

令和元年6月16日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15757

研究課題名(和文) 霊長類モデルを用いた革新的な術後SIRS/ARDS発症メカニズムの探究

研究課題名(英文) Exploration of innovative postoperative SIRS / ARDS onset mechanism using primate model

研究代表者

後藤 行延 (GOTO, Yukinobu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20451700

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)：カニクイザルARDS(急性肺障害)モデルを用いて実験を行い、データ解析を行った。術後SIRSとそれに続くARDSの発症予防手段の確立を目指すべく、薬理的制御の手法により群分けした。肺障害発生のkey-factorである白血球の活性化と肺への集積について骨髄由来白血球の動態に焦点を当て、CCL23(recombinant human CCL23)による骨髄刺激抑制効果をin vivoで検証、血液学的、組織学的、および画像的に解析した。実験プロトコルは順調に遂行され、先行研究からの追加解析を含め、第70回、および第71回日本胸部外科学会定期学術集会(札幌、および品川)で研究発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科手術に伴うSIRS・ARDS(急性肺障害)の発症は医学的に救急治療を要し、かつ難治性であるが故に、その発症予防が重要である。本研究の基盤となる手術が骨髄機能に与える影響、および本研究の結果である術前CCL23投与による骨髄制御に関する知見は最新で、従来のコルチコステロイド、好中球エラスターゼ阻害剤をはじめとした各種プロテアーゼ阻害薬による対処療法的治療に代わる術後ARDS発症理論に基づく予防法として、あるいはこれとの相加相乗効果によって、周術期管理の安全性を効果的に高める成果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow (BM)-derived leukocytes, such as polymorphonuclear leukocytes (PMNs), are a major contributor to post-surgical pulmonary injury and we previously reported that cardiopulmonary bypass (CPB) accelerates the release of both PMNs and monocytes which are recruited to the lungs from BM in a monkey model. In this study, CCL23/myeloid progenitor inhibitory factor-1 affects on kinetics of bone marrow-derived leukocytes associated with CPB, which could therefore hold value for preventing CPB-induced lung injury.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：ARDS 骨髄細胞 白血球 体外循環

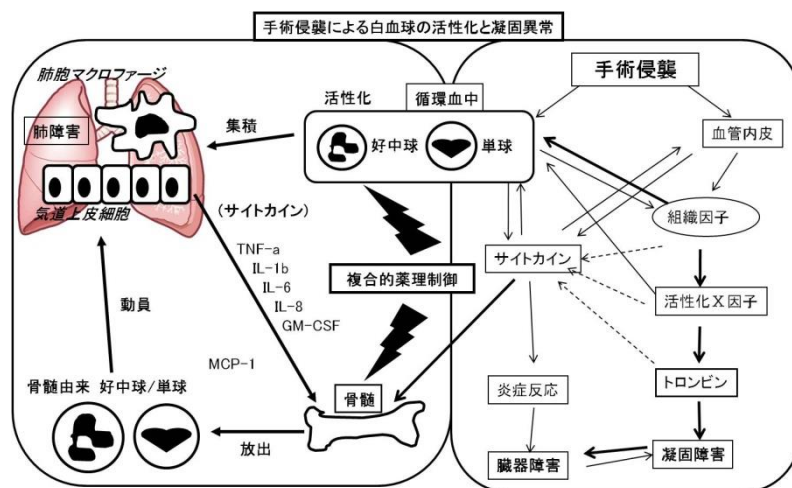
1. 研究開始当初の背景

外科手術後に発症する急性呼吸促拍症候群(ARDS)の死亡率は 40-50%と報告される救急治療を要する重篤な病態である。その発症は補体活性化、炎症性サイトカイン、凝固異常を介した白血球の活性化が主なメカニズムとされる (Apostolakis E. et al. *J Card Surg.* 2010)。これら活性化白血球は、優先的に肺に集積し、ARDS に代表されるような多臓器不全・SIRS のリスクを高める。本研究は平成 21-24 年度基盤研究(B)の上に成り立つ。この中で我々は、ヒトと同じ霊長類を用い、一般小児手術と同等のデバイス、体外循環を再現し、術後急性期の肺障害の病態(びまん性肺胞傷害、Diffuse alveolar damage: DAD)を忠実に再現できる、世界初のカンクイザル ARDS モデルの確立に成功した。その結果、術後急性期の骨髄から循環血への未熟活性化白血球の放出促進と、これら骨髄由来白血球 (BrdU 標識細胞; 後述) の肺循環への集積について、その臨床的意義を含め国内外で発表し、論文とした (*Ann Thorac Surg.* 2014)。

