

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08907

研究課題名(和文)敗血症における内皮微小粒子の動態とその病態生理学的作用の解明

研究課題名(英文)The elucidation and pathophysiological function of endothelial micro particles in sepsis

研究代表者

齋藤 浩二 (Saito, Koji)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：10359515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に炎症性刺激を加えると濃度依存性にEMPsが増加した。敗血症患者の血中EMPsは非敗血症患者に比較し、有意に増加しており、血管内皮傷害を反映していた。また、PECAM+EMPsおよびVE-cadherin+EMPsは敗血症性ショック患者で敗血症患者より有意に増加していた。HUVECsに血管透過性を変化させると、PECAM+EMPsおよびVE-cadherin+EMPsは血管透過性の変化に一致し放出が変化し、PECAM+EMPsおよびVE-cadherin+EMPsは敗血症における血管透過性の指標になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症において血管内皮傷害は、病態形成に積極的に関与し、かつ血管内皮傷害は臓器傷害の主因となる。本課題により、内皮由来微小粒子(EMPs)は敗血症の血管内皮傷害マーカーとなり得ることを示された。特にPECAM+EMPsやVE-cadherin+EMPsは、敗血症での血管透過性亢進の指標にもなり得るもので、今後の敗血症の新たな病態マーカーとなり得るものである。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory stimulation to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) increased EMPs in a concentration-dependent manner. The circulating EMPs in patients with sepsis were significantly increased compared to non-septic patients, reflecting vascular endothelial injury. In addition, PECAM + EMPs and VE-cadherin + EMPs were significantly increased in septic shock patients compared to septic patients. When vascular permeability is changed to HUVECs by permeability modifying agents, PECAM + EMPs and VE-cadherin + EMPs were consistent with changes in vascular permeability and their release was altered, so that PECAM + EMPs and VE-cadherin + EMPs might be novel indicators of vascular permeability in sepsis.

研究分野：集中治療

キーワード：マイクロパーティクル 敗血症 内皮傷害 血管透過性

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害である。世界的な敗血症治療ガイドラインである Surviving Sepsis Campaign Guidelines の普及に伴い、敗血症に対する治療は進歩を遂げたが、死亡率は 30~40%と依然として高く、世界的に大きな健康問題となっている。

血管内皮は、接着分子発現の増加、凝固反応促進、炎症性サイトカインの放出などにより、積極的に敗血症の病態形成に関与する。血管内皮傷害による血管透過性亢進に伴う微小循環不全は、臓器障害の主たる原因と考えられる。しかし、現時点で敗血症における血管内皮傷害を適切に評価する方法は確立されておらず、内皮傷害に基づく治療管理は行われていない。

内皮微小粒子 (EMPs: endothelial microparticles)は、内皮細胞から傷害、活性化、apoptosisの際に放出される膜小胞であり、虚血性心疾患や糖尿病、COPDなどで上昇し、その内皮傷害を反映する。敗血症においても EMPs は内皮傷害を反映するマーカーとして期待される。さらに、炎症により誘導される E-selectin や VCAM などの接着分子、内皮細胞間隙に存在し透過性の調節に関与する VE-cadherin に着目して EMPs のサブクラス解析を行えば、敗血症の病態形成に複雑に関与する内皮の病態生理、血管透過性のレベルなどを把握できると考えた。

また、近年では EMPs が細胞間伝達に関与すると考えられており、敗血症においても EMPs が病態形成または抑制に何らかの形で関与していることが推測される。しかし、現時点では、敗血症の EMPs の動態・生理学的作用は不明な点が多く、その解明が期待されている。

2. 研究の目的

本課題では、敗血症における EMPs の動態および EMPs の病態生理学的作用を解明し、血管内皮傷害に着目した新たな敗血症の病態マーカーを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 敗血症患者における EMPs の動態の解明

敗血症患者の circulating-EMPs の動態を検証するために、前向き観察研究を行なった。これは東北大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認を得て行なっている (2018-1-353)。2016年2月から2018年11月までに敗血症と診断されて東北大学病院のICUへ入院した成人患者、またはコントロール群として定期的頭頸部手術を受けて術後ICUに入室する成人非敗血症患者を対象としている。敗血症の診断は Spsis-3 に準ずる。敗血症患者にはICU入室時に、本人もしくは近親者から同意書を取得した。非敗血症患者は定期手術の術前訪問の際に本人から同意書を得た。対象敗血症患者はICU入室時、第2,3,5,7病日に、非敗血症患者は入室時、第2,3,5病日に末梢血採血を行ない、血漿 (platelet poor plasma: PPP)を精製した。PPPは末梢血を3000g x 5分遠心し、引き続き2000g x 20分遠心し精製した。分注後、速やかに-80度で保管した。対象患者のPPP中の各種EMPsをフローサイトメーターで測定し、EMPsのサブクラス解析を行う。測定したEMPsはPECAM+EMPs, VE-cadherin+EMPs, E-selectin+EMPs, ICAM-1+EMPs, VCAM-1+EMPsである。

