

令和元年5月20日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11762

研究課題名(和文) 血管内皮層を覆うグリコカリックスの機能分析と周術期管理への応用

研究課題名(英文) The functional analysis of glycocalyx on the vascular permeability

研究代表者

飯島 毅彦 (IIJIMA, TAKEHIKO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：10193129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1)肺血管の生体内観察と抗白血球抗体による白血球の凝集。抗白血球抗体により白血球は肺血管表面に凝集する。直ちに肺胞内の水分量が増加し、肺水腫を形成することが生体内で観察された。2)培養血管内皮層を用いたglycocalyxによる血管透過性の検討。単なるglycocalyxの破壊では血管透過性の亢進は起こらないが、炎症反応を開始する遺伝子の誘導が起こっていることが確認された。glycocalyxは各受容体の活性化を抑制していることが示唆された。3)抗白血球抗体を用いた肺血管透過性亢進におけるマクロファージの役割。肺水腫の形成にはマクロファージが重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮障害と微小循環障害は様々な病態の進行に大きく関与する。この病態の進行には微小構造物であるグリコカリックスが鍵を握っていることが想定されてきた。本研究ではグリコカリックスを生体内で観察することを可能とし、特に観察が難しい肺血管での生体内観察を可能とし、肺水腫の成立過程を示すことができた。さらに研究を進め、グリコカリックスの機能を検討した。その結果、グリコカリックスは構造物として血管の透過性を抑制するのではなく、細胞内シグナリングを抑制することで血管透過性の調節に関与することを示唆する結果を得た。今後、重症病態である肺水腫等を含めた様々な病態の解明および治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：1) Intra-vital observation of pulmonary microcirculation and leukocyte aggregation induced by anti-leukocyte antibody. It was observed under intra-vital microscope that lung edema developed immediately after leukocyte aggregation triggered by cognate leukocyte antibody. 2) The role of glycocalyx on the vascular permeability. Digestion of glycocalyx per se could not increase endothelial permeability, however, the genetic response leading to inflammation commenced. Thus, glycocalyx is suggested to play an important role to insulate receptors on the endothelium from the luminal content. 3) The role of macrophage on pulmonary vascular permeability. It was confirmed that lung edema induced by leukocyte aggregation needs participation of macrophage.

研究分野：体液管理

キーワード：血管透過性 グリコカリックス 血管内皮 肺水腫 抗白血球抗体 マクロファージ TRALI 炎症

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

### 1. 研究開始当初の背景

重症病態では、血管透過性が亢進するため血管内の容量管理に苦慮する。本来、血管は内皮を構成する構造物により密閉性が保たれているが、敗血症等の病態ではこの構造物が崩壊し、血管透過性が亢進していく。血圧を保ち、臓器灌流量を維持するためには血管収縮薬と容量負荷が必要になるが、血管透過性が亢進した病態では容量負荷は効率的な昇圧効果が望めず、むしろ間質浮腫を助長するために臓器血流にはむしろ悪化する可能性を含んでいる。血管透過性の亢進に介入するには血管内皮の機能を理解し、その修復を考慮しなければならない。血管内皮細胞間には水も含めた血管内容物を漏洩させない装置があり、内皮表面は糖とタンパクからなる glycocalyx (GCX) 層で被覆されている。敗血症ではこの GCX が崩壊し、それに伴い大きな分子量の血管内の物質が漏洩するのが観察されている。GCX の崩壊は血管透過性亢進と密接に関連するが、必ずしも十分条件ではなく、血管内皮間の junction の機能と制御を考えなくては、血管透過性亢進のメカニズムを解明することはできない。すなわち、血管内皮保護層である GCX が障害を受けた後の血管内皮へのシグナル伝達と tight junction の変化のメカニズムの解明が必要である。GCX は単なる血管内皮表層のスイッチをカバーしているだけの構造物であるか、あるいは機能的な意義があるか今後のさらなる研究が待たれる。現在、臨床では重症病態の予後予測マーカーとして GCX の崩壊産物の血中濃度の推移をモニターする研究も進められている。あるいは各種薬物を用いた GCX の保護についての研究も試みられている。

### 2. 研究の目的

本研究では、各種重症病態を悪化させる因子である血管透過性亢進の機序を明らかにし、臨床的に介入できるメカニズムを提案することを目的とする。すでに血管透過性亢進が病態の特徴である敗血症では実験モデルも確立され、多くの研究がなされており、白血球の活性化に伴う血管内皮への凝集、GCX 層の崩壊、間質の浮腫が同時に観察されている。しかし、それぞれの因果関係は明らかではない。本研究では特に GCX の崩壊に注目し、一連の病態進行の流れの中で主要な役割を果たしているのかを明らかにし、薬理的な介入ができるかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 肺血管の生体内観察と抗白血球抗体による白血球の凝集とは血管外水分量の測定

