

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861521

研究課題名(和文) Fアクチン-DNGR1シグナルを標的としたクラッシュ症候群に対する新規治療法開発

研究課題名(英文) A new therapeutic strategy by suppression of F-actin/DNGR-1 signal in a rat model of crush injury

研究代表者

松本 寿健 (Matsumoto, Hisatake)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70644003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、以下の2点である。クラッシュ症候群ラットモデルにおける全身性炎症病態において、Fアクチン-DNGR1受容体シグナル系のメカニズムを明らかにし、その制御による多臓器障害進行と生存率の改善を評価すること。全身炎症病態をきたす臨床患者(外傷、敗血症)におけるFアクチン-DNGR1受容体シグナル系のメカニズムを明らかにすること。本研究において、抗Fアクチン抗体の投与によるクラッシュ症候群ラットモデルの生存率改善は認められなかった。敗血症患者において、血中Fアクチン値は有意に増加しており、役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study are as follows. To investigate the F-actin/DNGR-1 signal in the context of systemic acute inflammation following crush injury and to assess the therapeutic effects of anti-F-actin antibody in a rat model of crush injury. To evaluate the F-actin/DNGR-1 signal in the patients with systemic inflammation (Trauma and Sepsis). In this study, the administration of anti-F-actin antibody did not improve the 7-day survival rate of crush injury rat model. The circulating F-actin levels significantly increased in the patients with sepsis, suggesting that the signal play a role in the pathogenesis of sepsis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：クラッシュ症候群 Fアクチン DNGR1受容体

1. 研究開始投与の背景

「基礎研究」クラッシュ症候群ラットモデルにおける抗Fアクチン抗体の治療効果

クラッシュ症候群は、交通事故等の災害で、身体の一部が長時間圧迫されることで発症する。圧迫解除により、骨格筋の挫滅部からカリウム、ミオグロビン等が血液中に漏出し致死性不整脈や急性腎不全が生じる。これらに対し、近年の輸液療法、腎代替療法の進歩により克服が可能となってきた。しかしながらクラッシュ症候群は依然として多臓器不全 (Multiple organ failure: 以下 MOF) を併発する致死的疾患であることに変わりはなく、その病態は不明な点が多い。

我々はこれまで、血管内皮細胞障害を起因とする (Systemic inflammatory response syndrome: 以下 SIRS) が関与していることを明らかにし、その誘導因子として、Damage Associated Molecular Pattern Molecules (以下: DAMPs) である High Mobility Group Box 1 (以下: HMGB1) を同定した。さらに、パターン認識受容体 (PRR) である RAGE 受容体を介して過剰な生体反応を引き起こすことを確認した。今回、新たな DAMPs として、血中 F アクチンに注目した。アクチンは細胞骨格の形成に関与している蛋白質で、筋細胞ではミオシンと共に筋収縮を担っており、侵襲で細胞が損傷された場合、F アクチンとなり血中に遊離する。血中 F アクチンはアクチン切断蛋白質のゲルゾリンにより、代謝・排泄が促進される。既に敗血症マウスモデルで、組織損傷から F アクチンの血中濃度が上昇することがわかっている。一方、血中 F アクチンとの反応からゲルゾリンが枯渇し、血中濃度が低下することが確認されている。ラットモデルに対し F アクチンを投与すると容易に死亡に至る。即ち、細胞外に遊離する F アクチンは生体にとって極めて有害に作用すると考えられる。一方、敗血症ラットモデルに枯渇したゲルゾリンを投与すると、生存予後が向上すると報告されている。最近になって、F アクチンが樹状細胞上に存在する PRR の一つである DNNGR1 受容体に対するリガンドであり、損傷組織における死細胞を認識し、免疫応答を惹起することで DAMPs として機能することが明確になった。

「臨床研究」SIRS 患者における F アクチン-DNNGR1 シグナル系の評価

本研究で得られる成果は非常に意義深いものと考えているが、その臨床応用はクラッシュ症候群という範疇に留まることではない。クラッシュ症候群という範疇に留まることではない。アクチンは全身のあらゆる細胞骨格の基礎を成しており、細胞損傷に関わる全ての病態に、DAMPs として作用し得る F アクチンが関連している可能性がある。さらに筋細胞にはアクチンが多量に含まれているため、筋細胞障害を伴う疾患は、より強い関連が想定される。即ち、その適応範囲は、ク

ラッシュ症候群を含む外傷 (非感染性 SIRS) や血管内皮細胞障害が中心的病態と考えられる敗血症 (感染性 SIRS) まで幅広い SIRS 病態であることが期待される。

2. 研究の目的

「基礎研究」

今回、我々は以下の如く仮説を立てた。クラッシュ症候群では、F アクチンが DAMPs となり、死細胞を danger signal として認識する DNNGR1 受容体を介して全身炎症を増強し、加速的に MOF を誘導している。本研究の目的は以下である。クラッシュ症候群に伴う MOF において、F アクチン-DNNGR1 受容体シグナル系の役割を評価し、F アクチン-DNNGR1 受容体シグナル系制御を標的とした新たな治療薬を開発することで

