

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10985

研究課題名(和文)重症敗血症における臓器リモデリングの検討

研究課題名(英文)Evaluation of organ remodeling in severe sepsis

研究代表者

矢野 武志 (Yano, Takeshi)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：80521707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症とは、感染に対して宿主生体反応の統御不全により臓器機能不全を呈している状態である。近年、効果的なガイドラインに基づく集学的治療が施されるようになって、短期的な治療成績は改善傾向にあるが、長期的な予後は悪いままである。本実験では、強力な抗炎症作用を有する遺伝子組み換え型トロンボモデュリン(rTM)を用いて、敗血症における血管機能障害の遷延抑制、血管内皮障害の抑制および回復期への影響を検証した。rTMには、リポポリサッカライド(LPS)によって生じる血管収縮機能低下の遷延を抑制する傾向が認められた。またLPSは血管内皮細胞を強く傷害するが、rTMによって組織構造が保たれる傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a condition that exhibits organ dysfunction due to poor control of host biological response to infection. In recent years, multidisciplinary treatment based on effective guidelines has been applied, short-term treatment outcomes are improving, but as a result of prolonged systemic dysfunction, long-term prognosis remains poor. In this experiment, we investigated the suppression effect of the recombinant thrombomodulin (rTM), which has a strong anti-inflammatory effect, for the prolonged vascular dysfunction in sepsis, the suppression of vascular endothelial dysfunction, and the effect on the recovery phase. When rTM was added, there was a tendency to suppress the prolongation of vasoconstriction degradation caused by lipopolysaccharide (LPS). Although LPS strongly injured vascular endothelial cells, rTM showed a tendency to maintain the tissue structure without association in the occurrence of apoptosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症の長期予後が問題となっている敗血症は、感染によって惹起された全身性炎症反応症候群であり、臓器障害を併発した場合は重症敗血症と診断される。米国では年間30万人が重症敗血症に罹患し、20%に相当する6万人が死亡している(N Engl J Med 2002;347:966)。2004年、米国集中治療医学会は敗血症の救命率向上を目的とした診療ガイドライン(Surviving Sepsis Campaign Guidelines)を発表した。この診療ガイドラインが普及したことにより、多くの施設で効果的な初期治療が行われるようになった。また、敗血症診療を含むICU管理全般の発展により、重症敗血症患者の死亡率は年々低下している。オーストラリアにおけるICU患者10万人を対象とした調査では、2000年に35.0%であった重症敗血症の死亡率が、2012年に18.4%まで低下したことが示された(JAMA 2014;311:1308)。

生命予後の改善が報告される一方、生存率の評価を90日で行うと、28日生存率よりも悪化することが知られている(Crit Care Med 2010;38:1276)。長期的な予後の悪化は、重症敗血症の治療後に認める様々な機能障害が原因となっている。このため、集中治療後の機能障害に関する検討の必要性を訴える論文が、近年相次いだ(Crit Care Med 2010;38:1276, JAMA 2010;304:1787)。これは臨床業務において実感するところであり、例えば、重症敗血症による危機的状況乗り越え28日間の生存が出来たとしても、呼吸機能障害が残存し社会復帰は困難で、結果的に軽快したとは感じ得ない症例は少なくない。

これらの機能障害に注目し、長期予後を改善しようとする新たな方針から、米国集中治療医学会は2012年に集中治療後症候群(Postintensive care syndrome: PICS)という新たな疾患概念を提唱した(Crit Care Med 2012;40:502)。PICSとは、ICUで治療を受けた生存者に生じる呼吸機能障害や神経筋障害、あるいは認知機能障害や精神的障害など、全身的な機能障害を包括した症候群と定義されている。PICSの原因は、疾患そのものによる侵襲だけではなく、人工呼吸などの医療行為も関係している。今後は、敗血症からの救命のみを目標とした従来の医療から脱却し、PICSの理解を深め、長期的な予後に配慮した新たな診療ガイドラインの策定が期待されている。

