

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17044

研究課題名（和文）ECMO症例におけるmicrovesiclesの臓器障害に対する役割

研究課題名（英文）Role of microvesicles in organ injury in patients on ECMO

研究代表者

塩田 修玄（Shiota, Nobuhiro）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30771779

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）：本研究はECMO 管理中において問題となる多臓器不全の発症機序について、細胞外小胞の一種であるmicrovesicles の解析を通して検討するべく計画された。本研究においてある種の血球細胞由来のmicrovesiclesが模擬ECMOモデルにおいて増加することが示され、多臓器不全の新規バイオマーカー、もしくは多臓器不全の発症機序の解明につながる可能性が考えられた。本研究成果を基に企業との共同研究契約が締結された。また、研究チームの大学院生がJSPSの海外若手挑戦プログラムに採用されて、今後は国際共同研究として発展する見通しである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ECMOは最重症の呼吸・循環不全患者に用いられる長期使用型人工心肺装置であるが、依然としてECMO 症例の致死率は50%程度と高値であり、その合併症の軽減及び予後の改善は社会経済にも大きな影響を与える。本研究では、実験モデルを用いて、細胞外小胞の一種であるMicrovesicles(MV)がECMO管理中に血中で増加することを示した。本研究は、血球細胞由来のMVの多臓器不全の新規バイオマーカーとしての有用性及び、血球細胞由来のMVが多臓器不全の発症において重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is an indispensable tool in the ICU to rescue critically ill patients. Whereas ECMO provides an ultimate cardiorespiratory support for critically ill patients, this also incurs number of fatal complications including systemic inflammation resulting in multiple organ failure (MOF).

Microvesicles (MV) carry a variety molecular cargo providing an alternative pathway for intercellular communications thus could cause systemic inflammation. In this study, we developed an experimental ECMO model and investigated MV numbers and their subtypes in human blood plasma during an experimental ECMO run.

We demonstrated that blood cell-derived MV increased in plasma in proportion to pump speed. In addition, MV was increased earlier than free hemoglobin, a conventional cell damage marker. Our findings suggest that blood cell-derived MV may serve as a useful early biomarker of MOF in ECMO patients, which warrants further investigation.

研究分野：集中治療医学

キーワード：集中治療医学 補助循環 ECMO 生理学 免疫学 トランスレーショナルリサーチ 細胞・組織 細胞外小胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

体外式膜型人工肺(ECMO: Extracorporeal Membrane Oxygenation)は、最重症の呼吸・循環不全患者に用いられる長期使用型人工心肺装置である。重症インフルエンザ肺炎の致死率を低下させた臨床研究を契機として 2010 年頃から ECMO 症例数は世界的に増加し、関連機器や管理の質も格段に向上した。しかし、炎症の伝播による多臓器不全や血栓性・出血性合併症のため、依然として ECMO 症例の致死率は 50%程度と高値である。ECMO 管理中の生理学的な理解や工学的な技術発展は認める一方で、ECMO 管理中の生物学的反応は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は ECMO 管理中において問題となる多臓器不全の発症機序について、国際共同研究を通して当科で可能となった Microvesicles(MV)の解析を応用して検討するべく計画された。本研究の主たる目的としては、以下の 3 つであった。

- (1) 小児・成人 ECMO 症例における MV と臓器障害の関連についての国内多施設研究
- (2) ECMO 回路の各構成要素が MV 産生・活性化に果たす役割の解明
- (3) in vitro/vivo 実験系を用いた ECMO 症例における MV の生理的活性の評価

3. 研究の方法

(2)に関しては、日本赤十字社と他企業からの協力も得て、ヒト全血製剤及び小型膜型人工肺を用いた模擬 ECMO モデルを樹立し、回路内を還流させた全血製剤に由来する血漿中の MV を解析した。MV の由来(親細胞)は細胞特異的表面マーカーを用いてフローサイトメトリーで同定した。また、実験条件を変化させることによる MV 産生状況の変化を比較検討した。

(3)に関しては、2)で産生された血漿中の MV を遠心分離及び細胞特異的表面マーカーを用いて特定の種類の MV を抽出する方法を確立し、抽出した MV を培養細胞と共培養することにより生理的活性の評価を試みた。

