

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390456
 研究課題名（和文） PARs と VEGF が関与する敗血症性臓器不全発症機序解明とその制御法の確立
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms sepsis-induced organ dysfunction syndrome in relation to protease-activated receptors (PARs) and vascular endothelial growth factor (VEGF)
 研究代表者
 丸藤 哲 (GANDO SATOSHI)
 北海道大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：30125306

研究成果の概要：Lipopolysaccharide (LPS)により発現誘導された「Protease-activated receptors (PARs)が PARs 自身による凝固・炎症反応増強機序に加えて、vascular endothelial growth factor (VEGF)の発現誘導あるいは VEGF 発現抑制からさらなる炎症反応増強とアポトーシスにより脳、肺臓、肝臓、腎臓等の敗血症性臓器不全発症に深く関わっている」、という仮説を証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：(1) 敗血症 (2) 臓器不全 (3) PARs (4) VEGF

1. 研究開始当初の背景

(1)救急集中治療領域では敗血症及び敗血症性ショックは治療に抵抗し多臓器不全を惹起して死亡率の高い病態として知られている。1990年代初期にはサイトカインによる炎症反応が臓器不全の原因と考えられ、その制御により敗血症症例の転帰を改善する試みがなされたが、その全てが失敗に終わった。その後、1990年代後半の protease-activated receptors (PARs)である PAR1、PAR2、PAR3、PAR4 のクローニングとその研究の進歩に伴い凝固炎症反応の密接な連関が解明され、現在では PARs を介した凝固炎症反応の制御が

敗血症性多臓器不全発症の予防と症例の予後改善に重要であるとされている。PARs は組織因子 (tissue factor)、FVIIa、FXa、FIIa (トロンビン)等の外因系凝固反応に関与する因子を選択的リガンドとして、炎症性サイトカイン発現や凝固亢進を来して臓器不全を引き起こす。

(2)炎症性サイトカインは VEGF (vascular endothelial growth factor)の発現を誘導し、産生された VEGF はその受容体である VEGFR1 と VEGFR2 を介してそれぞれマクロファージ/単球活性化・血管透過性亢進と血管新生・増殖 (アポトーシス抑制)を引き起こす。その

作用から当初は循環器領域で研究が進んだが、炎症性サイトカインによる VEGF 発現誘導、VEGFR1 を介する炎症反応亢進、VEGFR2 を介するアポトーシス抑制等の作用から、VEGF が炎症とアポトーシスが関与する臓器不全発症に関与していることが近年報告された。実際 VEGF は敗血症性臓器不全の典型である ALI/ARDS 発症に肺胞隔壁（血管内皮/肺胞上皮）透過性亢進を通じて深く関与し、アポトーシス抑制によりその回復にも係わることが知られている。

(3) 以上の研究は PARs と VEGF が何らかの関連を有しつつ敗血症性臓器不全発症とその回復過程に深く関わっている可能性を示唆するものであるが、両者の関連はこれまでまったく不明であった。しかし、最近 PARs 細胞内情報伝達経路の解明が進み PARs が PI3K/Akt - PKB と MAPK - NFκB を介して VEGF 遺伝子誘導、炎症・血管透過性亢進、アポトーシス抑制を惹起する経路が明らかになった (Leukemia 20: 1331, 2006)。現在では敗血症臓器不全発症に PARs と VEGF が凝固炎症反応連関と炎症・アポトーシスを通じて深く関与している可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

(1) 我々は平成 17 年度基盤研究 B で、LPS 誘発ラット敗血症モデルを使用して敗血症の重要な標的臓器である肺および肝で以下を明らかにして公表した。

① LPS は炎症性サイトカイン誘導、凝固亢進、凝固制御不全、線溶抑制と同時に PAR1, 2, 3, 4 の mRNA を誘導し PARs の臓器発現を増加する。

② この結果 ALI/ARDS、肝不全が発症する。

③ PAR2 blocking peptide (PAR2 BP) は、炎症・凝固亢進を抑制して臓器不全発症を予防する。すなわち PARs は凝固・炎症反応連関を通じ敗血症性臓器不全を発症し、その制御が臓器不全を予防する。現在腎に関して同様の研究を続行中である。

(2) 本研究はこの研究成果をさらに発展させて LPS により発現誘導された「PARs が PARs 自身による凝固・炎症反応増強機序に加えて、VEGF の発現誘導あるいは VEGF 発現抑制からさらなる炎症反応増強とアポトーシスにより敗血症性臓器不全発症に深く関わっている」、という仮説を証明することを目的とする。

(3) 具体的には LPS が PARs/VEGF を介して凝固・炎症亢進、アポトーシス、血管収縮と透過性亢進から多臓器不全を引き起こすが、PARs/VEGF 阻害・拮抗薬の単独使用あるいは

は同時使用がこれらの機序を抑制し多臓器不全発症を予防して転帰を改善することを証明する。

3. 研究の方法

下記標的分子の臓器発現が臓器不全を惹起することを確認する。その後、PARs, VEGFR1/R2 の阻害・拮抗薬が標的分子の制御を通じて臓器不全を改善することを確認する

(1) 実験モデル：ラット LPS 誘発敗血症

(2) 標的臓器：心、肺、肝、腎

(3) 標的分子：western blot, RT-PCR, ELISA を使用して定量。

Immunohistochemistry and immunofluorescent labelin で組織・細胞発現確認。

① PAR1, 2, 3, 4 (protein, mRNA), Tissue factor, FVIIa, FXa, Thrombin, PAI-1, Fibrin (以上、protein, mRNA), TNF-α (protein).