GCX は可視化が困難であるが、本研究室と国立保健医療科学院で開発してきた生体内観察法を用いて生体内で発現している GCX の崩壊と血管透過性亢進の病態を再現し、白血球の活性化と血管外への水の漏出の時間経過を明らかにする。特に病態の進行が急激で治療法が確立していない敗血症に伴う肺水腫の病態生理を明らかにするために肺血管での生体内観察法を開発する。

血管透過性亢進の病態の再現は敗血症モデルを用いることができるが、白血球の活性化と透過性亢進を再現するには抗白血球抗体を用いても再現することができる。本研究では抗白血球抗体を用いて急速に起きる肺水腫の発現を観察する。

#### 2) 培養血管内皮層を用いた glycocalyx による血管透過性の調節機能の検討

GCX の崩壊は血管透過性の亢進に先行して観察されているが GCX は構造物として血管内皮の密閉性を保っているのか、あるいは何らかの生物学的な機能を発揮しているかは明らかではない。GCX を酵素により取り除き、血管透過性の亢進が起こるかを観察する。さら

に血管内皮の遺伝子応答を見ることにより GCX の細胞生物学的役割を検討する。

### 3) 抗白血球抗体を用いた肺血管透過性亢進におけるマクロファージの役割

抗白血球抗体を用いる白血球活性化モデルでは肺水腫を実験的に再現することができるが、その病態の成立にはいくつかのステップがある。マクロファージが最終的には肺胞内に侵入し、肺水腫の形成に関与していると考えられる。実験的にマクロファージを除き、肺水腫の発生が抑えられるかを検討することにより、病態の進行に介入できるメカニズムを検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 肺血管の生体内観察と抗白血球抗体による白血球の凝集とは血管外水分量の測定

抗白血球抗体の投与により白血球は肺血管表面に結合し、集積する。直ちに肺胞内の水分量が増加し、肺水腫を形成することが生体内観察により示された。現在、Journal of Intensive Care に投稿中である。

### 2) 培養血管内皮層を用いた glyocalyx による血管透過性の調節機能の検討

HUVEC(Human umbilical vascular endothelial)を用いて GCX を酵素により紹介したモデルを作成し、血管透過性の変化を TEER(Trans Endothelial Electrical Resistance)を用いて分析した。単なる GCX の酵素的な破壊では血管透過性の亢進はみられなかった。しかし、遺伝子解析によりいくつかの炎症反応を開始する遺伝子の誘導が起こっていることが観察された。このことから GCX という構造物自体は血管透過性には大きな影響を与えているのではなく、血管内皮細胞表層にある各受容体の活性化を抑制していることが示唆された。現在、Anesthesia & Analgesia に投稿中である。

### 3) 抗白血球抗体を用いた肺血管透過性亢進におけるマクロファージの役割

抗白血球抗体による肺水腫モデルを作成し、肺血管外水分量の増加及び GCX 層の喪失を観察した。その結果、肺血管において GCX の喪失が認められ、同時に肺血管外水分量の増加が観察された。この病態の成立におけるマクロファージの関与を知るために chlodronate を用いてマクロファージを排除したモデルをつくり観察した。その結果、肺水腫の形成は抑制されることが示された。白血球の活性化に伴う肺水腫の形成にはマクロファージが重要な役割を果たしていることが示された。本論文は現在投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Masuda R, Iijima T, Kondo R, Itoda Y, Matsushashi M, Hashimoto S, Kohira T, Kobayashi N, Okazaki H: Preceding haemorrhagic shock as a detrimental risk factor for respiratory distress after excessive allogeneic blood transfusion. 査読有 Vox Sang. ; 2018, 113(1):51-59.
2. 飯島毅彦 術中輸液の考え方の流れ 特集 麻酔科学の領域の広がり 昭和学会雑誌 78(5) 440 - 448, 2018
3. 飯島毅彦【集中治療医学領域における基礎研究最近のトピックス】血管内皮障害の最近の知見 グリコカリックスを中心に考える ICU と CCU 査読有 42(1) 25-33 2018
4. 飯島毅彦  
サードスペースとは何か?(解説)  
臨床麻酔 (0387-3668)42 巻 2 号 Page173-180(2018.02)
5. Masuda R, Nonaka M, Nishimura A, Gotoh K, Oka S, Iijima T: Optimal and safe standard

- doses of midazolam and propofol to achieve patient and doctor satisfaction with dental treatment: A prospective cohort study. 査読有 PLoS One. 2017 ;12(2): e0171627.
6. Kataoka H, Ushiyama A, Akimoto Y, Matsubara S, Kawakami H, Iijima T: Structural Behavior of the Endothelial Glycocalyx Is Associated With Pathophysiologic Status in Septic Mice: An Integrated Approach to Analyzing the Behavior and Function of the Glycocalyx Using Both Electron and Fluorescence Intravital Microscopy. 査読有 Anesth Analg. 2017 ;125(3):874-883.
  7. Nishimura A, Tabuchi Y, Kikuchi M, Masuda R, Goto K, Iijima T. The Amount of Fluid Given During Surgery That Leaks Into the Interstitium Correlates With Infused Fluid Volume and Varies Widely Between Patients. 査読有 Anesth Analg. 2016 Oct;123(4):925-32.
  8. Kataoka H, Ushiyama A, Kawakami H, Akimoto Y, Matsubara S, Iijima T. Fluorescent imaging of endothelial glycocalyx layer with wheat germ agglutinin using intravital microscopy. 査読有 Microsc Res Tech. 2016 ;79(1):31-7.
  9. Ushiyama A, Kataoka H, Iijima T : Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologies 査読有 Journal of Intensive Care, 59, 2016 (DOI 10.1186/s40560-016-0182-z )

