

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10973

研究課題名(和文) 血管内皮細胞特異的ホーミングペプチドによる敗血症に伴う急性腎障害治療の試み

研究課題名(英文) Hydrocortisone Therapy with CAR Peptide Protects the Injured Endothelial Glycocalyx in Sepsis.

研究代表者

吉田 隆浩 (YOSHIDA, Takahiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40452148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮傷害部位に特異的にホーミングする環状ペプチドCARSKNKDC (CAR) を用いて傷害された血管内皮細胞に集中的にステロイド剤を送達することで、少量のステロイド使用でも敗血症による多臓器不全の治療が可能であるかどうかを検討した。リポ多糖(LPS)を20 mg/kg腹腔内注射し敗血症を作製。低用量ハイドロコルチゾン0.2 mg/kg、高用量HCT 10 mg/kg、低用量HCT 0.2mg/kg + CAR 20 mg/kg の3群で、いずれもLPS投与後3、12、24時間後に腹腔内投与を行ったところ48時間後の生存率、臓器障害がCARペプチド併用群で著明に改善していた。

研究成果の概要(英文)：A tissue-penetrating homing peptide, CARSKNKDC (CAR) has previously demonstrated the unique ability to facilitate transport of co-administered drugs into injured endothelial cell. Co-administration of hydrocortisone and CAR could improve the endothelial disorder and survival in sepsis using lower amounts of hydrocortisone. Mice were given lipopolysaccharide (LPS, 20 mg/kg). Subsequently, five different treatments were initiated: saline only; CAR peptide-alone administration 500 ug; hydrocortisone 0.2mg/kg or 10mg/kg; and CAR co-administered with hydrocortisone 0.2mg/kg. Hydrocortisone and /or CAR peptide were injected intraperitoneally at 3, 12 and 24 hours after LPS administration. Forty-eight hours after LPS administration, combined therapy group showed the best survival ratio. These results suggest that co-administration of hydrocortisone and CAR peptide is a highly effective treatment strategy for endothelial disorder in sepsis.

研究分野：集中治療医学

キーワード：敗血症

1. 研究開始当初の背景

近年、敗血症や SIRS に伴う急性腎障害 (AKI) が臨床的に問題となってきた。敗血症治療ガイドラインの提起などにより敗血症治療が確立され救命に至る症例が多く認められるようになったが、治癒後も急性期の腎障害が遷延し慢性腎不全への移行や透析導入などの予後悪化因子となることが原因である。これに対して臨床の現場において有効な治療介入方法が無いのが現状である。敗血症における AKI の成因メカニズムは、グラム陰性菌からエンドトキシンが産生され、これがサイトカインの過剰産生、いわゆるサイトカインストームが血管内皮細胞障害による内皮依存性の NO 産生合成低下、尿細管障害、糸球体微小血栓形成などが生じることとされている。

ステロイド治療は臨床上で頻用されてきた薬物治療であり、それ自体が強い抗炎症作用もつとともに、相対的副腎不全状態となる重症敗血症や敗血症性ショック症例に対する循環動態改善作用があり有用とされる (Dellinger RP : *Intensive Care Med.* 30 : 536-55, 2004) 一方で生存率に差はなく、新たな敗血症や敗血症性ショックなどの感染症を増加させたという報告もありいまだに十分なコンセンサスを得られていない。近年、細胞特異的に集積するホーミングペプチドを用いて抗癌剤と結合させ癌治療に応用する試みがなされており、臨床応用への期待が高まっている (Sugahara KN et al. *Science* 2010)。これらのペプチドはわずか 9 つのアミノ酸配列からなり細胞に特異的な受容体に対しリガンドとして働く。血管内皮細胞に特異的にホーミングするペプチドにステロイド剤を結合させ静脈内投与して、血管内皮細胞に集中性の効率的でかつ感染症治療が可能になるのではないかとこの考えに至った。

2. 研究の目的

ホーミングペプチド CARSKNKDC (以下 CAR) はヘパラン硫酸を認識することで、血管新生中の血管内皮や腫瘍にホーミングする環状ペプチド (Jarvinen TA et al. *Am J Pathol* 2007) である。動物実験において臍や皮膚の創傷部位、肺高血圧症の肺動脈に選択的にホーミングすることが報告されている。それゆえ、CAR ペプチドは敗血症による血管内皮障害部位に選択的にホーミングするのではないかと考え、CAR ペプチドを用いて敗血症により生じた血管内皮障害の部位にステロイドの送達を行うことが可能であるという仮説を証明するために研究

