

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17048

研究課題名(和文) アンチトロンビン製剤による血管内皮保護効果の検討

研究課題名(英文) Anti-thrombin attenuates endothelial injury under endotoxemia

研究代表者

岡本 遥(池庄司)(OKAMOTO, Haruka)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50585239

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)：敗血症は感染症により臓器障害をきたすと考えられており、血管内皮傷害の存在も示唆されている。アンチトロンビン(AT)は抗炎症効果を有していることから、敗血症時の血管内皮傷保護効果と臓器障害抑制効果について検討した。10週齢のマウスにリポ多糖(LPS)を腹腔内注射し、LPS投与後3、24時間にAT 500U/kgを腹腔内投与した。LPS投与後48時間のマウスの生存率は未治療群で24%であったのに対しAT群は70%と有意に改善していた。超微形態では心臓、肺、肝臓においていずれも未治療群では血管内皮を覆うグリコカリックスの脱落を認めたと、AT群では保たれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリコカリックスは細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしており、その機能維持・回復は新しい治療の開発のターゲットとして注目されている。近年、ゲノム大量解析と同様に質量分析やグライコミクスによる網羅的解析は盛んであるが、疾患の病因・病態からのアプローチは遅れている。敗血症を起因とする臓器障害には現在のところ対症療法しか方法がないため、新規治療の開発は社会的意義の大きい研究である

研究成果の概要(英文)：Anti-thrombin (AT) was recently reported to protect eGC from septic vasculitis but the underlying mechanism is still unknown. The aim of the present study is to examine the structural basis and molecular mechanisms of AT effect on vascular endothelial injury in sepsis. Lipopolysaccharide (LPS) was intraperitoneally injected into 10-week-old male mice at a dose of 20 mg/kg and saline or rAT was intraperitoneally injected 3 and 24 h after LPS injection. Using serum and/or lung tissue, we performed analysis on histology and ultrastructure. Survival rate of the AT-treated mice was significantly higher than that of the control mice 48 h after LPS injection (70% vs 24%, $p < 0.05$). eGC injury in the heart, lung and liver capillaries was attenuated by AT treatment, as seen by thrombomodulin expression and ultrastructural analysis. AT treatment attenuated endothelial injury in multiple organ.

研究分野：救急・集中治療医学

キーワード：敗血症 血管内皮障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、病原体感染の結果として起こる臓器不全をきたした病態であり、多臓器不全に至り死亡する。病原体により放出されたりポ多糖 (LPS) が単球やマクロファージの toll-like receptor を活性化することで、腫瘍壊死因子 (TNF) を産生され、強力に好中球や血管内皮細胞を活性化し、その結果として血管内皮が傷害される。播種性血管内凝固症候群 (DIC) は、傷害された血管内皮が機能障害を起し、全身で微小血栓が形成亢進、分解抑制が引き起こされた病態である。

アンチトロンビン (AT) は、主に肝臓と血管内皮細胞で産生される糖タンパクであり、セリンプロテアーゼインヒビターとして、ほとんどすべての凝固系プロテアーゼを阻害する作用を有している。そのため、AT は線溶抑制型 DIC に対する抗凝固作用を目的として投与されるが、近年抗炎症作用を併せ持つことも報告されており、その効果にも期待されている。しかし、主病態である血管内皮傷害そのものに着目した研究は少なく、抗凝固作用、抗炎症作用が血管内皮に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

敗血症における臓器障害はサイトカインストームによる血管内皮傷害がその要因として考えられているがその詳細についてはいまだ議論の余地がある。アンチトロンビン(AT)製剤は、播種性血管内凝固症候群 (DIC) の治療薬として広く臨床に用いられている。

本研究の目的は AT が血管内皮障害を抑制し、微小循環障害を保つことで臓器障害を抑制することを検証することである。

3. 研究の方法

10 週齢の C57BL6 雄性マウスにリポ多糖 20mg/kg を腹腔内投与することで敗血症性血管炎マウスを作製。LPS 投与 3 時間、24 時間後に AT を 500 IU/kg の Dose で腹腔内投与を行い、臓器障害に対する AT の治療効果を検討する。

