

令和元年6月11日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11428

研究課題名(和文) アナフィラキシーショックにおけるAngiopietin 2の役割

研究課題名(英文) The role of angiopoietin-2 in anaphylactic shock

研究代表者

芝本 利重 (SHIBAMOTO, Toshishige)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90178921

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)：Angiopietin(Angpt)-2は血管透過性を亢進させる血管内皮由来の成長因子で、敗血症などの病態に関与している。一方、アナフィラキシーの病態の特徴は血管透過性亢進である。本研究ではラットとマウスのアナフィラキシーショックで血中Angpt-2濃度を測定し、アナフィラキシーショックへの関与を検討した。その結果、血管透過性亢進と血管外体液漏出によるヘマトクリット上昇は抗原投与後20分以内に見られ、後者は以後漸減した。Angpt-2濃度は20分では上昇せず、ラットでは1～6時間後に遅れて増加した。Angpt-2はアナフィラキシー初期の血管外体液漏出への関与はないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アナフィラキシーショックは致死的となりうる救急疾患で、更なる病態解明が求められている。その病態の特徴として血管透過性亢進がある。本研究の目的は敗血症などの血管透過性亢進に関わるAngiopietin(Angpt)-2がアナフィラキシーへの関与を動物実験で解明することであった。その結果、ラットとマウスともにアナフィラキシー低血圧時に血管透過性は抗原投与20分以内の早期に亢進したが、その時にはAngpt-2の血中と組織中の濃度増加はなく、血管透過性亢進への関与は低いことが明らかとなった。本研究成果は致死的病態であるアナフィラキシー低血圧時の血管透過性亢進の病態の解明に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Angiopietin (Angpt)-2, an endothelium derived permeability-increasing factor, is involved in vascular leakage of sepsis, but its role remains unknown in anaphylactic hyperpermeability. We determined plasma Angpt-2 levels and hematocrit (Hct) as a measure of vascular leak during anaphylactic hypotension in ovalbumin-sensitized mice and rats. In both animals, following antigen injection, vascular permeability increased at 20 min, and Hct increased reaching the peak within 20 min, followed by a progressive decrease in rats. The plasma Angpt-2 levels did not change significantly within 20 min and until 60 min in mice and rats, respectively. Thereafter, in awake rats, they reached the peak at 6 h after antigen, and returned to the baseline at 24 h. In addition, in mice, western blot analysis revealed no increase in tissue Angpt-2 within 20 min after antigen. In conclusion, Angpt-2 is not released at early phase when vascular leak occurs during anaphylactic hypotension in mice and rats.

研究分野：生理学

キーワード：Angiopietin 2 アナフィラキシーショック マウス ラット 血管透過性亢進 ヘマトクリット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシーショックは時として致命的となり、その治療の改善が求められている。アナフィラキシーショックの血圧低下機序には、血管透過性亢進が最も重要な要因の一つである。その血管透過性亢進はアナフィラキシー反応時に肥満細胞から分泌されるヒスタミンなどの化学伝達物質の関与が第一義的であるが、副次的に一酸化窒素などの関与もある。近年、敗血症や急性呼吸促進症候群の血管透過性亢進に関与が指摘されている Angiopietin(Angpt)-2 が注目されている(文献 1,2)。Angpt-2 は内皮細胞内の Weibel-Palade body に蓄積され、アナフィラキシー時に血中濃度の増加がする histamine, serotonin, epinephrine, vasopressin などにより放出される(文献 3,4)。その後、Tie2 受容体に結合して、内皮細胞を不安定化させ、血管透過性を亢進させる(文献 5)。以上より、血管透過性が亢進するアナフィラキシーショック時に血液中の Angpt-2 の増加が予想される。しかしながら、血中 Angpt-2 濃度の検討はなく、アナフィラキシー時の血管透過性亢進に Angpt-2 の関与は不明である。

2. 研究の目的

マウスとラットのアナフィラキシーショック時に血中と組織中の Angpt-2 濃度を測定して、その役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BALB/c マウスのアナフィラキシーショックモデルでの検討：

BALB/c マウスのアナフィラキシー低血圧は既報に従い惹起した(文献 6)。すなわち、抗原の卵白アルブミン(0.01 mg)を aluminum potassium sulfate adjuvant (2 mg)とともに 1 週おきに 2 回皮下投与して感作した。実験は三種混合麻酔薬 (medetomidine hydrochloride 0.75 mg/kg, midazolam 4 mg/kg, butorphanol tartrate 5 mg/kg, ip)の麻酔下で頸動脈から体血圧を測定した。抗原(0.01 mg)を静脈内に投与してアナフィラキシーを惹起し、抗原投与後 3 分, 10 分, 20 分に脱血した。採血血液から 血漿 Angpt-2 濃度、体液の血管外漏出の指標となるヘマトクリット(Hct)を測定した。Angpt-2 は ELISA 法で測定した。また、血管透過性が亢進した組織中の Angpt-2 量を各時点において Western blot 法により測定した。さらに、別の実験で血管透過性を Evans blue dye (EB)の組織への漏出量で評価した。