(2) 炎症性刺激による EMPs の放出の特性

培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) に TNF-

1, 5, 25 (ng/ml)の刺激を24時間加え、刺激後に回収した内皮細胞の細胞膜上のPECAM, VE-cadherin, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1の発現を検証した。また細胞培養液を回収し、超遠心処理を施してMPsを沈降させ、MPs含有液を精製した。このMPs含有液中のPECAM+EMPs, VE-cadherin+EMPs, E-selectin+EMPs, ICAM-1+EMPs, VCAM-1+EMPs数をフローサイトメトリーで測定した。

EMPs放出と細胞死との関連を検証するために、汎カスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMKによる全処理を行なった。培養したHIVECsにZ-VAD-FMK (50 μ M)の前処理を1時間加えたのちに、TNF-5 (ng/ml)を加え、24時間後にHUVECs、培養液を回収し、HUVECsの各種内皮抗原の発現、各種EMPsの放出を検証した。

(3)血管透過性とEMPsの関係性の検証

炎症性刺激を加えることで血管内皮細胞の透過性が亢進する。炎症性刺激による血管透過性亢進とEMPsの関係性を検証した。angiopoietin (250 ng/ml), VEGF (100 ng/ml), PGI₂ (500 ng/ml)などの血管透過性修飾因子による前処置を1時間加えたのちに、TNF-5 (5 ng/ml)の炎症性刺激を24時間加え、血管透過性と放出される各種EMPsの変化を測定した。血管透過性はdextran assayとtrans endothelial electronic resistance (TEER)試験で測定した。HUVECsはgelatinでコーティングしたtrans-well (Corning 3470: pore-size 0.4 μ m, 0.33 cm² / well)で培養した。HUVECsは第5-6継代細胞を用いて、insert-wellに1.0x10⁶ cells/100 μ Lで播種した。72h後にHUVECsのmonolayerが形成されたことを確認し、上述の前処理および刺激を加えた。培養液を除去した後に、上部チャンバーにFITC標識デキストラン 100 μ Lを、下部チャンバーにFITC非標識デキストラン 500 μ Lをそれぞれ加えた。デキストランを加えて1時間後に、底部チャンバーに入れたmediumを回収し、マイクロプレートリーダー (Spectra Max M2e; Molecular DEVICES, San Jose, CA, USA)で蛍光強度を測定した。FITCデキストランの濃度を算出し、透過性を評価した。TEER試験は非侵襲的に内皮細胞のmonolayerの電気抵抗値を測定することで血管透過性を評価しうる検査である。TEER値は電気抵抗測定装置であるEVOM2と (EVOM2, World Precision Instruments) Endohm-6チャンバーを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) EMPsは敗血症で有意に増加する

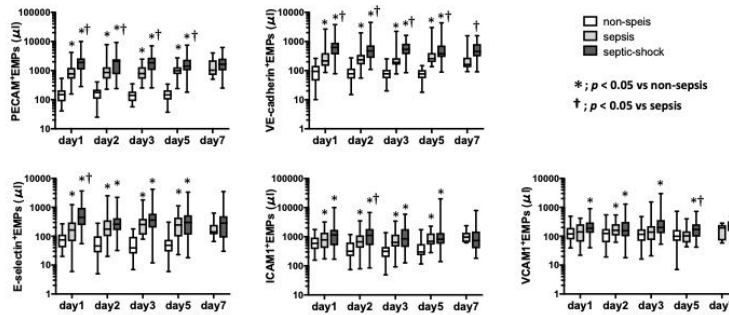
30名の敗血症患者、42名の敗血症性ショック患者、30名の非敗血症患者がエントリーされた。PECAM+EMPs, VE-cadherin+EMPs, E-selectin+EMPs, ICAM1+EMPsはday1からday5まで敗血症患者および敗血症性ショック患者は非敗血症患者より有意に増加していた。VCAM1+EMPsも敗血症性ショックではday1からday5まで非敗血症患者より有意に増加していたが、敗血症患者では非敗血症患者に比較し有意に増加はしていなかった。今回測定したあらゆるタイプのEMPはサブタイプにかかわらず、敗血症患者では増加していた。(Figure.1)

