

令和元年6月17日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17075

研究課題名(和文) HMGB1制御を軸とした敗血症時の血管透過性亢進制御機構へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to the vascular hyperpermeability mechanism during sepsis centering on HMGB1 control

研究代表者

鍋田 雅和 (NABETA, Masakazu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20529523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1などのAlarminは、敗血症時の血管透過性亢進の一因となることが示唆されている。虚血を伴う盲腸結紮穿孔マウスモデル(CLP)では、36時間後の細胞外水分率がsham群と比較し有意に増加し、HMGB1濃度も有意に高値であったが、細胞外水分量とHMGB1の間に明瞭な関係は認めなかった。マウス肺血管上皮細胞を用いた検討では、虚血を伴うCLP血漿の添加は、早期の経上皮抵抗低下に加え、添加後10時間前後に虚血のないCLPと異なる障害型を示した。血漿から分離したEVsの添加が同様の障害型を示したことから、EVsに包含されるAlarminと細胞障害機序について更なる検討の必要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症をはじめとする高度侵襲下に生じる血管透過性亢進は、臓器障害の一因と考えられる。ひとたび血管透過性亢進が制御困難になれば、臓器障害の進行から致命的となるため、この制御メカニズムを検討し、あらたな知見から新規治療アプローチを探索することが重要である。本研究では、血管透過性亢進を制御する対象として、血漿中のHMGB1との関係を検討したが、むしろ、血漿中に存在する細胞外小胞とHMGB1等のAlarminの関係、さらには血漿中に存在するEVsの機能を抑制しうる物質など、血管透過性亢進を制御するための新たなアプローチと検討すべき方向性を得る事ができた。

研究成果の概要(英文)：Alarmins, such as HMGB1, etc., has been suggested to contribute to vascular hyperpermeability in patients with severe sepsis. The extracellular water in CLP mice with cecal ischemia was higher than that of sham operation mice at the point of 36 hours after operation. The concentration of HMGB1 in plasma was also higher than that of sham operation mice. However, there was no relationship between delta-ECW% and HMGB1 concentration. In vitro experiments using cultured cells, an addition of plasma of CLP mice with cecal ischemia to the cultured fluid showed decreasing of TEER and disruption of cells after 10 hours later. This reaction was one of a typical difference between CLP mice without cecal ischemia and with cecal ischemia. The addition of EVs isolated from plasma to the cell cultured fluid showed a similar pattern of impairments. These facts show the necessity for further investigations about EVs, particularly in the relation to Alarmin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CLPモデル バイオインピーダンス法 HMGB1

## 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、病原体由来の PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) と内因性の壊死組織などから放出される Alarmin をトリガーとして、高サイトカイン血症をはじめとする様々な制御困難な病態が連続して生じる病態ととらえられる。

高サイトカイン血症によって引き起こされるアポトーシスやオートファジーなどの細胞死・細胞障害、あるいはミトコンドリアの機能不全などが、臓器障害が生じる本態として重要視されてきたが、毛細血管の障害により引き起こされる透過性亢進もまた、臓器障害に繋がる制御困難な病態の一つとして重要と考えられる。

重症敗血症の治療において、その本態が高サイトカイン血症にあるとの立場から、感染巣のコントロールや抗菌薬投与に加え、高サイトカイン血症対策としての急性血液浄化療法、サイトカインによって生じる血液凝固障害 (播種性血管内凝固症候群) に対する治療、破綻した免疫機能に対する補充療法などを行い、一定の治療成績の向上を得てきた。しかし、重症患者の中には、これらの積極的な治療に加えて厳密な水分出入管理を行っても、過度な血管透過性亢進が進行し、結果的に全身浮腫や体重増加が制御できず救命困難となる症例を少なからず経験する。

敗血症や外傷、虚血再灌流などの侵襲下に生じる毛細血管透過性亢進の制御・調整メカニズムと病態の関係が近年注目されている。特に細胞間接着装置 (tight junction) の障害と血管透過性亢進機序、あるいはその制御機構と病態との関係が徐々に解明され、tight junction の主要な構成要素である血管内皮カドヘリンが敗血症患者の予後や重症度を反映することもすでに報告されている。今後、敗血症時に認められる制御困難な透過性亢進をコントロールすることが、敗血症をはじめとする高度侵襲下の患者に対する治療戦略の鍵になると考えられる。