(2) C57BL マウスのアナフィラキシーショックモデルでの検討：

BALB/c マウスと strain の異なる C57BL マウスにおいて BALB/c マウス実験と同様に麻酔下に抗原(3 μ g)を静脈内に投与してアナフィラキシーを惹起させ、血中 Angpt-2 濃度と Hct を測定した。また、EB 法による血管透過性も BALB/c マウスと同様に測定した。

(3) 麻酔下 SD ラットのアナフィラキシーショックモデルでの検討：

既報のごとく(文献 7) 実験 2 週間前に卵白アルブミン 1 mg と complete Freund's adjuvant (0.5 ml)の混合液 1 ml を皮下に投与して SD ラットを感作した。実験は (1)ketamine (50 mg/kg, ip) と α -chloralose (40 mg/kg, ip)ならびに(2)urethane(1.2 g/kg)の麻酔下に抗原 0.6 mg を静脈内に投与してアナフィラキシー低血圧を惹起させた。体血圧測定とともに(1)ketamine & α -chloralose 麻酔下では抗原投与前と抗原投与後 20 分, 60 分に、(2) urethane 麻酔下では抗原投与前と投与後 3 分, 10 分, 30 分, 60 分に、それぞれ

血液 0.2mL を採血して血漿 Angpt-2 濃度と Hct を測定した。また、urethane 麻酔下で抗原投与後 20 分に EB 法による血管透過性をマウスと同様に測定した。

(4) 無麻酔 SD ラットのアナフィラキシーショックモデルでの検討：

麻酔下ラットに比べて、より長期的観察が可能な無麻酔ラットで既報のごとく(文献 8) アナフィラキシー低血圧を惹起させ、同様に採血して検討した。体血圧測定とともに採血を抗原投与前と投与後 3 分, 10 分, 20 分, 60 分, 2 時間, 6 時間, 24 時間に行い、血漿 Angpt-2 濃度と Hct を測定した。

いづれの実験においても抗原を感作したラットのみならず対照として非感作ラットにおいても検討した。

4. 研究成果

(1) BALB/c マウスのアナフィラキシー：

アナフィラキシー低血圧は既報(文献 6)のとおり再現できた。すなわち、血圧は抗原投与前の 94 ± 4 mmHg から投与後初期に 32 ± 6 mmHg (1 分)に上昇し、20 分には 65 ± 10 mmHg に低下した。Hct は $45 \pm 1\%$ から抗原投与後 3 分に $48 \pm 2\%$ に上昇し、10 分にはピークの $61 \pm 1\%$ となり、以後低下傾向を示した。血漿 Angpt-2 濃度は前値が 14 ± 3 ng/ml であったが、抗原投与後の 3 分, 10 分, 20 分に測定するも有意な増加はなかった。組織中 Angpt-2 量は血管透過性が亢進した腎臓、小腸、下肢骨格筋で Western blot 法により測定したが、血中と同様に有意な増加はみられなかった。EB 法により測定した血管透過性は 20 分に腎臓では 53%、骨格筋では 134%、腸間膜では 172%、小腸では 72%、増加した。

以上の結果から、麻酔下 BALB/c マウスのアナフィラキシー時には抗原投与後早期に血管透過性が亢進し、血管外へ血漿漏出が生じるが、血中ならびに組織中の Angpt-2 濃度には変化がみられないことが明らかになった。

(2) C57BL マウスのアナフィラキシー：

C57BL マウスに抗原投与量 $3 \mu\text{g}$ を投与すると血圧は投与前値の 87 ± 4 mmHg から 20 分には 64 ± 7 mmHg に低下した。Hct 値は $5 \pm 1\%$ 上昇した。EB 法により測定した血管透過性は 20 分に腎臓では 57%、肺では 52%、腸間膜では 39%、小腸では 50%、増加した。しかし、血漿 Angt-2 濃度は 6 分, 20 分に測定するも投与前値に比べて有意な増加はみられなかった。

以上の結果から、麻酔下 C57BL マウスのアナフィラキシー時にも血圧低下し、血管透過性は亢進して、血管外へ血漿漏出が生じるが、血中 Angpt-2 濃度は変化しないことが明らかになった。

(3) 麻酔下 SD ラットのアナフィラキシー：

麻酔下ラットのアナフィラキシー低血圧において血漿 Angpt-2 濃度と Hct を測定した。

(1) ketamine & α -chloralose 麻酔下と(2) urethane 麻酔下、ともに抗原投与後、体血圧はそれぞれ抗原投与前値の 112 ± 9 mmHg と 92 ± 4 mmHg から、それぞれ、10 分と 9 分に最低値の 36 ± 3 mmHg と 49 ± 8 mmHg に低下し、以後回復した。Hct は抗原投与前値の 46% から 20 分にピークの 58% となり、60 分には低下した。血漿 Angpt-2 濃度は