応募者(呼吸器外科医)はこれまで、生体刺激によって新たに動員される骨髄由来白血球の体内動態を明らかにし国内外で発表、CCL23 (myeloid progenitor inhibitory factor-1: MPIF-1) による病態制御の可能性を示した (Shih CH., Goto Y., et al. *Exp Hematol.* 2005)。CCL23は、MIP (macrophage inflammatory protein) -1aとほぼ相同のCCケモカインとして知られ、骨髄の細胞分裂過程を制御して骨髄刺激に対する白血球前駆細胞の保護作用が期待されている。

一方、手術侵襲における凝固線溶機転亢進の主要トリガーは、組織因子を発端とする外因系凝固経路にある。本研究では血管内皮細胞上のトロンビン受容体であるトロンボモジュリンによる抗炎症作用にも着想した。トロンボモジュリンはVaおよびVIIIa因子を分解、失活化し、凝固反応を制御する。トロンビンの凝固促進活性を直接阻害する作用を有し、近年、HMGB1蛋白の捕捉を介して好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を発揮する事が示されている (Abeyama K. ら、*J Clin Invest* 2005, Kudo D. ら、*Clin. Exp. Immunol.* 2013)。

今回、医薬基盤研究所より、霊長類医科学研究センターでの安定的な本実験用サル供給が実験計画と共に承認されるに至り、本研究では、我々の考えるSIRSからARDS発症のアイデア(左図)を基に、サルARDSモデルを用いて、CCL23による骨髄刺激抑制に加え、トロンボモジュリンの好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を併用(複合的薬理制御)し、手術侵襲が惹起する循環血中と骨髄由来白血球



の肺への集積を中心としたSIRS発症制御にチャレンジする。

2. 研究の目的

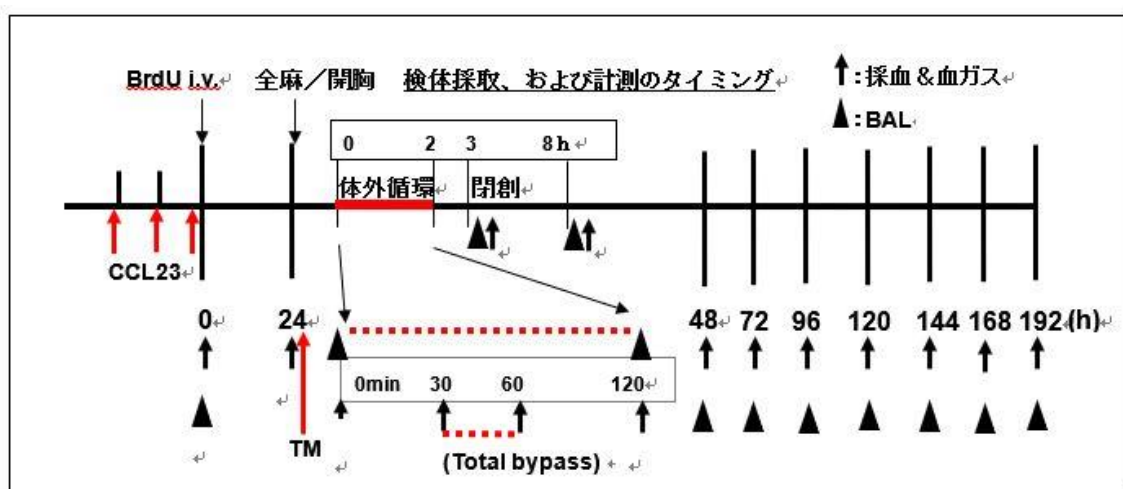
医学的に救急疾患となる、麻酔・手術侵襲による炎症機転亢進と高サイトカイン血症に基づく全身性炎症反応症候群(SIRS)、これに続く肺障害(ARDS)を抑止すべく、本研究では、SIRS発症に不可欠な白血球活性化に関して、循環血由来白血球に加え近年注目されている骨髄由来白血球に着目し考察する。これまでの基礎研究で得られた、CCL23による骨髄刺激抑制と、トロンボモジュリンの術中投与による好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を併用し、均一化され

た *in vivo* モデルを用いて ARDS 発症に対する革新的予防手段を検証、確立する事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

BrdU を静注 (100mg/kg) しカニクイザル(Adult male; B.W. 5kg 前後)の骨髄前駆細胞を標識する。24 時間 (BrdU 標識白血球が骨髄より放出され始める) 後、手術 (体外循環) 実験を開始する。全身麻酔下に胸骨正中切開、ヘパリン 3mg/kg を体外循環直前に静脈内投与する。その後、30 分間の完全体外循環 (Total bypass: 肺虚血モデル) を含む、計 120 分間の軽度低体温体外循環をおこなう。開始後 120 分後に体外循環から離脱し、止血ののち閉創する。術中、および術後一週にわたり経時的に血液検体、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液の採取をおこなう。