AT 投与後採取した血清を用いた生化学検査、病理学的検討をおこない臓器障害の程度を評価し、トロンボモジュリンによる血管内皮障害を定量する。

次に血管内皮細胞の掉尾形態学的検討を行う。10 週齢のオスの C57BL6 マウスを屠殺し、グルタルアルデヒドと硝酸ランタンを含んだカコジル酸バッファーを 100mmHg の圧で左心室心尖部より注入し 5 分間還流固定を行う。還流固定後素早く臓器を取り出し、さらに 2 時間還流液に浸した後、グルタルを除去したカコジル酸バッファーに置換しさらに一晩浸す。翌日アルカリ性の洗浄液で洗浄後カコジル酸バッファーに浸す。このようにして得たサンプルを、液体窒素による凍結切断法を用いて走査型電子顕微鏡用のサンプルを作製する。また、同様に作成したサンプルを脱水しエポキシ樹脂に埋め込み透過型電子顕微鏡用のサンプルとして使用する。これらサンプルを走査型電子顕微鏡 (S-4500, Hitachi) と透過型電子顕微鏡 (HT7700, Hitachi) を用いて観察を行う。

4. 研究成果

LPS 投与 48 時間後の生存率を比較し屠殺した。コントロール群は PBS を腹腔内注射したマウスを用いた。投与後 48 時間のマウスの生存率はコントロール群で 24% (12/50) であったのに対し AT 投与群は 70% (28/40) と有意に改善していた (FIGURE 1A)。

血管内皮障害のマーカーである血清トロンボモジュリンと心筋障害マーカーである血清トロポニン I が AT 治療群で有意に低下していた。(FIGURE 1B,C) 敗血症において血清トロポニン I が上昇していたことから、敗血症において心筋障害が生じていることが推測され、その原因が微小血管障害による微小梗塞ではないかと推測されたため Hypoxia Probe

により虚血の有無を検討したところ敗血症マウスの心筋細胞には Hypoxia Probe の集積が散発して見られた。(FIGURE 2)。

トロンボモジュリンは通常血管内皮に存在しており、凝固・線溶系の機能において中心的役割を果たしており、その血中への逸脱は血管内皮障害を意味する。心臓に対してトロンボモジュリンの免疫染色を行うと通常では心臓毛細血管の血管上皮にトロンボモジュリンの発現が確認できるが、LPS 投与により血管炎を惹起させると心血管内皮でのトロンボモジュリンの発現が確認できなくなり血管内皮のトロンボモジュリンが逸脱していることがわかる。一方で AT 治療群ではトロンボモジュリンが逸脱せず、血管保護作用が確認できる。

(FIGURE 3)

次に、走査型ならびに透過型電子顕微鏡にて血管内皮の観察を行った。近年、血管内皮の管腔表面に存在する内皮グリコカリックス層は血管透過性調節においての重要な役割を担っていることが明らかにされ、敗血症では同時多発的に臓器障害が生じるがその要因の一つとしてサイトカインストームによる血管内皮グリコカリックス層の傷害があげられる。グリコカリックスはその構造が不安定であるため、硝酸ランタンによる電子染色を行いその構造を描出した (FIGURE 4)。

心臓毛細血管では血管内皮グリコカリックスは血管内皮細胞表面を覆うように存在し、血管内皮表面を保護しているが、LPS 投与により剥がれ落ち、血管内皮が露出した形となっている。これに対し AT により治療を行うと、グリコカリックスの構造が維持されてお

