

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17887

研究課題名(和文)横紋筋融解症を起因とする多臓器障害に対するアンチトロンビンの効果の検討

研究課題名(英文)The effect of Antithrombin Therapy against Multiple Organ failure in Rhabdomyolysis

研究代表者

岡本 遥(池庄司遥)(Okamoto, Haruka)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50585239

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):横紋筋融解症に伴う AKI に対する遺伝子組換えアンチトロンビン(rAT)治療を検討する。10週齢のマウスを24時間絶食後、50%グリセオールを5mL/kgの用量で左大腿部に筋肉注射し、横紋筋融解症モデルマウスを作成。モデル作成後24時間と72時間に750IU/kgの用量でrATを腹腔内注射し、96時間後に屠殺して組織学検査を受けた。対照群では、尿細管上皮細胞核の消失と尿細管内腔表面構造の破壊が観察されたが、rAT投与により改善された。Ki67による免疫染色では、rAT投与群の尿細管上皮細胞においてKi67陽性核の数が増加し、rATが尿細管上皮細胞の再生を促進す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

横紋筋融解症は外傷的要因や非外傷的要因、代謝性疾患などの内的要因によって骨格筋が壊死して発症する。主な合併症として播種性血管内凝固症候群(DIC)や急性腎障害などが挙げられる。しかし横紋筋融解症惹起性の多臓器障害に対しての治療は輸液、血液浄化などの対症療法しかないのが現状である。本研究により、rATの投与は抗炎症作用、内皮細胞および近位尿細管の回復促進などいくつかの要因によって近位尿細管障害を減弱させる可能性が示唆された。rATはすでに臨床応用されているため、その投与は横紋筋融解症によるAKIの治療における新規戦略とみなすことができ、社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文): Aim is to investigate recombinant antithrombin (rAT) therapy for AKI associated with rhabdomyolysis. Ten-week-old male mice were injected intramuscularly into the left thigh of the mice at a dose of 5 mL/kg of 50% glyceol after 24 hours of fasting to create a rhabdomyolysis model mouse. rAT was injected intraperitoneally at a dose of 750 IU/kg 24 and 72 hours after the creation of the rhabdomyolysis model, and the mice were slaughtered 96 hours later for histological examination. In the control group, loss of tubular epithelial cell nuclei and destruction of tubular luminal surface structure were observed, but both abnormalities were improved by rAT treatment. Immunostaining with Ki67 showed a clear increase in the number of Ki67-positive nuclei in tubular epithelial cells in the rAT group, suggesting that rAT may promote the regeneration of tubular epithelial cells. rAT treatment attenuated rhabdomyolysis induced AKI, suggesting that it may be a new treatment method.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：急性腎障害 横紋筋融解症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

横紋筋融解症 (RM) は、骨格筋線維の損傷と、電解質やミオグロビンなどの筋小胞体タンパク質、クレアチニンキナーゼ、アルドラーゼ、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなどの筋細胞内容物の循環への漏出によって特徴づけられる臨床症候群である。損傷した骨格筋は分解され、その内容物が血液中に放出され、糸球体で濾過され、タンパク質の沈殿による尿細管閉塞や炎症を引き起こす。特にミオグロビンの放出は、ヘム部分が脂質過酸化や腎臓障害を誘発するため、重度の酸化的障害を誘発し、急性腎障害 (AKI) 発症の主要因の一つである。実際、RM は AKI の最も一般的な合併症の一つであり、AKI 全症例の最大 50% を占め、AKI 合併症による死亡率は 5~10% と高い。同様に、AKI は腎内だけでなく全身の炎症とも関連しています。一方、AKI には根治的な治療法はなく、輸血や血液浄化などの対症療法が唯一の治療法となっている。アンチトロンビン (AT) はトロンビンに対する阻害活性を有するため、トロンビンと活性化した凝固因子との相互作用を阻害して抗凝固作用を発揮する。また、AT は内皮細胞上のヘパリン硫酸や好中球上のシンデカン-4 に結合し、組織修復作用により LPS によって活性化した炎症や内皮の糖鎖損傷を抑制することが報告されており、全身性の炎症に対して保護的に作用すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リコンビナント AT (rAT) が横紋筋融解症による AKI に対して有益な効果を持つかどうかを調べることである。