を行った。

3. 研究の方法

対照群 (Group S) として 10 週齢オスの C57BL6 マウス (n=18) にリポ多糖 (LPS) を 20mg/kg 腹腔内注射し敗血症を作製。治療群は、低用量ヒドロコルチゾン (HCT) 0.2mg/kg (Group L, n=20)、高用量 HCT 10mg/kg (Group H, n=28)、低用量 HCT 0.2mg/kg + CAR 20mg/kg (Group L + C, n=20) の 3 群で、いずれも LPS 投与後 3、12、24 時間後に腹腔内投与を行った。48 時間後の生存率、各臓器障害を検討し、さらに超微形態の観察を行った。

4. 研究成果

結果 1 : CAR ペプチドのホーミングについて

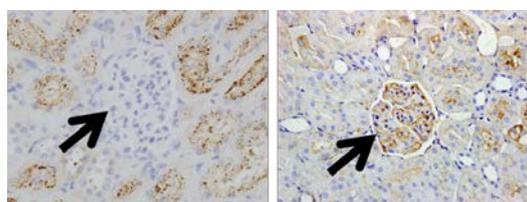


図 1 : FAM で標識した CAR ペプチド静注後のマウス腎糸球体の免疫染色。

(左) コントロール (右) 敗血症モデル、どちらも排泄のための尿細管への集積を認めるが、敗血症モデルにおいてのみ糸球体内の血管内皮に CAR ペプチドが集積している。

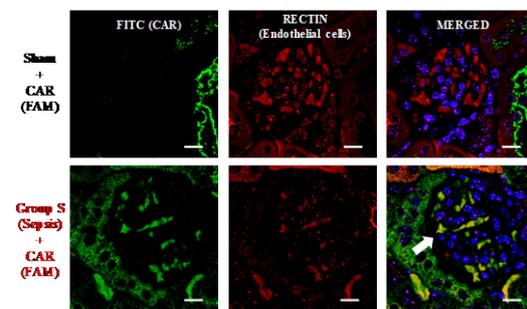


図 2 : FAM で標識した CAR ペプチド静注後のマウス腎糸球体の免疫 2 重染色。

(上) コントロール (下) 敗血症モデル、緑が CAR、赤がレクチン (血管内皮)。敗血症マウスのみ、糸球体に CAR の集積が確認でき、同部位は RECTIN でも染色された。

LPS 投与 6 時間後の敗血症モデルマウスとコントロールマウスに CAR ペプチドを静注し、その集積を比較したところ、どちらの群でも排泄のための尿細管への集積を認める一方で、敗血症モデルマウスにおいてのみ腎糸球体血管内皮への CAR ペプチドの集積を認めた。(図 1,2)

結果 2 : 生存率

LPS 投与後、3、12、24 時間でヒドロコルチゾンを 10mg/kg の Dose でマウスに投与し 12 時間おきに生存率を調べたところ、

LPS 投与後 48 時間での生存率は未治療マウス 25.8%に対して 57.1%と有意な改善を示した。一方、0.2mg/kg の濃度で同様の手法でヒドロコルチゾン投与したところ生存率は30%と未治療群との差は認めなかった。ここに CAR を 500ug/mouse の Dose で 0.2mg/kg のヒドロコルチゾンと共投与したところ 48 時間の生存率は 90%と大幅な改善が認められた。また CAR 単独では治療効果が得られなかった。

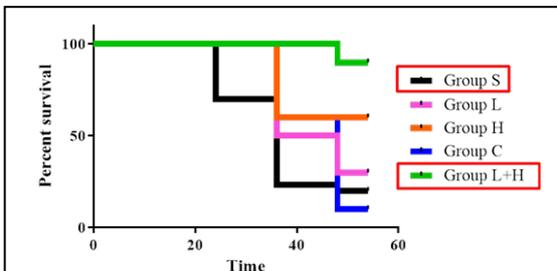


図 3：生存率比較

Group S：コントロールマウス、Group C：CAR ペプチド単独マウス、Group L：ヒドロコルチゾン 0.2mg/kg 投与マウス、Group H：ヒドロコルチゾン 10mg/kg 投与マウス、Group L+H：ヒドロコルチゾン 0.2mg/kg と CAR ペプチド 20mg/kg の併投与群。CAR 併用群で有意に生存率は改善した。