これを基本モデル (コントロール群) とするが、本群は先行研究にて既に終了している。



従って本研究 (プロトコール: 上図) では、CCL23、トロンボモジュリンによる骨髄刺激および活性化白血球制御のいかんにより、treated 群として、以下の 3 群を追加し、比較検討する。

- ① [CCL23 群]; CCL23 (recombinant human CCL23, 100 μ g/kg) を術前に静注し、骨髄の細胞分裂過程を制御して骨髄刺激に対する白血球前駆細胞の保護作用により、骨髄由来活性化白血球を制御する。(Shih CH, Goto Y, et al. *Exp Hematol.* 2005; 33:1101-8.)
- ② [トロンボモジュリン (TM) 群]; 血管内皮細胞上のトロンビン受容体であるトロンボモジュリン (recombinant TM, 380 U/kg) を術直前に添加し凝固促進活性を直接阻害、より広範な凝固遮断を図り、さらには好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を発揮させる。(Morizumi S, Goto Y, et al. *J Card Surg.* 2014;29:35-40)
- ③ [①+②群]; CCL23 とトロンボモジュリンによる術後肺障害に対する複合的薬理制御を試みる。

4. 研究成果

本研究期間では、上記 treated 群のうち、CCL23 群のみで施行終了となり、学会発表、論文作成に至っている。CCL23 投与群では CPB による骨髄刺激 (血中 band cell 数上昇) が抑制され (Fig.1B)、好中球および単球の骨髄通過時間 (Transit time) を有意に延長 (Table1) し、循環血中への白血球放出を抑制した (Fig.2)。また、BrdU 陽性白血球の肺 BAL 液中への出現数は、投与群で有意に減少した (Fig.3)。一方で、術後 BAL 液中サイトカイン濃度の推移に有意差を認めなかった (Fig 5)。CCL23 投与による骨髄由来白血球の肺への動員抑制が、術後急性肺障害の発症予防に寄与する可能性が示唆される。

Figure 1

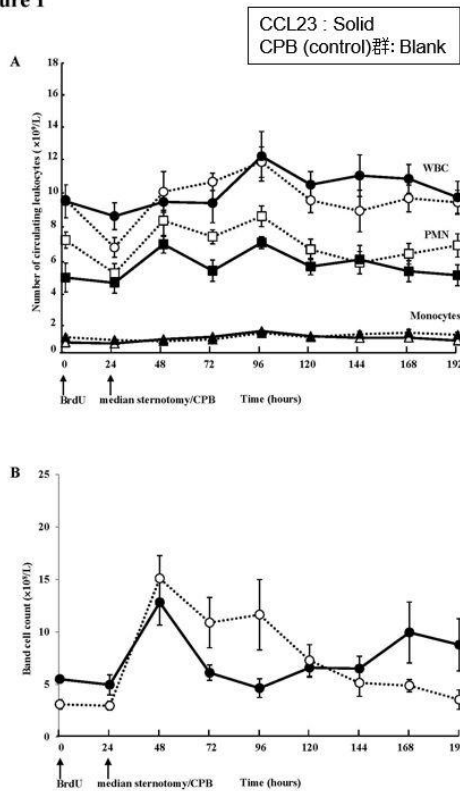


Table 1.

Transit Times of Leukocytes through the Bone Marrow

| Group (n) | PMNs (h) | Monocytes (h) |
|-------------------|----------------|---------------|
| CPB (controls: 4) | 95.5 ± 4.1 | 62.0 ± 3.0 |
| CCL23 (3) | 118.4 ± 11.7 * | 91.6 ± 5.0 * |

*P < 0.05 versus control group.

All values represent the means ± SE.

CPB = cardiopulmonary bypass; n = number of experimental monkeys; h = hours.

Figure 2

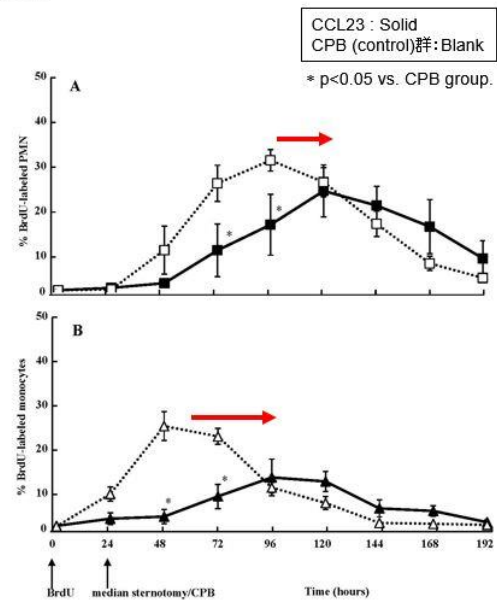


Figure 2: Percentages of circulating (A) BrdU-labeled PMNs and (B) monocytes after operations with CPB (controls, dashed line; CCL23 group, solid line). A peak of each BrdU-labeled PMN and monocyte appearance after the BrdU injection in CCL23 group was significantly later than that in control group. Each value represents mean ± standard error (SE). *P < 0.05 versus control group.

