

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11000

研究課題名(和文) 赤血球機能からみた敗血症時の血管透過性亢進制御とその異常

研究課題名(英文) Control mechanisms and its failure of endothelial hyperpermeability in sepsis: from a view point of erythrocyte and platelet

研究代表者

高須 修 (Takasu, Osamu)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90236216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲下に生じる血管透過性亢進は、臓器障害発症の一因である。本研究は、血小板あるいは赤血球の血管透過性亢進に対する調整力の有無を確かめることにある。マウス盲腸結紮穿孔(CLP)モデルにおいて、バイオインピーダンス法で測定した細胞外液増加率と血中可溶性VE-Cadherin濃度は正に相関した。血小板と赤血球はcadherinの正の調整因子とされるが、CLP早期は赤血球の生理学的変化は乏しく、血小板依存性のAngiopoietin-1(Ang-1)減少が顕著であった。血小板由来のAng-1含有血漿の投与は、CLPモデルの血管透過性亢進を抑制したことから、治療モジュレーションとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Endothelial hyper permeability is attracted attention as one of the mechanisms of the organ failure in critically ill patients. The purpose of this study was to clarify the potential of platelets or erythrocytes as modulator of the endothelial hyperpermeability. On the cecal ligation and puncture (CLP) model of mice, there was a positive correlation between the sVE-Cadherin and the extracellular water ratio (ECW% ratio) measured by bioimpedance analysis. The characteristic changes of platelets were prominent than that of erythrocytes in early phase of sepsis. Angiopoietin-1, which acts as a positive regulating factor for VE-cadherin, decreased depending the number of platelets. Administration of the platelet rich plasma (PRP) extraction containing abundant Ang-1 suppressed increase in the ECW% on CLP mice. These findings suggested that a therapeutic potential of PRP extraction for endothelial hyperpermeability.

研究分野：救急集中治療

キーワード：敗血症 臓器不全 血管透過性亢進

## 1. 研究開始当初の背景

生体に侵襲が加わった場合、通常、血管内皮の障害に伴って、体液は血管外非機能的細胞外スペース(いわゆるサードスペース)へ移動し間質の浮腫が生じる。生体の恒常性が保たれる程度の侵襲では、血管透過性亢進は24~72時間程度で終息し、リフィーリング期、さらには利尿期を経て、正常の体液分布に回復する。一方、生体の恒常性を逸脱する過大侵襲やそれが持続する場合、制御困難な血管透過性亢進が生じ、間質の浮腫を背景に微小循環障害、ひいては組織酸素代謝の失調を引き起こすことから、臓器障害の重要な一因と考えられている。ICUで加療した重症敗血症例における自験例の検討では、加療1週間以内の体重増加比が搬入時の1.14倍以上は予後不良因子の一つであった。すなわち、いかにこの血管透過性亢進を制御し修復するかは、侵襲下に生じる臓器障害に対する治療戦略として、非常に重要と考えられる。

血管内から血管外への物質や体液の移動は、隣接細胞間を介す経路 paracellular leakage と経細胞的な経路 transcellular leakage<sup>1)</sup>の2つがある。敗血症時にはどちらの経路からも血漿成分の移動が生じるが、血球成分の血管外遊走も踏まえ、前者の経路の制御・修復機構がより重要と考え本研究を開始した。

隣接細胞間にある複数の接着装置のうち、adherens junction に存在するカドヘリン分子は、血管透過性亢進における主要な分子構造の一つで、炎症性サイトカインやトロンピン、HMGB1といった接着を障害する因子と、sphingosine-1-phosphate (S1-P) や、angiopoietin-1(Ang-1)、fibrinopeptide B 15-42 などの接着に対する正の調整因子の存在が報告されている。特に前者2者は、血小板や赤血球がその調整に関与することが指摘されているが、特に侵襲時の変化とその修復過程にいかに関与しているかについては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

敗血症モデルにおいて、血管透過性亢進(体液分布の異常)を経時的に測定できる方法を検討し、測定された体液分布の異常と血管透過性に関わる血管障害マーカー(sVE-Cadherin)との関係を明らかにする。その上で、血管透過性亢進とsVE-Cadherin、さらにAngiopoietin-1との関係について検討する。

Angiopoietin-1の調整因子としての血小板、sphingosine-1-リン酸の調整因子としての赤血球と血小板の、血管透過

性亢進時に生じる生理学的機能の変化を明らかにし、血小板あるいは赤血球が侵襲時の血管透過性亢進に対しどのような調整機能を有しているか、その調整力を検討する。なお、赤血球による調整機能に関しては、継続検討中であり、本報告では血小板の機能からの検討を中心に報告する。

