

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15562

研究課題名(和文) ARDSにおける内皮微小粒子の役割

研究課題名(英文) The role of endothelial microparticles in ARDS

研究代表者

齋藤 浩二 (Saito, Kouji)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：10359515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アンギオテンシン変換酵素(ACE)を発現する内皮微小粒子(ACE+EMPs)に着目し、急性呼吸促進症候群(ARDS)の肺血管内皮傷害を評価した。ACE+EMPsは肺毛細血管内皮細胞から多く放出され、炎症性刺激により放出は増加した。敗血症患者の中で、ARDSを発症した患者では有意にACE+EMPsが有意に上昇していた。急性肺傷害モデルマウスを用いた検証では、急性肺傷害モデルマウスでACE+EMPsが上昇するだけでなく、肺血管透過性亢進の指標となりえることが示唆された。ACE+EMPsはARDSの肺血管内皮傷害の新たなマーカーとなり得る。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of the angiotensin+ endothelial microparticles (ACE+EMPs) as a pulmonary endothelial injury. More ACE+EMPs were released from Human pulmonary microvascular endothelial cells than other endothelial cells and increased by inflammatory stimuli. Circulating ACE+EMPs were significantly higher in septic patients with ARDS than patients without ARDS. Furthermore, ACE+EMPs increased significantly in mouse lung injury model and correlate with the severity of pulmonary microvascular permeability. Circulating ACE+EMPs could therefore be a useful marker for evaluating pulmonary endothelial injury during ARDS.

研究分野：集中治療

キーワード：ARDS 内皮微小粒子 血管内皮傷害 敗血症

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促迫症候群 (ARDS: acute respiratory distress syndrome) は、過大侵襲により惹起される非心原性肺水腫であり、その本態である肺胞毛細血管関門 (alveolar-capillary barrier) の崩壊には、肺毛細血管内皮細胞傷害が強く関与している。

ARDS の診断の鍵となるのは、“心不全または輸液過剰の否定”である。ARDS の代表的な基礎疾患である敗血症は、高齢の患者が多く、心血管系合併症を有しており、初期治療の急速輸液により心原性肺水腫が起こりやすい状況となる。加えて、肺血管透過性亢進、肺毛細血管静水圧上昇による肺水腫が混在することもあるため、両者の鑑別に苦慮する場合もある。肺血管透過性亢進の主因である肺血管内皮傷害を評価可能なバイオマーカーは、ARDS 診断の大きな助けとなりえる。

末梢血中に循環する微小粒子 (MPs: microparticles) は、細胞が傷害、活性化、またはアポトーシスの際に細胞膜から出芽により放出される直径 100 nm から 1 μm の小さな膜小胞である。microparticles は表面上の特異抗原から由来細胞が特定できるため、細胞傷害時のマーカーとして用いられてきた。血管内皮由来微小粒子 (EMPs: endothelial microparticles) は、急性冠症候群、腎不全、糖尿病、COPD 敗血症など血管内皮傷害を有する病態で上昇し、その内皮傷害の程度を反映する。

ARDS の病態形成に肺毛細血管内皮傷害が関与しているため、EMPs は上昇すると推測される。しかしながら、敗血症などの基礎疾患でも EMPs が上昇するため、それが肺の内皮傷害に起因するのか、肺以外の内皮傷害に起因するものなのか判断することは難しい。

アンギオテンシン変換酵素 (ACE: angiotensin converting enzyme) は、主に肺毛細血管内皮細胞で産生・分泌され、肺毛

細血管内皮細胞に比較的特異度が高い。

そこで、ACE を発現している EMPs (ACE⁺ EMPs) に着目すれば、全身性の内皮傷害を有する ARDS においても、肺血管内皮傷害を評価することができるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、ACE⁺ EMPs が急性肺傷害の肺血管内皮傷害を反映するか検証することを目的とする。

そのために (1) 肺毛細血管内皮細胞における細胞膜 ACE の発現、ACE⁺ EMPs の放出の特性、および炎症刺激時の反応についての *in-vitro* 研究、(2) 敗血症性 ARDS 患者の ACE⁺ EMPs の動態を調査する臨床研究、(3) 急性肺傷害モデルマウスを用いた ACE⁺ EMPs の動向に関する *in-vivo* 研究を行い、ARDS と ACE⁺ EMPs の関連性を総合的に検証する。

