

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究(A)  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21249086  
 研究課題名(和文) 生体侵襲・生体反応相互作用から生じる臓器不全の病態解明とその予防・治療体系の確立  
 研究課題名(英文) Elucidation of pathomechanisms of organ dysfunction caused by interaction of body insults and responses.  
 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（和文）：

生体侵襲と生体反応に基づく臓器不全発症機序の研究をさらに発展させ、神経内分泌反応・凝固線溶反応・免疫炎症反応三者の連関の病態生理を明確にすることにより臓器不全発症機序を体系的かつ網羅的に解明し臓器不全の新たな予防および治療方法の確立を目指した。具体的には神経内分泌反応の賦活あるいは抑制が抗炎症反応と凝固線溶反応制御を通じて臓器不全発症を予防して生体侵襲に対して生体恒常性を維持することにより症例の予後を改善することの証明を試みた。

### 研究成果の概要（英文）：

To establish new methods to prevent and to treat organ dysfunction caused by the relationships between body insults and body responses, we have investigated pathogenesis of the interaction among three representative body insults, namely inflammation, tissue injury, and ischemia and reperfusion, and body responses to the insults. We specified to elucidate hypothesis that control of neuroendocrine responses could prevent organ dysfunction through the improvement of changes in coagulation and fibrinolytic response

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2012年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

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：敗血症、臓器不全、神経内分泌反応、凝固線溶系、VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

生体反応はすべての生体侵襲に対し非特異的に発現し、侵襲に起因する生体損傷を制御かつ修復することにより生体恒常性を維持する反応と定義される。生体侵襲は細胞・組織損傷から臓器不全を惹起するが（一次性臓器不全）、恒常性維持のための生体反応の過剰あるいは過小発現もまた病的生体反応として二次性臓器不全を引き起こし生体の予後を大きく規定する。現在生体反応として神経内分泌反応・凝固線溶反応・免疫炎症反応が知られ、三者の密接かつ複雑な連関が生体恒常性維持と病的臓器不全発症の両者に深く関わっている。

## 2. 研究の目的

代表的生体侵襲として感染（敗血症）を想定した。これまでの私どもの研究、LPS 敗血症モデルによる感染性生体侵襲と二つの生体反応（免疫炎症反応と凝固線溶反応）に関する研究課題を大きく発展させ、「生体侵襲の如何に関わらず非特異的に惹起される神経内分泌反応・免疫炎症反応・凝固線溶反応連関が生体の恒常性を維持して私どもを侵襲から守っている」という仮説の証明を今回の研究で解明すべき主題とした。すなわち、神経内分泌反応の賦活あるいは抑制が抗炎症反応と凝固線溶反応制御を通じて臓器不全発症を予防して感染性生体侵襲（敗血症）に対して生体恒常性を維持することにより症例の予後を改善することを目的とした。具体的には、「ニコチン性アセチルコリン受容体（nicotinic acetylcholine receptor, nAChR）の賦活による炎症反応および凝固線溶反応の制御が感染性侵襲による臓器不全発症を予防し生体の予後を改善する」との仮説証明が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### In Vivo 研究

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。対照群には LPS 溶解量と同量の生理食塩水を静注する。ニコチン性アセチルコリン受容体（nicotinic acetylcholine receptor, nAChR）刺激が凝固線溶系制御を介して標的分子の変化と臓器不全改善をもたらすことを確認する。

- (1) 実験モデル：ラット LPS 誘発敗血症モデル
- (2) 標的臓器：肺、肝
- (3) 標的分子：

- ① Tissue factor, FVIIa, FXa, Thrombin, PAI-1, Fibrin, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ .

- ② VEGF, VEGFR1/R2.

### (4) 使用薬剤および神経刺激

- ① 選択的 nAChR 刺激薬 (JN403)
- ② 非選択的 nAChR 刺激薬 (nicotine)
- ③ nAChR 拮抗薬 (mecamylamine)

### 臨床研究

敗血症、外傷、心停止・蘇生後症例を対象として血管新生因子と凝固線溶系の関連を通じて臓器不全発症機序の解明を行う。各生体侵襲受傷日、3 および 5 病日に以下のパラメータを測定する。

- (1) 血管新生因子：VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Angiopoietin1 (Ang1), Angiopoietin2 (Ang2), Tie2

