

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06236・19K21335

研究課題名(和文)人工呼吸関連肺傷害における内皮微小粒子の動態とセボフルランの内皮傷害に対する影響

研究課題名(英文) The dynamics of endothelial microparticles in ventilator related lung injury (VILI) and the effect of sevoflurane on endothelial injury n VILI

研究代表者

武井 祐介 (TAKEI, YUSUKE)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80822890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：急性肺傷害では、肺血管内皮傷害を反映し、肺由来の血中のEMPsが増加し、さらにそれは血管透過性亢進の指標と強い相関を示し、肺血管内皮傷害マーカーとなることを報告した(Y.Takei et al. Eur Respir J 2019)。また、敗血症においてもEMPsは増加し、特にPECAM+EMPsやVE-cadherin+EMPsは血管透過性亢進の指標になり得ることを明らかにした。小動物に対して正確に20ml/kgの高容量換気を可能にする精密な人工呼吸器を購入し、筋弛緩薬の投与により自発呼吸の影響を排除することで、より安定したVILIラットモデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、内皮微小粒子(endothelial microparticles: EMPs)が敗血症や急性肺傷害の内皮傷害を反映し、新たな血管内皮マーカーとなり得ることを示した。特に、PECAM+EMPsやVe-cadherin+EMPsは血管透過性亢進の指標になり得ることが示唆されており、人工呼吸関連肺傷害(VILI)の内皮傷害の病態の解明、セボフルランを含めたVILIに対する新規治療の効果判定に役立てられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We reported that lung-derived circulating Endothelial Microparticles (EMPs) increased in acute lung injury, reflecting pulmonary endothelial injury. Furthermore, it were strongly correlated with the severity of vascular hyper-permeability in acute lung injury. In addition, we showed that the number of circulating EMPs increased in patients with sepsis, and that PECAM+EMPs and VE-cadherin+EMPs could be a novel indicator of vascular hyper-permeability. We established more stable VILI rat model by administering muscle relaxants to eliminate the effect of spontaneous breathing with precise ventilator that enables high volume ventilation of 20 ml / kg accurately for small animals.

研究分野：麻酔科学

キーワード：人工呼吸関連肺傷害 内皮微小粒子 血管内皮傷害

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸は集中治療において必要不可欠な治療法である一方で、人工呼吸関連肺炎(ventilator induced lung injury: VILI)を引き起こす。圧損傷や容量損傷、atelectrauma、これらの刺激により惹起される biotrauma が複雑に絡み合い、VILI の病態を形成する。

急性呼吸促進症候群(acute respiratory distress syndrome: ARDS)と同様に、VILI においても肺血管内皮傷害の重要性が指摘されている。内皮由来微小粒子(endothelial microparticles: EMPs)は、近年注目を浴びている新たな内皮傷害マーカーであり、急性肺傷害の肺血管内皮傷害マーカーとなる可能性を秘めている(図1)。申請者は、科研費の補助を得て、肺由来 EMPs が ARDS における新たな肺血管内皮傷害マーカーであることを見出し、現在論文投稿中である。

本課題では、前課題をさらに発展させ、EMPs 表面に発現する内皮抗原に基づく EMPs の発現特性を解析することで、VILI における肺血管内皮傷害をより詳細に把握できるのではないかと考えた。VILI に対する有効な治療法は確立されておらず、低容量換気や open lung approach といった肺保護戦略による予防しか、有用な対策がないのが現状である。吸入麻酔薬であるセボフルランは、プレコンディショニング効果や臓器保護作用を有することが知られている。動物実験モデルでは急性肺傷害や VILI に対し、抗炎症作用や活性酸素の抑制により肺傷害を軽減することが報告されている(Strosing KM. et al. Anesth Analg. 2016 Jul;123 (1): 143-51)。しかし、現時点ではセボフルランの VILI における血管内皮障害への影響は不明のままである。そこで、本課題ではセボフルランが肺血管内皮障害に対する保護作用を持ち、VILI 治療の選択肢の1つとなるのではないかと仮説を立て、EMPs の内皮抗原発現パターンの変化で効果を検証する。