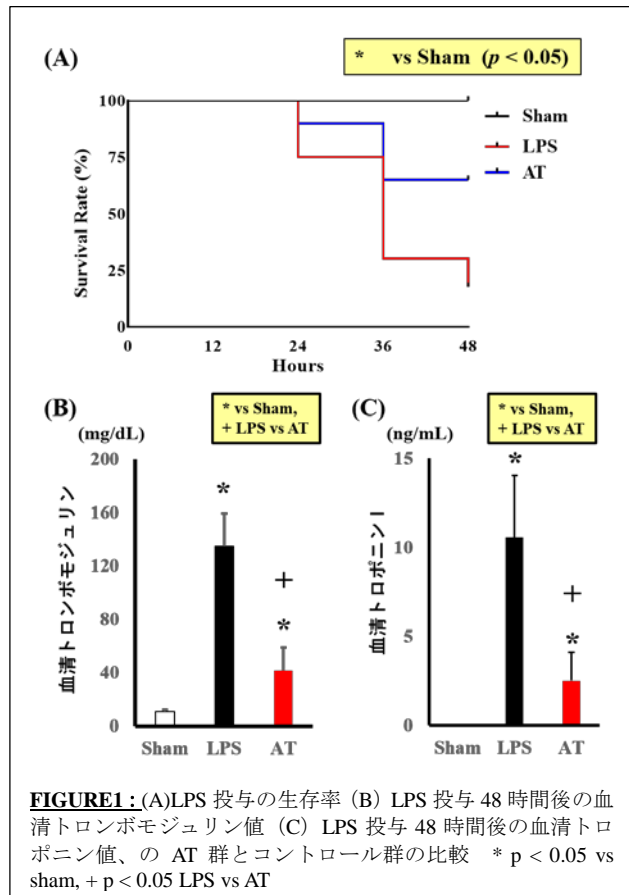


FIGURE 1: (A) LPS 投与の生存率 (B) LPS 投与 48 時間後の血清トロンボモジュリン値 (C) LPS 投与 48 時間後の血清トロポニン値、の AT 群とコントロール群の比較 * p < 0.05 vs sham, + p < 0.05 LPS vs AT

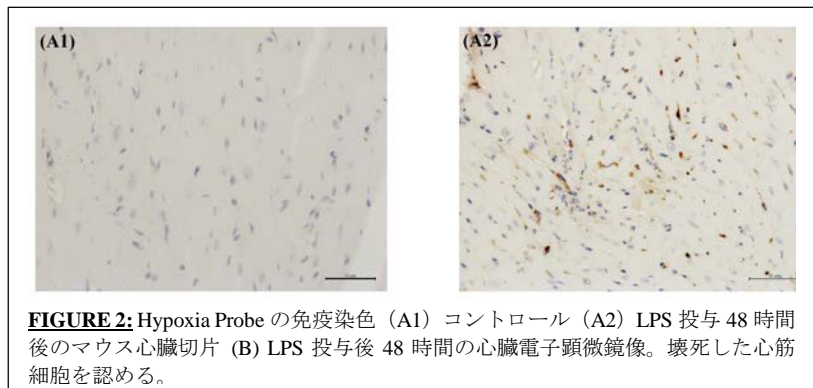


FIGURE 2: Hypoxia Probe の免疫染色 (A1) コントロール (A2) LPS 投与 48 時間後のマウス心臓切片 (B) LPS 投与後 48 時間の心臓電子顕微鏡像。壊死した心筋細胞を認める。

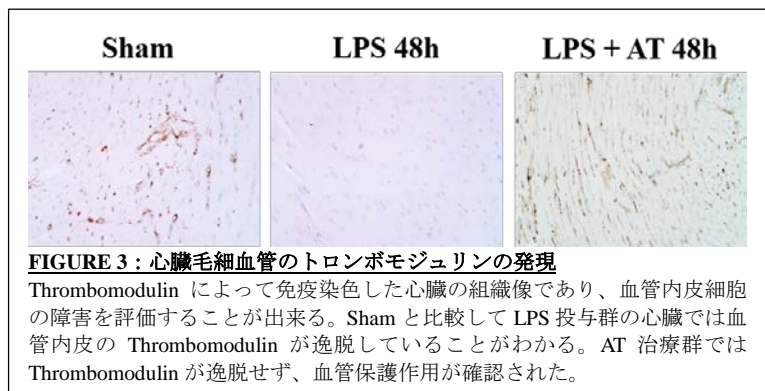


FIGURE 3: 心臓毛細血管のトロンボモジュリンの発現

Thrombomodulin によって免疫染色した心臓の組織像であり、血管内皮細胞の障害を評価することが出来る。Sham と比較して LPS 投与群の心臓では血管内皮の Thrombomodulin が逸脱していることがわかる。AT 治療群では Thrombomodulin が逸脱せず、血管保護作用が確認された。