3. 研究の方法

In vivo 動物実験

本研究は、岐阜大学動物実験委員会 (2022-053) の承認を得て、10 週齢の雄性 C57BL6 マウスを用いた。横紋筋融解症の処置として、5ml/kg の 50% グリセロールを左大腿部に筋肉内注射し、同量の生理食塩水を対照群に筋肉内注射した。グリセロールおよび生理食塩水の注射の前後 24 時間は動物を絶水した。グリセロール注射後 48 時間および 72 時間に rAT 750 IU/kg をマウスに腹腔内投与した。対照として、rAT の代わりに生理食塩水を同様の方法で投与した。生存したマウスをグリセロール注射後 96 時間で安楽死させ、腎臓検体を得た。

血清の調製および血液生化学検査

マウス 6 匹から、頰動脈から血液を採取し、25°C で 2 時間凝固させた後、遠心分離 (2,000 × g, 4°C, 20 分) した。その後、上清を回収した。血清血中尿素窒素およびクレアチニンは、SRL に測定を依頼した。血清好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N-GAL) は、マウス用酵素結合免疫吸着測定定量キット (KIT042, BioPorto Diagnostics Inc., Hellerup, Denmark) を用いて測定した。

病理組織学的評価

グリセロール投与 96 時間後のマウス 6 個体の右腎臓全体を、10% ホルマリンを含む PBS で固定し、パラフィンに包埋した。その後、パラフィン切片 (厚さ 4 μm) を脱パラフィンし、再水化した。最後に、スライドを HE で染色し、上皮細胞の壊死を示す外髄の尿細管の割合を推定し、損傷の程度を表す数値スコアを割り当てた; 0: 損傷なし、1: 0-10%、2: 11-20%、3: 21-40%、4: 41-60%、5: 61-75%、6: 75% 以上。これらの実験は、盲検で行われた。

免疫組織化学

脱パラフィン化した 4 μm 厚の切片を、Ki67、近位尿細管細胞上皮マーカー CD15 に対する 1 次抗体とインキュベートした。標的タンパク質の局在は、VECTASTAIN Elite ABC システム (Vector Laboratories) または二次抗体 (Alexa Fluor 488 および 568, Invitrogen) を用いて可視化した。核はヘマトキシリンまたはおよびヘキストで染色した。

走査型電子顕微鏡 (SEM)

マウスを麻酔し、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 中の 2.5% グルタルアルデヒドからなる溶液を、左心室に設置したカニューレから 1ml/min の定常流量で灌流した。腎臓を採取した後、同じ溶液で一晩固定した。走査型電子顕微鏡 (SEM; S-4800, Hitachi, Tokyo, Japan) 用のサンプルの作製には、凍結破砕法を使用した。

統計解析

データは平均値 ± 平均値の標準誤差で示した。2 群の比較には Student の両側 t 検定を用い、生存データはログランク検定を用いて解析した; p < 0.05 を有意とした。すべての計算は、GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) を用いて行った。

4. 研究成果

rAT はグリセロールによる横紋筋融解症による AKI を抑制した

血清血中尿素窒素、クレアチニン、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N-GAL) は、偽手術マウスと比較して、生理食塩水投与群でグリセロール投与 96 時間後に有意に上昇した。(図 1A-C)。一方、rAT 注射マウスでは、生理食塩水投与マウスと比較して、このパラメータ上昇が抑制された。これらの結果は、グリセロールによる横紋筋融解が AKI を引き起こし、rAT 投与がそれを抑制していることを示しています。

rAT 投与はグリセロール横紋筋融解症による腎尿細管傷害を抑制した

横紋筋融解症条件下では、生理食塩水投与マウスでは尿細管上皮細胞の多くの核が消失し（図 1D、黒矢印）、核の並びが不均一になっていた。また、尿細管の内腔は拡大し、刷子縁は消失していた。これらの所見は、尿細管壊死を示唆するものであった。逆に、尿細管上皮細胞の一部は核を持ち、肥大していた（図 1D、白矢印）。また、rAT 投与マウスでは、尿細管の蛇行が認められ、尿細管上皮が再生していることが示唆された（図 1D、青矢印）。また、上皮細胞が壊死した髄質外側の尿細管の割合を示す組織学的スコアでは、生理食塩水投与マウスでは悪化し、rAT 投与マウスでは改善した（図 1E）。