2. 研究の目的

本課題の目的は、新たな血管内皮マーカーである EMPs を用いて、VILI の血管内皮傷害の評価法を確立することである。そのためには、(1)急性肺傷害において肺由来 EMPs が放出されることことの検証、(2)EMPs のサブクラス解析で血管内皮傷害の重症度と EMPs の関連の検証、(3)安定した VILI モデルの確立、が必要となる。

(1) angiotensin converting enzyme (ACE)を発現する肺由来 EMPs (ACE+EMPs)が急性肺傷害の肺血管内皮傷害を反映することを申請者は報告していたが、血中の ACE+EMPs が本当に肺血管内皮由来であるのか、その証明のために以下の検証が必要となった。ACE+EMPs が脂質可溶性洗剤である Triton-X により消失しうるか、脂質二重膜の成分である phosphatidylserine(PS)が EMPs に発現しているのか、血中 ACE+EMPs が増加する急性肺傷害モデルマウスでは、肺肺血管内皮細胞における ACE 発現が低下するか。

(2)近年、敗血症や ARDS、VILI などの全身性の炎症に起因する重症病態で EMPs が上昇するという報告は散見されるが、研究によって EMPs の検出に用いる内皮特異抗原が異なるため、その解釈は難しい。重症病態における EMPs の系統的な解析は行われておらず、本課題では、著明な血管内皮傷害を伴う敗血症患者を対象に5種類の内皮抗原に着目した EMPs のサブクラス解析を行い、内皮傷害の重症度と EMPs の関連を検証する。

(3) 本課題では、安定した VILI ラットモデルの構築が不可欠である。ラットなどの小動物に対して、小さな1回換気量を正しく換気可能な精密な人工呼吸器を選定する必要がある。また、自発呼吸の有無は肺傷害に大きな影響を及ぼしうるので、筋弛緩含め麻酔方法の検証も必要である。

3. 研究の方法

● MPs、EMPs の同定

血清および血漿中の MPs はフローサイトメーター(BD LSRFortessa™ X-20)を用いて同定した。MPs の解析には、フローサイトメーターのサイズ検出感度限界に近い作業を要求される。フローサイトメーター装置の微小粒子に対する散乱応答に関しては、個々の装置で特性が異なり、今回使用する BD LSRFortessa™ X-20 は側方散乱光(SSC: side scatter)のパラメーターを最大限に活用しているため、MPs 解析用のビーズは、SSC から微小粒子を同定可能な Megamix-Plus SSC™ (Beckman Coulter)を用いた。Megamix-Plus SSC™を用いて直径0.1 μmから1.0 μmの微小粒子に相当するゲートを設定し、MPs を同定した。

FITC 標識抗 CD31 抗体、PE 標識抗 CD41 抗体、APC 標識抗 CD106 抗体、FITC 標識抗 CD144 抗体、PE 標識抗 CD62E 抗体、APC 標識抗 CD54 抗体による多重免疫染色を行なったのちに、フローサイトメーター (BD LSRFortessa) で解析を行い、上述通りに同定した MPs のうち、CD31+MPs を PECAM+EMPs、CD144+EMPs を VE-cadherin+EMPs、CD62+EMPs を E-selectin+EMPs、CD54+EMPs を ICAM1+EMPs、CD106+EMPs を VCAM1+EMPs と定義した。ヒト血漿・血清サンプルにおいては血小板由来 MPs も含まれるため、CD31+CD41-MPs を PECAM+EMPs とした。

● EMPs に対する Triton-X の効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

敗血症患者血清中 EMPs、またはヒト肺微小血管内皮細胞 (Human pulmonary microvascular endothelial cells: HPMECs)の培養上清から得られた EMPs が本当に脂質膜由来の小胞であるのか、免疫複合体やデブリではないのか検証した。敗血症患者血清および HPMECs 培養上清を 21,000g で 45 分遠心して得られた MPs 含有液(MPs-rich fluids)を、Triton- の最終濃度が 0.5 %となるように調整し、4 で 1 時間培養した。Triton- による前処理を施した敗血症患者の血清、MPs-rich fluids 中の PECAM+EMPs をフローサイトメーターを用いて測定した。