## 3. 研究の方法

### 1) 敗血症モデルの作成<sup>2)</sup>

20週前後のC57BL/6雄性マウスを用い、盲腸結紮穿孔モデル(Cecal ligation and puncture model, 以下CLPモデル)を作成し、腹膜炎による敗血症モデルとした。すなわち、麻酔開腹下に両側の付属器脂肪組織を切除した後、盲腸結紮サイズと穿孔に用いる針のサイズの組み合わせにより、mild CLP群(0.5cm結紮, 26G針)、moderate CLP群(1.0cm, 21G針)、severe CLP群(1.5cm, 21G針)の3群を作成した。開腹下に両側の付属器脂肪組織を切除したマウスを対照群(以下sham群)とした。

### 2) 生体バイオインピーダンス法による血管透過性亢進の評価

動物モデルにおける血管透過性亢進の評価には、エバンスブルー(EB)を用いて血管外に漏出したEB量により評価することが多い。しかしこの方法では各組織の採取を必要とするため、同一個体で繰り返し測定することは困難である。そこで本研究では、微小な交流電流を生体に流し、電気的な抵抗値インピーダンスから非侵襲的に体液分布・体組成を測定可能な生体バイオインピーダンス法(BIA法)による評価を検討した。体組成計としては、実験動物用体組成計ImpediVETを使用した。本装置では、4から1000kHzの異なる256周波数を流し、得られたレジスタンス(R)、リアクタンス(Cx)、インピーダンス(Z)からCole-Coleプロットを用いて体内水分量や細胞外水分量(ECW)、細胞内水分量(ICW)、体組成が算出される。

### 3) 血管透過性亢進に関わる血管障害マーカーの評価

本研究では、血管内皮細胞間の接着障害マーカーとして、可溶性血管内皮カドヘリン(s-VE-Cadherin)をELISA法(Mouse VE-Cadherin ELISA Kit, BOSTER)により測定した。

### 4) CLPモデルにおける赤血球、血小板の生理学的特徴の変化についての検討

CLP前(0h)と24ないしは36h後にEDTA採血を行い、全自動血球計数器(MEK-6500 Celltix, NIHON KODEN)によってヘマトクリット値(Ht, %), 赤血球分布幅(RDW%), 血小板数を、ektacytometry techniques (RheoScan-D200)により赤血球変形能を測定しelongation indexes (EI max)として表

示した。これらの測定結果と上記(1)~(3)で得られた結果との関係について検討した。

#### 5) 血管透過性亢進に関する血小板機能の検討

Angiopoietin-1 と血小板との関係を検討する目的で、血漿と血清における Angi-1 濃度の測定値を比較した。血清については、採血後 30 分室温で静置した後、遠心分離し血清を採取し、血漿は EDTA 採血により採取し、Mouse Angiopoietin-1 PicoKine ELISA Kit (Boster biological technology Co.,Ltd) により測定した。さらに、コントロールマウスの血液を Platelet rich plasma (PRP) と Platelet poor plasma (PPP) に分離した後、PPP の Ang-1 濃度の測定を行なった。

#### 6) 血小板由来 Ang-1 含有血漿 Platelet rich plasma extraction (PRP extraction) の CLP モデルにおける血管透過性亢進制御効果の検討

血管透過性亢進に対する血球の調整機能、特に血小板そのものがもつ調整機能を検討する目的で、Angiopoietin-1 を高濃度を含む血漿を、Platelet rich plasma より作成し、CLP モデルへの投与により体内水分分布に与える影響を検討した。PRP extraction の作成は、Mamoto T らの方法<sup>3)</sup>に準じた。すなわち、マウス全血より作成した platelet rich plasma を超音波攪拌機を用いてソニケーション後、10000G で遠心することにより血小板を除去し、上澄を PRP extraction とした。ELISA による Ang-1 濃度の測定後、CLP マウスに 12h 毎に皮下投与し、生食投与群と比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) BIA 法によるマウス CLP モデル上での体液分布異常について

mild CLP 群と severe CLP 群および sham 群における 6 時間毎の ECW の変化量 (d-ECW%) と変化率 (ECW% ratio) を図 1 に示す。

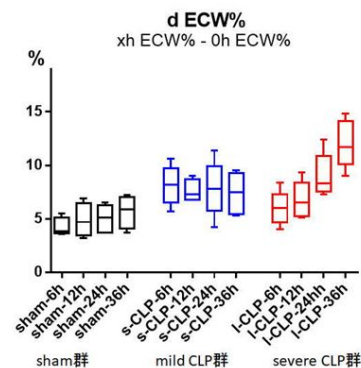


図 1. 36h までの ECW% 変化量

moderate CLP 群では、0 h から 36h までに細胞外水分量は、約 45% から約 55% へ有意に増加し、sham 群に比べても明らかに増加した。