### 2. 研究の目的

HMGB1 をはじめとする Alarmin は、内因性の壊死組織などから放出され、特に HMGB1 に関しては敗血症の病態との関係について様々報告がなされている。細胞レベルの研究において、HMGB1 は血管透過性亢進の病態に関与している可能性が報告されているが、そのメカニズムは完全には解明されておらず、生体モデルでの評価も不明である。本研究では、敗血症時の血管透過性亢進の病態解析を、小動物 (マウス) を用いた敗血症モデルと、マウス組織由来の細胞を用いた培養細胞上の血管内皮モデルの双方で、血管透過性亢進状態の病態と HMGB1 との関係性を評価し、そのメカニズムを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 虚血の有無による2つの異なる盲腸結紮穿孔 (以下、CLP) モデルマウスの作成

一般的な CLP モデルは、右図 1a に示すように、盲腸結紮時に虫垂間膜動静脈も結紮するため時間の経過とともに虫垂に壊死を来す。一方、図 1b のように虫垂間膜の血流を残存させることで、虫垂の壊死は生じず、穿孔による腹腔内汚染だけを生じさせることが可能である。HMGB1 の血中濃度に差が生じる CLP モデルになることを予測し、上記2つのモデルを作成した。

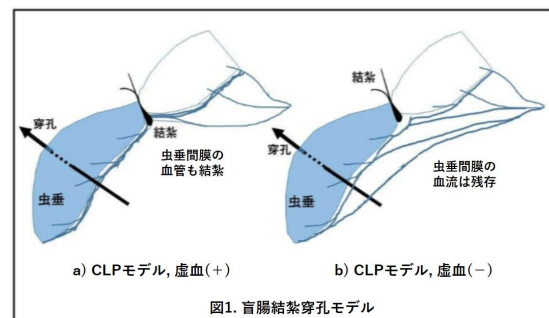


図1. 盲腸結紮穿孔モデル

#### (2) CLP モデルにおけるインピーダンス評価 (体内水分分布・細胞外水分量の評価)

研究 (1) の要領で作成した 虚血あり CLP モデルと 虚血なし CLP モデル、および対照として偽手術マウス (sham) において、動物用体組成計を用いて生体インピーダンス法による体内水分評価を行った。測定ポイントは、細胞外水分量がピークに達したと考えられたモデル作成後 36 時間の時点とした。

(予備検討において 12, 24, 36 時間で評価)

さらにインピーダンス測定後、麻酔鎮静下に開腹し、後大静脈から採血し検体を採取。白血球および血小板数の測定と、酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 以下 ELISA) を用いて HMGB1 濃度測定を行なった。

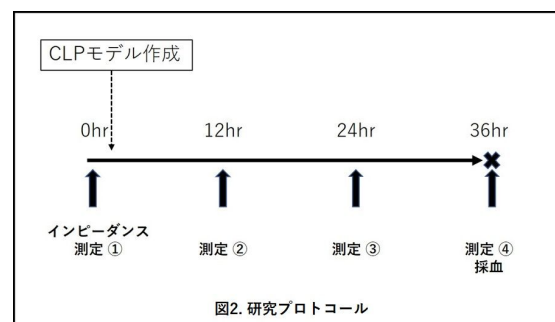


図2. 研究プロトコール

#### (3) マウス肺微小血管内皮細胞を用いた単層培養細胞におけるインピーダンス評価

(高 AC, 低 AC 周波数による細胞被覆、細胞間接着障害の評価)

研究 (1) の要領で作成した 虚血あり CLP モデルと 虚血なし CLP モデル、および対照として偽手術マウス (sham) より、術後 30h に後大静脈から採血し血漿を採取。リアルタイム細胞

解析装置 Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) 法を用いて、マウス肺微小血管内皮細胞 (MPLMEC) 上で、高 AC 周波数 (4000Hz) と低 AC 周波数 (125Hz) での経上皮電気抵抗 (TEER) を測定評価した。さらに、同血漿を、サイズ排除型クロマトグラフィー法を用いて細胞外小胞 (Extracellular vesicles、以下 EVs) 分画と EVs を除いた血漿蛋白分画の 2 つに分離し、両分画各々について、同様に ECIS 法を用いて、MPLMEC 上で TEER を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) CLP モデルにおける虫垂間膜動静脈の結紮の有無 (虫垂の虚血の有無) による生存率の検討の結果、18 週から 20 週マウスをモデル作成に用いることで、虚血の有無に関わらず 36 時間生存率が 90% 以上の再現性のある CLP モデル作成が可能となった。