(1)に関しては、他施設での倫理審査に時間を要し十分な pilot data を取得できなかった。検体採取に必要な協力体制は得られており、引き続き企業との共同研究として検討を進めていく予定である。

4. 研究成果

(1)模擬 ECMO モデルの確立

具体的には、保存液の入った全血製剤を生理的条件下で使用するために、全血製剤に対して重炭酸投与及び人工肺を介した 5%CO₂ ガスの投与を行い、調整した全血製剤を保温された模擬回路内に充填し、蠕動型ポンプにより回路内を 2 時間還流させ、血漿中の MV を解析した。

(2)模擬 ECMO モデルにおける MV 産生動態

模擬 ECMO モデルを用いた実験中の血液検査結果を Fig.1 に示す。実験中の酸塩基平衡及び電解質は生理学的範囲内に保たれていた。また、ECMO 管理中の血球傷害の指標として用いられる遊離ヘモグロビン値が上昇しないことを確認した。

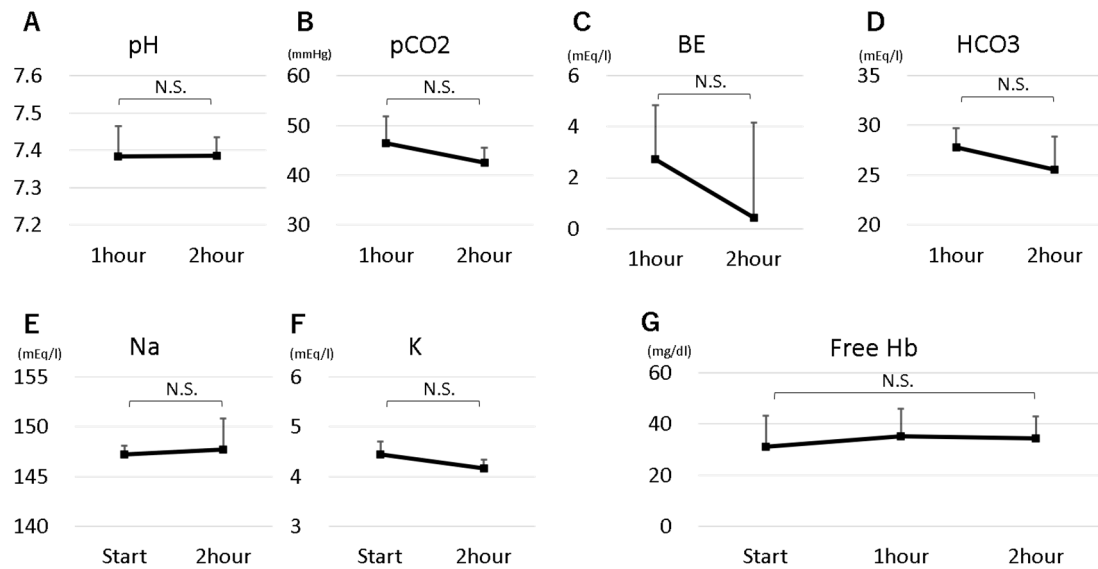


Figure 1. Results of blood test during experiments. Acid-base equilibrium (A~D) and electrolytes (E,F) was maintained in physiological range. The value of plasma free hemoglobin (G) did not rise. Mean+SD, n=4-6.

本モデルを用いて血漿中の MV を測定したところ (Fig.2)、各血球由来の MV 数の上昇を認め、ポンプ回転数の増加に伴い MV 産生数が増加傾向となることが示された。また、ある種の血球由来の MV は他の血球由来の MV と比較して早期から大幅に増加していた。

