

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390404

研究課題名(和文)腎肺クロストークを介した人工呼吸器誘発性腎障害のメカニズム解明

研究課題名(英文)The mechanism on ventilator induced kidney injury associated with kidney-lung crosstalk

研究代表者

橋本 悟 (Hashimoto, Satoru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90167578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺および腎の双方に影響すると考えられるHO-1(Heme Oxygenase-1, 以下HO-1)の関与に着目して研究を進め重症患者ほどHO-1の血中濃度は有意に高値を示し、腎機能も障害を示すことが判明した。また緑膿菌を用いた敗血症マウスモデルにおいて抗PcrV抗体を含むガンマグロブリン投与等が肺腎等の全身臓器傷害に対して防衛的に作用することを示した。これらの結果は肺における障害が遠隔臓器に影響を及ぼすいわゆる臓器間クロストークの存在を示唆するものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Several studies have suggested the interdependent crosstalk mechanism might exist among several vital organs and especially crosstalk between lung and kidney has been a focus of attention in the critical care settings. We evaluated serum HO-1 measured by modified ELISA as a biomarker to predict a prognosis of patients with acute respiratory distress syndrome. Concentrations of serum HO1 in non-survivors during the ICU stay were persistently higher than those of survivors. We also conducted animal study using pathogen-free mice. Pseudomonas aeruginosa PA103 were given via instillation to the trachea to cause lethal effect within 24 hours in control mice. We showed that administration of anti-PcrV polyclonal IgG or commercially available immunoglobulin have significant effectiveness against the Pseudomonas induced lung injury and reduced mortality. These results validated further investigation to elucidated the cross talk of kidney and lung.

研究分野：救急

キーワード：急性呼吸窮迫症候群 急性腎不全 Heme Oxygenase-1 多臓器不全

## 1. 研究開始当初の背景

救急集中治療の領域において敗血症や急性呼吸窮迫症候群(ARDS)等の疾患群は、その病態が未だ十分に解明されておらず、死亡率も高い。このような臓器障害は多くの場合、単発するのではなく複数臓器がほぼ同時に障害を呈することが多く、これは多臓器不全と称される。この20年間、医学の進歩とともにこのような病態において各臓器の相互作用がその病態に大きな影響をあたえることが徐々に明らかになってきた。これは心、肺、腎、肝などの各臓器障害がその臓器ばかりではなく遠隔の多臓器にも悪影響を与えるという概念である。一方で臨床的には急性腎傷害、急性呼吸窮迫症候群などの病態において明らかなエビデンスを有する治療法はほとんどないのが現状である。敗血症やARDSに深く関係する物質として、従来エンドトキシンに代表される外因性物質 PAMPs (pathogen-associated molecular patterns: 病原体関連分子パターン) や内因性物質 alarmin など、いわゆる DAMPs (damage-associated molecular patterns: 傷害関連分子パターン) が注目されているが、さらに第3の因子としてミトコンドリアの機能が発端となる”guard hypothesis”とも呼ばれる cSADD (cellular-surveillance-activated detoxification and defenses) も近年注目されている。これらの要因によって敗血症やARDSなどの臓器不全が惹起されるわけであるが、これらの疾患群の病態の解明と有効な治療法を見出すことは本分野において喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では急性肺傷害はじめ各臓器障害の発症機転を検討し、新しい治療法の糸口を探ることを目的とした。特に肺、腎の相互作用がその病態に影響している可能性についても検討を重ねた。特に急性肺傷害発症に伴う腎不全の併発は予後規定因子の一つであり、今回は臨床研究としてARDS患者を対象に、また基礎実験としては緑膿菌に起因するマウス肺傷害モデルを用いて検討を試みた。急性肺傷害においては上皮細胞および内皮細胞傷害による肺構造の破壊によって肺胞内外の透過性が亢進して肺水腫が生じる。さらに好中球が肺内に遊走し、肺胞マクロファージ等からも各種炎症反応物質が放出され過剰な細胞シグナル伝達が惹起され肺傷害が進行するとされる。このような観点から今回は Heme oxygenase-1 (HO-1) に注目した。HO-1 は 32kDa の heat shock protein で、各種臓器、マクロファージ、気道上皮細胞などに存在し、多臓器不全等の炎症、ストレスによって up regulate される。したがって HO-1 の推移は遠隔臓器に対しても影響を与える可能性があるかと予想された。また動物実験においては緑膿菌肺炎による急性肺傷害に対する抗 PcrV 抗体 (anti-Pcv) 等の効果を検討した。これら一連の検討により急性肺傷害の、急性腎不全を含む臓器間クロストークへの関与解明が期待された。

