

令和元年6月17日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15578

研究課題名(和文)敗血症誘発性炎症反応及び臓器障害とエストロゲン受容体との関連の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between sepsis-induced organ damage and the estrogen receptor.

研究代表者

富田 賢吾 (Tomita, Kengo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：20758213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症は種々の抗菌薬治療が確立した現在においても未だにICUで高い死亡率を有している。敗血症は未だに決定的治療法が模索されており、敗血症病態を惹起するメカニズムの解明は世界的に喫緊の課題となっている。本研究では、ICUの現場における女性患者の炎症に対する抵抗力の高さがエストロゲンの作用によるものだとすると仮定し、エストロゲンの作用が敗血症モデルマウスの予後に変化を及ぼすか検討した。その結果、本実験結果において敗血症に対してエストロゲンが炎症性サイトカインの発言や臓器障害について差を認めなかった。一方、抗VEGF抗体を投与したモデルマウスでは有意に肺胞洗浄液内IgMの減少を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は当初仮定していたエストロゲンの敗血症性炎症性反応および臓器障害への影響があることを確認できなかった。一方、抗VEGF抗体を投与したモデルマウスにおいて有意に肺胞洗浄液内の血管透過性の指標として用いられているIgMの減少を認めたことから、抗VEGF抗体によって肺の微小血管透過性亢進の病態を抑制できる可能性を示唆し、今後敗血症によるARDSの治療に対する応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Sepsis still has a high mortality rate in the ICU, even at present when various antimicrobial therapies have been established. The definitive therapy of sepsis is still groped, and the elucidation of the mechanism of sepsis becomes an urgent problem worldwide. In this study, it was assumed that the high resistance for the inflammation of the woman patient in the field of the ICU was caused by the action of the estrogen, and whether the action of the estrogen affected the prognosis of the septic model mouse was examined. As a result, the estrogen did not recognize the difference in the expression of the inflammatory cytokine and organ damage in this experimental result. In the meantime, the decrease of IgM in the bronchoalveolar lavage fluid was significantly decreased in the CLP mouse which administered the anti-VEGF antibody.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は種々の抗菌薬治療が確立した現在においても未だに ICU で 25% もの高い死亡率を有しており、特に敗血症性ショックを伴うものは予後が悪く、院内死亡率は 30-50% と非常に高くなる。2016 年には敗血症ガイドラインが見直され、「感染症を伴う生命を脅かす臓器障害」と新しく定義された。炎症を重視していた「感染を基盤とした全身性炎症反応症候群(SIRS)」とされた従来の診断基準よりも、新基準は臓器障害を重視した、より重症な集団に絞ったものとなった。このように敗血症は未だに決定的治療法が模索されており、敗血症病態を惹起するメカニズムの解明は世界的に喫緊の課題となっている。

### 2. 研究の目的

集中治療室での敗血症症例では女性患者の方が男性患者に比べて炎症性サイトカインの産生が低く、予後が良好であることが知られている。動物を用いた研究においても雌性動物での炎症反応が雄性動物よりも軽微であることが報告されている。しかしその詳しい機序は明らかにされていない。そこで本研究では、①卵巣摘出術を施したマウスにおける、敗血症病態の進行とエストロゲンとの関連を解明する。②エストロゲン受容体ノックアウトマウスを使用した敗血症モデルマウスにおける病態生理の違いを明らかにする。以上のことを検討することにより、エストロゲンと敗血症性炎症反応の詳細な関連が明らかとし、敗血症病態の新たなメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物モデルの作成及び組織サンプルの採取

9 週齢の雌性マウスを以下の 3 群に分けて処置を施す。

1. Sham 手術群 (腹部切開のみで縫合)

2. 卵巣摘出術 (腹部切開後卵巣摘出し縫合)

3. エストロゲン補充群 (卵巣摘出後、皮下に包埋した浸透圧ミニポンプから  $17\beta$ -estradiol 0.5-1  $\mu\text{g/day}$  を持続投与)。

