis: current understanding regarding diagnosis, pathogenesis, and natural history. *Semin Respir Crit Care Med* 2001;22:399-408.

17. Oishi.K. Association between cytokine removal by polymyxin B hemoperfusion and improved pulmonary oxygenation in patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis.:cytokine. 2013;11:84-89.

18. Meyer A,Buhl R, Magnussen H. The effect of oral N-acetylcysteine on l III g glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 1994 ; 7 : 431-36.

19. Gillissen A,Nowak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol anti-oxidant therapy *Respir Med* 1998 ; 92 : 609-23.

20. Clark JH,Schrader WT,O Malley BW:Mechanism of action of steroid hormones. *Text of Endocrinology*,Saunders,Philadelphia,8<sup>th</sup> Edition,pp.35-90,1992.

21. 臨床サイトカイン学—日常診療への新たなる応用- 2007.