

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17882

研究課題名(和文)人工呼吸関連肺傷害の血管内皮傷害における内皮微小粒子の病態生理学的作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiological role of endothelial microparticles for endothelial injury in ventilator-induced lung injury

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸関連肺傷害(VILI)モデルラットでは、肺血管内皮傷害を反映し、PECAM+EMPs数、VE-cadherin+EMPs数、ICAM-1+EMPs数、VCAM-1+EMPs数が上昇した。特に血管透過性亢進の指標である肺乾湿重量比とは強い相関を示し、VILIの血管内皮傷害マーカーとなることが示唆された。また、抗炎症作用をもつセボフルランを1MACで20分間吸入させたのちに高容量換気を行うと、ICAM-1+EMPs数およびVCAM-1+EMPs数が減少し、VILIの炎症性内皮傷害が軽減される可能性があ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

高容量換気による人工呼吸関連肺傷害(VILI)モデルラットを用いて、EMPs数がVILIの血管内皮マーカー、特に肺血管透過性亢進の指標となることを示した。また、VILIへの対策は換気量を制限し肺胞の過伸展を防ぐ肺保護戦略しかないのが現状であるが、病的肺では正常な肺容量が減少しており、肺保護戦略だけではVILIの進展を防ぐことはできない。VILIの進展には肺胞過伸展につづく炎症が関与しており、肺胞における炎症抑制はVILI抑制への重要な戦略である。本解題では、吸入麻酔薬であるryセボフルランがVILIの内皮傷害を軽減させることが示唆され、あらたなVILI対策への足がかりになる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In the ventilation-induced lung injury (VILI) model rat, the numbers of PECAM+EMPs, VE-cadherin+EMPs, ICAM-1+EMPs, and VCAM-1+EMPs were increased, reflecting pulmonary vascular endothelial injury. The number of EMPs showed a strong correlation with lung wet to dry ratio, an index of increased endothelial permeability, suggesting that EMPs may be a marker of vascular endothelial injury in VILI. In addition, inhalation of sevoflurane at 1 MAC for 20 minutes followed by high tidal ventilation decreased the number of ICAM-1+EMPs and VCAM-1+EMP, suggesting that pre-conditioning effect of sevoflurane may reduce inflammatory induced endothelial injury in VILI.

研究分野：麻酔科学、集中治療

キーワード：人工呼吸関連肺傷害 細胞外小胞 マイクロパーティクル 内皮傷害 セボフルラン

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、人工呼吸関連肺傷害 (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、肺血管内皮傷害が VILI の病態でも注目されているが、その評価法は確立されていない。

内皮由来微小粒子 (endothelial microparticles: EMPs) は、近年注目を浴び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。申請者らは、肺由来 EMPs が *in-vitro* 研究、*in-vivo* 研究、臨床研究から包括的に ARDS における肺血管内皮傷害マーカーとなりえることを見出した (Y. Takei et al. *Eur Respir J* 2019)。実際に VILI ラットモデルでは PECAM⁺ EMPs が上昇するとの報告があり (Nuria E et al. *Crit Care Med* 2015)、EMPs が VILI の血管内皮傷害のマーカーとなることが示唆される。しかし、VILI における EMPs の動態は未だ完全に解明されておらず、内皮抗原に基づく EMPs のサブクラス解析は、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仮説を立てた。

さらに microparticles は抗炎症や凝固促成作用などの生理活性を有しており、単なる細胞傷害性マーカーだけではなく、細胞間伝達にも関与すると考えられている。高容量換気による VILI 動物モデルでは、肺以外の遠隔臓器にも傷害が引き起こされることが示されており、microparticles も情報伝達物質として機能している可能性がある。ラットの血管内皮細胞を用いて、細胞ストレッチ刺激による EMPs 放出の機序及び *in-vivo*、*in-vitro* での機能解析を検証することは、細胞外小胞の観点から見た VILI のさらなる病態解明に寄与できる。

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 などの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。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。本課題では VILI においてセボフルランが肺血管内皮障害に対する保護作用を持つのではないかと仮説を立て、EMPs のサブクラス解析を用いてその効果を検証する。