3. 研究の方法

内皮細胞の ACE⁺ EMPs 放出の特性を調べるために、ヒト肺微小血管内皮細胞 (HPMECs: human pulmonary microvascular endothelial cells) およびヒト皮膚血管内皮細胞 (HDBECs: human dermal blood endothelial cells) に LPS 100 ng/ml、TNF- α 25 ng/ml の炎症刺激を 24 時間加え、回収した内皮細胞の細胞膜上の ACE 発現を検証した。また細胞培養液を回収し、超遠心処理を施して MPs を沈降させ、0.2 μm フィルターを通した PBS 溶液により再懸濁し MPs 含有液を精製した。この MPs 含有液中の EMPs 数、ACE⁺ EMPs 数をフローサイトメトリーで測定した。

敗血症性 ARDS 患者の ACE⁺ EMPs の動態を調査するために、東北大学病院へ入院した敗血症 (旧定義: 重症敗血症)、敗血症性ショック患者を対象とし、入室日、入室 2、3、5、7 日に末梢血採血を行い、血漿・血清を精製した。精製、保存された血清を用いて、EMPs 数、

ACE⁺ EMPs 数をフローサイトメーターで測定した。本研究はオープンコホート研究で、対象敗血症患者は経過中に ARDS を発症した群 (ARDS 群) と発症しなかった群 (非 ARDS 群) に分け、両群間で EMPs 数、ACE⁺ EMPs、ACE⁺ EMPs/EMPs 比を比較検討した。

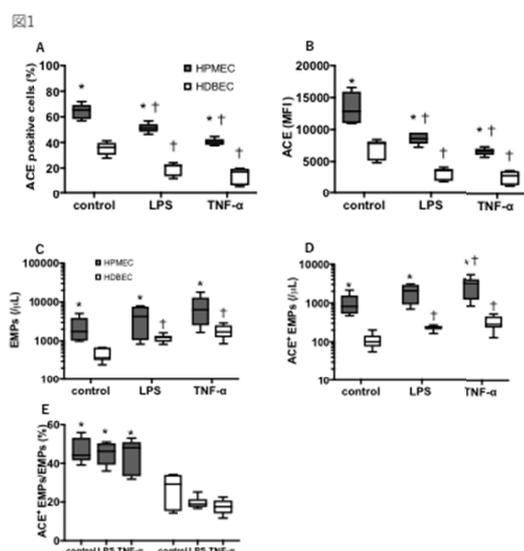
8~12 週齢の雄の C57BL/6 マウスに CLP 手術、LPS 気管内投与を行い、成因の異なる二つの急性肺傷害モデルマウスを作製した。CLP 手術に対しては開腹手術のみの Sham 手術、LPS 気管内投与モデルに対しては PBS 気管内投与モデルをコントロールとした。CLP 手術、LPS 気管内投与から 24 時間後に、全身麻酔下で全血採血を採取し、安楽死させた後肺組織を摘出した。

フローサイトメーターを用いてマウス血清中の EMPs 数、ACE⁺ EMPs 数、ACE⁺ EMPs/EMPs 比を測定し、急性肺傷害モデルマウスにおける ACE⁺ EMPs の動態を調査した。さらに lung injury score や肺乾湿重量比と ACE⁺ EMPs との関係性を調査した。

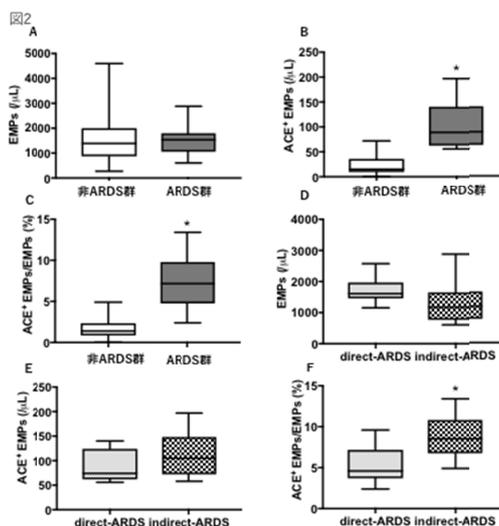
4. 研究成果

HPMECs は HDBECs に比較し、ACE 陽性となる細胞数が多く、かつ発現量も多かった。LPS や TNF- α の炎症性刺激を加えることで、細胞膜表面の ACE の発現は低下した (図 1A, B)。

