

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09281

研究課題名(和文)グリコカリックス障害から解析する敗血症病態：急性・慢性複合障害と超微形態的検討

研究課題名(英文) Endothelial glycocalyx damage in pathophysiology of sepsis: analysis from complex acute on chronic damage and ultrastructural alterations

研究代表者

久志本 成樹 (Kushimoto, Shigeki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50195434

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)：超微形態学的検討を用いた本研究において、1)糖尿病マウスでは敗血症発症前から血管内皮グリコカリックス障害があり、2)敗血症性血管炎によりさらに障害され、3)肺への炎症細胞集積の遅延および遷延が生じ、4)敗血症による生存率が低下することを明らかにした。一方、糖尿病モデルマウスの血管内皮グリコカリックスは、血糖コントロールおよびヘパラン硫酸類似物質を投与により回復がみられ、糖尿病患者においては、血管内皮グリコカリックス障害が感染症の転帰に影響する可能性がある。血管内皮グリコカリックスは多彩な糖たんぱく質や多糖類から構成されており、治療効果を有する構成成分を明らかにすることが注目される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症や生活習慣病の病態として、微小循環障害が注目されている。微小循環を維持する血管は内皮細胞により支持され、その内腔側表面をグリコカリックスと呼ばれる糖タンパク複合体によって覆われている。血管内皮グリコカリックスは微小循環の恒常性を保つが、その構造は脆弱で容易に傷害され、様々な疾患や病態に影響を与える可能性がある。

糖尿病患者が感染症で重篤化しやすいこと、糖尿病・敗血症ともに微小循環障害を有することに着目し、病態と血管内皮グリコカリックス傷害との関係、治療法を検討した。血管内皮グリコカリックスの保護による重症化予防の可能性は、これからの医療に大きなインパクトを与える可能性があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research provided the ultrastructure of endothelial glycocalyx injury under diabetic conditions. In diabetic mice, endothelial glycocalyx is already injured before infection, and the migration of inflammatory cells is both delayed and expanded. This extended inflammation may be involved in endothelial glycocalyx damage due to the attenuation of endothelial glycocalyx synthesis, leading to unfavorable outcomes. Appropriate glycemic control or administration of heparan sulfates may improve the endothelial glycocalyx injury under diabetic conditions.

Endothelial glycocalyx is composed of variable glycoproteins and polysaccharides, and identifying the component with efficacy on outcome will be a novel research issue.

研究分野：救急・集中治療医学

キーワード：敗血症 糖尿病 グリコカリックス 血管内皮細胞傷害

### 1. 研究開始当初の背景

感染症や生活習慣病などの病態として、微小循環障害が注目されている。微小循環を維持する血管は内皮細胞により支持され、その内腔側表面をグリコカリックスと呼ばれる糖タンパクの複合体によって覆われ保護されている。血管内皮グリコカリックスは多彩な機能を有し微小循環の恒常性を保つが、その構造は脆弱で容易に傷害され、様々な疾患や病態に影響を与える可能性がある。

糖尿病患者が感染症で重篤化しやすいこと、糖尿病および敗血症が共に微小循環障害を有することに着目した。血管内皮グリコカリックスの保護により重症化を予防できれば、患者予後および医療資源の節約といった観点から意義は大きいものと考えた。

### 2. 研究の目的

糖尿病における易感染性および感染症重症化と血管内皮グリコカリックス障害の関係を検討すること。また血管内皮グリコカリックス損傷改善による転帰との関連を検討すること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病における血管内皮グリコカリックス障害と炎症反応

糖尿病モデルマウスを用いて、リポ多糖 (LPS) による敗血症性血管炎における血管内皮グリコカリックス障害と炎症応答を評価し、転帰との関係を検討した。9-12 週齢の雄性糖尿病マウス C57BLKS/J *lar-+leprdb/leprdb* (db/db) を用い、対照群を同腹仔の C57BLKS/J *lar-m+/+leprdb* (db/+) マウスとした。LPS 15 mg/kg 腹腔内投与による敗血症モデルを作成し、48 時間生存率を評価した。肺障害は HE 染色による組織病理学的スコアリング、炎症反応は肺組織への炎症細胞遊走および血清 IL-1 を経時的に評価した。血管内皮グリコカリックス傷害を定量化するため、グリコカリックスのコアタンパクである血清シンデカン-1 および肺インテンシティスコアを計測した。またグリコカリックス合成能を quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) にて評価し、グリコカリックスを超微形態学的に検討した。