2. 研究の目的

VILI モデルラットの血漿中の PECAM⁺ EMPs、VE-cadherin⁺ EMPs、ICAM-1⁺ EMPs、VCAM-1⁺ EMPs を測定し、EMPs が VILI モデルラットの肺血管内皮傷害マーカーとなるか検証すること、また、セボフルランの pre-conditioning 効果が VILI の血管内皮傷害を軽減させるか検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)人工呼吸関連肺傷害 (VILI) モデルラットの作成

8-10 週の雄の Sprague-Dawley ラットを用いて VILI モデルラットを作成した。ミダゾラム + 塩酸メドミジン + 酒石酸ブトルファノールの腹腔内投与により全身麻酔を導入した後、気管切開を行い、14G サーフロー針 (TERUMO, Tokyo, Japan) を用いて気管挿管をし、3-0 シルク糸で結紮した。右頸部静脈を露出し、ラット頸静脈用カテーテル (Rat Thracic Juglar Vein Catheter R-JVC, Braintree Scientific Inc, Braintree, MA, USA) を挿入し中心静脈路を確保した。左頸部を切開し、左頸動脈に 24G サーフロー針 (TERUMO, Tokyo, Japan) を挿入し観血的動脈圧測定を開始した。

気管挿管後に小動物用人工呼吸器 (オートマチック人工呼吸器 Rovent, Kent Scientific 社, Torrington, CT, USA) に接続し、人工呼吸を開始した。VILI モデルラットは 1 回換気量を 20 mL/kg に設定し、呼吸回数は 30 回/分とした。コントロールとして、自発呼吸群 (SB 群)、低容量換気群 (1 回換気量 6 mL/kg, 70 回/分; LTV 群) を設定した。吸入酸素濃度は 0.21 とし、ミダゾラム + 塩酸メドミジン + 酒石酸ブトルファノールの腹腔内投与を 1 時間ごとに行い、体

動による影響をなくするために筋弛緩薬（臭化ベクロニウム）を持続投与した。換気量、最高気道内圧を持続モニタリングし、4時間の人工呼吸を行い、VILIモデルラット(VILI群)を作成した。

(2) 肺乾湿重量比

肺血管透過性の評価のために肺乾湿重量比を測定した。4時間後に動脈圧ラインから全血採血を行い失血死させた。肺を en-bloc で摘出し、右肺後葉を同定し、肺重量 (wet weight) を測定後、摂氏 70 度で 72 時間乾燥させ、肺重量 (dry weight) を測定し肺乾湿重量比 (wet weight/dry weight)。

(3) 肺組織学検査

摘出した左肺は 20 cmH₂O の圧をかけて 4%パラホルムアルデヒドで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。肺傷害の程度は modified VILI-score (肺胞壁の肥厚、炎症性細胞の浸潤、出血) で評価した。

(4) circulating EMPs の測定

4時間の人工呼吸の後に観血的動脈圧ラインより全血採血し、platelet free plasma(PFP)を精製し、測定まで-80度で凍結保存した。本研究ではラット PFP 中の PECAM+ EMPs, VE-cadherin+ EMPs, ICAM-1+ EMPs, VCAM-1+ EMPs をフローサイトメーターで測定した。

本研究では、MPs を直径 0.1 – 1.0 μm の大きさで細胞膜のリン脂質であるフォスファチジルセリンを有する小胞集団と定義した。そこで、PFP の microparticles (MPs) を検出するために、Megamix-PLUS SSC (Biocytex, Mardeille, France)により直径 0.1 – 1.0 μm のサイズの小胞群のゲートを設定し、かつ Annexin-V 染色 (VB421 標識抗ラット Annexin-V 抗体; Biolegend, San Diego, CA, USA) によりフォスファチジルセリン発現集団を検出した。EMPs は内皮抗原を発現する MPs であり、本課題では PECAM, VE-cadherin, ICAM-1, VCAM-1 のを発現する MPs を EMPs とした。

PECAM+ EMPs 検出のために Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 labeling kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA)を用いて非標識抗ラット PECAM モノクローナル抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA)を Alexa Fluor 488 で蛍光標識した。PECAM は、内皮細胞以外にも血小板にも発現しているために、血小板由来 MPs を除外する必要があり、血小板抗原である CD42 の発現のない PECAM(+)CD41(-)MPs を PECAM+ EMPs とした。CD42 の検出のためには、APC 標識抗ラット抗 CD42 抗体 (Biolegend)を用いた。VE-cadherin+ EMPs の検出のために Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 labeling kit を用いて非標識抗ラット VE-cadherin モノクローナル抗体 (Invitrogen)を Alexa Fluor 488 で蛍光標識した。ICAM-1+ EMPs, VCAM-1+ EMPs の検出にはそれぞれ PE 標識抗ラット ICAM-1 抗体、PE 標識抗ラット VCAM-1 抗体を用いた。

