

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20381

研究課題名(和文)リコモジュリンの抗炎症効果による重症敗血症抑制効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of anti-inflammatory effect of recombinant thrombomodulin for severe sepsis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症時には過剰炎症により全身の血管内皮障害が引き起こされ、多臓器不全が進行する。リコンビナントトロンボモジュリン(rTM)は抗凝固作用に加えて抗炎症作用を有することが知られている。本検討により敗血症マウスと比較しrTM投与マウスでは、LPS投与48時間後の生存率が有意に改善し、心臓、肺、肝臓、腎臓の臓器障害も有意に抑制された。各臓器の微小血管の超微形態を観察すると、敗血症マウスでみられた血管内皮内腔構造の破綻やその表面にある血管内皮グリコカリックスの逸脱がrTM投与マウスで抑制されていた。以上より、rTMを投与することで血管内皮傷害から保護し、生存率の改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Multiple organ failure often occurs in sepsis via vascular endothelial injuries. It was recently reported that recombinant thrombomodulin (rTM) had anti-inflammatory and anticoagulant effects in sepsis. As a result, rTM-treated mice were significantly decreased mortality and each organ failures including heart, lung, liver and kidney compared with LPS-treated mice. In septic mice, endothelial wall became destroyed and endothelial glycocalyx was peeled away. On the other hands, rTM therapy attenuated endothelial injuries and endothelial glycocalyx injuries. These results demonstrated that rTM attenuates LPS-induced sepsis caused microvascular injuries and increases survival rate.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 多臓器不全 リコンビナントトロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

敗血症は重症化すると炎症が全身に波及し、その感染臓器のみならず他臓器でも機能不全をきたし死に至る。その機序の一因として過剰炎症により全身の血管内皮障害が引き起こされ、多臓器不全が進行すると考えられている。そのため、臓器障害を認める敗血症に対して抗炎症を目的とした多くの抗炎症薬剤を使用した臨床試験が世界中で行われたが、生存率を改善させたものはただ一つとしてなかった。現在においても敗血症に対しては感染巣のコントロールを目的とした抗菌療法、排膿と発症した各臓器障害の重症度に合わせた対症療法を行っているにすぎない。日本で開発されたりコンビナントロンボモジュリン (rTM) は抗凝固作用に加えて抗炎症作用を有することが知られており、日本では敗血症性播種性血管内凝固症候群 (DIC) に対してすでに臨床使用されている。しかしながら、その抗炎症作用が敗血症にどの程度影響しているか、その効果はまだ十分に確認されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、敗血症モデルマウスを用いて rTM 投与することによる敗血症時の致死率改善効果、各臓器傷害抑制効果検討することである。その評価は各臓器の微小血管傷害に着目し、電子顕微鏡を用いて微小形態学的に検証する。そのメカニズムを分子生物学的に解明し、敗血症治療に抗炎症からの新たな治療戦略を加えることである。

3. 研究の方法

実験 1、敗血症モデルマウスの作製と血管内皮傷害の超微形態解析の確立

当研究室では C57BL6 マウスに LPS20mg/kg を腹腔内投与する敗血症モデルマウス確立している。観察対象マウスを屍殺後、まず従来法である 2.5% グルタルアルデヒドを注入し灌流固定を施行。次いで、当研究室で確立している硝酸ランタンによる電子染色を行い、血管内皮グリコカリックスを観察する固定法を施行した。

実験 2、rTM の至適濃度の検討、サバイバルスタディ

LPS 投与後 3 時間、24 時間に rTM を腹腔内投与する際に投与量 (1mg/kg, 30mg/kg, 100mg/kg) を変更して有効投与量を検討する。

実験 3、rTM の治療効果の検討

Sham マウス、敗血症マウス、rTM 投与マウスの 3 群で臓器不全抑制効果の検討を行った。LPS 投与 48 時間後に血清、臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓) を採取し、生化学、炎症マーカー (HMGB1)、血管内皮傷害マーカー (Thrombomodulin)、グリコカリックス傷害マーカー (Syndecan1) の評価、微小血管の超微形態学的観察を行った。

4. 研究成果

結果 1、

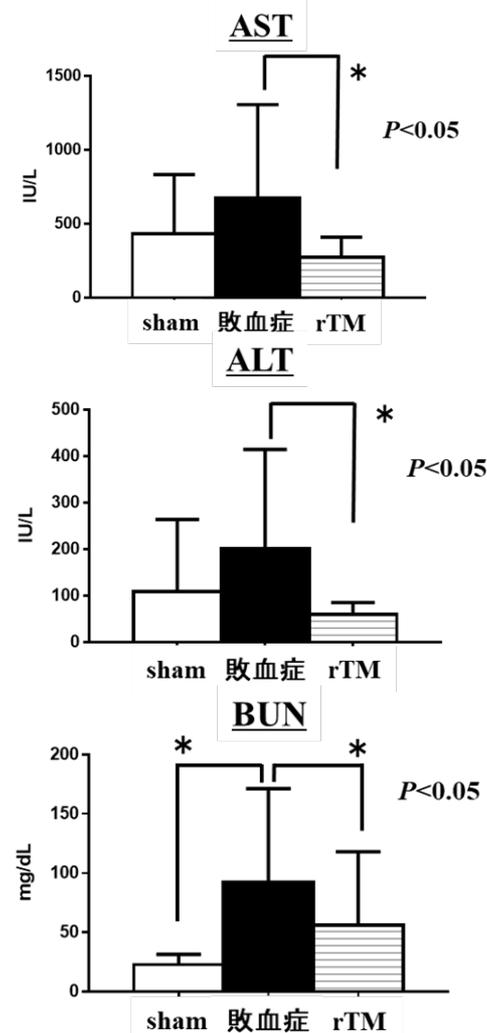
Sham マウス、敗血症モデルマウスの各臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓) の血管内皮傷害を超微形態より比較検討した。いずれの臓器でも従来法では敗血症モデルマウスで正常構造の血管内皮は肥厚し、内腔構造の破綻が認められた。グリコカリックス描出法では同じく Sham マウスではいずれの臓器でもグリコカリックスが血管内腔を覆っているが、敗血症マウスでは逸脱していることが認められた。