(2) PECAM+EMPsおよびVE-cadherin+EMPsは敗血症性ショック患者で上昇する

PECAM+EMPsおよびVE-cadherin+EMPsは、敗血症性ショック患者で敗血症患者より有意に高かった (figure.1)。PECAMやVE-cadherinは恒常的に内皮細胞間隙に存在し、細胞間接着や透過性の調節に関与する因子である。一方で、E-selectinやICAM-1, VCAM-1は普段はほとんど発現していない、または弱くしか発現していないが、炎症により発現が誘導・増強され、白血球などの免疫担当細胞を血管内皮細胞に接着・結合に貢献する。炎症により誘導される接着分子を発現

する EMPs に着目すると、Day1 の E-selectin+EMPs 数、day2 の ICAM+EMPs 数、day5 の VCAM1+EMPs 数のみ、敗血症性ショック群で敗血症群よりも有意に増加していた。それ以外では、敗血症性ショック患者と敗血症患者間で有意な差は認められなかった。

figure.1 sepsis-typeによるEMPsの経時的変化

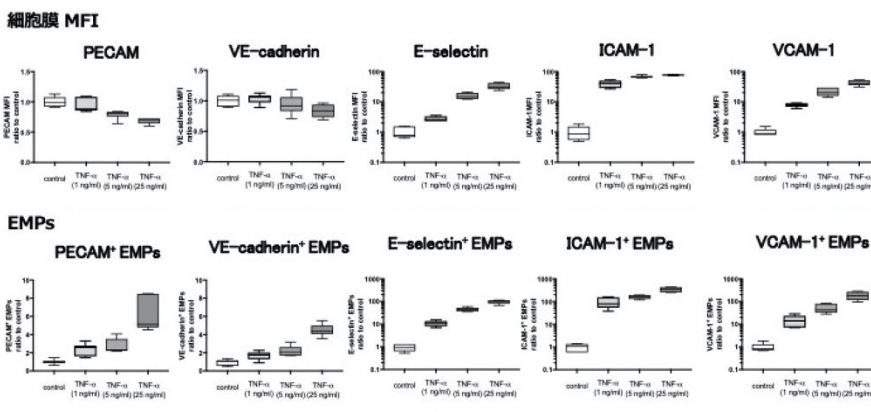


(3) TNF-α は濃度依存性に HUVECs からの EMPs 放出を増加させる

HUVEC に TNF-α の刺激を加えることで、今回測定した全てのタイプの EMPs は濃度依存性に増加した。ただし、TNF-α 刺激による細胞膜上の内皮抗原の発現の変化の違いにより、EMPs の増加の程度は異なった。

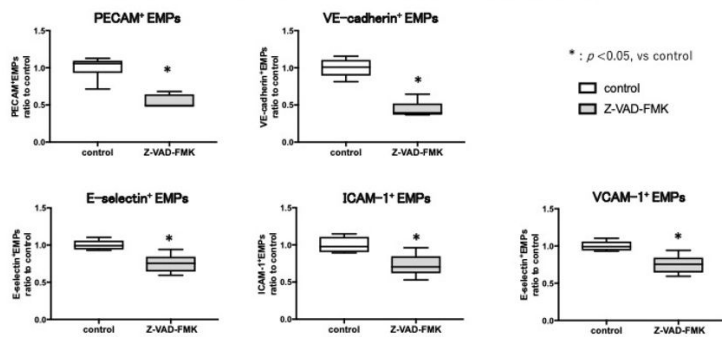
E-selectin, ICAM1, VCAM1 などの接着分子は TNF-α の炎症性刺激により細胞膜上の発現が濃度依存性に増強され、接着分子を発現する EMPs は、細胞膜上の接着分子の発現に連動し、その放出は指数関数的に増加した。接着分子を発現する EMPs の増加と細胞膜上の接着分子の発現に極めて強い相関があった。一方で、PECAM や VE-cadherin などは炎症による発現増強は認めず、PECAM の発現は有意に低下した。PECAM+EMPs や VE-cadherin+EMP の放出は、濃度依存性に線形に増加し、その増加は接着分子を発現する EMPs より軽度であった。PECAM+EMPs と PECAM 発現の間には強い負の相関が、VE-cadherin+EMPs と VE-cadherin の間には相関関係が認められなかった。

(Figure.2)