Figure 3

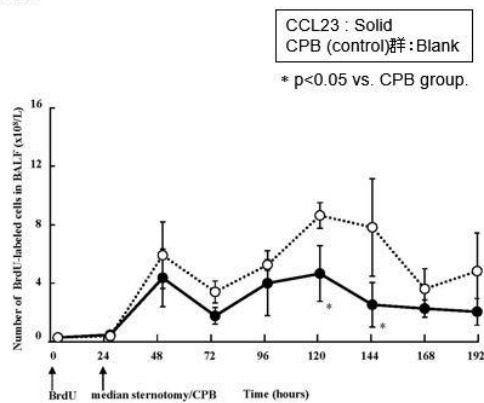


Figure 3: Number of BrdU-labeled cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after operations with CPB (controls, dashed line; CCL23 group, solid line). CPB caused a significant increase in bone marrow derived leukocytes within 24 hours after CPB, reaching a peak at 96 hours after operations (controls). Recruitment of BrdU-labeled cells to alveolar spaces from 96 to 120 hours after CPB was significantly suppressed in the CCL23 group compared to the control group. Each value represents mean ± standard error (SE). *P < 0.05 versus control group.

Figure 5

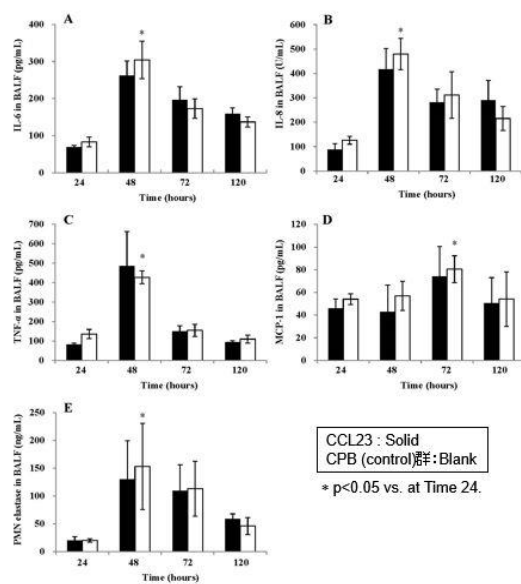


Figure 5: (A) Interleukin (IL)-6, (B) IL-8, (C) TNF-α, (D) MCP-1, and (E) PMN elastase levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after operation with CPB (controls, unfilled bars; CCL23 group, filled bars). Surgical procedure was performed at time 24 hours and induced an increase in all of these cytokine levels after the operation, however no significant differences were seen between groups. Each value represents mean standard error (SE). *P < 0.05 versus values at time 24 hours.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- (1) Goto Y., Hiramatsu Y., Ageyama N., Sato S, Mathis BJ, Kitazawa S, Matsubara M, Sakamoto H, Sato Y. Rolipram plus Sivelestat inhibits bone marrow-derived leukocytic lung recruitment after cardiopulmonary bypass in a primate model. J Artif Organs. 2019;22(1):44-52 DOI 10.1007/s10047-018-1071-0 (査読有)

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) Goto Y., Hiramatsu Y., Ageyama N., Kitazawa S, Kobayashi N, Matsubara M, Kikuchi S, Ichimura H, Sato Y.: Sivelestat and Rolipram synergistically inhibit leukocyte recruitment to the lungs after cardiopulmonary bypass. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Association for Thoracic Surgery. 2018 年 10 月 6 日 品川
- (2) Goto Y., Hiramatsu Y., Ageyama N., Kitazawa S, Kobayashi N, Matsubara M, Kikuchi S, Ichimura H, Sato Y.: Effects of CCL23/myeloid progenitor inhibitory factor-1 on kinetics of bone marrow-derived leukocytes associated with CPB. The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Association for Thoracic Surgery. 2017 年 9 月 29 日 札幌

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/respiratory/staff/staff03.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平松 祐司

ローマ字氏名：HIRAMATSU, Yuji

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号：30302417

研究分担者氏名：揚山 直英

ローマ字氏名：AGEYAMA, Naohide

所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

部局名：霊長類医科学研究センター

職名：主任研究員

研究者番号：50399458

研究分担者氏名：井上 貴昭

ローマ字氏名：INOUE, Yoshiaki

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系
職名：教授
研究者番号：60379196

研究分担者氏名：佐藤 幸夫
ローマ字氏名：SATO, Yukio
所属研究機関名：筑波大学
部局名：医学医療系
職名：教授
研究者番号：10312844

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。