## 3. 研究の方法

(1) ICU に入室しARDSと診断された患者を対象として、肺、腎のいずれの傷害にも深い影響を与える可能性の高い HO-1 に焦点を絞

り検討を加えた。ARDS 診断直後から経時的に最長で 2 8 日間血清を採取し、新規開発した ELISA 法によって HO-1 濃度を測定した。その結果を用いて ARDS 診断の 1 ヶ月以内の予後に関する血清 HO-1 カットオフ値の検討について ROC 曲線を用いて検討し、Log rank 方によって生存曲線の比較を行った。

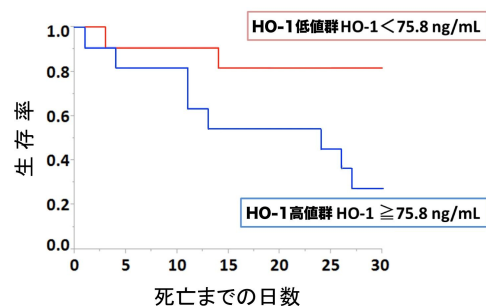
(2)急性肺傷害の治療法として抗 PcrV 抗体の有用性を検討した。実験には抗 PcrV 抗体以外に市販ガンマグロブリン製剤および市販ガンマグロブリン製剤において抗 PcrV 抗体を不活化させてものなどを用いて検討を加えた。無菌オスマウスに対して揮発性麻酔薬を吸入させて不動化した後、気管内に特殊ニードルを用いて緑膿菌 PA103 株を注入することによって細菌性肺炎に起因する急性肺傷害モデルを作成した。これに抗 PcrV 抗体等を前投与、後投与しその効果について検討を加えた。

#### 4 . 研究成果

(1) 血清 HO-1 はコントロールの健康成人に比べ ARDS 患者で有意に高値であった。ARDS 患者の発症初日の血清 HO-1 濃度は、生存例に比べ死亡例で高値を示した (図)。

HO-1 の推移は患者重症度、挿管期間、ICU 滞在期間等と相関し、さらに初期の HO-1 高値例は低値例に比して 1 か月生存率は不良であった。HO-1 は肺細胞保護作用を示す酸化ストレスマーカーであり、血清学的にも HO-1 の評価が有用であると考えられるとともに、酸化ストレスの程度が ARDS や多臓器不全の予後に影響している可能性が示唆された。またそ

の経過追跡が予後予測に有用である可能性が示唆された。



(2) マウスモデルでは緑膿菌の Type III トキシンによる細胞傷害が主たる傷害要因であるとされているがその要因の主体である PcrV に対する、抗 PcrV 投与により本モデルによる傷害は軽減することが判明した。さらに市販のガンマグロブリンにも本致死モデルを生存させる効果があることが示され、またその効果は含まれる抗 PcrV 投与も関与するがそれ以外の未知の要因も含まれることが示された。細菌性肺炎などによって惹起される急性肺傷害においては、本モデルのように急速に全身臓器が冒されてすみやかに死に至るが、肺の部分傷害だけで説明は困難であり、腎、肝を含む臓器間クロストークによって全身臓器障害が生じている可能性が高いと考えられた。