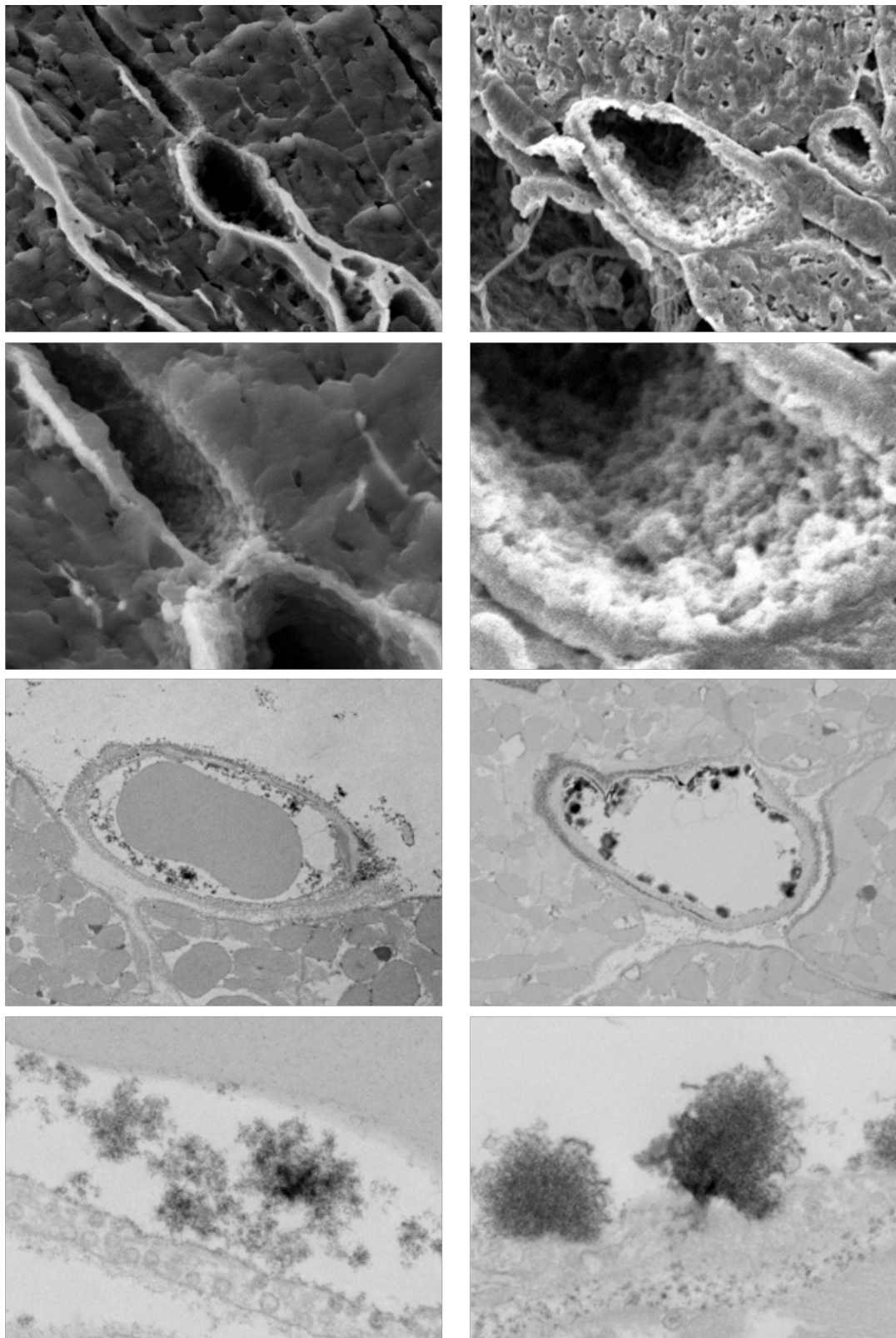
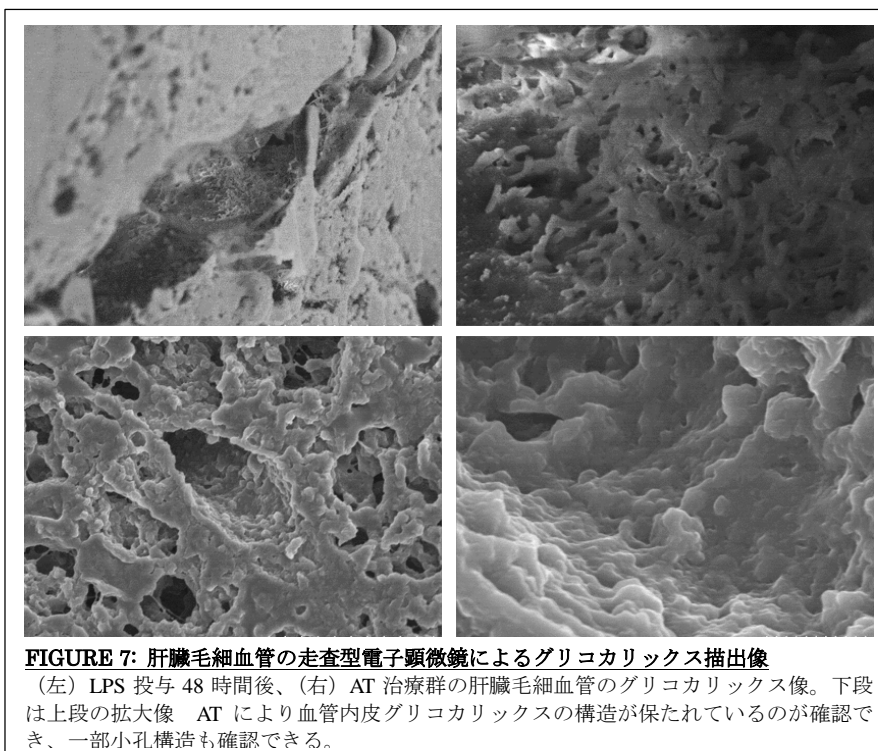