● HPMECs 由来の phosphatidylserine (PS)+EMPs

Annexin- はカルシウムイオン存在下で細胞膜脂質二重層に含まれる PS と強く結合する。PS が必ずしも MPs の特異抗原となるわけではないが、細胞膜由来の MPs は PS 陽性となり得る。HPMECs 由来の MPs-rich fluids に Annexin- binding buffer を加え、FITC 標識抗 CD31 抗体と BV421 標識抗 Annexin- 抗体と反応させ、フローサイトメーターで PS+EMPs を測定した。

また、TNF- などの炎症性刺激は内皮細胞から EMPs 放出を促すが知られているが、EMPs 放出に関するメカニズムの詳細はわかっていない。そこで p38MAPK 阻害作用の SB203580 (10 μM)、各種 caspase 阻害作用の Z-VAD-FMK(50 μM)、necrosis 阻害作用の necrostatin-1(20 μM)、各種阻害剤の溶解液である DMSO による 1 時間の前処理後に、TNF- (25 ng/ml)を 24 時間行い、EMPs の変化を観察した。

● 急性肺傷害モデルマウスの臓器別 ACE 発現の変化

8~12 週齢の雄の c57/Bl6 マウスに CLP 手術を施し、急性肺傷害モデルマウスを作成した。コントロールとして sham 手術を行なった。CLP 手術から 24 時間後に安楽死させ肺、肝臓、腎臓を摘出し、各組織の ACE の発現をウエスタンブロッティング法により検出した。採取した組織は均質化したのち電気泳動により蛋白を分離し、PVDF メンブレンに転写した。抗 ACE 抗体、抗 アクチン抗体と反応させ HRP 標識二次抗体と反応させ、LAS-4000 mini で検出した。また ACE の定量化は アクチンをローディングコントロールとして使用した。

また回収したマウス肺組織を均一化し、PE 標識 VE-cadherin 抗体および FITC 標識 CD45 抗体で染色し、FACS Aria cell sorter を用いて CD45+CD144+の肺血管内皮細胞を回収した。回収したマウス肺血管内皮細胞の ACE 発現をウエスタンブロッティング法により検出した。

● 敗血症患者の EMPs サブクラス解析

敗血症患者の EMPs のサブクラス解析のために、東北大学病院集中治療部に入院した敗血症患者を対象とし、入室時、第 2、3、5、7 日に末梢血採血を行い、血漿を精製した。精製、保存された血漿中の、PECAM+EMPs, VE-cadherin+EMPs, E-selectin+EMPs, ICAM1+EMPs, VCAM1+EMPs を測定した。また、定期的頭頸部腫瘍根治術を受けて集中治療室に入室する患者を、非敗血症のコントロール群とした。

● 人工呼吸関連肺傷害モデルラットの作製検討

雄の 10-12 週齢の Sprague-Dawley ラットを用いた。小動物用人工呼吸器は、Kent Scientific 社オートマチック人工呼吸器/Rovent(ローベント)モジュール付き PS-04 を購入し、使用した。塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノールを腹腔内投与による全身麻酔施行後に、気管切開し、14 ゲージサーフローで気管挿管を行い、人工呼吸器に接続した。高容量換気(1 回換気量 20ml/kg、呼吸回数 30 回)を 4 時間行い VILI ラットモデルを作製した。同様に人工呼吸器に接続し、低容量換気(1 回換気量 6ml/kg、呼吸回数 90 回)を 4 時間行い、コントロールとした。

● 統計解析

データは中央値(四分位範囲)で表した。統計解析には GraphPad Prism 7.0b または JMP Pro 13.0.0 を用いた。二群間の変数の比較には、Wilcoxon の符号順位検定を、多群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を行った。