上記処置した一週間後にマウスを麻酔下で左臍下に約 5mm の切開を入れ、盲腸を膨出する。盲腸の先端に糞便を充満させた後、先端約 2 mm を結紮し、21G 針で 2 箇所穿孔を加える。対照群として盲腸結紮穿孔のみを行わない、すなわち腹膜切開と盲腸先端膨出に留めたものを設ける。その後盲腸を腹部に戻し、4.0 ナイロン糸で縫合を行う。このモデルでは 80% 以上は 48 時間以内に死亡することから、臨床病態に近い敗血症モデルと考えられている。盲腸結紮穿孔後 24 時間後に血液及び各臓器を (肺、肝臓、腎臓) をセボフルラン麻酔下に還流後サンプリングを行う。

#### (2) 敗血症性誘発性の炎症性サイトカイン発現

敗血症により増加する炎症性サイトカインである  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{MCP-1}$  の遺伝子発現を realtime PCR 法にて定量する。

#### (3) 組織学的染色法を用いた敗血症誘発性の臓器障害の評価

各臓器 (肺、肝臓、腎臓) の切片を作成し、HE 染色をしたのちに顕微鏡で観察する。

#### (4) 敗血症モデルマウスの血中にける VEGF 濃度の測定。

CLP18 時間後にセボフルラン麻酔下に血液をサンプリングし、VEGF を ELISA 法で測定する。

(5) 敗血症性 ARDS モデルマウスとして、LPS 60 $\mu\text{g}$  をマウスに経鼻投与し 24 時間経過後気管支肺胞洗浄液を採取し、血管透過性の指標として用いられている IgM 濃度の変化を測定する。

### 4. 研究成果

(1) 卵巣摘出 (OVX) 一週間後に浸透圧ミニポンプで  $17\beta$ -estradiol (E2) 補充したマウスの血中濃度を検討した。その結果、OVX マウスに比べて E2 の持続投与では有意な血中濃度の増加を認めた (図 1)。

(2) 敗血症性誘発性の炎症性サイトカイン発現を腎臓において検討した。炎症性サイトカインである  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{MCP-1}$  の遺伝子発現を realtime PCR 法にて検討した。その結果、卵巣摘出を施した Sham と CLP では有意な炎症性サイトカインの発現増加が見られるが、仮説に反して、エストロゲン補充を行った CLP 群では OVX+CLP 群と比較して有意な変化は認められなかった (図 2)。