フローサイトメーターは BD LSRFortessa(BD Biosciences)を用いた。専用のフローカウンティングビーズ (Flow-Count Fluorospheres; Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA)を用いて定量化した。

(5) VILI に対するセボフルランの pre-conditioning 効果の検証

セボフルランの pre-conditioning 効果を検証するために、挿管チューブを介して、自発呼吸下にセボフルラン 1MAC を 20 分間吸入したのち、筋弛緩薬を投与して高容量換気 (20 mL/kg) を 4 時間行った (セボフルラン群)。コントロール群では、気管切開後自発呼吸で 20 分間空気を吸入したのちに高容量換気を 4 時間行った。4 時間後観血的動脈圧ラインより全血採血を行い失血死させ、肺を en-bloc で摘出した。

(6) 統計解析

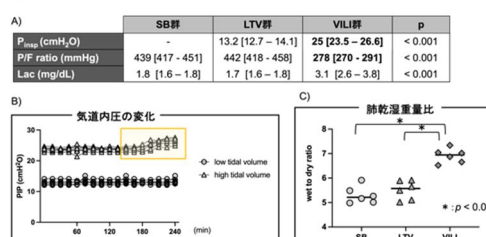
結果はノンパラメトリック検定で行い、データは中央値 [四分位範囲]で表記した。2 群間比較は Wilcoxon の符号順位検定で、3 群間比較は Steel-Dwass 検定で行った。相関関係は Spearman 順位相関係数を用いて評価した。の解析には JMP pro 15, GraphPad prism 9 を用いた。

4. 研究成果

(1) 高容量換気(20 mL/kg)は肺血管透過性を亢進させ酸素化を悪化させる

高容量換気群では 180 分以降から最高気道内圧が上昇し始め、4 時間後の最高気道内圧は VILI 群で有意に LTG 群より高かった。酸素化の指標である P/F 比は VILI 群で 278 [270, 291] mmHg, SB 群で 439[417, 451] mmHg, LTV 群で 442 [418, 458] mmHg と VILI 群で SB 群、LTV 群より有意に高くなった (ともに $p < 0.01$)。肺血管透過性を反映する肺乾湿重量比も SB 群 5.21 [5.00, 5.60], LTV 群 5.57[5.08, 5.90], VILI 群 6.94[6.62, 7.12]と VILI 群で SB 群、LTV 群より有意に上昇

Figure.1



していた (ともに, $p = 0.014$)

(2) 肺組織学検査

VILI 群においては、肺胞壁の肥厚、出血、肺胞マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が目立つ (Figure. 2 A-D)。Modified VILI-score は、SB 群 0 [0 - 0], LTV 群 1 [0.75 - 1.25], VILI 群で 6.0 [5.75 - 7.25] と VILI 群で有意に上昇していた (vs SB 群: $p < 0.01$, vs LTV 群: $p = 0.011$) (figure. 2E)。

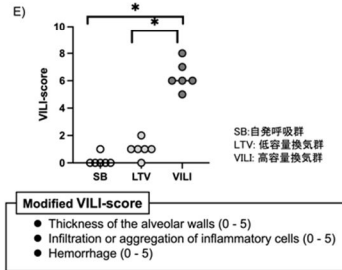
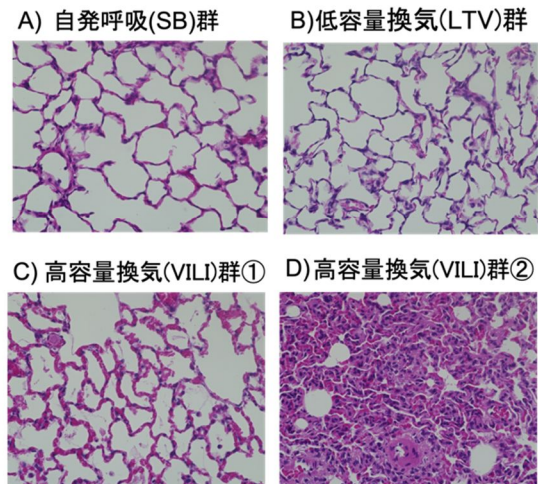