#### (2) BIA 法による細胞外水分量の変化と血管障害マーカーとの関係について

mild 群と severe 群における血中 sVE-Cadherin の時間推移を図 2 に示す。結果の(1)に示したように、severe 群 36h 後の ECW% 変化が最大であったが、sVE-Cadherin の濃度は 24h に比べ低下していた。mild CLP 群の生存率が 95% 以上であるのに対し、severe CLP 群の生存率は約 60% であったことから、生存バイアスが原因と考えた。

次に moderate CLP 群における 36h-ECW% と sVE-Cadherin 濃度の関係を図 3 に示す。細胞外水分量の増加と血管内皮の障害マーカーとは有意な相関が認められた。

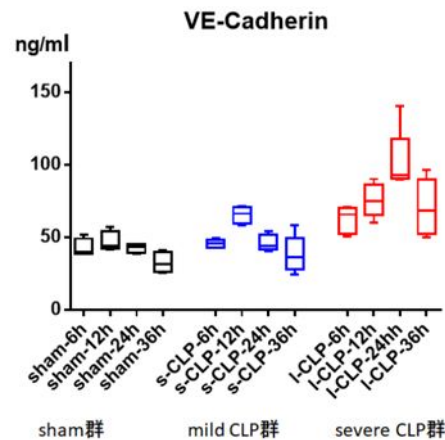


図 2 sVE-Cadherin の時間的推移

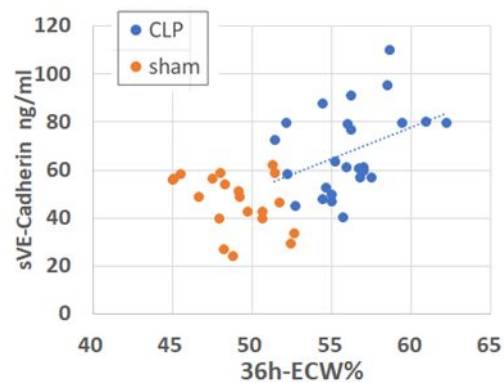


図 3. 36h-ECW% と血中 sVE-Cadherin の関係

#### (3) マウス CLP モデル上の赤血球、血小板の態度と生理学的変化について

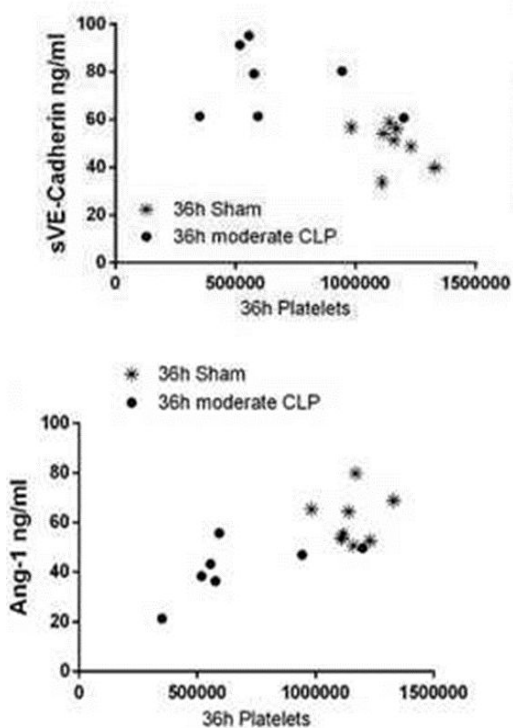
36 時間後の時点で、血小板数は sham 群中央値  $115 \times 10^4 / \mu\text{L}$  に対し CLP 群  $57.7 \times 10^4 / \mu\text{L}$  と有意な低下 ( $p < 0.009$ ) を認めた。一方、ヘマトクリット値は、sham 群 vs CLP 群: 36.6% vs 36.8%, 赤血球変形能 EI max: 0.569 vs 0.556 と両群に有意差を認めなかった。赤血球分布幅 RDW%: 13.7 vs 12.8 ( $p = 0.0486$ )

と CLP 群でわずかに低下していた。興味深いことに、36 時間以上では生存バイアスが存在するものの、生存例では 36 以降に、さらに RDW% の開大と EI max の低下が認められたことは興味深い結果であった。(データ未提示)