「臨床研究」

今後の臨床応用を念頭に置いた臨床研究を施行した。研究目的は、SIRS 患者 (外傷、敗血症) において F アクチン-DNNGR1 受容体シグナル系の役割を評価し、SIRS 病態との関連性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

「基礎研究」

クラッシュ症候群ラットモデル作成には、成体ラット (12 週、270-300g) を用いる。全身麻酔をかけ、外科的に外頸静脈にポリエチレンチューブを挿入し、輸液ルートとする。その後、仰臥位で固定した、両後脚をそれぞれ専用器具を用いて 3.0kg の重りで圧迫し、6 時間後に解除する。圧迫開始から 5 時間目までは 1mL/kg/hr の速度で輸液し、圧迫解除前 1 時間から解除後 3 時間まで、生食を 10mL/kg/h で投与し脱水、電解質異常が原因となる急性死を避けつつ、多臓器不全を誘導する。

実験終了後は、ルート抜去後にラットをケージに戻す。治療介入群・非介入群・シャム群の 3 群に無作為割り付けして行う。治療介入群は、発症直前に抗 F アクチン抗体を投与する。シャム群は、上記手技のうち下肢圧迫を行わなかった。治療群は、圧迫解除直前に抗 F アクチン抗体 (Thermo Fisher Scientific) 150 µg/kg を経静脈的に単回投与した。ケージに戻したラットは 7 日目まで生存を確認した (シャム群 n=3、非治療群 n=6、治療群 n=6)。

統計は、Kaplan-Meier 法で生存曲線は算出後に、生存率を Log-rank test および Bonferroni correction にて検定した。P 値は 0.05 未満を有意とした。

「臨床研究」

研究デザインは横断研究である。対象患者は大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターにおいて診療を行った 18 歳以上の SIRS の診断基準を満たした外傷患者、敗血症患者とした。比較対照として健常人からも採血検査をおこなった。本研究は大阪大学医学

部附属病院倫理委員会の承認を得て実施した。

受傷後 24 時間以内において採血を行った。血中 F アクチン値(ELISA 法: MyBioSource, San Diego, CA)を測定した。血中 F アクチンはアクチン切断蛋白質のゲルゾリンやスカベンジャーの Gc グロブリン蛋白により、代謝や排泄が促進される。一方、血中 F アクチンとの反応から血中ゲルゾリンや血中 Gc グロブリン枯渇し、血中濃度が低下することが確認されている。これから、血中 F アクチンと同時に血中ゲルゾリン値(ELISA 法: Wuhan Eiaab Science, Wuhan, China)、血中 Gc グロブリン値(ELISA 法: Human Vitamin D BP, R&D systems, Minneapolis, USA)を評価した。また炎症性サイトカインとして IL-6 値、TNF 値(ELISA 法: R&D systems, Minneapolis, USA)、血管内皮障害マーカーとして PAI-1 値(ELISA 法: R&D systems, Minneapolis, USA)を評価した。重症度は、SIRS スコア、APACHE II スコア、SOFA スコア、ISS スコアで評価した。また DIC は日本救急医学会 DIC スコア(JAAM スコア)で評価した。

統計解析は、2 群間の比較は Mann-Whitney U 検定を用いた。2 値の相関の検定には、Spearman 順位相関係数を算出した。P 値は 0.05 未満を有意とした。

4. 研究成果

「基礎研究」

7 日生存率は、治療群で 33%に対し非治療群では 50%であった。シャム群は全個体が生存した 100%。7 日生存率は治療群と非治療群の間で有意差はなかった。抗 F アクチン抗体の投与量を調整後に生存率を再度確認したが、同様の結果であった。

今後、投与方法、抗体種類、F アクチン分解作用を有するゲルゾリンや Gc グロブリンとの併用療法など、更なる検討が必要と考えられた。

「臨床研究」

本研究で対象とした SIRS 患者は 48 名であった。男性 32 名、女性 16 名で、年齢中央値は 62 歳であった。患者群の重症度評価としては、SIRS はスコア別に 2 点 15 人、3 点 15 人、4 点 11 人であった。全 SIRS 患者中、多発外傷患者は 24 名で、男性 17 名、女性 7 名、年齢中央値は 46 歳であった。ISS の中央値は 25 であった。受傷機転は交通外傷 15 名、墜落 8 名、刺創 1 名で、受傷部位(重複部位含む)は頭部 9 名、顔面 4 名、頸部 2 名、胸部 10 名、腹部 6 名、骨盤 1 名、四肢 9 名であった。全 SIRS 患者中の敗血症患者は 24 名で、男性 15 名、女性 9 名、年齢中央値は 70 歳であった。重症度は APACHE II スコアの中央値 20 点、SOFA スコアの中央値は 11.1 点、DIC 評価の JAAM スコアの中央値は 5.8 点であった。感染部位は胸部 11 名、腹部 3 名、軟部組織 3 名、尿路 5 名、その他 2 名であった。健常人は 12 名であった。