(2) Sham 群 (n=10) および CLP モデル (虫垂間膜動静脈結紮なし; 以下、虚血なし群 (n=10)、虫垂間膜動静脈結紮あり; 以下、虚血あり群 (n=13)) に対して、生体インピーダンス法を用いた血管透過性の評価を行った。虫垂間膜動静脈結紮による虚血ありの群では、左図 3 に示すようにモデル作成後 36 時間後の細胞外水分率が前値 (モデル作成前) と比較して 10.6% (実測値で前値 45.9%、36 時間後 56.5%) 増加し、sham 群 (7%; 前値 45.85%、36 時間後 51.75%)、および虚血なし群 (5.95%; 前値 47.05%、36 時間後 53.25%) と比較して有意差を認めた。

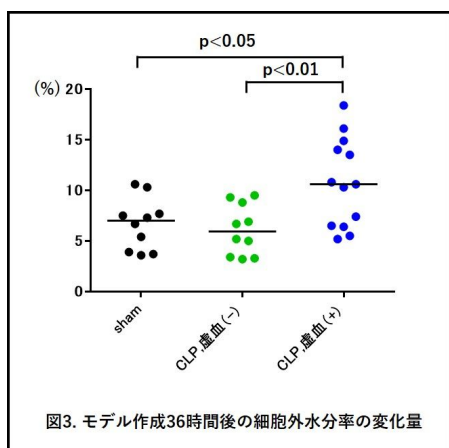


図3. モデル作成36時間後の細胞外水分率の変化量

さらにマウス敗血症モデル作成後 36 時間後に後大静脈から採取した血液を用いて、白血球数、血小板数および ELISA による HMGB1 測定を行った (下図 4~6)。白血球数は Sham 群 6150/μL、虚血なし群 1300/μL、虚血あり群 800/μL で各群間において有意差を認めた。血小板数は虚血あり群で  $29.4 \times 10^3/\mu\text{L}$  と低値で、Sham 群 ( $67.55 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) および虚血なし群 ( $61.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) と比較して有意差を認めた。HMGB1 は Sham 群 (5.52ng/ml) と比較して、虚血あり群で有意に高い結果であった (sham 群; 5.52ng/ml、虚血あり群; 10.06ng/ml)。

群で有意に高い結果であった (sham 群; 5.52ng/ml、虚血あり群; 10.06ng/ml)。

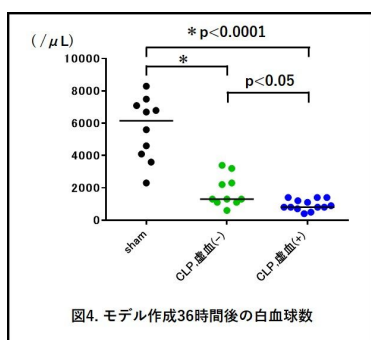


図4. モデル作成36時間後の白血球数

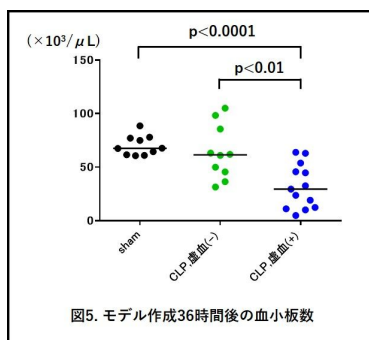


図5. モデル作成36時間後の血小板数

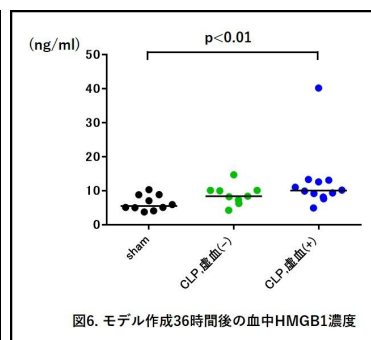
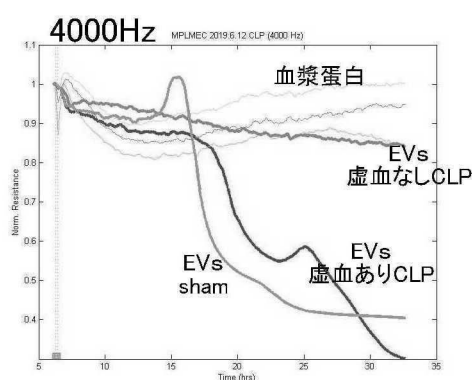
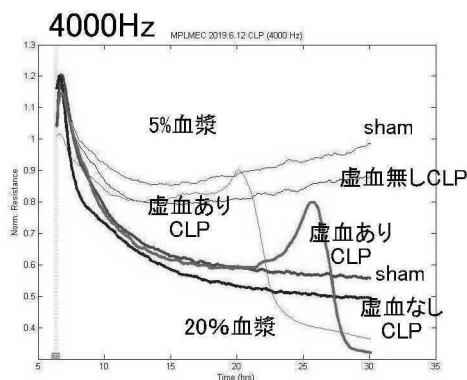