② VEGF (protein, mRNA), VEGFR1/R2 (protein, mRNA), Akt/PKB (protein), eNOS, iNOS (protein), Caspase-3/Bax (protein), Bcl-2 (protein), ET-1, ETR1/R2 (protein, mRNA).

(4) 臓器不全：病理組織学的検討、アポトーシス誘導。心、CKMB, TnI, T, ET-1; 肺、血液ガス、肺湿乾重量比、135Ialbumin permeability index; 肝、T Bil, AST/ALT, LDH; 腎、ET-1, NO system

(5) 阻害薬：PAR1 s 選択的阻害薬 (BMS-200621, RWJ-58529, FR17113), PAR2 BP, VEGFR1 and R2 選択的阻害・拮抗薬。

(6) 方法

① 敗血症性ショックの作成：ラットに LPS 15 mg/kg を尾静脈より静注して敗血症性モデルを作成する。予備実験で得られた経過観察時点で屠殺して実験を行う。対照群には LPS 溶解量と同量の生理食塩水を静注する。ペントバルビタール麻酔下に頸動脈から観血的に血行動態と血液ガスを観察・測定し敗血症発現を確認する。

② 病理組織学的検討：HE 染色に加えて、各臓器傷害に特異的な染色（例：肺線維化の指標としての Van Geison 染色）を施行して臓器障害の程度を形態学的に観察し、阻害薬の使用が傷害を軽減することを確認する。

③ 免疫組織染色 (Immunohistochemistry and

immunofluorescent labeling) : 各標的分子の抗体を使用した免疫組織染色により、標的臓器におけるそれらの発現部位を同定する。この発現は各観察時点において経時的に施行し、発現部位の妥当性は肺胞上皮 (cytokeratin)、血管内皮 (CD31) 等の細胞・組織発現特異マーカーを使用して確認する。さらに標的臓器の組織・細胞内の標的分子発現量を2名の病理専門医が盲目的に半定量し、その発現組織・細胞が臓器不全発症に関与程度を確認する。

④ウエスタンブロット解析 : 定型的ウエスタンブロット法を使用して、標的分子の標的臓器における蛋白質発現量を各観察時点で経時的に解析する。

⑤定量的リアルタイム RT-PCR : total RNA を抽出し逆転写により cDNA を作成しリアルタイム PCR を施行して各標的分子の遺伝子 (mRNA) 発現量を定量的に解析する。

⑥血清濃度の検討 : ELISA 法を使用して標的分子の血清中濃度、細胞・組織発現量を定量する。

⑦アポトーシス : photometric enzyme-immunoassay (cell death detection ELISA) による histone-associated DNA fragment の測定により定量確認する。

4. 研究成果

(1) 主な成果

研究者等はこれまでに LPS 誘発ラット敗血症モデルを使用して、①敗血症では PAR1, PAR2, PAR3, PAR4 が炎症性サイトカイン発現と凝固線溶反応異常を伴いつつ肺臓および肝臓に発現して呼吸 (Acute lung injury, ALI) および肝不全を来す。さらに PAR2 blocking peptide (PAR2 BP) がこれら炎症凝固反応連関を抑制し臓器不全発症を制御することを世界に公表している。

②今回は同様の結果が脳および腎臓にも見られることを確認し世界に公表した。

(Thromb Res, Shock いずれも in press 2009)。脳 : 炎症性サイトカイン TNF 発現に引き続き組織因子およびフィブリンの発現誘導を大脳皮質組織で確認。同時に mRNA 発現からさらに、PAR1, PAR2, PAR3, PAR4 蛋白質の発現を大脳の同部位に確認した。腎 : TNF 発現に引き続き、組織因子による外因系凝固反応亢進に伴う FVIIa・FXa・トロンビン・フィブリン・PAI-1 の発現を認め腎不全が進行した。これら一連の変化は PAR2 BP により阻止されることを確認した。

③さらに ALI の血漿では VEGF 発現増加を認めるが肺臓では VEGF 発現減少およびその受容体発現の増加 (Flt-1、血管透過性亢進)・減少(Flk-1、血管増殖)を認めると同時にアポトーシス関連蛋白 (Caspase-3, Bax、

アポトーシス亢進 ; Bcl-2、アポトーシス制御) 発現の変化を確認し、VEGF が血管増殖低下、血管透過性亢進とアポトーシス誘導により ALI 発症に深く関与することを証明した (Shock 2009 投稿準備中、2008 日本救急医学会発表)。同様に PAR2 BP 投与が血漿 VEGF 発現を維持しつつ肺臓 VEGF 発現増強をもたらすことを確認し、PAR2/VEGF が ALI 発症に関与することを証明した。