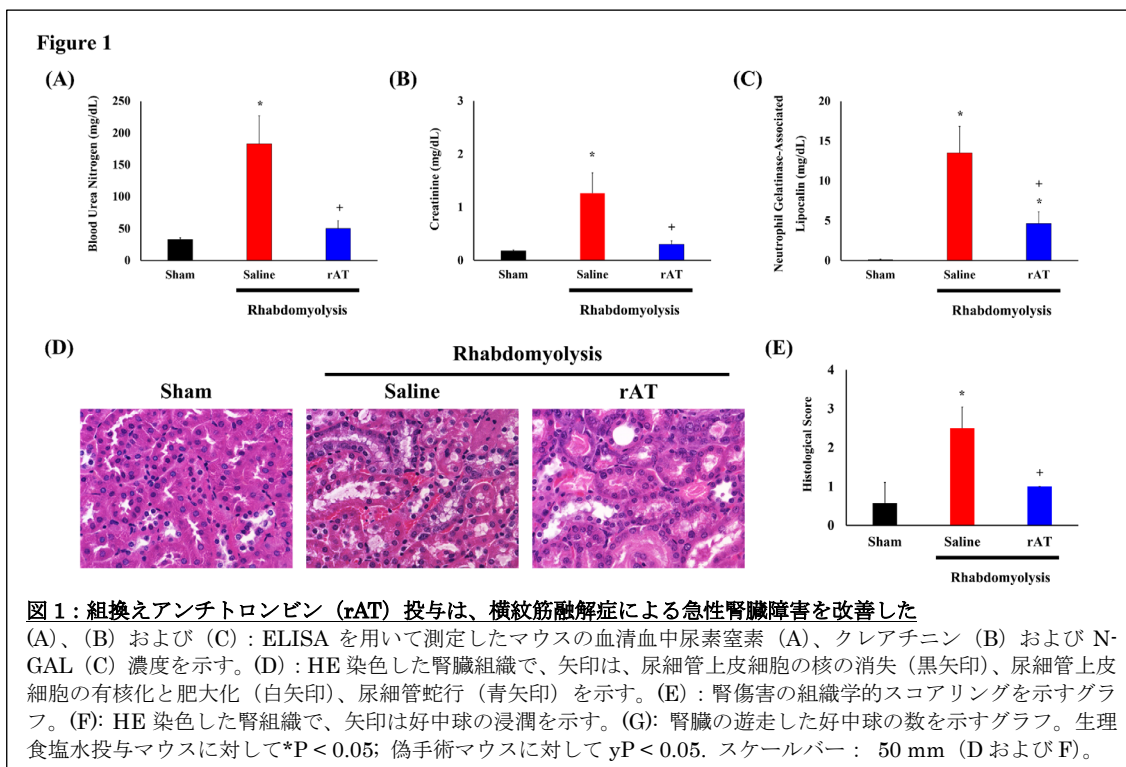


図 1： 組換えアンチトロンビン (rAT) 投与は、横紋筋融解症による急性腎臓障害を改善した

(A)、(B) および (C)： ELISA を用いて測定したマウスの血清血中尿素窒素 (A)、クレアチニン (B) および N-GAL (C) 濃度を示す。(D)： HE 染色した腎臓組織で、矢印は、尿細管上皮細胞の核の消失 (黒矢印)、尿細管上皮細胞の有核化と肥大化 (白矢印)、尿細管蛇行 (青矢印) を示す。(E)： 腎臓の組織学的スコアリングを示すグラフ。(F)： HE 染色した腎臓組織で、矢印は好中球の浸潤を示す。(G)： 腎臓の遊走した好中球の数を示すグラフ。生理食塩水投与マウスに対して* $P < 0.05$; 偽手術マウスに対して $yP < 0.05$ 。スケールバー： 50 μ m (D および F)。

rAT は腎尿管再生に関与する可能性がある

尿管上皮細胞が実際に増殖しているかどうかを調べるために、尿管を細胞分裂のマーカーである Ki67 で免疫組織化学的に染色した（図 2A）。rAT を投与した腎臓では、生理食塩水を投与したマウスと比較して、Ki67 陽性細胞の数が増加した（図 2B）。さらに、どのような細胞が増殖しているのかを調べるために、Ki67 と尿管上皮細胞のマーカーである CD15 の二重免疫染色を行いました。その結果、rAT 投与マウスでは、Ki67 と CD15 の発現が共局在することが明ら