#### (2) 糖尿病モデルマウスの血管内皮グリコカリックスの回復と転帰

血管内皮細胞は高血糖で機能が低下することから、糖尿病モデルマウスに対し A. 血糖コントロール群および B. 血糖コントロールに加え、ヘパラン硫酸類似物質を投与した群を治療群と設定した。これらを蛍光レクチンにて免疫染色し、評価した。

また未治療群と の血糖コントロールに加えヘパラン硫酸類似物質を投与した群について、LPS を投与し生存率および重症度を評価するため disease activity index score (DAIS) を設定し、経時的にスコアリングした。DAIS は 0 点：元気に動き回る、1 点：丸くなっているが、ケージを揺らすと動くことは可能、2 点：丸くなってほとんど動かない、3 点：体が平らに伸びてきて、たまに歩くとふらつく、4 点：足も伸びてきてほとんど動かない、5 点：死亡とした。

### 4. 研究成果

(1) 48 時間生存率は、対照群 75% (18/24) に対し、糖尿病マウス 0% (0/10) と有意差を認めた ( $P < 0.01$ ) (図 1)。

肺の組織病理学的スコアリングでは、LPS 投与 24 時間後に糖尿病マウスで好中球浸潤および肺浮腫ともに障害を強く認めた (LPS 投与 24 時間後 / 好中球浸潤：対照群  $2.0 \pm 0.2$ 、糖尿病マウス  $3.0 \pm 0.2$  ( $P=0.021$ )；肺浮腫：対照群  $1.5 \pm 0.2$ 、糖尿病マウス  $2.0 \pm 0$  ( $P=0.049$ )) (図 2)。

図 1. LPS 投与後の生存率

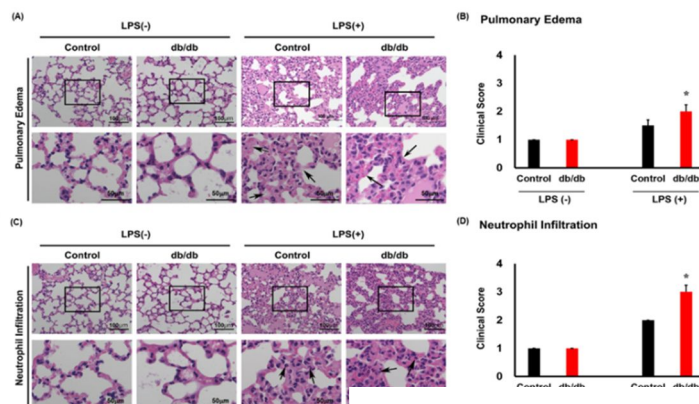
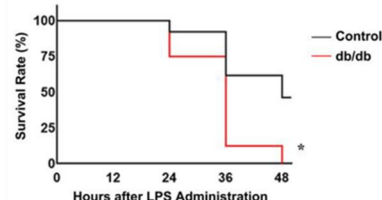


図 2. LPS 投与後の肺障害の組織像およびスコアリング

また炎症反応は、糖尿病マウスで血清 IL-1 高値が遷延し(LPS 投与後 24 時間 / 対照群 :  $30.3 \pm 6.7$  ng/mL、糖尿病マウス :  $248.7 \pm 85.7$  ng/mL ( $P=0.029$ ))、好中球などの炎症細胞の遊走が遅延し遷延した(図 3)。

血清シンデカン-1 は、糖尿病マウスで経時的に上昇した(LPS 投与後 0, 6, 12, 24 時間 / 対照群 :  $3.0 \pm 0.3$  ng/mL,  $7.7 \pm 0.8$  ng/mL,  $11.2 \pm 0.9$  ng/mL,  $7.2 \pm 1.4$  ng/mL、糖尿病マウス :  $2.0 \pm 0.2$  ng/mL,  $11.3 \pm 1.8$  ng/mL,  $16.5 \pm 1.1$  ng/mL\*,  $20.0 \pm 1.9$  ng/mL\* ; \*,  $P < 0.01$  対対照群) (図 4)。