(1) ketamine & α -chloralose 麻酔下と(2) urethane 麻酔下で、それぞれ抗原投与前値の

6.5±1.2 ng/ml と 10.2±1.7 ng/ml から投与後 60 分に 12.0±2.8 ng/ml と 14.8±1.5 ng/ml に初めて有意に増加した。EB 法で測定した血管透過性は抗原投与後 20 分に気管では 140%, 気管支では 240%, 骨格筋では 280%, 腸間膜では 350%に増加した。

以上の結果から、Angpt-2 は麻酔下ラットアナフィラキシー低血圧時の早期の血管透過性亢進による血管外体液漏出時には増加せず、その回復がみられる抗原投与後 60 分に増加することが明らかになった。

(4) 無麻酔 SD ラットのアナフィラキシー :

無麻酔ラットのアナフィラキシー低血圧においても経時的に血漿 Angpt-2 濃度と Hct を測定した。抗原投与により体血圧は 106±3 mmHg から 投与後 6 分に 58±10 mmHg と最低となり、その後 1 時間には回復した。Hct は 42%から抗原投与後 20 分に最大値 55%となり、1 時間、2 時間にはそれぞれ 50%、46%に漸減し、24 時間には投与前値以下になった。血漿 Angpt-2 濃度は投与前値の 20±2 ng/ml から投与後 1 時間から有意に上昇し(27±3 ng/ml)、6 時間にはピークの投与前値の 2.7 倍(54±6 ng/ml)となり、24 時間には投与前値に復した。一方、非感作ラットでは測定値に有意な変化は見られなかった。

以上の結果から、血中 Angpt-2 は無麻酔ラットアナフィラキシー低血圧時においても増加するも、その増加は初期の血管外体液漏出よりも遅く、麻酔下ラットと同様に抗原投与後 60 分から増加し始め、ピークは投与後 6 時間であることが明らかとなった。このことより Angpt-2 はアナフィラキシー低血圧時の早期の血管外体液漏出には関与しないことが示唆された。

<引用文献>

1. Ricciuto DR, et al. Angiotensin-1 and angiotensin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2011;39:702-710.
2. Agrawal A, et al. Plasma angiotensin-2 predicts the onset of acute lung injury in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:736-742.
3. Scholz A, et al. Angiotensin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 2015;1347:45-51.
4. Fiedler U, et al. The Tie-2 ligand angiotensin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004;103:4150-6.
5. Fiedler U, et al. Angiotensin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006;12:235-239
6. Liu W, et al. Involvement of splanchnic vascular bed in anaphylactic hypotension in anesthetized BALB/c mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R1947-R1953.
7. Shibamoto T, et al. Hepatic venoconstriction is involved in anaphylactic hypotension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1436- H1441.
8. Zhang W, et al. Pulmonary vasoconstrictive and bronchoconstrictive responses to anaphylaxis are weakened via β_2 -adrenoceptor activation by endogenous epinephrine in anesthetized rats. *Anesthesiology.* 2011;114:614-23.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Wei Yang, Toshishige Shibamoto, Yuhichi Kuda, Tao Zhang, Mamoru Tanida, Yasutaka Kurata. 2-adrenoceptor blockade deteriorates systemic anaphylaxis by enhancing hyperpermeability in anesthetized mice. Allergy Asthma and Immunology Research. 査読有, 10(1), 2018, 52-61. DOI:10.4168/aair.2018.10.1.52.

〔学会発表〕(計6件)

Toshishige Shibamoto, Tao Zhang, Mamoru Tanida, Yuhichi Kuda, Yasutaka Kurata. Angiotensin-2 is released only at late phase of systemic anaphylaxis in awake rats. The 2019 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting, San Francisco, 2019.

Toshishige Shibamoto, Mamoru Tanida, Tao Zhang, Wei Yang, Yuhichi Kuda, Yasutaka Kurata. Angiotensin-2 is released after vascular leak onset during anaphylaxis in un- and anesthetized rats. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, Kobe, 2019.

芝本利重, Tao Zhang, 谷田 守, 九田裕一, 倉田康孝. 無麻酔ラットにおけるアナフィラキシー低血圧時の血漿 Angiotensin-2 濃度の変動. 第65回中部日本生理学会, 名古屋, 2018.

Toshishige Shibamoto, Wei Yang, Mamoru Tanida, Yuhichi Kuda, Tao Zhang, Yasutaka Kurata. Angiotensin-2 is not released during anaphylaxis-induced vascular leak in anesthetized mice and rats. The Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2018, Copenhagen, 2018.

Toshishige Shibamoto, Wei Yang, Mamoru Tanida, Yuhichi Kuda, Tao Zhang, Yasutaka Kurata. No release of angiotensin-2 during anaphylaxis-induced vascular leak in anesthetized mice. The 8th International Congress of Pathophysiology, Bratislava, 2018.

楊 巍、芝本利重、張 涛、九田裕一、谷田守、倉田康孝. Angiotensin-2 is not involved in anaphylaxis-induced hyperpermeability in anesthetized mice and rats. 第64回中部日本生理学会, 甲府, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷田 守

ローマ字氏名：(TANIDA, mamoru)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70512309

研究分担者氏名：九田 裕一

ローマ字氏名：(KUDA, yuhichi)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 50566916

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。