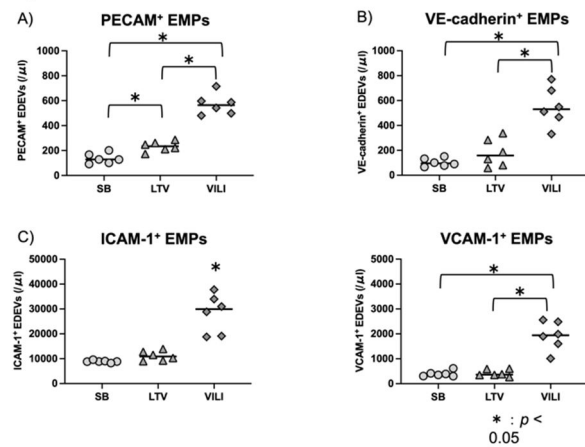
Figure. 2



(3) VILI モデルラットでは血中 EMPs 数は増加する

PECAM⁺ EMPs 数は SB 群、LTV 群、VILI 群で 129[92, 176] / μ L, 235[202, 267] / μ L, 565[494, 627] / μ L と VILI 群で有意に SB 群 ($p = 0.014$), LTV 群 ($p = 0.014$) よりも高かった (Figure. 3)。VE-cadherin⁺ EMPs 数もそれぞれ、96[75, 138] / μ L, 159[76, 298] / μ L, 530[433, 704] / μ L と VILI 群で SB 群、LTV 群に比べ有意に上昇していた (ともに $p = 0.014$)。ICAM-1⁺ EMPs 数は、それぞれ 8856[8666, 9161] / μ L, 10886[9168, 13004] / μ L, 29923 [19019, 34931] / μ L と VILI 群で SB 群、LTV 群よりも増加していた。VCAM-1⁺ EMPs 数は、それぞれ 371 [306, 465] / μ L, 366 [328, 592] / μ L, 1944 [1455, 2505] / μ L とやはり VILI 群で SB 群、LTV 群よりも増加していた。

Figure. 3



(4) EMPs と肺乾湿重量比には強い相関関係がある

PECAM⁺ EMPs 数, VE-cadherin⁺ EMPs 数, ICAM-1⁺ EMPs 数, VCAM-1⁺ EMPs 数と肺乾湿重量比との Spearman 順位相関係数は、それぞれ $r_s = 0.726$ ($p < 0.001$), 0.736 ($p < 0.001$) 0.701 ($p < 0.001$), 0.740 ($p < 0.001$) であり、EMPs 数と肺血管透過性亢進の指標である肺乾湿重量比の間には、強い相関関係が認められた (Figure. 4)。

一方、EMPs 数と酸素化の指標である P/F 比の間には負の相関関係を認めた (Figure. 5)

Figure. 4

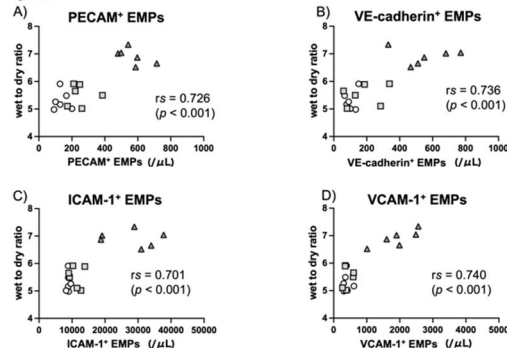
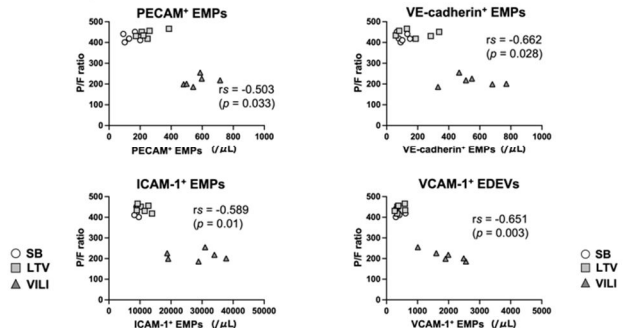
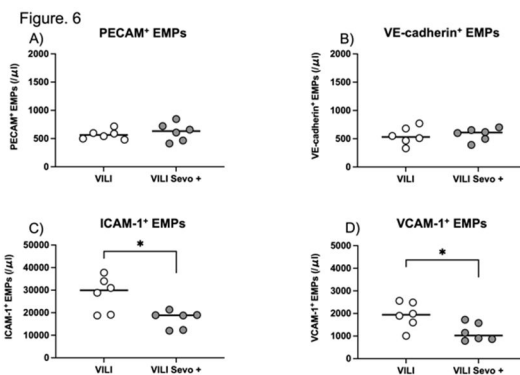