- (2) 凝固線溶系：Platelet, global markers, soluble fibrin, D-dimer

## 4. 研究成果

### (1) JN403

LPS 誘発ラット敗血症モデルで選択的ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 刺激薬 JN403 (NOVARTIS) と同受容体拮抗薬 mecamylamine を使用した。標的分子を TNF $\alpha$ 、標的臓器を肝臓として対照群、LPS, LPS+JN403, LPS+JN403+mecamylamine の 4 群を設定して TNF $\alpha$ 、VEGF, PAI-1 産生と発現を血清と肝臓で測定した。予備実験で設定した LPS (15 mg/kg)、刺激薬 (3.0 mg/kg)、拮抗薬 (2.0 mg/kg) を使用した。上記 4 群での血清発現は TNF $\alpha$  (26.4, 623.7, 842.8, 1343.8)、肝臓発現 TNF $\alpha$  (2.7, 3.8, 4.6, 7.2)、VEGF (2.2, 3.2, 3.6, 3.5)、PAI-1 (0.03, 1.25, 1.23, 1.27) であった。刺激薬 JN403 の用量調節の必要性を示唆する結果、あるいは JN403 の nAChR 刺激薬としての限界を示唆する結果である。

### (2) ニコチン

1. LPS 誘発ラット敗血症モデルで非選択的ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 刺激薬 nicotine と同受容体拮抗薬 mecamylamine を使用した。2. 標的臓器を肺臓として対照群、LPS, LPS+nicotine, LPS+nicotine+mecamylamine の 4 群を設定して TNF $\alpha$ 、IL-6, VEGF, PAI-1 産生と発現を血清と肺臓で測定した。投与薬物量は予備実験で設定した

LPS (15 mg/kg)、刺激薬 (2.0 mg/kg)、拮抗薬 (2.0 mg/kg) を使用した。3. Nicotine によるアセチルコリン受容体刺激は、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ /IL-6 の発現を一部拮抗したが、血液ガス所見および肝腎機能、VEGF, PAI-1 値に大きな影響を与えなかった。結果の意義：非選択的ではあるが確実に同受容体を刺激する nicotine を使用して実験を行った。従来の報告を参考にして用量を決定したが、LPS15mg/kg に拮抗するためには用量が少ないことが判明した。拮抗薬 mecamylamine の用量は十分と評価した。これらの結果に基づき nicotine 用量を 4.0mg/kg に増量することを決定し、新たな実験を施行することとした。

### (3) 血管新生因子

VEGF/VEGFR1/VEGFR2 および Angiopoietin (Ang)/Tie2 システムの動態と DIC、臓器不全発症との関連を、外傷、敗血症、心停止蘇生後症例で検討した。血管新生関連因子である VEGF/VEGFR1/VEGFR2 および Ang1/Ang2/Tie2 動態は、対象とした三病態で同一の変化を呈することが判明した。トロンビン産生・活性化指標である soluble fibrin と組織酸素代謝失調の指標である乳酸値が VEGF, VEGFR1, Ang2 変化の独立した規定因子であった。さらに VEGF, VEGFR1, Ang2, Ang1/Ang2 ratio、中でも Ang2 が外傷、敗血症、心停止蘇生後の DIC 発症例では多臓器不全 (MODS) 発症に深く関わり、症例の予後を規定することが証明された。さらに、血中 VEGF 動態には血小板含有 VEGF が影響することが判明し、血小板数が減少する DIC 症例では血中 VEGF も同様に減少することが証明された。

### 4. 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 10 件)

(1) Jesmin S, Zaedi S, Islam AM, Sultana SN, Iwashima Y, Wada T, 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.

Inflammation 35:484-500, 2012

査読あり

doi: 10.1007/s10753-011-9337-1

(2) Wada T, Jesmin S, Gando S, Yanagida Y, Mizugaki A, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H.

Angiogenic factors and their soluble receptors predict organ dysfunction and mortality in post-cardiac arrest syndrome (PCAS).

Critical Care 16:R171, 2012

査読あり

doi:10.1186/cc11648

(3) Wada T, Jesmin S, Gando S, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H.

Using angiogenic factors and their soluble receptors to predict organ dysfunction in patients with disseminated intravascular coagulation associated with severe trauma.

Critical Care 16:R63, 2012

査読あり

doi:10.1186/cc11309

(4) Murakami H, Gando S, Mineji H, Sawamura A, Sugano M, Uegaki S, Jesmin S.

Disseminated intravascular coagulation (DIC) at an early phase of trauma continuously proceeds to DIC at a late phase of trauma.

Thrombosis and Hemostasis 18(4):364-369, 2012

査読あり

doi: 10.1177/1076029611426138

(5) Robert I, Shakur H, Afolabi A, Brohi K, Coats T, Dewan Y, Gando S, Guyatt G, Hunt BJ, Morales C, Perel P, Prieto-Merino D, Woolley T.

The importance of early treatment with tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploratory analysis of the CRASH-2 randomised controlled trial.

Lancet 377: 1096-1101 2011

査読あり

doi: 10.1016/S0140-6736(11)60278-X

(6) Hayakawa M, Katabami Kenichi, Wada T, Minami Y, Sugano M, Shimojima H, Kubota N, Uegaki S, Sawamura A, Gando S.