肺のインテンシティスコアは、糖尿病マウスでは LPS 投与前から低下しており、投与後さらに低下した(LPS 投与前 / 対照群 :  $165.7 \pm 5.9$ 、糖尿病マウス :  $78.6 \pm 5.6$  ( $P < 0.01$ )) ; LPS 投与 24 時間後 / 対照群 : IL-1  $69.0 \pm 5.8$ 、糖尿病マウス :  $44.9 \pm 4.0$  ( $P < 0.01$ )) (図 5)。

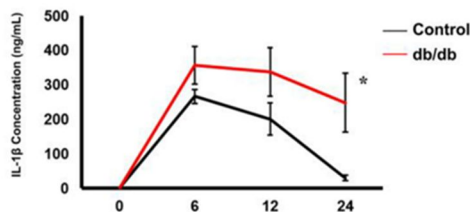


図 3. LPS 投与後の血清 IL-1β

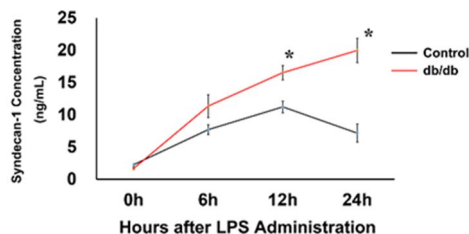


図 4. LPS 投与後の血清シンデカン-1

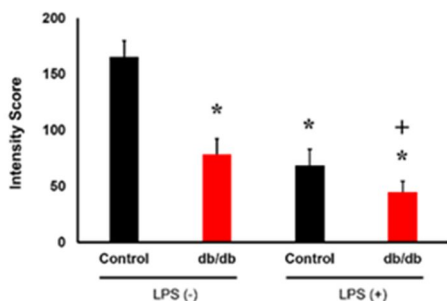


図 5. 肺の蛍光レクチン染色及びインテンシティスコア

超微形態学的検討においても、血管内皮グリコカリックスが糖尿病マウスで LPS 投与前から傷害され、投与後さらに損傷を受けた(図 6、7)。

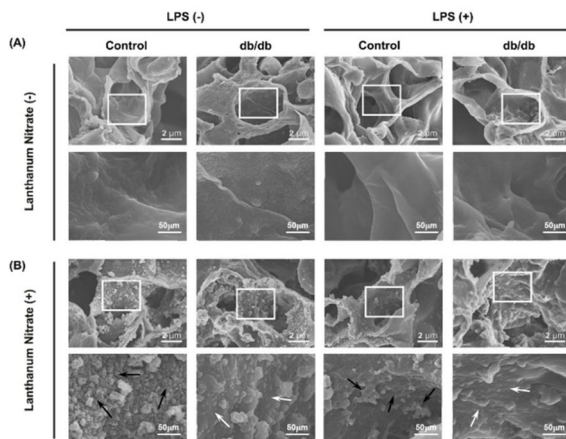


図 6. 走査型電子顕微鏡による肺の血管内皮グリコカリックス像

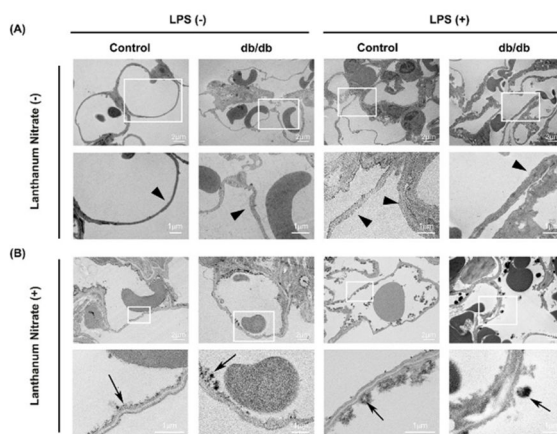


図 7. 透過型電子顕微鏡による肺の血管内皮グリコカリックス像

また qRT-PCR により、糖尿病マウスの血管内皮グリコカリックスの合成能低下を認めた (*Vcan* :  $0.76$  ( $P=0.021$ ), *EXT1* :  $0.77$  ( $P=0.032$ ), *Csgalnact1* :  $0.76$  ( $P=0.022$ )) (図 8)。