(2) 国内外の位置づけとインパクト

PARs、特に PAR2 が敗血症における脳、肺臓、肝臓、腎臓の各臓器不全発症に関与することを証明した報告は国内外において我々の研究成果を嚆矢とする。この研究成果は PAR1、PAR2、PAR3、PAR4 を介した凝固炎症反応の密接な連関を示唆するものであり、これら PARs (特に PAR2) を介した凝固炎症反応の制御が脳、肺臓、肝臓、腎臓等の敗血症性多臓器不全発症の予防と症例の予後改善に重要であることの証明に一步近づくことができたものとする。国外では PARs と敗血症性臓器不全研究に携わる競争グループは多いが、国内において同様の成果をあげている研究グループは検索し得た限りではなく、今回の我々の研究成果は今後の国内外の敗血症性臓器不全発症機序とその制御方法の解明に関して大きなインパクトを持つ成果と確信する。

(3) 今後の展望

PAR2/VEGF の連関が敗血症性臓器不全に関与する可能性を示唆した今回の ALI における結果が重要である。今後他の臓器不全への関与の証明、さらに凝固炎症反応連関のみならず、凝固・炎症・神経内分泌反応連関から敗血症性臓器不全発症機序の解明とその治療方法開発に向けた研究を継続している我々にとり大きな収穫であり、研究のさらなる発展が大きく期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Prodhon SH, Sawamura A, Miyauchi T, Hiroe M, Yamaguchi N

Protease-activated receptor 2 (PAR2) blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates renal fibrin deposition in a rat model of acute renal failure.

Shock (in press) (査読有)

② Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Sawamura A, Yamaguchi N

Expression of 4 protease-activated receptors is associated with increased levels of TNF- α , tissue factor, and fibrin in the frontal cortex of endotoxemic rats.

Thromb Res (in press) (査読有)

③ Jesmin S, Gando S, Zaedi S, Sakuraya F
Differential expression, time course and distribution of 4 PARs in rats endotoxin-induced acute lung injury. *Inflammation* 30:14-27, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

① ジェスミンサブリーナ, 丸藤哲, ショヘルザエディ, 山口直人, 小山哲夫, 澤村淳

Time-dependent alterations of VEGF and its signaling molecules in ALI in a rat model of sepsis.

第 36 回日本救急医学会総会
2008 年 10 月 14 日 札幌

② ジェスミンサブリーナ, 菅野正寛, 久保田信彦, 星野弘勝, 早川峰司, 澤村淳, 丸藤哲
Chronological expression of ET-1 and TNF- α in acute liver injury and its amelioration by PAR2 blockade in a septic rat model.

第 35 回日本救急医学会総会・学術集会
2007 年 10 月 16 日 大阪

③ ジェスミンサブリーナ, 菅野正寛, 久保田信彦, 星野弘勝, 早川峰司, 澤村淳, 丸藤哲
PAR2 BP counteracts LPS-induced inflammation and coagulation and ameliorates glomerular fibrin deposition in a rat with ARF.

第 35 回日本救急医学会総会・学術集会
2007 年 10 月 16 日 大阪

④ Gando S, Jesmin S, Zaedi S, Prodhan HS, Sawamura A, Miyachi T, Yamaguchi N.
Protease-activated receptor 2 blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates glomerular fibrin deposition in a rat model of acute renal failure.

Sepsis 2007. An International Symposium Paris.
September 28, 2007, Paris

⑤ Sawamura A, Jesmin S, Zaedi S, Prodhan SH, Yamaguchi N, Goto K, Gando

S.

Effects of protease-activated receptor 2 on the upregulated levels of ET-1 and TNF- α in acute liver injury in a rat model of endotoxemia.

Tenth International Conference on Endothelin.

September 18, 2007, Bergamo Italy

⑥ Sawamura A, Jesmin S, Zaedi S, Prodhan SH, Yamaguchi N, Goto K, Gando S.

Effects of TNF- α blocking peptide on endothelin-1 levels in lungs in endotoxemic rat model.

Tenth International Conference on Endothelin.

September 17, 2007, Bergamo Italy

[その他]

投稿予定論文

Jesmin S, Zaedi S, Togashi H, Sultana SN, Iwashima Y, Yamaguchi N, Hiroe M, Gando S

Time-dependent alterations of VEGF and its signaling molecules in acute lung injury in a rat model of sepsis.

Shock

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸藤 哲 (GANDO SATOSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30125306

(2) 研究分担者

前田 清司 (MAEDA SEIJI)

筑波大学・人間総合科学研究所・講師

研究者番号：30282346

澤村 淳 (SAWAMURA ATSUSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00241448

Jesmin Subrina

国立国際医療センター研究所・遺伝子診断

治療開発研究部・室長

研究者番号：60374261

山口 直人 (YAMAGUCHI NAOTO)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40239900

家子 正裕 (IEKO MASAHIRO)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：50250436

(3)連携研究者
なし