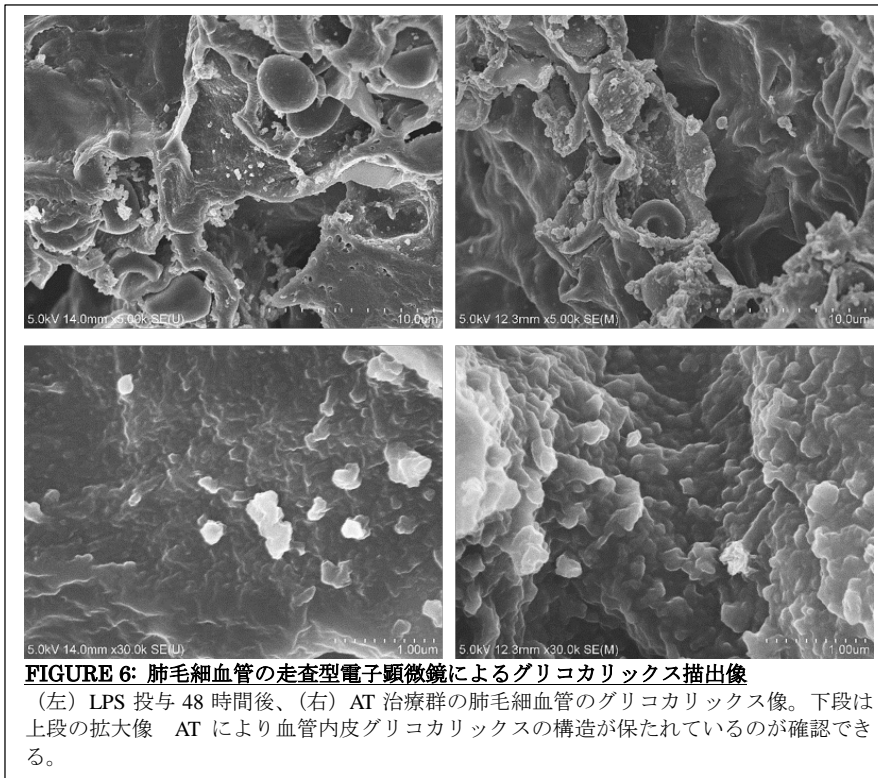