(1) SIRS 患者と健常人における血中 F アクチン値、血中ゲルゾリン値、血中 Gc グロブリン値: SIRS 患者では、血中 F アクチン値は健常人(中央値 5.8 ng/mL)と SIRS 患者(中央値 6.6 ng/mL)との間で有意差は認めなかった。ゲルゾリン値は、健常人(中央値 0.0 ng/mL)と比較して SIRS 患者(中央値 155.7 ng/mL)で有意に増加した。血中 Gc グロブリン値は、健常人(中央値 68.1 ng/mL)と SIRS 患者(中央値 52.4 ng/mL)との間で有意差は認めなかった。外傷患者では、血中 F アクチン値は健常人(中央値 5.83 ng/mL)と外傷患者(中央値 5.8 ng/mL)との間で有意差は認めなかった。血中ゲルゾリン値は、健常人(中央値 0.0 ng/mL)と比較して外傷患者(中央値 161.2 ng/mL)で有意に増加した。血中 Gc グロブリン値は、健常人(中央値 68.1 ng/mL)と外傷患者(中央値 150.1 ng/mL)との間で有意差は認めなかった。敗血症患者では血中 F アクチン値、血中ゲルゾリン値ともに、健常人(各中央値 5.8 ng/mL、0.0 ng/mL)と比較して敗血症患者(各中央値 7.5 ng/mL、148.1 ng/mL)では有意に増加した。血中 Gc グロブリン値は、健常人(各中央値 68.1 ng/mL)と比較して敗血症患者(中央値 39.2 ng/mL)で有意に減少していた。

(2) SIRS 患者における血中 F アクチン値、血清ゲルゾリン値、血中 Gc グロブリン値と IL 6 値、TNF 値、PAI 値との関連: SIRS 患者において、血中 F アクチン値、血中ゲルゾリン値、血中 Gc グロブリン値ともに、血中 IL-6 と相関がなかった。対象を外傷患者、敗血症患者とした場合も同様に、血中 F アクチン値、血中ゲルゾリン値、血中 Gc グロブリン値とも IL 6 値、TNF 値、PAI 値との関連は認めなかった。

(3) SIRS 患者における血中 F アクチン値、血清ゲルゾリン値、血中 Gc グロブリン値と重症度、DIC との関連: SIRS 患者では血中 F アクチン値は APACHE II スコア ($\rho=0.30$, $p<0.05$) と有意な相関を認めた。血中ゲルゾリン値は APACHE II スコア、SOFA スコア、JAAM スコアともに関連がなかった。血中 Gc グロブリン値は APACHE II スコア ($\rho=-0.32$, $p<0.05$)、SOFA スコア ($\rho=-0.41$, $p<0.05$) と有意な負の相関を認めた。JAAM スコアとは関連を認めなかった。外傷患者、敗血症患者では、血中 F アクチン値、血中ゲルゾリン値、血中 Gc グロブリン値ともに重症度、JAAM スコアとの関連は認めなかった。

本研究では、SIRS 患者(外傷患者、敗血症患者)で受傷後 24 時間以内に 1 点評価を行った。

SIRS 患者において血中ゲルゾリン値は、健常人と比較して有意な増加を認めたが、その臨床的意義を捉えることはできなかった。また対象を外傷患者とした場合も同様に、血中ゲルゾリン値が健常人と比較して有意に増加したが、臨床的意義を確認できなかった。対象を敗血症患者とした場合、健常人と比較

して血中Fアクチン値、血中ゲルゾリン値は有意に増加し、血中Gcグロブリン値は有意に減少した。これから、敗血症病態におけるFアクチンシグナル系の誘導と、それに対応するゲルゾリンの代償的増加やGcグロブリンの消耗性減少の可能性が示唆された。本研究ではこれら3つの血中蛋白と重症度、炎症、血管内皮障害との関連を見出せなかったが、さらなる症例蓄積と経時的な評価により、病態との関連性が見出される可能性が考えられた。

5. 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)

[学会発表](計3件)

①

松本寿健、松本直也、島崎淳也、中川淳一郎、今村行雄、山川一馬、山田知輝、小倉裕司、嶋津岳士 クラッシュ症候群ラットモデルに対する抗RAGE抗体の治療効果 第29回日本外傷学会総会・学術集会、2015年6月11日、札幌

Matsumoto H, Matsumoto N, Shimazaki J, Nakagawa J, Yamakawa Kazuma, Yamada T, Ogura H, Shimazu T.

Survival improvement by anti-RAGE antibody administration in a rat model of crush injury. Society of Critical Care Medicine's 44th Critical Care Congress.2015; January 17-21. Arizona. 1031

Hisatake M, Naoya M, Hiroshi O, Junya S, Kazuma Y, Kouji Y, Takeshi S. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis. 73rd Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma and Clinical Congress of Acute Care Surgery. 2014; September 10-13. Philadelphia.

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本寿健 (Hisatake Matsumoto)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：70644003

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：