(4) 血小板、赤血球変形能と透過性亢進状態との関係について

血小板数と sVE-Cadherin 値に緩やかな負の相関を認めた。一方で、Ht%, ECW%, EI-max に関しては、ECW%, sVE-カドヘリンとの間に一定の関係がみられなかった。

血小板数と sVE-Cadherin, 血漿中 Angiopoietin-1 濃度との関係について図に示す。



(5) Angiopoietin-1 と血小板との関係について

血小板と Angiopoietin-1 のとの局在関係を検討する目的で、血清と血漿における Ang-1 濃度を比較 (n=6) した。図 4 に示すように、EDTA 血漿中 Ang-1 濃度に比べ血清 Ang-1 濃度は有意に高値であった (図 4)。

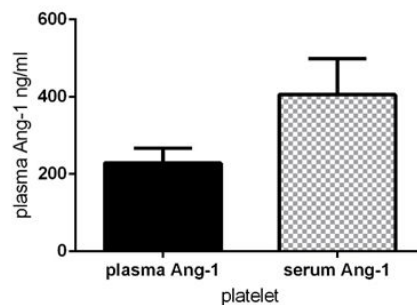
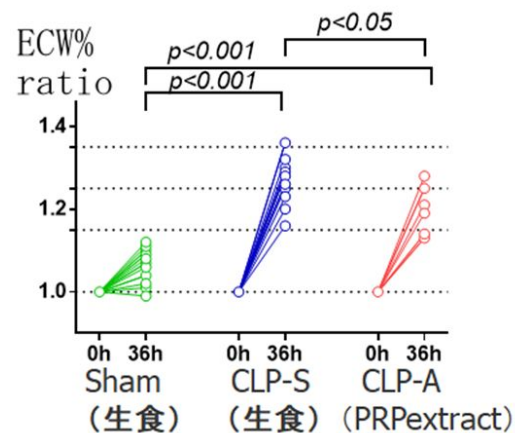


図 4 血漿 Ang-1 vs 血清 Ang-1 濃度

さらに、マウス血液より作成した PPP 中の Ang-1 濃度は感以下であるのに対し、PPP の残血漿 PRP をソニケートし作成した PRP extraction は、結果的に PRP から約 Ang-1 15~25ng/mice 抽出可能であった。すなわち、血小板が Ang-1 の運搬体として機能していると考えられた。

(6) PRP extricator (PRP 由来 Angiopoietin-1 他抽出血) 漿による細胞外水分量の変化について

moderate CLP マウスに対して、CLP 直後、12h, 24h の 3 回、PRP extraction (10~20ng Ang-1 を投与) したところ、生食投与の対象群に比較し、明らかに 36h 後の ECW% は低下傾向となり、ECW% ratio (36h ECW%/0h ECW%) も有意に低下した。(図 5)



上記結果を加味すれば、少なくとも敗血症早期においては、血小板、あるいは血小板内に存在する Angiopoietin-1 を中心とするカドヘリンに対する正の調整因子が、血管内皮の透過性亢進のモデュレーターとして機能しているといえる。PRP extraction には Angiopoietin-1 以外にも S1-P、その他の因子が含まれており、本報告で示した ECW% 増加の抑制作用、血管透過性亢進制御作用が、Angiopoietin-1 単独によるものか、他の因子の関与があるのかについては、さらなる検討が必要である。

また、赤血球に関しては、生理学的変化と血球内の S1-P を中心とする正の調整因子の

関係について現在検討を行っているところであり、結論には至っていない。急性期を過ぎ、1週間程度経過した CLP モデルにおける赤血球には、より強い変化を認めているため（データ未提示）、侵襲後の時間経過の中で、血管透過性亢進の回復・修復に主体となる調整因子が異なる可能性もあり、今後の検討課題である。

少なくとも、制御困難な血管透過性亢進に対して、血小板による新たな治療オプションの可能性が考えられた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 45 回日本救急医学会総会(2017) パネルディスカッション 侵襲反応を制御する～基礎研究

高須 修, 他: 生体バイオインピーダンス分析 (BIA) 法による血管透過性亢進の評価と Angiopoietin-1 による制御効果の検討.

第 45 回日本集中治療医学会学術集会 (2018) パネルディスカッション 一歩進んだ集中治療へ 集中治療の基礎研究

高須 修, 他: CLP モデルにおける生体バイオインピーダンス法による血管透過性亢進評価と位相角 (Phase Angle) の意義について.

〔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〕

無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高須 修 (Takasu, Osamu)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 90236216

##### (2) 研究分担者

新山 修平 (Niiyama, Shuhei)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 40258455

##### (3) 連携研究者

##### (4) 研究協力者