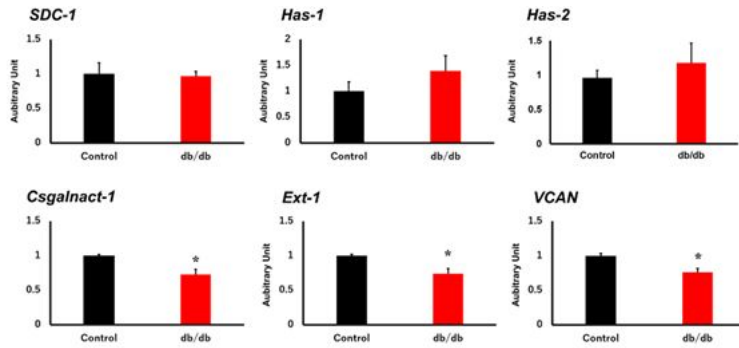


図 8. qRT-PCR による mRNA の発現量

(2)血管内皮グリコカリックスは血管内皮細胞で合成され、2 型糖尿病モデルマウスの血管内皮グリコカリックス合成能低下を先の実験で確認している。血管内皮細胞は高血糖で機能が低下することから、2 型糖尿病モデルマウスに対し 血糖コントロール群と 血糖コントロールに加えヘパラン硫酸類似物質を投与した群の両者において、蛍光レクチンにて血管内皮グリコカリックスを描出し定量的に評価したところ、未治療群に対し両群で改善がみられた (図 9)。

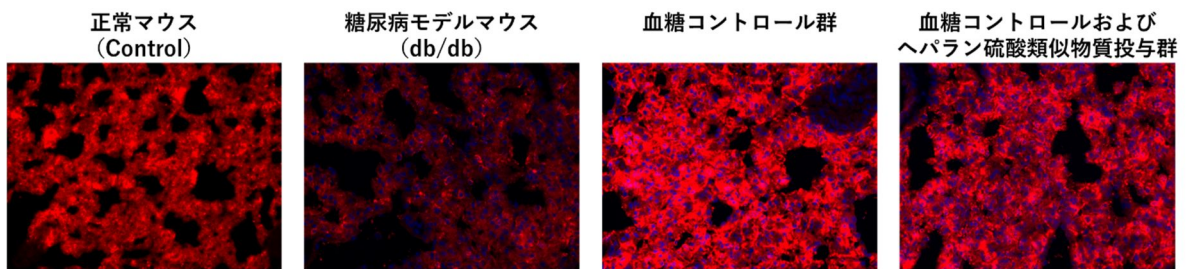


図 9. 蛍光レクチン染色による正常マウスおよび db/db の未治療群、治療群の血管内皮グリコカリックス

血糖コントロールおよびヘパラン硫酸類似物質投与群を治療群として、未治療群に対し LPS を 5.75 mg/kg 投与したところ、治療群 80% (n=5)、未治療 60% (n=5) であった。

さらに炎症の極期である LPS 投与 6 時間後の血清 IL-1 $\beta$  およびシンデカン-1 について ELISA 法で正常マウスおよび未治療群と比較したところ、数値の改善が得られた (図 10)。

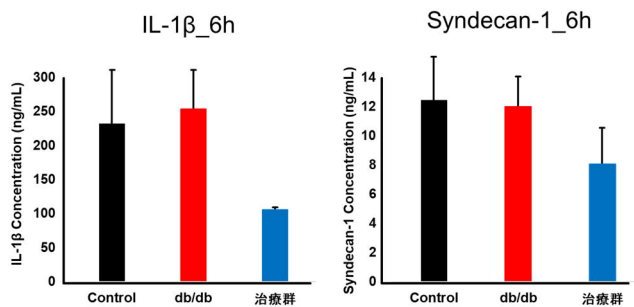


図 10. ELISA 法による、LPS 投与 6 時間後の血清 IL-1 $\beta$  およびシンデカン-1

LPS の投与量を 5.0 mg/kg ~ 7.5 mg/kg の間で振り生存率の検討を行った。統計学的有意差は得られなかったが、治療群で Disease activity index score の早期改善がいずれの群でもみられた (図 11)。