Figure. 5



(5) セボフルランは人工呼吸関連肺傷害の内皮傷害を軽減させる

VILI 群と高容量換気に先立ちセボフルラン 1MAC を 20 分間吸入させた VILI-sevo 群間で EMPs 数を比較した。PECAM+ EMPs 数および VE-cadherin+ EMPs 数は両群間で有意差はなかった(PECAM+ EMPs: $p = 0.575$, VE-cadherin+ EMPs: $p = 0.810$)、ICAM-1+ EMPs 数および VCAM-1+ EMPs 数は有意に減少した(ICAM-1+ EMP: $p = 0.025$, ICAM-1+ EMP: $p = 0.037$) (Figure. 6)。ICAM-1 および VCAM-1 は炎症により誘導される接着因子であり、セボフルランの pre-conditioning 効果により、VILI の biotrauma を抑制し内皮傷害が軽減された可能性が示唆された。



本研究では VILI モデルラットで各種 EMPs 数が上昇すること、EMPs の増加は肺血管透過性亢進と強い相関を示すことがわかった。また、VILI モデルラットの気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF) の解析が済んでいないが、BALF 中の炎症性サイトカインと各種 EMPs の相関関係を解析することで、VILI における炎症に起因する内皮傷害のマーカーとして活用できる可能性がある。

現在、人工呼吸関連肺傷害に対する治療・予防は 1 回換気量を制限し肺胞の過伸展を防ぐ肺保護戦略しか存在しない。しかしながら人工呼吸管理を必要とする ARDS などでは、“baby lung” と呼ばれるほどに有効な肺容量は減少しており、仮に推奨される肺保護戦略を実践しても局所的な肺胞の過伸展を抑制することはできない。今後われわれが取り組むべき VILI 対策は肺胞過伸展、atelectrauma により惹起される biotrauma であろう。抗炎症・抗酸化作用を有するセボフルランは VILI へも有効である可能性は議論されてきた。本研究では高容量換気に先立つセボフルランの投与により ICAM-1+EMPs、VCAM-1+EMPs と炎症による誘導される接着分子を発現する EMPs 数の減少を認め、セボフルランの pre-conditioning 効果が biotrauma を抑制する可能性が示された。今後は BALF, 肺組織の炎症性サイトカインの解析をすすめていく予定である。

また、セボフルラン以外にも抗炎症作用・抗酸化作用を有する試薬による biotrauma の抑制に関する研究にも進めていく予定である。

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 Yusuke Takei , Michio Kumagai , Manami Suzuki , Sakura Mori , Yuna Sato , Toru Tamii , Akane Tamii , Ako Saito , Yuko Ogata , Yu Kaiho , Hiroaki Toyama , Yutaka Ejima , Masanori Yamauchi	4. 巻 37(7)
2. 論文標題 Accuracy of cardiac output measured by fourth-generation FloTrac and LiDCOrapid and their characteristics regarding systemic vascular resistance in patients undergoing cardiac surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic and vascular anesthesia	6. 最初と最後の頁 1143-1151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.jvca.2023.03.019	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, 岩崎 夢大, 紺野 大輔, 入間田 大介, 関根 智宏, 齋藤 秀悠, 杉野 繁一, 鈴木 潤, 山内 正憲
2. 発表標題 細胞外小胞に着目した人工呼吸関連肺傷害の内皮傷害マーカーの探索
3. 学会等名 第50回 日本集中治療医学会 学術集会
4. 発表年 2022年～2023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
---------------------------	-----------------------	----

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