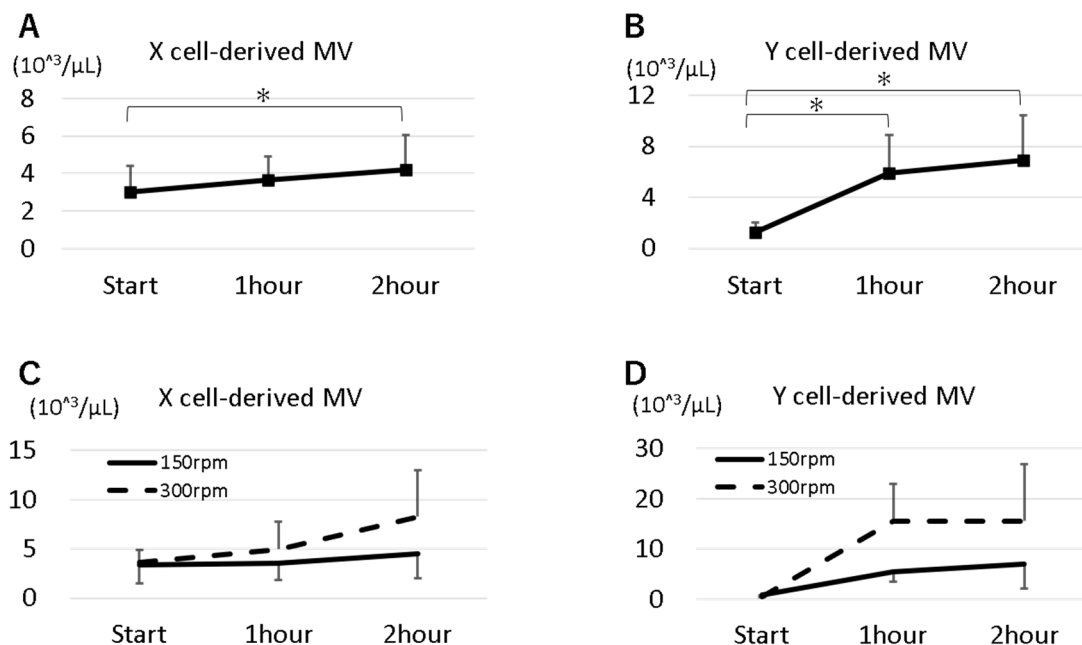


Figure 2. The number of plasma blood cell-derived MV increased in the experimental ECMO model. Y cell-derived MV (B) increased earlier than X cell-derived MV (A). Mean+SD, n=9-11, *P<0.05 by one way ANOVA with Bonferroni post hoc test. The number of blood cell-derived MV tended to increase as the pump speed increased. (C,D)

上記の結果より、血球細胞由来の MV が ECMO 管理中の血球傷害の新規バイオマーカーとして臨床応用できる可能性に加え、その生理活性の解析を通して ECMO 管理中の多臓器不全発症機構を明らかにできる可能性があると考ええる。

本研究結果を基に企業との共同研究契約が締結され、MV の生理活性及び臨床検体を用いた評価に関して継続的に検討を進めることとした。また、本研究成果を元に研究チームの大学院生が JSPS の海外若手挑戦プログラムに採用されて、今後は国際共同研究としても発展していく見通しである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Shiota Nobuhiro, Sato Sachiyo, Wakabayashi Kenji, Tsukada Yoko, Tanaka Marie, Shigemitsu Hidenobu |
| 2 . 発表標題 Multidisciplinary rounds shorten ICU length of stay in a Japanese university tertiary hospital |
| 3 . 学会等名 Society of Critical Care Medicine Congress (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Yoichi Iki, Shotaro Matsumoto, Michiko Abe, Kieran P. O'Dea, Hidenobu Shigemitsu, Masao Takata |
| 2 . 発表標題 Microvesicles are absorbed on the surface of extracorporeal membrane oxygenation circuit tubing. |
| 3 . 学会等名 Annual Meeting of International Society of Extracellular Vesicles (国際学会) |
| 4 . 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Shiota N, Sato S, Wakabayashi K, Tsukada Y, Tanaka M, Shigemitsu H |
| 2 . 発表標題 Multidisciplinary rounds shorten ICU length of stay in a Japanese university tertiary hospital |
| 3 . 学会等名 第45回日本集中治療医学会学術集会 |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Shiota N, Sato S, Wakabayashi K, Tsukada Y, Tanaka M, Shigemitsu H |
| 2 . 発表標題 Multidisciplinary rounds shorten ICU length of stay in a Japanese university tertiary hospital |
| 3 . 学会等名 Society of Critical Care Medicine Annual Congress 2018 (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 若林 健二 (Wakabayashi Kenji) | | |
| 研究協力者 | 壹岐 陽一 (Iki Yoichi) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|-------------------------|--|--|--|
| 英国 | Imperial College London | | | |