### 結果 3：臓器障害について

LPS 投与 48 時間後の腎機能障害の評価を行ったところ、CAR ペプチドの併用により有意に腎機能が改善していることが示唆された。

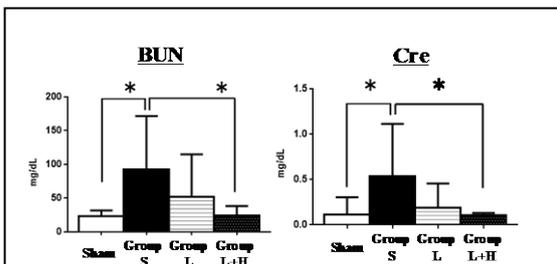


図 4：血液生化学的検査による腎機能障害の評価  
CAR 併用群で有意に BUN、Cre は改善を示した。

### 結果 4：血管内皮障害についての評価

血管内皮傷害マーカーである血清トロンボモジュリンと血管内皮グリコカリックスの傷害マーカーである血清シンデカン 1 は Group S、Group L と比較し Group L + C で抑制されていた。

次に走査型電子顕微鏡によりグリコカリックスを硝酸ランタンで電子染色した血管内皮表面の観察を行った。腎糸球体の血管内皮は有窓型毛細血管の形態を呈し、健全な状態ではその表面をグリコカリックスが覆っていた。しかし、LPS 投与 48 時間後、血管内皮グリコカリックスは血管内皮表面から剥離し、血管内皮の有窓構造が破壊されていた。Group L+C ではこの構造が保たれており

血管内皮障害が抑制されているのが超微形態でも確認された。

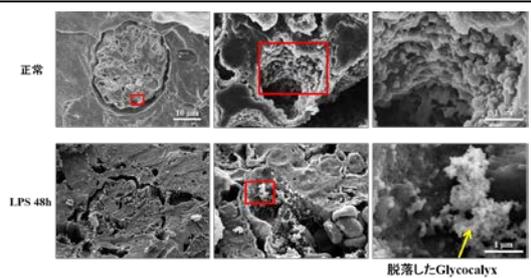


図 5：走査型電子顕微鏡を用いた血管内皮の観察

正常糸球体では血管内皮を覆うグリコカリックスが観察されるが、LPS 投与 48 時間後にはそれらが剥離しグリコカリックスの残渣が確認された。血管内皮表面も遊走構造が破壊されているのが確認できる。

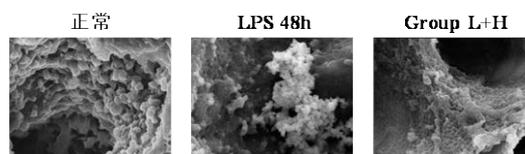


図 6：CAR 併投与による血管内皮障害の減弱

Group L+H では血管内皮グリコカリックスの剥離が減少し、血管内皮の有窓構造も保たれていた。

現時点でのメカニズムは CAR の配列はヘパラン硫酸の結合モチーフに似た配列であるため、健全グリコカリックスが傷害を受けると障害を受けたグリコカリックスに CAR が結合しリポッドラフトにより細胞内に取り込まれると仮説を立てた。この仮説を確かめるためにグリコカリックスを形成しているヘパラン硫酸を血管内皮上からノックアウトできる Vascular Cadherin Cre overexpression マウスに EXT1 flox マウスを掛け合わせて作製した血管内皮のみでグリコカリックスを KO したマウスを作製し、CAR ペプチドが取り込まれるかどうかについて検討を行っている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ①. Okada H, Takemura G, Suzuki K, Oda K, Takada C, Hotta Y, Miyazaki N, Tsujimoto A, Muraki I, Ando Y, Zaikokuji R, Matsumoto A, Kitagaki H, Tamaoki Y, Usui T, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Ushikoshi H, Toyoda I, Ogura S. Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions. *Crit Care*. 2017 Oct 23;21(1):261. (査読有)
- ②. Inagawa R, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Yano H, Ando Y, Usui T, Hotta Y, Miyazaki N, Tsujimoto A, Zaikokuji R, Matsumoto A, Kawaguchi T, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Kumada K, Ushikoshi H, Toyoda I, Ogura S. Ultrastructural Alteration of Pulmonary Capillary Endothelial