Imbalance between macrophage migration inhibitory factor and cortisol induces multiple organ dysfunction in patients with trauma.

Inflammation 34: 193-197 2012

査読あり

doi: 10.1007/s10753-010-9223-2

(7) Gando S.

Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction  
Critical Care Med 38 (Suppl.):S35 -S42, 2010

査読あり

doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c9e31d

(8) Hayakawa M, Katabami K, Wada T, Sugano M, Sawamura A, Gando S.

Sivelestat improves the mortality rate of sepsis associated with both acute respiratory distress syndrome and disseminated intravascular coagulation.  
SHOCK 33:14-18, 2010

査読あり

doi: 10.1097/SHK.0b013e3181aa95c4

(9) Okamoto K, Hatada T, Uchiyama T, Kawasugi K, Mayumi T, Gando S, Kushimoto S, Seki Y, Madoiwa S, Asakura H, Koga S, Iba T, Maruyama I; Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee. Frequency and hemostatic abnormality in pre-DIC patients.

Thrombosis Research 126:74-78, 2010

査読あり

doi: 10.1016/j.thromres.2010.03.017.

(10) Hayakawa M, Katabami K, Wada T, Sugano M, Hoshino H, Sawamura A, Gando S.

Sivelestat improves the mortality rate of sepsis associated with both acute respiratory distress syndrome and disseminated intravascular coagulation.  
SHOCK 33. 14-18, 2010

査読あり

DOI:10.1097/SHK.0b013e3181aa95c4

[学会発表] (計 12 件)

(1) Wada T, Jesmin S, Yanagida Y, Terashima T, Gando S.

Angiogenic factors and their soluble receptors for predicting organ dysfunction in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis.

15<sup>th</sup> WFSA World Congress of Anaesthesiologists

March 25-30, 2012, Buenos Aires Convention

Center (Argentina)

(2) Wada T, Jesmin S, Gando S, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H.

Angiogenic factors and their soluble receptors to predict organ dysfunction in patients with DIC associated with severe trauma.

The 32<sup>nd</sup> International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine March 19-22, 2012, Brussel Meeting Center (Belgium)

(3) Wada T, Jesmin S, Zaedi S, Gando S.

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

24<sup>rd</sup> European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress

October 1-5, 2011, The International Congress Center Berlin (Germany)

(4) Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Sugano M, Uegaki S, Kubota N, Jesmin S.

Low TAFI activity promotes organ dysfunction and poor progress in DIC associated with sepsis.

Chest 2011

October 22-26 2011, Hawaii Convention Center (USA)

(5) Hayakawa M, Sawamura A, Sugano M, Uegaki S, Kubota N, Gando S, Jesmin S.

Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor and organ dysfunction in DIC associated with sepsis.

Chest 2011

October 22-26, Hawaii Convention Center (USA)

(6) Jesmin S, Wada T, Zaedi S, Suhana SN, Yamagushi Y, Iwashima A, Gando S.

Time-dependent expression of endothelin-1 in lungs and the effects of TNF- $\alpha$  blocking peptide on endothelin-1 levels in lungs in endotoxemic rat model.

24th European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress

October 1-5, 2011, The International Congress Center Berlin (Germany)

(7) Sawamura A, Gando S, Kubota N, Uegaki S, Shimojima H, Sugano M, Ikeo M. Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both by plasmin and neutrophil elastase. Chest 2010 October 30 – November 4, 2010, Vancouver Convention Center (Canada)

(8) Murakami H, Gando S, Hayakawa M, Sawamura A, Sugano M, Kubota N, Uegaki S, Jesmin S. Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma continuously proceeds to DIC at a late phase of trauma 6th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. October 13, 2010, Bali International Convention Center (Indonesia)

(9) Gando S. Coagulopathy of critical bleeding - disseminated intravascular coagulation - The second International Symposium on Critical Care Bleeding. September 6-7, 2010, Moltokke Palace, Copenhagen (Denmark)

(10) Gando S. Coagulopathy of trauma - disseminated intravascular coagulation with hemorrhagic phenotype The second International Symposium on Critical Care Bleeding. September 6-7, 2010, Moltokke Palace, Copenhagen (Denmark)

(11) Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Kubota N, Uegaki S, Sugano M. DIC at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both by plasmin and neutrophil elastase, and continues to DIC at late phase of trauma. 21st International Thrombosis Congress. July 6-7, 2010, Milan Marriott Hotel (Italy)

## 5. 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  
ジェスミン サブリナ (JESMIN SAUBRINA)  
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
- (3) 研究分担者  
澤村 淳 (SAWAMURA ATSUSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00241448
- (4) 連携研究者  
和田 剛志 (WADA TAKESHI)  
北海道大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30455646