図6. モデル作成36時間後の血中HMGB1濃度

(3) 培養細胞に対する血漿、血漿由来 EVs、血漿蛋白の作用についての検討

ここに示す結果 3 は、現段階では preliminary なものであり、再現性、EVs の採取方法、投与量等について、引き続き検討中のデータである。最終的な結論に至っていないため、典型的なデータを提示するにとどめる。

虚血あり CLP モデルと 虚血なし CLP モデル、および対照として偽手術マウス (sham) より得られた血漿に対するマウス肺微小血管内皮細胞 (MPLMEC) 上での TEER 変化の典型例を下図に示す。



培養細胞液に 5%、10%、20%血漿になるよう血漿を添加したところ（図は 5%と 20%を提示）ともに濃度依存性に、時間経過と共に TEER は低下し、およびの 5%低濃度血漿では添加約 10 時間以降には回復傾向となった。においてはいずれの濃度においても、10 時間以降、急激な異常値（急激な低下）を示し、細胞障害（細胞死）の状態に陥ったと推察され、虚血の無いと虚血を有すとの間に明瞭な相違が認められた。

急激な細胞障害（細胞死）が疑われたため、その原因が血漿蛋白中に存在するのか、EVs に存在するのかを検討するため、血漿より分離した EVs と EVs を除く血漿蛋白各々を、同様に培養細胞（MPLMEC）上に添加したところ、EVs においてのみ同様の障害反応が認められた（図）。ただし、sham, 虚血なし CLP より採取・作成した EVs でも同様の变化を示した。

## 考察

本研究においては、予測通り、虚血のない CLP モデルに比べ、虚血を伴った CLP モデルにおいて透過性亢進は有意に高度であった。しかし、血漿中の HMGB1 濃度には、予測した程の顕著な差は認められなかった。HMGB1 採取のタイミング、血中濃度測定と透過性亢進評価のタイミングについて検討を必要とするが、本モデルにおいては、透過性亢進の程度と血漿中の HMGB1 濃度との間には、明瞭な関係を認めることができなかった。

一方、結果 3 に示したように、培養血管上皮の反応においては、血漿添加から約 10 時間前後に虚血の有無による相違が認められた。さらに、同様の障害パターンは、血漿から得られた EVs 添加時に認められ、EVs を除いた血漿蛋白においては認められなかった。

現在、(3)の結果に関しては、再現性、EVs の分離方法、EVs の濃度測定を含めてさらなる慎重な検討が必要と考えられるため、最終的な結論には至っていないが、EVs 内に存在する HMGB1 や heat shock proteins などの Alarmin が細胞障害性、および sham および虚血を伴わない CLP モデル血漿蛋白に EVs の関与をブロックする因子の存在などが推測されるため、両者について今後解析等を検討している。

本研究において、虚血の有無にかかわらず双方の CLP モデルの血漿、血漿蛋白添加後に認められる添加早期の血管内皮障害（低 AC 周波（細胞接着状態）での障害パターン、高 AC 周波（細胞被覆状態）障害パターン）に加え、虚血を伴う CLP モデルの血漿添加後後期における強い細胞障害と、HMGB1 や heat shock proteins などの内因性 Alarmin を含む EVs との関係、さらに EVs をブロックする血漿中の因子の存在などを今後検討し解明することにより、侵襲下の血管透過性亢進制御に向けた新たな治療アプローチの策定に繋がると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：高須 修

ローマ字氏名：(TAKASU, osamu)

研究協力者氏名：平湯 恒久

ローマ字氏名：(HIRAYU, nobuhisa)

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。