Glycocalyx During Endotoxemia. *Chest*. 2018 Mar 17. pii: S0012-3692(18)30409-4. doi: 10.1016/j.chest.2018.03.003. (査読有)

[学会発表] (計 22 件)

①. Kodai Suzuki, Hideshi Okada, Genzou Takemura, Fuminori Yamaji, Chihiro Takada, Kazumasa Oda, Yasuaki Hotta, Nagisa Miyazaki, Tomoaki Doi, Takahiro Yoshida, Shozo Yoshida, Hiroaki Ushikoshi, Shinji Ogura Neutrophil Elastase Plays a Pivotal Role in Sepsis-induced Myocardial Dysfunction. AHA Scientific Sessions 2017 Anaheim, USA, 2017 年 11 月

②. Fuminori Yamaji, Hideshi Okada, Genzou Takemura, Kodai Suzuki, Chihiro Takada, Nagisa Miyazaki, Shinji Ogura Recombinant Thrombomodulin Attenuates Sepsis-induced Myocardial Dysfunction via Protection of Endothelial Glycocalyx Structure. AHA Scientific Sessions 2017 Anaheim, USA, 2017 年 11 月

③. 矢野博久、岡田英志、鈴木浩大、柿野圭紀、水谷喜雄、山路文範、三宅喬仁、吉田省造、吉田隆造、豊田泉、小倉真治 敗血症性肺炎に対するリコンビナントトロンボモジュリンの臓器保護作用の検討 第 45 回日本救急医学会総会 大阪 2017 年 11 月

④. 村木勇、岡田英志、鈴木浩大、柿野圭紀、水谷善雄、山路文範、三宅喬人、山田法顕、吉田省造、豊田泉、小倉真治 敗血症性肝障害時におけるアンチトロンビンの血管内皮保護効果の検討 第 45 回日本救急医学会総会 大阪 2017 年 11 月

⑤. 黒田あゆみ、岡田英志、鈴木浩大、小田和正、岡本遥、北川雄一郎、福田哲也、吉田省造、吉田隆造、豊田泉、小倉真治 好中球エラスターゼと肺血管内皮グリコカリックス 第 45 回日本救急医学会総会 大阪 2017 年 11 月

⑥. 安藤徳晃、岡田英志、鈴木浩大、小田和正、岡本遥、北川雄一郎、福田哲也、吉田省造、吉田隆造、豊田泉、小倉真治 連続型毛細血管の血管内皮グリコカリックスの超微形態の比較 第 45 回日本救急医学会総会 大阪 2017 年 11 月

⑦. Hideshi Okada, Genzou Takemura, Kodai Suzuki, Chihiro Takada, Nagisa Miyazaki, Hiroaki Ushikoshi, Shinji Ogura Three-Dimensional Ultrastructural Alteration of Vascular Endothelial Glycocalyx in Septic Cardiac Injury. 日本循環器学会 金沢 2017 年 3 月

⑧. 鈴木浩大、岡田英志、高田ちひろ、小田和正、吉田隆造、竹村元三、David Mann、小松正信、豊田泉、小倉真治 細胞選択的ホーミングペプチドを用いた少量ステロイドの血管内皮保護効果の検討 第 44 回日本集中治療学会 札幌 2017 年 2 月

⑨. 岡本遥、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、小田和正、吉田隆造、吉田省造、豊田泉、竹村元

三、小倉真治 敗血症性急性腎傷害に対するリコンビナントトロンボモジュリンの臓器保護作用の検討 第 44 回日本集中治療学会 札幌 2017 年 2 月

⑩. 北川雄一郎、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、小田和正、吉田省造、牛越博昭、豊田泉、竹村元三、小倉真治 類洞閉塞を伴う敗血症性肝機能障害に対するリコンビナントトロンボモジュリンの作用の超微形態学的検討 第 44 回日本集中治療学会 札幌 2017 年 2 月

⑪. Kodai Suzuki, Hideshi Okada, Chihiro Takada, Kazumasa Oda, Takahiro Yoshida, David Mann, Masanobu Komatsu, Shinji Ogura Hydrocortisone Therapy with CAR Peptide Protects the Injured Endothelial Glycocalyx in Sepsis. 46<sup>th</sup> Critical Care Congress, Honolulu, USA, 2017 年 1 月