## (2) 血管におけるリモデリング

敗血症のメカニズムは血管内皮障害を主体としたものである(J Thromb Haemost 2015;13:1743)。細菌の毒素は血管内皮細胞上のToll-like受容体を介して細胞内炎症性シグナル伝達経路を惹起させ、炎症性サイトカインの分泌を促進する(Innate Immun 2015;21:827)。過剰な炎症性サイトカインに

よって、血管内皮細胞はアポトーシスに至り、血管内皮がはがれて壁構造が破綻し、血管透過性亢進や凝固機能障害を招く(Crit Care Med 2004;32:901)。血管が種々のストレスや傷害を受けた後、修復および再構築することを血管リモデリングと呼ぶ(N Engl J Med 1994;330:1431)。過剰な血管リモデリングは、さらなる血管構造の破綻に繋がり、臓器障害を引き起こす。典型的な血管リモデリングは血管内皮の障害による炎症性変化を伴い、血管平滑筋細胞の遊走および増殖が刺激され、さらに脱分化が促進される(J Vasc Res 1994;31:61)。脱分化型血管平滑筋細胞は、血管壁肥厚や線維化、炎症性サイトカイン分泌などに関与し、マトリックスメタロプロテアーゼなどの機能性タンパク質とも相互作用する(J Vasc Res 2015;52:221)。血管リモデリングは比較的早期に始まっており、血管ダメージから72時間後には明らかな徴候を認める(J Vasc Surg 2017;65:207)。従来、血管リモデリングについては、慢性疾患である動脈硬化症の発生機序を中心に研究されてきた(N Engl J Med 1994;330:1431)。近年では、肺高血圧症や冠動脈血管内治療に関連して数多くの知見が報告され、血管リモデリングでは炎症反応プロセスが重要な要素であると考えられている(J Am Coll Cardiol 2009;54:S10)。

## (3) トロンボモデュリン

トロンボモデュリンは、557個のアミノ酸によって構成され、レクチン様ドメインをはじめとする5つのドメインによって形成される血管内皮表在性タンパク質である(EMBO J 1987;6:1891)。凝固促進因子であるトロンビンと結合することによって、抗凝固作用を示す。また、凝固抑制因子であるプロテインCを活性化させることによって抗凝固作用を発揮する(Science 1987;235:1348)。近年、本邦では遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤が播種性血管内凝固(DIC)治療薬として市販されている。

トロンボモデュリンは強力な抗炎症作用を持つ。トロンビンによる炎症増幅作用を軽減させるほか、活性化したプロテインCによる間接的な抗炎症効果を示す(Blood 2005;105:3178)。また、トロンボモデュリンのN末端から155個のアミノ酸によって形成されるレクチン様ドメインには、直接的な抗炎症作用が認められており、血管内皮に対する好中球接着抑制や、Nuclear factor-kappa B(NF-kB)の抑制が報告されている(J Exp Med 2002;196:565)。近年の研究では、強力な炎症惹起物質であるHighmobilitygroupboxprotein1(HMGB1)に対する阻害作用も明らかにされている(J Clin Invest 2005;115:1267)。

## (4) トロンボモデュリンの敗血症治療薬としての可能性

大腸菌の内毒素であるリポポリサッカライド(LPS)を投与したラット敗血症モデルに対して、遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤を予防的に使用したところ、炎症性サイトカインの発現が抑制され、肺や肝での炎症細胞浸潤は減少し、有意な死亡率の低下を認めた(Crit Care Med 2009;37:2181)。臨床研究では、遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤を用いた第 相臨床試験において高い DIC からの離脱率を認め(J Thromb Haemost 2007;5:31)、また最近の後向き調査では、敗血症患者に対する臓器障害抑制効果、死亡率の低減効果が報告されている(J Trauma Acute Care Surg 2012;72:1150)。このため、トロンボモデュリンの敗血症治療薬としての有用性が示唆されている。しかしながら、敗血症性ショックにおける血管リモデリングに関する研究は過去に存在しない。研究代表者は、トロンボモデュリンによる抗炎症作用が、敗血症性ショック時に認められる血管障害を抑制し、さらに血管障害後の回復期において、PICS で示される機能障害を回避し、正常な回復を促し得る可能性に着眼した。