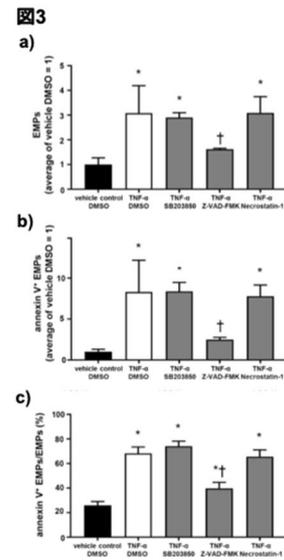
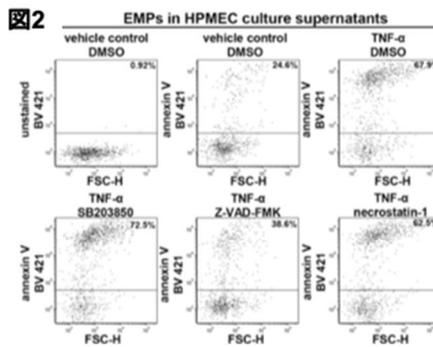
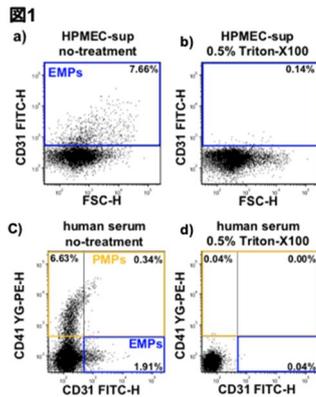
4. 研究成果

(1) Triton- の MPs に対する効果

図 1 に Triton- 処理前後のフローサイトメーター図を示す。HPMECs 由来の MPs-rich fluids および敗血症患者の血清検体を 0.5% Triton と 1 時間で培養すると、MPs-rich fluids、血清中

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

の EMPs はほぼ消失した。本課題で測定している MPs は、細胞膜由来の小胞であることに矛盾はしなかった。



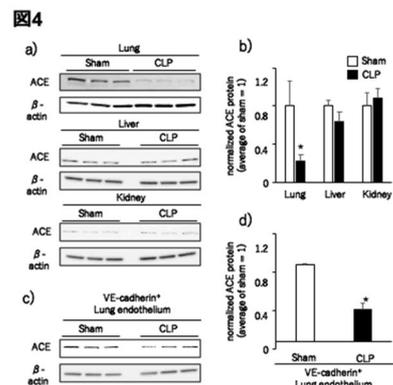
(2) HPMECs 由来 EMPs の PS 発現

図 2 に HPMECs 由来 MPs-rich fluids のフローサイトメーター図を示す。非刺激状態の HPMECs から PS⁺EMP⁺ の放出が確認できるが、24 時間の TNF- α (25 ng/ml) 刺激により PS⁺EMP⁺ は著しく上昇することが示された。また Z-VAD-FMK のみが TNF- α 刺激による EMPs および PS⁺EMP⁺ 放出を有意に抑制した (図 3)。このことから TNF- α による血管内皮細胞からの EMPs 放出には caspase が関与していると考えられた。

(3) 急性肺傷害モデルマウスの臓器別 ACE 発現の変化

急性肺障害モデルマウスの肺、肝、腎の ACE 値をウエスタンブロッティング法で測定した (図 4a)。CLP 群では全肺の ACE 値は有意に sham 群より低下していた一方で、肝・腎などの ACE を発現する肺以外の臓器では CLP 群と Sham 群間で変化がなかった (図 4b)。

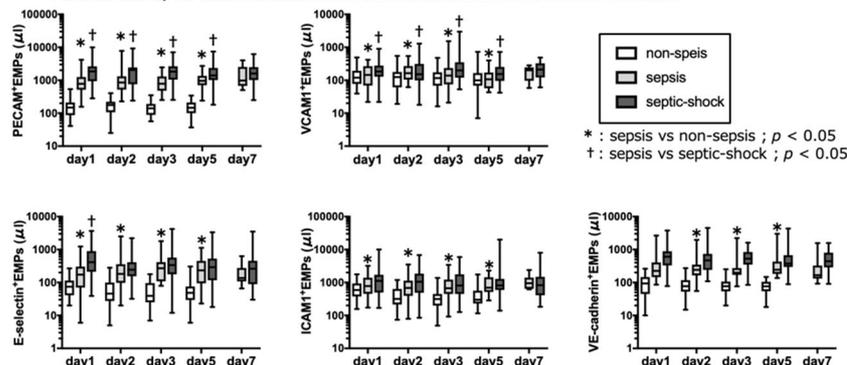
さらに、回収したマウスの肺血管内皮細胞の ACE 値をウエスタンブロッティングで測定すると、CLP 群では Sham 群では有意に ACE 値が低下していた (図 4c, d)。以上のことから、急性肺障害モデルマウスの血中 ACE⁺EMP⁺ の増加は、肺血管内皮由来のものであることが強く示唆された。