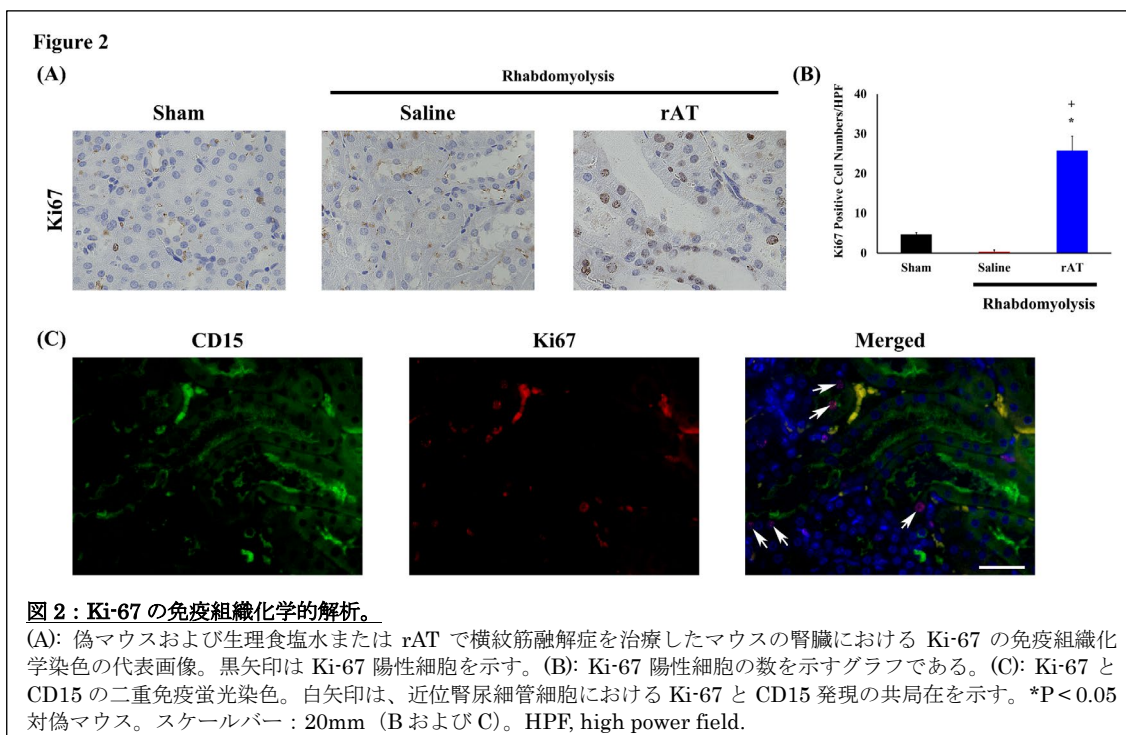
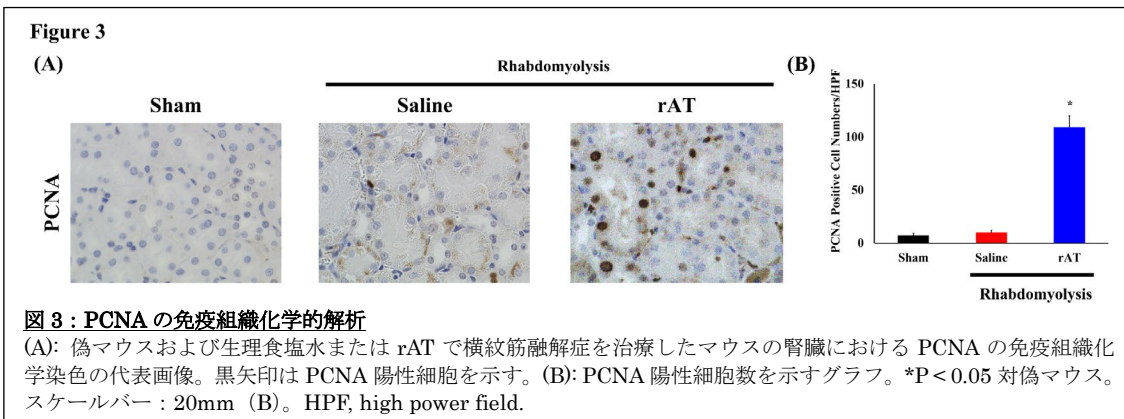


図 2： Ki-67 の免疫組織化学的解析。

(A)： 偽マウスおよび生理食塩水または rAT で横紋筋融解症を治療したマウスの腎臓における Ki-67 の免疫組織化学染色の代表画像。黒矢印は Ki-67 陽性細胞を示す。(B)： Ki-67 陽性細胞の数を示すグラフである。(C)： Ki-67 と CD15 の二重免疫蛍光染色。白矢印は、近位尿管細胞における Ki-67 と CD15 発現の共局在を示す。* $P < 0.05$ 対偽マウス。スケールバー： 20 μ m (B および C)。HPF, high power field.