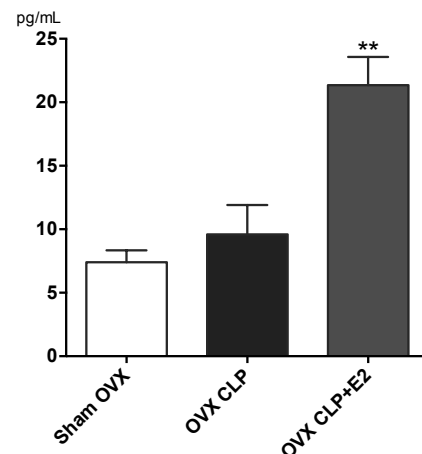


図1.  $17\beta$ -estradiol 血漿濃度

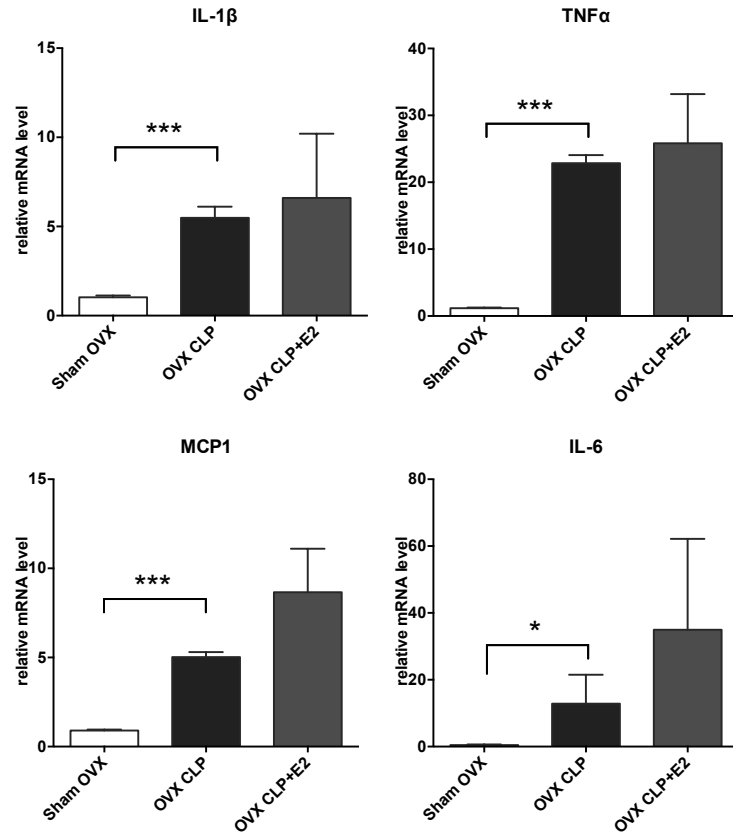


図2. 腎における炎症性サイトカイン遺伝子発現

(3) 組織学的染色法を用いた敗血症誘発性の臓器障害の評価を肺，肝臓，腎臓の切片を用いて HE 染色を行い評価した。その結果，炎症性サイトカインの発現と同様にエストロゲン補充を行った CLP 群と OVX+CLP 群の比較において有意な変化は認められなかった。これらの結果より，卵巣摘出におけるエストロゲンの補充の効果は見られたが敗血症における炎症性サイトカインの発現や臓器障害における変化を認めなかった。

(4) 敗血症による新たなメカニズムを注目する上で次に血管透過性の亢進因子である VEGF に注目した。血管内皮細胞増殖因子である VEGF は内皮細胞の増殖を始めとした血管新生過程の促進作用やリンパ管形成作用で知られるが，内皮の細胞間結合を解離させることによって血管に透過性をもたせ，浮腫を引き起こす作用もある。敗血症モデルマウスの血中における VEGF 濃度を変化を検討した結果，CLP 後 18 時間において有意な VEGF の増加を認めた (図 3)。

(5) 最後に LPS 60  $\mu$ g を経鼻投与した敗血症性 ARDS モデルマウスの肺胞洗浄液中の IgM を測定したところ，Sham モデルと比較し明らかな上昇を認めた。加えて抗 VEGF 抗体であるベバシズマブを投与したモデルマウスでは有意に IgM の減少を認めた。このことから，抗 VEGF 抗体によって肺の微小血管透過性亢進の病態を抑制できたのではないかと示唆される (図 4)。

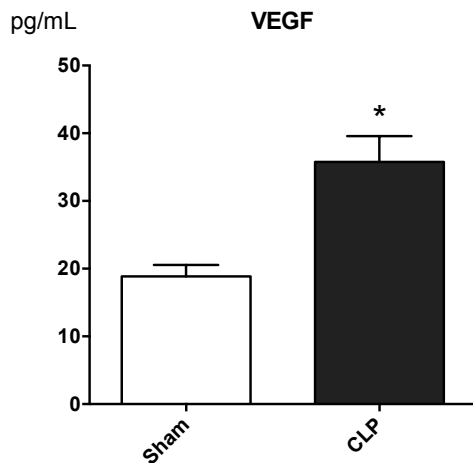


図3. VEGF 血中濃度

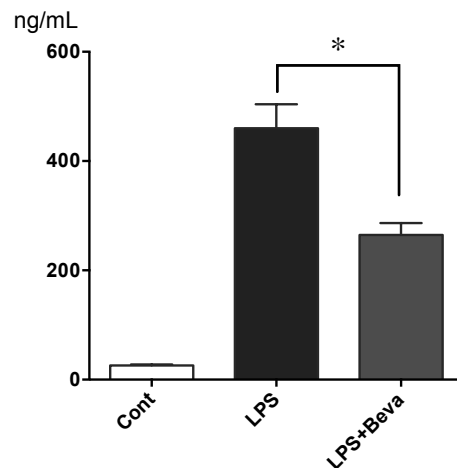


図4. 肺胞洗浄液内IgM濃度

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

1. 齊藤優奈、富田賢吾、Samar Imbaby、山崎弘美、渡邊泰秀、服部裕一：敗血症病態における肺微小血管透過性亢進に対する VEGF の寄与について. 第 28 回日本循環薬理学会 東京 B-05 2018 年 12 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：富田 賢吾

ローマ字氏名：TOMITA, Kengo

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部（医学）

職名：助教

研究者番号（8 桁）：20758213

※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。