さらに Angiopoietin 2 (Ang2) and soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) は ARDS において非生存者で高値を示すとの報告があるが、これについて我々のグループはこれらの因子が内皮細胞に影響することから、腎細胞についても影響を与える可能性を示唆した。

以上のように急性肺傷害における諸因子とその予後について、様々な観点から検討をおこなった。今回の検討では遠隔臓器に対する影響を示唆する所見がみられたが、残念ながら具体的な検証を行うまでには至らなかった。この点については今後の本研究の焦点の一つとなることが期待されるので、引き続き臓器間クロストークについての検討を重ねていく所存である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕（計 4 件）

Katoh H, Yasumoto H, Sawa T, et al. Iv immunoglobulin for acute lung injury and bacteremia in pseudomonas aeruginosa pneumonia. 査読あり  
Critical Care Med 44(1):e12-24, 2016

Sawa T, Naito Y, Kato H, et al. Cellular stress responses and monitored cellular activities. 査読あり Shock 46(2):113-121, 2016

Kyo M, Ohshimo S, Shime N. Factors affecting biomarkers of endothelial and alveolar epithelial dysfunction. 査読あり  
Intensive Care Med 42(12):2111-2112, 2016

Horita N, Hashimoto S, Miyazawa N, et al. Impact of corticosteroids on mortality in patients with acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. Internal medicine 査読あり  
54(12):1473-1479, 2015

### 〔学会発表〕（計 4 件）

原悠, 新海正晴, 長井賢次郎, 橋本壮志, 橋本悟, 金子猛: ARDS 患者における血清 HO-1 の予後因子としての可能性 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 2016.4.10 京都

原悠, 新海正晴, 橋本壮志, 橋本悟, 金子猛他 急性呼吸窮迫症候群における血清 Heme Oxygenase-1(HO-1)のバイオマーカーとしての有用性に関する検討第 55 回日本呼吸器学会, 2015/4/27 東京  
中野泰, 藤島清太郎, 宮庄拓, 田坂定智, 橋本悟, 長谷川直樹, 別役智子: ALI/ARDS 患者肺局所サイトカインの網羅的解析による病態評価の試み. 第 55 回日本呼吸器学会, 東京, 2015.4.19

橋本 悟, ARDS におけるバイオマーカー, 10<sup>th</sup> Critical Care Symposium, 2013.4.25 Manchester (英国)

### 〔図書〕（計 3 件）

橋本悟, 讚井将満, 江木盛時, 大下慎一郎, 塩塚潤二, 瀬尾龍太郎, 田中竜馬, 田中優, 則末泰博, 林淑朗, 南郷栄秀: ARDS 診療ガイドライン 2016, 日本呼吸器学会/日本集中治療医学会, 東京, 2016

橋本悟: 第 3 章呼吸, 呼吸不全の項, 集中治療専門医テキスト, pp135-pp148, 総合医学社, 東京, 2015

橋本 悟, 敗血症性肺傷害の治療と有効性評価 技術情報協会, pp478-481, 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 悟 (HASHIMOTO Satoru)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号: 90167578

### (2) 研究分担者

佐和 貞治 (SAWA Teiji)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 10206013

志馬 伸朗 (SHIME Nobuaki)  
広島大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 00260795

柴崎 雅志 (SHIBASAKI Masashi)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20405319

天谷 文昌 (AMAYA fumimasa)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研  
究院)・准教授  
研究者番号：60347466

成宮 博理(NARUMIYA Hiromichi)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研  
究院)・助教  
研究者番号：20768105

橋本 壮志 (HASHIMOTO Soshi)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研  
究院)・客員講師

研究者番号：60515279

徳平 夏子 (TOKUHIRA Natsuko)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研  
究院)・客員講師  
研究者番号：60597227

中嶋 康文 (NAKAJIMA Yasufumi)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70326239

金子 猛 (KANeko Takeshi)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：90275066