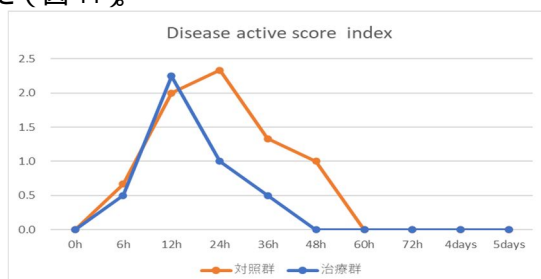


図 11. LPS 投与後の DAIS

総括：

本研究では、1) 糖尿病マウスでは敗血症発症前から血管内皮グリコカリックス障害があり、2) 敗血症性血管炎によりさらに障害され、3) 敗血症による生存率が低下し、4) 肺への炎症細胞集積の遅延および遷延が生じることを明らかにした。糖尿病マウスでは、血管内皮機能障害のため血管内皮グリコカリックスの合成能が低下し、LPS 投与前から菲薄していたともと思われる。さらに、血管内皮細胞が血管内腔に露出し、炎症反応が惹起されやすい環境となっていると考えられた。そのため、敗血症において血球との相互作用による血管内皮細胞傷害が生じ、炎症が誘導され遷延したことから微小循環障害に陥り、生存率低下に影響した可能性があると考えられた。

一方、糖尿病モデルマウスの血管内皮グリコカリックスは、血糖コントロールおよびヘパラン硫酸類似物質を投与により回復がみられ、これら治療群では未治療群に対し炎症反応が抑制されることが示唆された。生存率について、統計学的有意差は見られなかったが、disease activity index score の改善がみられた。

以上より、糖尿病患者においては、血管内皮グリコカリックス障害が感染症の転帰に影響する可能性がある。

血管内皮グリコカリックスは多彩な糖たんぱく質や多糖類から構成されており、今後どの構成成分を投与することでより治療効果が得られるか、さらに検討を行うことで臨床応用へと繋がりたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hatano Yuichiro, Ideta Takayasu, Hirata Akihiro, Hatano Kayoko, Tomita Hiroyuki, Okada Hideshi, Shimizu Masahito, Tanaka Takuji, Hara Akira	4. 巻 13
2. 論文標題 Virus-Driven Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112625	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 Keiko, Okada Hideshi, Sumi Kazuyuki, Tomita Hiroyuki, Kobayashi Ryo, Ishihara Takuma, Kakino Yoshinori, Suzuki Kodai, Yoshiyama Naomasa, Yasuda Ryu, Kitagawa Yuichiro, Fukuta Tetsuya, Miyake Takahito, Okamoto Haruka, Doi Tomoaki, Yoshida Takahiro, Yoshida Shozo, Ogura Shinji, Suzuki Akio	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum syndecan-1 reflects organ dysfunction in critically ill patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-88303-7	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 -
1. 著者名 Okamoto Haruka, Muraki Isamu, Okada Hideshi, et.al	4. 巻 191
2. 論文標題 Recombinant Antithrombin Attenuates Acute Respiratory Distress Syndrome in Experimental Endotoxemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1526 ~ 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.05.015	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 Kinoshita Takamasa, Tomita Hiroyuki, Okada Hideshi, et.al	4. 巻 12
2. 論文標題 Endothelial cell-specific reduction of heparan sulfate suppresses glioma growth in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Discover Oncology	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) 10.1007/s12672-021-00444-3	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 Kitagawa Yuichiro, Kawamura Itta, Suzuki Keiko, Okada Hideshi, et.al	4. 巻 16
2. 論文標題 Serum syndecan-1 concentration in hospitalized patients with heart failure may predict readmission-free survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260350	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 Kamidani Ryo, Miyake Takahito, Okada Hideshi, et.al	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of cryoprecipitate transfusion therapy in patients with postpartum hemorrhage: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-97954-5	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 Kusuzawa Keigo, Suzuki Keiko, Okada Hideshi, et.al	4. 巻 8
2. 論文標題 Measuring the Concentration of Serum Syndecan-1 to Assess Vascular Endothelial Glycocalyx Injury During Hemodialysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	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) 10.3389/fmed.2021.791309	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 Yamada Noriaki, Kitagawa Yuichiro, Yoshida Takahiro, Nachi Sho, Okada Hideshi, Ogura Shinji	4. 巻 21
2. 論文標題 Validity and risk factor analysis for helicopter emergency medical services in Japan: a pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Emergency Medicine	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) 10.1186/s12873-021-00471-x	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 Sampei So, Okada Hideshi, et.al	4. 巻 9
2. 論文標題 Endothelial Glycocalyx Disorders May Be Associated With Extended Inflammation During Endotoxemia in a Diabetic Mouse Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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) 10.3389/fcell.2021.623582	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 Fukuta T, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Tomita H, Suzuki A, Oda K, Uchida A, Matsuo S, Fukuda H, Yano H, Muraki I, Zaikokuji R, Kuroda A, Nishio A, Sampei S, Miyazaki N, Hotta Y, Yamada N, Watanabe T, Morishita K, Doi T, Yoshida T, Ushikoshi H, Yoshida S, Maekawa Y, Ogura S.	4. 巻 54
2. 論文標題 Neutrophil Elastase Inhibition Ameliorates Endotoxin-induced Myocardial Injury Accompanying Degradation of Cardiac Capillary Glycocalyx	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 386-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001482.	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 -