⑫. 鈴木浩大、岡田英志、小田和正、岡本遥、田中卓、中野志保、吉田隆造、豊田泉、小倉真治 敗血症時におけるリコンビナントトロンボモジュリンの血管内皮保護作用効果の検討 第 44 回日本救急医学会総会 東京 2016 年 11 月

⑬. 北川雄一郎、岡田英志、鈴木浩大、小田和正、福田哲也、高田ちひろ、堀田康明、牛越博昭、豊田泉、竹村元三、小倉真治 敗血症性心筋障害と好中球エラスターゼ 日本 SHOCK 学会 東京 2016 年 10 月

⑭. Kodai Suzuki, Hideshi Okada, Chihiro Takada, Kazumasa Oda, Takahiro Yoshida, David Mann, Masanobu Komatsu, Shinji Ogura CAR Peptide Enhances Hydrocortisone to More Effectively Treat Injured Endothelium in Sepsis. The 8<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Shock Society, Tokyo, 2016 年 10 月

⑮. Takahiro Usui, Hideshi Okada, Kodai Suzuki, Chihiro Takada, Risa Inagawa, Go Furui, Hiroki Uekado, Hiroki Jinno, Junya Ota, Yasuaki Hotta, Taku Tanaka, Shiho Nakano, Takahiro Yoshida, Shozo Yoshida, Nagisa Miyazaki, Hiroaki Ushikoshi, Izumi Toyoda, Genzou Takemura, Shinji Ogura Low dosage aspirin attenuated multiple organ failure in sepsis through vascular endothelial protection The 8<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Shock Society, Tokyo, 2016 年 10 月

⑯. Akihiro Uchida, Hideshi Okada, Kodai Suzuki, Chihiro Takada, Airi Kageyama, Yuki Kato, Ayumi Kuroda, Yoshiaki Ogawa, Yasuaki Hotta, Taku Tanaka, Shiho Nakano, Takahiro Yoshida, Shozo Yoshida, Nagisa Miyazaki, Hiroaki Ushikoshi, Izumi Toyoda, Genzou Takemura, Shinji Ogura Ulinastatin ameliorated acute kidney injury in sepsis via inhibition of endothelial injury The 8<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Shock Society, Tokyo, 2016 年 10 月

⑰. Kodai Suzuki, Hideshi Okada, Genzou Takemura, Chihiro Takada, Kazumasa Oda, David Mann, Masanobu Komatsu, Shinji Ogura Highly Effective Treatment of Endothelial Disorders in Sepsis by CAR Peptide Adjuvant for Hydrocortisone Therapy. American Thracic Society International Conference 2016 San Francisco, USA, 2016年5月

⑱. 鈴木浩大、岡田英志、小田和正、田中卓、中野志保、吉田隆浩、牛越博昭、豊田泉、小倉真治 顆粒球コロニー刺激因子 Knock out マウスでは敗血症に伴う血管内皮障害が抑制される 神戸 2016年2月

⑲. 鈴木浩大、岡田英志、田中卓、中野志保、吉田隆浩、中野通代、吉田省造、牛越博昭、豊田泉、小倉真治 敗血症時における血管内皮の超微形態 日本救急医学会総会 東京 2015年10月

⑳. Kodai Suzuki, Hideshi Okada, Genzou Takemura, Yasuaki Hotta, Chihiro Takada, Shozo Yoshida, Hiroaki Ushikoshi, Izumi Toyoda, Shinji Ogura ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF ENDOTHELIAL DISORDER IN ACUTE KIDNEY INJURY BY SEPSIS American Shock Society, Denver, CL, USA 2015年6月

㉑. 北川雄一郎、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、薄井貴裕、玉置祐斗、堀田 康明、竹村元三、小倉真治 敗血症における血管内皮障害の走査型電子顕微鏡を用いた形態学的考察 第31回医学生物学電子顕微鏡技術学会 名古屋 2015年6月

㉒. 鈴木浩大、岡田英志、高田ちひろ、小倉真治 細胞特異的ホーミングペプチドを利用した新規敗血症治療の開発 日本 Shock 学会 東京 2015年5月

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 隆浩 (YOSHIDA, Takahiro)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40452148

### (2)研究分担者

竹村 元三 (TAKEMURA, Genzou)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号：40283311

岡田 英志 (OKADA, Hideshi)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30402176

鈴木浩大 (SUZUKI, Kodai)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80724583

### (3)連携研究者

なし

研究者番号：

### (4)研究協力者

菅原 一樹 (SUGAHARA, Kazuki)