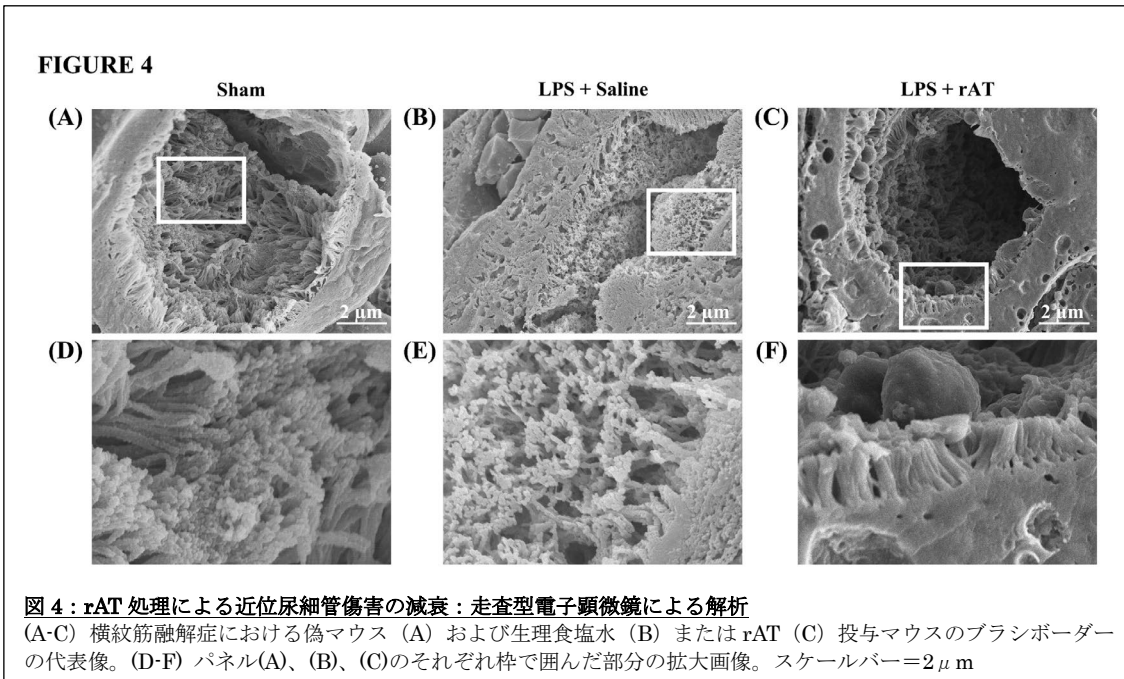
かになった（図 2C）。

同様に、尿細管を DNA ポリメラーゼ γ 活性を促進する因子である PCNA で免疫組織化学的に染色した (図 3A)。rAT 投与群の PCNA 陽性細胞数は生理食塩水投与マウスと比較して有意に多く、尿細管上皮細胞の増殖が促進されていることが示唆されました (図 3B)。



腎臓尿細管の超微細構造解析

走査型電子顕微鏡を用いて、腎臓の超微細構造を観察した。腎尿細管は、その間を流れる毛細血管によって栄養されている。尿細管の超微細構造を観察したところ。正常な腎臓の近位尿細管細胞の表面には、長さや厚さが揃いの微絨毛が密生し、刷子縁を形成している (図 4A と D)。横紋筋融解症では、近位尿細管表面の微絨毛は消失し、その密度はまばらであった (図 4B、E)。横紋筋融解症に対する rAT の投与により、微絨毛の密度が改善し、尿細管の損傷が抑制された (図 4C および F)。