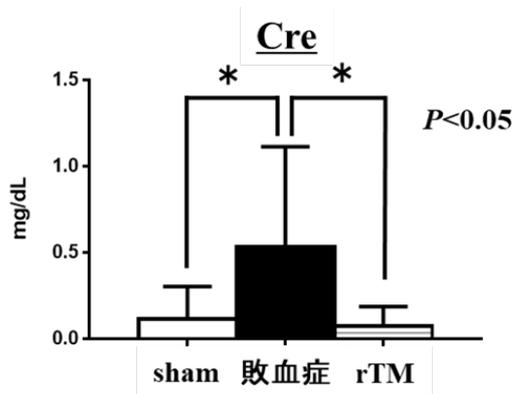
結果 2、

本敗血症モデルは 48 時間後の生存率が 20% 程度である。rTM 投与群における LPS 投与 48 時間後の生存率は 1mg/kg, 30mg/kg, 100mg/kg でそれぞれ 33.3%, 100%, 0% であった。よって、本検討では 30 mg/kg を投与量として設定した。

結果 3

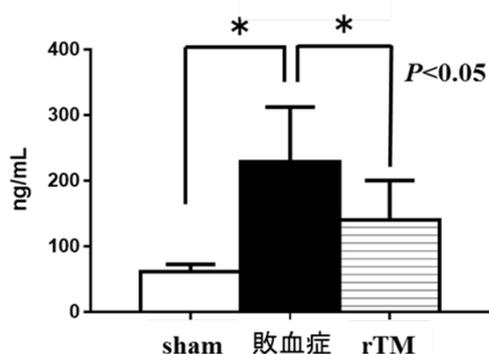
敗血症マウスと rTM 投与マウスを比較すると、肝機能酵素 (AST, ALT)、腎機能 (BUN, Cre)、血清トロポニン I 値、血清 HMGB1 値において rTM 投与マウスで有意に低値であった。肺組織において好中球の浸潤は rTM 治療マウスで有意に抑制されていた。以上より、rTM 投与マウスでは敗血症マウスと比較し臓器不全抑制効果が認められた。



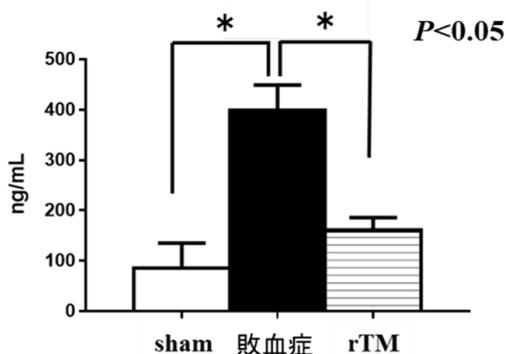


さらに血清 Thrombomodulin、Syndecan1 は rTM 投与マウスで有意に低下しており、各臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓)での発現も低下、さらに免疫染色を行うと血管内皮での発現が低下していた。つまり、敗血症時には逸脱する Thrombomodulin、Syndecan1 は rTM の投与により抑制されることが分かった。

Thrombomodulin



HMGB1



さらに超微形態を観察すると、rTM 投与群で明らかに血管内皮グリコカリックスが傷害されずに形態を保っていた。

以上の結果より、敗血症時には血管内皮細胞、血管内皮グリコカリックスが傷害されることがわかった。そして、rTM を投与することでそれらの傷害から保護し、さらに生存率の改善に寄与する可能性が示唆された。

今後は血管内皮グリコカリックスと rTM の

保護効果について、その機序を解明すべく検討を進めていく。

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 2 件)

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

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*. 査読有. 2017 Oct 23;21(1):261.

[学会発表](計 13 件)

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

鈴木浩大, 岡田英志, 小田和正, 岡本遥, 北川雄一郎, 福田哲也, 吉田省造, 牛越博昭, 豊田泉, 小倉真治. 敗血症性心筋傷害に対するリコンビナントトロンボモジュリンの治療効果の検討. 第45回日本救急医学会総会. 大阪, 2017年11月

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, 吉田隆浩, 豊田泉, 小倉真治. 敗血症性肺血管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

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, 吉田隆浩, 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. 2017年11月

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

岡本遥、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、小田和正、吉田隆浩、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
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

鈴木浩大、岡田英志、小田和正、岡本遥、田中卓、中野志保、吉田隆浩、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効果の検討. 第44回日本救急医学会総会, 東京, 2016年11月

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 8th Congress of the International Federation of Shock Society, Tokyo, 2016 October

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 8th Congress of the International Federation of Shock Society, Tokyo, 2016 October

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 8th Congress of the

International Federation of Shock Society, Tokyo, 2016 October

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トラーゼ. 日本SHOCK学会 東京 2016年10月
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 May

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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