FIGURE 5 ; 心臓毛細血管内皮の走査型（上2段）と透過型（下2段）電子顕微鏡による超微形態（左）LPS 投与48時間後、（右）AT 治療群の心臓毛細血管のグリコカリックス像。

り、血管内皮表面が保護されている状態となっており、これが敗血症時の血管内皮障害を軽減している要因の一つであると推測された。(FIGURE 5) 同様に、肺毛細血管 (FIGURE 6) や肝臓毛細血管 (FIGURE 7) においても LPS 投与により血管内皮グリコカリックスが障害され血管内皮が血管内腔に露出することが確認されているが、これらについても AT を使用することによりその傷害が抑制され血管内皮の構造が保たれていることが確認できている。



本研究は、敗血症性血管炎により血管内皮障害による微小循環障害をきたし臓器障害を生じ示し、さらに AT が血管内皮グリコカリックスを保護することにより血管内皮障害を減弱させることにより敗血症性の臓器障害を抑制することを示唆した。生体内における主要な血液凝固因子の一つであるアンチトロンビンはトロンビンのほか活性型第X因子、第XII因子、第IX因子、第XI因子等と複合体を形成することでこれら血液凝固因子群を不活性化するセリンプロテアーゼインヒビターであり、敗血症に続発する

播種性血管内凝固症候群では AT が欠乏するため、その補充が治療に有用であるとの報告がなされている。また、AT は抗炎症効果を有しているという報告もある。

AT の血管内皮保護作用については近年徐々に報告が出つつあるが、血管内皮障害に対する AT のグリコカリックスに対する直接的な影響についてはいまだ不明であり、今後研究を進めていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ando Y, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Tomita H, Zaikokuji R, Hotta Y, Miyazaki N, Yano H, Muraki I, Kuroda A, Fukuda H, Kawasaki Y, Okamoto H, Kawaguchi T, Watanabe T, Doi T, Yoshida T, Ushikoshi H, Yoshida S, Ogura S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-35976-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kodai, Okada Hideshi, Yoshida Shozo, Okamoto Haruka, Suzuki Akio, Suzuki Keiko, Yamada Yuto, Hayashi Hideki, Yasuda Ryu, Fukuta Tetsuya, Kitagawa Yuichiro, Miyake Takahito, Kawaguchi Tomonori, Watanabe Takatomo, Doi Tomoaki, Kumada Keisuke, Ushikoshi Hiroaki, Sugiyama Tadashi, Itoh Yoshinori, Ogura Shinji	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of high-flow high-volume-intermittent hemodiafiltration on metformin-associated lactic acidosis with circulatory failure: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s13256-018-1809-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oda Kazumasa, Okada Hideshi, Suzuki Akio, Tomita Hiroyuki, Kobayashi Ryo, Sumi Kazuyuki, Suzuki Kodai, Takada Chihiro, Ishihara Takuma, Suzuki Keiko, Kano Soichiro, Kondo Kohei, Iwashita Yuki, Yano Hirohisa, Zaikokuji Ryogen, Sampei So, Fukuta Tetsuya, Kitagawa Yuichiro, Okamoto Haruka et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Factors Enhancing Serum Syndecan-1 Concentrations: A Large-Scale Comprehensive Medical Examination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1320 ~ 1320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/jcm8091320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyake Takahito, Okada Hideshi, Kanda Norihide, Yamaji Fuminori, Okamoto Haruka, Ushikoshi Hiroaki, Noguchi Kei, Tomita Hiroyuki, Yoshida Shozo, Ogura Shinji	4. 巻 18