## 2. 研究の目的

本研究では、強力な抗炎症作用を有する血管内皮表在性タンパク質であるトロンボモデュリンを用いて、敗血症における血管収縮機能障害の抑制、血管内皮障害の抑制、および回復期における血管リモデリングの正常化が認められるか検証した。

## 3. 研究の方法

(1) ラット血管モデルにおけるトロンボモデュリンによる LPS 暴露後血管収縮機能障害抑制作用

Wistar 系ラット(雄; 10 週齢程度)を用いた。ラットを安楽死させた後に開胸開腹し、胸腹部大動脈を周囲の結合織を含めて摘出した。4 のリンゲル液を胸腹部大動脈内に灌流し、さらに対物顕微鏡下に精密ピンセットを用いて手動的に結合織を取り除いた後、主に胸部大動脈より長さ 2mm の血管リングを切り出した。

血管収縮性の測定は、専用に開発された微小血管運動観察装置の測定バスを用いた。血管リングが測定バスに浸水した状態で、リンゲル液や試験薬を 37 に温度調整して持続灌流した。血管リングは、タングステン線で作成された 2 本のフックに懸架されており、タングステン線に連続する張力トランスデューサを介して収縮力を測定した。初期状態として、2g の張力を示す位置に血管リング位置を調整し、1 時間の回復期において測定を開始した。

基準となる血管収縮は、高濃度カリウム(80 mM)含有リンゲル液(High K)を灌流させて確認した。High K、およびその他の試験薬は、7 分間灌流させ、続いて 23 分間の洗い出しを

行った。その他の試験薬の収縮力は、High K との相対的な収縮率として求めた。同一の実験系を用いた過去の経験、および予備実験の結果より、ノルアドレナリン濃度は 50 %効果濃度(EC50)に近い 0.025  $\mu$ M を採用した。敗血症性ショック様状態を再現するために、血管リングに LPS(0.05 mg/ml)を曝露させた。トロンボモデュリンの敗血症性ショック時における血管収縮への影響を評価するため、LPS 曝露に続きトロンボモデュリン 30 ng/ml を投与し、ノルアドレナリンの血管収縮能の変化を評価した。さらに、血管収縮障害の遷延を評価するため、LPS 曝露から 24 時間経過した血管リングを用いて、上記と同様に実験を行った。

## (2) LPS による血管内皮細胞障害に対するトロンボモデュリンの作用

培養細胞としてウシ由来血管内皮細胞(HH, JCRB0099)を用いた。5 % Fetal bovine serum(FBS) + Eagle's minimal essential medium(EMEM)培地にて 37、湿度 95 %、5 % 二酸化炭素の条件下で培養した。細胞は 35 mm x 10 mm 細胞培養用ディッシュに播種した。細胞がコンフルエントとなった後、敗血症性ショック状態として LPS を添加、あるいはトロンボモデュリンの作用を観察するため、トロンボモデュリン単独または LPS と混雑して添加し、24 時間後の細胞形態を顕微鏡で観察し評価した。

形態の評価の後、4 の PBS で細胞を洗浄し、Annexin V & Dead Cell Assay kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を用いて、手順書通りに細胞を染色し、アポトーシスを測定した。細胞数の測定、および結果の解析は Muse<sup>®</sup> Cell Analyzer (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を用いた。

## 4. 研究成果

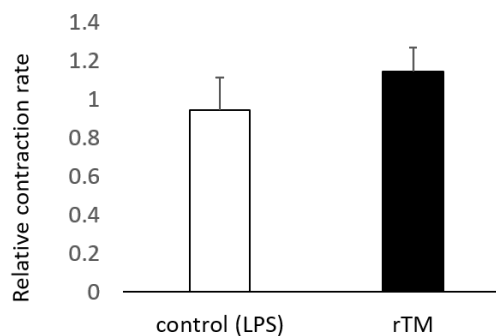


Fig 1. The relative contraction rate of the vascular ring

The relative contraction rate of the vascular ring was  $0.993 \pm 0.167$  (mean  $\pm$  SD) in the control (LPS) group and  $1.153 \pm 0.125$  in the rTM group 24 hours after LPS exposure. There was a tendency that the vasoconstriction function tended

to be maintained in the rTM group compared to the control group, but no statistically significant difference was observed.  
 LPS: Lipopolysaccharide  
 rTM: Recombinant thrombomodulin