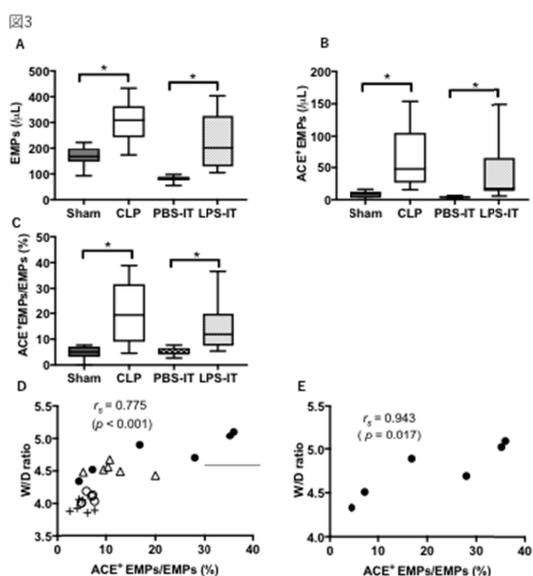
HPMECs は HDBECs よりも多くの ACE⁺ EMPs を放出し、ACE⁺ EMPs の放出は炎症性刺激を加えることで増強された。内皮細胞が放出する EMPs 数と ACE⁺ EMPs 数の比 (ACE⁺ EMPs/EMPs 比) を検証すると HPMECs は HDBECs より有意に高く、これは炎症性刺激を加えた場合も同様であった (図 1C, D, E)。



ARDS 群 20 症例、非 ARDS 群 59 症例の血清中 EMPs、ACE⁺ EMPs を検討した。ARDS 群、非 ARDS 群間では酸素化や人工呼吸器離期間など以外に患者背景に差はなかった。EMPs 数は ARDS 群と非 ARDS 群で差はなかった。一方で、ACE⁺ EMPs 数、ACE⁺ EMPs/EMPs 比は ARDS 群で非 ARDS 群より有意に高かった (いずれも $p < 0.001$) (図 2A, B, C)。また ARDS 群をその成因により、直接肺傷害に起因する direct-ARDS 群、間接肺傷害に起因する indirect-ARDS 群に分けて検証した。EMPs 数、ACE⁺ EMPs 数に有意差はなかったが、ACE⁺ EMPs/EMPs 比は内皮傷害が強いと報告されている indirect-ARDS 群で有意に高かった。ACE⁺ EMPs は ARDS における肺血管内皮傷害を反映していることが示唆された。



成因の異なる2つの急性肺傷害モデルマウスでACE⁺ EMPs数、ACE⁺ EMPs/EMPs比の有意な上昇を認めた(図3A,B,C)。さらに肺血管透過性亢進の指標である肺乾湿重量比とACE⁺ EMPs/EMPs比との間に強い相関が見られた。とりわけ肺血管内皮傷害の強いindirect-ARDSを想定したCLP群においては、非常に強い相関を示した。ACE⁺ EMPsは急性肺傷害モデルマウスの肺血管内皮傷害および肺血管透過性亢進を反映することが示唆された(図3D,E)。



ACE⁺ EMPsに着目することで、全身性の肺血管内皮傷害を伴うARDSにおいても、肺血管内皮傷害を分別評価することが可能となった。ACE⁺ EMPsはARDSにおける肺血管内皮傷害を反映する有用なマーカーであることが示唆された。

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)

投稿中

[学会発表](計 3 件)

1. 武井 祐介, 山田 充啓, 藤野 直也, 齋

藤 浩二, 山内 正憲, 杉浦 久敏, 一ノ瀬 正和: ACE 陽性 EMP に着目した新規ARDS バイオマーカーの開発. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017 年 4 月. 東京.

2. 武井 祐介, 齋藤 浩二, 亀山 良亘, 斎藤 和智, 金谷 明弘, 杉野 繁一, 吾妻 俊弘, 江島 豊, 志賀 卓弥, 山内 正憲: Endothelial microparticles に着目した急性呼吸促進症候群における肺血管内皮傷害の検討. 第 45 回日本集中治療医学会学術集会 2018 年 2 月. 幕張.

3. Yusuke Takei, Mitsuhiro Yamada, Koji Saito, Yoshinobu Kameyama, Hisatoshi Sugiura, Tomonori Makiguchi, Naoya Fujino, Hiroaki Toyama, Kazutomo Saito, Yutaka Ejima, Yu Kawazoe, Daisuke Kudo, Shigeki Kushimoto, Masanori Yamauchi and Masakazu Ichinose: Circulating ACE⁺ EMPs are a potential marker for evaluating pulmonary endothelial injury during ARDS. The International Conference American Thoracic Society 2018. May 2018. San Diego, USA.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 浩二 (Saito, Kouji)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号: 10359515

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

武井 祐介 (Takei, Yusuke)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：80822890

(4)研究協力者
なし