2. 論文標題 Multiple trauma including pelvic fracture with multiple arterial embolization: an autopsy case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12959-020-00217-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 在國寺良蔵、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、矢野博久、村木勇、柿野圭紀、岡本遥、土井智章、吉田省造、牛越博昭、小倉真治
2. 発表標題 Recombinant Antithrombin Therapy Improved Sepsis-Induced Lung Injury Via Inhibition of Endothelial Disorder
3. 学会等名 ATS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野博久、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、在國寺良蔵、村木勇、柿野圭紀、岡本遥、土井智章、吉田省造、牛越博昭、小倉真治
2. 発表標題 Recombinant Thrombomodulin Attenuates Sepsis-Induced Pulmonary injury Via Protection of Endothelial Glycocalyx Structure
3. 学会等名 ATS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井智章、吉田省造、岡本遥、鈴木浩大、山田法顕、熊田恵介、牛越博昭、小倉真治
2. 発表標題 当院におけるDICに対する治療成績からみるアンチトロンビン（AT）活性値の重要性
3. 学会等名 日本集中治療医学会第2回東海北陸支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本遥、吉田省造、土井智章、鈴木浩大、岡田英志、長屋聡一郎、内藤順子、吉田学郎、村田一知朗、小倉真治
2. 発表標題 薬剤性重症肝障害に対して急性血液浄化療法が有効であった一例
3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤順子、岡本遥、岡田英志、土井智章、長屋聡一郎、吉田省造、小倉真治、吉田学朗、村田一知朗
2. 発表標題 コレステロール塞栓症による消化管穿孔を繰り返し発症しLDL吸着療法により救命しえた一例
3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田省造、楠澤佳吾、岡本遥、鈴木浩大、土井智章、岡田英志、長屋聡一郎、小倉真治
2. 発表標題 高TG血症を起因とした繰り返し重篤急性膵炎に対する血漿交換療法の有効性の検討
3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井智章、吉田省造、長屋聡一郎、岡本遥、岡田英志、内藤順子、吉田学郎、村田一知朗、山田佳輝、土屋朋大、鈴木浩大、小倉真治、山田徹
2. 発表標題 横紋筋融解症に対する血液浄化法を考察する
3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田洋丞、岡田英志、鈴木浩大、三瓶想、福田哲也、岡本遥、川口智則、吉田隆浩、牛越博昭、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 糖尿病と血管内皮グリカコリックスの超微形態
3. 学会等名 第46回日本救急医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲川莉紗、岡田英志、鈴木浩大、渡邊崇量、館正仁、岡本遥、川口智則、吉田隆浩、牛越博昭、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血管内皮グリカコリックスの超微形態からみた心不全と臓器連関
3. 学会等名 第46回日本救急医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田哲也、岡田英志、富田博之、鈴木浩大、岡本遥、山田法顕、土井智章、吉田省造、牛越博昭、小倉真治
2. 発表標題 敗血症性血管内皮障害により誘発される腸管粘膜バリア変化の超微形態
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館 正仁、柿野圭紀、岡本遥、吉田隆浩、熊田恵介、吉田省造、丹羽亜弓、富田弘之、小倉真治
2. 発表標題 治療に難渋した外傷性大量乳糜胸の一例
3. 学会等名 第33回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 哲也、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、岡本遥、山田法顕、土井智章、吉田隆浩、牛越博昭、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 敗血症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
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅 喬人,土井智章、神田典秀、市橋雅大、岡本遥、福田哲也、中野通代、吉田隆浩、吉田省造、牛越博昭、小倉真治
2. 発表標題 壊死性筋膜炎における手術治療の検討
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土井 智章,山田法顕、上谷遼、中野通代、長屋聡一郎、岡本遥、川口智則、館正仁、牛越博昭、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 救急領域でも意外と使える高気圧酸素治療
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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