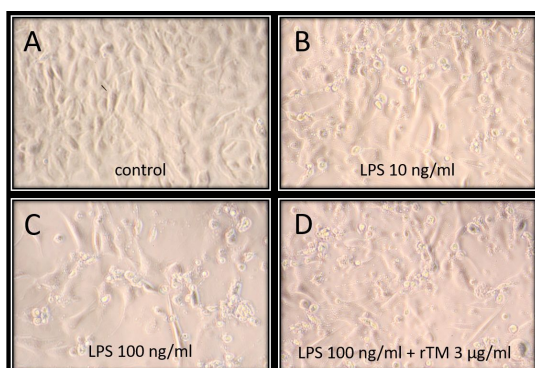


Fig 2. Typical microscopic photographs of cultured vascular endothelial cells and evaluation of tissue injury

In B and C, cell blistering is observed as a result of tissue destruction by LPS compared with A, but cytotoxicity was suppressed and tissue structure was maintained in D.

LPS: Lipopolysaccharide  
 rTM: Recombinant thrombomodulin

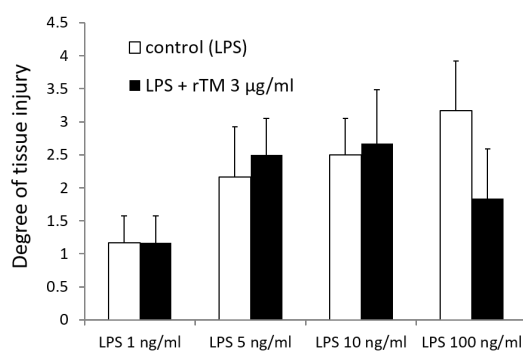


Fig 3. Protective effect of rTM on the injury effect of LPS for the tissue structure of cultured endothelial cells

Compared to LPS alone, when adding rTM (3 µg/ml), especially when LPS concentration was high (> 100 ng/ml), there was a tendency to show protective effect against tissue injury. There was no statistically significant difference in any of the comparisons.

LPS: Lipopolysaccharide  
 rTM: Recombinant thrombomodulin  
 Degree of tissue injury: The degree of tissue injury was scored as none 0, mild 1, moderate 2, severe 3, extreme 4.

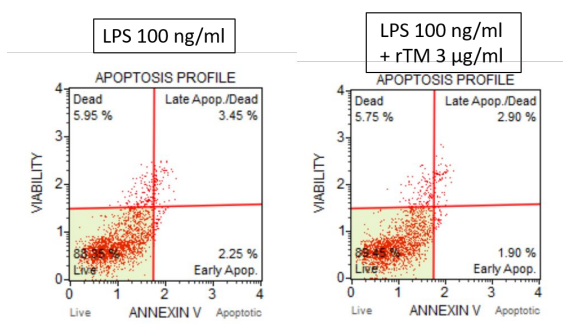


Fig 4. Evaluation of apoptosis by Annexin V & Dead Cell Assay

Even when rTM was added to LPS (right), there was no significant difference in the occurrence of apoptosis compared to LPS only (left). Total apoptotic cell concentrations were  $145646 \pm 3888$  cells/ml in the LPS group and  $162970 \pm 23210$  cells/ml in the rTM group (mean  $\pm$  SD).

#### 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)

[雑誌論文](計 4件)

Takeshi Yano, Hiroyuki Fukumoto, Masahiko Taniguchi, Isao Tsuneyoshi: Analysis of the Alarms From a Blood Purification Machine During Continuous Haemodiafiltration. Turk J Anaesthesiol Reanim 45: 237-238, 2017 (査読有り)

DOI: 10.5152/TJAR.2016.92260

Takeshi Yano, Masahiko Taniguchi, Isao Tsuneyoshi: Food choking in a patient with congenital temporomandibular joint ankylosis. Turk J Anaesthesiol Reanim 45:380-381, 2017 (査読有り)