考察

本研究では、横紋筋融解症による AKI を組換えアンチトロンビンが抑制することを明らかにした。ATIII はトロンビンなどの凝固カスケードのセリンプロテアーゼの阻害剤であるだけでなく、抗炎症作用や細胞保護作用も有している。ATIII は腎臓の TNF α 、MCP-1、ICAM-1 の発現を低下させ、局所炎症である 26 ことから、ATIII は腎臓の炎症に対する重要な抗炎症メディエーターであると考えられる。ATIII の抗炎症作用のメカニズムとしては、好中球の動員や白血球の転動・浸潤抑制、炎症の抑制 サイトカイン分泌抑制、血管内皮保護が報告されている。本研究では、rAT 投与群において炎症性細胞浸潤の減少が認められ、rAT の抗炎症作用が確認された。

さらに、本研究では、rAT 投与群の尿細管で尿細管の再生が観察されました。最近の研究では、rAT が DNA 修復作用を有することを報告した。本試験では、rAT 投与群において、細胞周期に関与する PCNA および Ki67 陽性細胞がより多く観察された。結論として、rAT による治療は、抗炎症作用や内皮細胞および近位尿細管の修復促進など、いくつかの要因によって近位尿細管障害を減弱させる。rAT はすでに臨床応用されているため、その投与は横紋筋融解症による AKI の治療における新規戦略とみなすことができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Suzuki Keiko, Okada Hideshi.....Okamoto Haruka et al. | 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 8864 |
| 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 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 Kamidani Ryo, Miyake Takahito, Okada Hideshi.....Okamoto Haruka 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 18458 |
| 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, Suzuki Kodai, Takada Chihiro, Nagaya Soichiro, Yasuda Ryu, Okamoto Haruka 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 791309 |
| 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 Kamidani Ryo, Okada Hideshi, Kitagawa Yuichiro, Kusuzawa Keigo..... Haruka, Suzuki Kodai, Yamada Noriaki, Doi Tomoaki, Yoshida Takahiro, Ushikoshi Hiroaki, Kumada Keisuke, Yoshida Shozo, Ogura Shinji | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Severe heat stroke complicated by multiple cerebral infarctions: a case report | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medical Case 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) 10.1186/s13256-020-02596-2 | 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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉村絃希、北川雄一郎、吉田省造、上谷遼、楠澤佳悟、柿野圭紀、三浦智孝、大岩秀明、安田立、岡本遥、長屋聡一郎、土井智章、岡田英志、柚原利至、小倉真治 |
| 2. 発表標題 自殺のため市販薬である無水カフェイン製剤を大量内服し急性血液浄化療法を実施した13歳女性の一例 |
| 3. 学会等名 第32回日本急性血液浄化学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三宅喬人、吉田省造、岡本遥、土井智章、岡田英志、熊田恵介、牛越博昭、小倉真治 |
| 2. 発表標題 地方救命センター集中治療室での Medikation エラー防止への取り組み |
| 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 三宅喬人、吉田省造、柿野圭紀、土井智章、神田倫秀、市橋雅大、水野洋佑、岡本遥、熊田恵介、牛越博昭 |
| 2. 発表標題 多発四肢外傷後の集中治療管理後症候群 (PICS) に対してリハビリテーションの積極的な介入に難渋した一例 |
| 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 三宅喬人、上谷遼、岡本遙、吉田省造、中野通代、川田紘資、永田翔馬、牛越博昭、松尾政之、小倉真治 |
| 2. 発表標題 産後出血における緊急IVRチームとの協働の有用性- |
| 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 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上谷遼、三宅喬人、岡本遙、福田哲也、中野通代、吉田隆浩、牛越仁明、吉田省造、小倉真治 |
| 2. 発表標題 産科危機的出血に対するクリオプレシピエートの有用性の検討 |
| 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 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三瓶想、岡田英志、鈴木浩大、岡本遙、土井智章、三宅喬人、福田哲也、北川雄一郎、吉田省造、久志本成樹、小倉真治 |
| 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性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 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡本遙、三宅喬人、上谷遼、吉田省造、中野通代、福田哲也、吉田隆浩、牛越博昭、小倉真治 |
| 2. 発表標題 当院高度救命救急センターに搬送された産後出血症例の検討 |
| 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 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水野洋佑、糸井陽、三宅喬人、岡本遥、神田倫秀、大林治、岡田英志、牛越博昭、吉田省造、小倉真治 |
| 2. 発表標題 胸痛を主訴とする胸椎椎間板ヘルニア：症例報告 |
| 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〕

血清インデカン-1が重症患者の臓器障害を反映
<https://medical.jiji.com/topics/2149>

| 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 |
|---------|---------|
| | |