(4) 敗血症患者の EMPs サブクラス解析

敗血症患者 72 名 (敗血症 29 名、敗血症性ショック 43 名)、非敗血症患者 30 名の血中 EMPs 数を測定した。入院時の VCAM-1⁺EMP を除き、第 5 病日にまで、測定したすべての EMPs は敗血症患者で非敗血症群に比較し、有意に上昇していた。とりわけ、PECAM⁺EMP および VE-cadherin⁺EMP は、入院時から第 5 病日まで、敗血症性ショック群において敗血症群より有意に高かった。PECAM や VE-cadherin は血管内皮間に存在し、細胞間接着により細胞間の透過性などに関与しており、PECAM⁺EMP および VE-cadherin⁺EMP の増加は血管透過性亢進を示唆した。一方で、炎症により誘導される内皮抗原 (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) を発現する EMPs に関しては、入院時の E-selectin⁺EMP のみが敗血症ショックで有意に敗血症患者より高かったが、その他では敗血症性ショック群と敗血症群で差はなかった。また入院時および第 2 病日の PECAM⁺EMP、入院時の VE-cadherin⁺EMP および E-selectin⁺EMP は死亡群で生存群より有意に高かった。

図 5: 敗血症患者では血中 EMPs が上昇する。PECAM⁺EMP、VE-cadherin⁺EMP は敗血症患者より敗血症性ショック患者で有意に高い



敗血症患者の PECAM⁺EMP 数および VE-cadherin⁺EMP 数は、血管透過性や重症度を反映し、予後予測因子になり得ることが示唆された。

(5) 人工呼吸関連肺傷害ラットモデルの作製

VILI ラットモデルでは、低容量換気群に比較し、換気開始から 4 時間まで有意に最高気道内圧が高く、摘出肺は肉眼的に肺うっ血および肺出血が起きており、肺傷害を引き起こしていることは明らかだった。しかし、当初予定していた VILI ラットモデルでは、自発呼吸を完全に消失させることが出来ず、設定した呼吸回数を超える呼吸回数、および設定換気量以上の巨大な換気量、人工呼吸器との非同調などがみられた。高容量換気による肺傷害に対する自発呼吸の影響を鑑みて、右頸静脈にシリコンチューブを挿入し、非脱分極性筋弛緩薬である臭化ベクロニウムの反復投与を行うこととした。筋弛緩薬投与後は自発呼吸の混入はなく、設定した換気量および換気回数の完全調節呼吸を実現した。

VILI モデルでは $P/F < 300\text{mmHg}$ と酸素化傷害を認めただけでなく、低容量換気群に比較し、血中乳酸値も有意に高く、代謝性アシドーシスも誘発されていた。

VILI モデルラットの血中 EMPs の測定にはまだ着手できていない。EMPs サブクラス解析には多重免疫染色が必要であるが、細胞染色とは異なり MPs は洗浄の過程で喪失が見込まれるため、蛍光標識抗体が望ましい。しかし、蛍光標識抗ラット抗体は種類が少ないため研究の進行が遅れていたが、Zenon labeling technology を用いた多重染色を検証中である。

ARDS、敗血症、VILI においては血管内皮傷害の評価法の確立は重要な課題であり、EMPs はこれらの重症病態における新たな内皮マーカーとなり得るものである。特に、PECAM や VE-cadherin は内皮細胞間隙に存在し、血管透過性の調節を担う内皮抗原であり、これらを発現する PECAM⁺EMPs や VE-cadherin⁺EMPs は敗血症患者の重症度や血管透過性を反映していることが示唆されている。VILI の病態においても血管透過性や重症度を反映する可能性があり、VILI モデルラット血中の EMPs 解析法を早急に確立し、研究を進めていきたい。また、ラット血中の EMPs 解析手法が確立されれば、セボフルランの VILI に対する臓器保護作用の検証も可能となる。

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 1. 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 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0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
3. 学会等名 第66回 日本麻酔科学会学術集会
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