DOI: 10.5152/TJAR.2017.45143

Takeshi Yano, Tetsu Yonaha, Koutaro Hidaka, Masumi Nagahama, Tomohiro Koshida, Hiroshi Matsuoka, Masahiko Taniguchi, Isao Tsuneyoshi: A case of severe acute exacerbation of Yokkaichi asthma treated with a vibrating mesh nebulizer. Respir Med Case Rep 19:83-85, 2016 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.rmcr.2016.08.002

Takeshi Yano, Masahiko Taniguchi, Isao Tsuneyoshi: Continuous rocuronium administration for tracheomalacia. J Anesth 29: 978, 2015 (査読有り)

DOI: 10.1007/s00540-015-2055-3

[学会発表](計 8件)

矢野武志、内村修二、須江宣俊、長浜真

澄、越田智広、與那覇哲、谷口正彦、新福玄二、白阪哲朗、恒吉勇男：集中治療を必要とした急性心不全患者の血中プレセプシン濃度。第44回日本集中治療医学会学術集会，2017年3月9-11日，札幌

矢野武志、内村修二、須江宣俊、長濱真澄、越田智広、與那覇哲、松岡博史、谷口正彦、新福玄二、白阪哲朗、恒吉勇男：当院ICUで経験した重症急性膵炎の治療成績に関する後ろ向き検討。日本集中治療医学会第1回九州支部学術集会，2017年5月13日，長崎。

矢野武志、内村修二、長濱真澄、與那覇哲、谷口正彦、恒吉勇男：口腔内異物により窒息し救命し得なかった先天性顎関節強直症の一症例。第39回日本呼吸療法医学会学術集会，2017年7月15-16日，東京。

矢野武志、内村修二、與那覇哲、谷口正彦、恒吉勇男：持続血液透析濾過における透析液の段階的ナトリウム濃度調節が有用であった高ナトリウム血症の2症例。日本臨床麻酔学会第37回大会，2017年11月3-5日，東京。

矢野武志、日高康太郎、長濱真澄、越田智広、與那覇哲、松岡博史、谷口正彦、恒吉勇男：当院ICUにおける重症急性膵炎の病態と治療効果に関する後ろ向き検討。第43回日本集中治療医学会学術集会，2016年2月12日，神戸。

Takeshi Yano, Masumi Nagahama, Tomohiro Koshida, Tetsu Yonaha, Masahiko Taniguchi, Isao Tsuneyoshi: Efficacy of a tracheal-tube fixation device for prevention of ventilator-associated pneumonia: a prospective randomized controlled study. Euroanaesthesia 2016, 2016, May 28, London, UK.

太田尾剛、矢野武志、須江宣俊、日高康太郎、長濱真澄、與那覇哲、松岡博史、谷口正彦、恒吉勇男：高頻度振動排痰補助装置スマートベスト使用中に心停止となった一症例。第36回日本循環制御医学会総会，2015年6月5-6日，名古屋

矢野武志、日高康太郎、須江宣俊、太田尾剛、長濱真澄、與那覇哲、松岡博史、谷口正彦、恒吉勇男：人工呼吸中のマイクロポンプ型吸入器使用が効果的であった四日市喘息重積発作の一症例。第37回日本呼吸療法医学会，2015年7月17-18日，京都

〔図書〕(計 3件)

矢野武志：仙骨麻酔の失敗（効果なし）・不完全ブロック。2）仙骨麻酔の偶発症，2 区域麻酔，麻酔偶発症 AtoZ, pp434-435, 文光堂，東京，2017。

矢野武志：硬膜外麻酔・末梢神経ブロック中の痙攣（局所麻酔薬中毒）。6）局

所麻酔薬に関する偶発症，2 区域麻酔，麻酔偶発症 AtoZ, pp475-476, 文光堂，東京，2017。

矢野武志，恒吉勇男：第6章 各科手術での使用 [9]高齢者手術 - 高齢者への応用の長所・短所 - デスフルランの上手な使い方 臨床麻酔実践シリーズ8 日本臨床麻酔学会(編)。pp134-139, ライフメディコム，東京，2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 武志 (Yano Takeshi)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：80521707