(4) Z-VAD-FMK の前処置は TNF-α による EMPs 放出を抑制した

汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK の前処置により、TNF-α による HUVECs からの PECAM+EMPs, VE-cadherin+EMPs, E-selectin+EMPs, ICAM-1+EMPs, VCAM-1+EMPs の放出を抑制した (figure.3)。TNF-α による EMPs 放出にはカスパーゼの関与が示唆された。

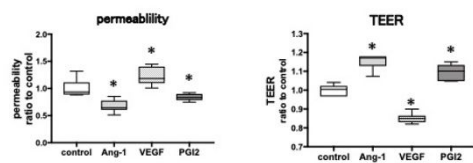


(5) 透過性修飾因子による血管透過性の変化

血管透過性修飾因子による前処理、続く TNF- α の刺激による HUVECs の血管透過性の変化を検証した。Angiopoietin-1 および PGI2 の前処置は、TNF- α による FITC 標識デキストランの透過亢進を抑制した。一方で VEGF の前処理は TNF- α による透過亢進を増強させた(Figure*)。また、

Angiopoietin-1 および PGI2 は TNF- α による TEER の減少を抑制した。一方で VEGF の前処置は、TEER 値を有意に低下させた。(Figure.4)。

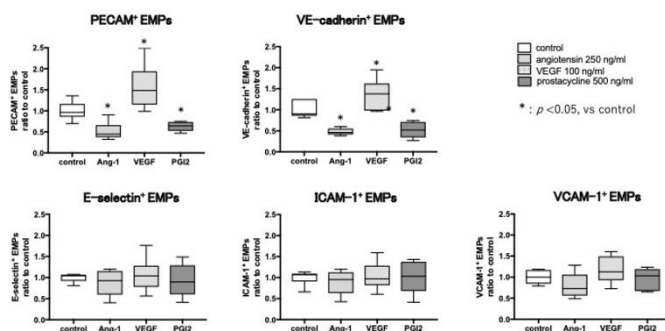
以上より、angiopoietin-1 と PGI2 は TNF- α による血管透過性亢進を抑制させ、VEGF は増強させた。



(6) 血管透過性修飾因子による pre-treatment の EMPs 放出への影響

血管透過性を抑制した Angiopoietin-1 および PGI2 による前処理では、TNF- α による PECAM+EMPs および VE-cadherin+EMPs の放出増加を有意に抑制した。一方で血管透過性亢進を促進させた VEGF の前処置では、PECAM+EMPs および VE-cadherin+EMPs の放出を有意に増加させた。また、Angiopoietin-1, PGI2, VEGF の前処理によって、TNF- α による HUVECs の血管透過性亢

進を変化させても、HUVECs からの E-selectin+EMPs, ICAM1+EMPs, VCAM1+EMPs の放出は変化しなかった。以上より、PECAM+EMPs および VE-cadherin+EMPs が、炎症性刺激に伴う血管透過性亢進を反映することが示唆された。



敗血症において血管内皮傷害の新たなマーカーとして、EMPs に着目し検証をした。炎症性刺激により血管内皮細胞から EMPs の放出が促進される。臨床研究においても、敗血症患者の PPP 中の各種 EMPs は非敗血症患者で有意に増加していた。特に PECAM+EMPs や VE-cadherin+EMPs は敗血症患者で有意に増加していた。また、血管内皮細胞で血管透過性を変化させると、PECAM+EMPs や VE-cadherin+EMPs は血管透過性の変化に伴って増減し、血管透過性の指標になり得ることが示唆された。今後はこれら EMPs の生理学的作用についての検証を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takei Y, Yamada M, Saito K, Kameyama Y, Sugiura H, Makiguchi T, Fujino N, Koarai A, Toyama H, Saito K, Ejima Y, Kawazoe Y, Kudo D, Kushimoto S, Yamauchi M, Ichinose M.	4. 巻 17;54(4)
2. 論文標題 increase in circulating ACE-positive endothelial microparticles during acute lung injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European respiratory journal	6. 最初と最後の頁 1801188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/13993003.01188-2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武井 祐介
2. 発表標題 敗血症における内皮微小粒子の動態の解明
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. TAKEI, M. Yamada, K. Saito, S. Kazutomo, T. Shiga, Y. Kameyama, M. Yamauchi
2. 発表標題 Endothelial Microparticles Is Novel Markers of Endothelial Injury in Patients with Sepsis
3. 学会等名 2020 33rd annual congress in ESICM (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	山田 充啓 (Mitsuhiro Yamada) (00396483)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	武井 祐介 (Yusuke Takei) (80822890)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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