1. 著者名 Yano H, Kuroda A, Okada H, Tomita H, Suzuki K, Takada C, Fukuda H, Kawasaki Y, Muraki I, Wakayama Y, Kano S, Tamaoki Y, Nishio A, Inagawa R, Sampei S, Kamidani R, Kakino Y, Yasuda R, Kitagawa Y, Fukuta T, Miyake T, Kanda N, Miyazaki N, Doi T, Yoshida T, Suzuki A, Yoshida S, Ogura S	4. 巻 13
2. 論文標題 Ultrastructural alteration of pulmonary tissue under conditions of high oxygen concentration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Clin Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 3004-3012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡田英志、楠澤佳吾、鈴木景子、北川雄一郎、長屋聡一郎、土井智章、鈴木昭夫、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血液浄化療法により生じる血管内皮グリコカリックス障害の定量
3. 学会等名 第66回日本透析医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 岡田英志、川村一太、北川雄一郎、渡邊崇量、松尾仁司、小倉真治
2. 発表標題 Serum Syndecan-1 Concentration in Hospitalized Patients with Heart Failure may Predict Readmission-free Survival
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田洋丞、岡田英志、鈴木浩大、玉置祐斗、南山徹、吉村絃希、大岩秀明、福田哲也、土井智章、小倉真治
2. 発表標題 心不全による血管内皮グリコカリックス障害は炎症細胞の遊走を増加させる
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田陽平、岡田英志、塚田真菜、上谷遼、三浦智孝、柿野圭紀、水野洋佑、安田立、北川雄一郎、三宅喬人、小倉真治
2. 発表標題 肺炎における好中球組織動態と役割についての考察
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田知輝、岡田英志、川崎雄輝、中島優介、島田卓人、吉田知生、柴將人、神田倫秀、名知祥、吉田隆浩、小倉真治
2. 発表標題 横紋筋融解症に伴う急性腎障害に対するアンチトロンピン治療の考察
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野博敬、岡田英志、加島朔、宮田遥香、高田ちひろ、三瓶想、加納壮一郎、若山佑豪、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血管内皮グリコカリックス障害は微小血栓生成を促進する
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西尾紋首、岡田英志、楠澤佳吾、鈴木景子、石原拓磨、岡本遥、長屋聡一郎、安田立、鈴木昭夫、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血液浄化療法により生じる血管内皮グリコカリックス障害の定量とその要因解析
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎雄輝、岡田英志、富田弘之、柿野圭紀、鈴木浩大、北川雄一郎、三宅喬人、土井智章、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血管内皮におけるヘパラン硫酸の減少は組織の炎症増悪に關与する
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田英志
2. 発表標題 血管内皮障害で敗血症の重症化を紐解く～グリコカリックスでつなぐ病態生理と臨床～
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三瓶想 岡田英志 久志本成樹 小倉真治
2. 発表標題 糖尿病の感染症には血管内皮グリコカリックス傷害が関与する
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田英志、楠澤佳悟、北川雄一郎、長屋聡一郎、土井智章、吉田省造、小倉真治、鈴木景子、鈴木昭夫
2. 発表標題 血液浄化療法により生じる血管内皮グリコカリックス障害の定量
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三瓶 想、岡田英志、久志本成樹
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスのグリコカリックス障害と敗血症血管炎下における炎症細胞の遊走遅延
3. 学会等名 第48回 日本救急医学会総会・学術集会
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	岡田 英志  (Okada Hideshi)  (30402176)	岐阜大学・医学部附属病院・准教授   (13701)	

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
---------	---------