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 福井梨恵、鈴木大、田中準一、美島健二、上條竜太郎、飯島毅彦  
抗 MHC 抗体によって引き起こされる肺水腫は肺血管内皮細胞においてグリコカリックスの分解を伴う  
第 65 回昭和大学学士会総会 (東京・2018・12・1)
2. 阿部響子、田中準一、吉田優子、福井梨恵、美島健二、飯島毅彦  
Glycocalyx 層を構成する Glycosaminoglycans による血管内皮透過性の機能解析  
第 65 回昭和大学学士会総会 (東京・2018・12・1)
3. 福井梨恵、鈴木大、上條竜太郎、飯島毅彦  
抗 MHC 抗体によって引き起こされる肺水腫は肺血管内皮細胞においてグリコカリックスの分解を伴う  
第 66 回国際歯科研究学会日本部会総会 (札幌・2018・11・16)
4. 福井梨恵、鈴木大、秋元義弘、牛山明、田中準一、飯島毅彦、上條竜太郎  
抗 MHC 抗体によって引き起こされる肺水腫は肺血管内皮細胞においてグリコカリックスの分解を伴う  
第 60 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡・2018・9・6)
5. Yoshida Y, Yamada A, Abe K, Kamijo R, Iijima T  
Cdc42 is expected to become a target gene for the control of vascular permeability  
ANESTHESIOLOGY 2018 Annual Meeting (San Francisco・2018・10.16)
6. Fukui R. Suzuki D. Akimoto Y. Ushiyama A. Tanaka J. Kamijo R. Iijima T.  
Pulmonary edema induced by cognate anti-MHC antibody accompanies glycocalyx degradation  
American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (San Francisco・2018・10・13)
7. Abe K. Tanaka J. Yoshida Y. Fukui R. Mishima K. Iijima T.

Functional analysis of endothelial permeability driven by glycosaminoglycans composing the glycocalyx

American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (San Francisco・2018・10・13)

8. 吉田優子、山田篤、池畑美紀子、加藤憲、上條竜太郎  
Cdc42 は出生後の血管形成および血管を介した骨形成に重要な役割を果たしている  
日本骨代謝学会第 36 回学術集会 (長崎・2018・7.26)
9. Yoshida Y, Yamada A, Iijima T, Kamijo R  
Cdc42 plays important roles in postnatal angiogenesis and bone formation  
The 28th annual scientific meeting of the Australia and New Zealand Bone and Mineral Society (Queenstown・2018・9.4)
10. Ochi H, Ushijima A, Iijima T Intravital observation of primed and activated leukocytes in the microcirculation of a TRALI mouse model. IARS(International Anesthesia Research Society)2017 Annual Meeting
11. 越智英行, 牛山明, 飯島毅彦:マウスを用いた肺微小循環の生体イメージング手法の開発と循環動態のリアルタイム観察 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 札幌市, 2017 年 6 月
12. Ochi H, Ushijima A, Iijima T Development of real-time imaging of lung microcirculation in mice. 第 42 回日本微小循環学会総会, 2017 年 3 月
13. 越智英行, 牛山明, 飯島毅彦 マウス肺観察窓法による肺微小循環の生体イメージング手法の開発 第 3 3 回体液代謝管理研究会年次学術集会, 栃木県, 2017 年 1 月 1 4 日

〔図書〕(計 5 件)

1. 飯島毅彦 西村晶子 膠質液と晶質液 貧血と赤血球輸血 血小板と血漿 リトル ICU ブック 稲田英一監訳 メディカルサイエンスインターナショナル 2018 年 5 月 17 日発行
2. 飯島毅彦 リンゲル液は、点滴後にどこに分布するの? 代用血漿には、どのような種類があるの? 麻酔で使う薬の疑問 58 山本達郎編 2018 年 5 月 6 日発行 文光堂
3. 飯島毅彦 知っておきたい! 予後まで考える!! 周術期輸液・輸血療法 KEYNOTE 克誠堂出版, 2017 年 11 月発行
4. 飯島毅彦 第 4 章 口腔外科治療学総論 6.麻酔法 .精神鎮静法 .全身麻酔法 最新口腔外科学 第 5 版 医歯薬出版, 2017 年 9 月発行
5. 飯島毅彦 晶質液と膠質液をどのように使い分けるか? 中分子量ヒドロキシデンプン (HES) はどのように用いるか? 麻酔科クリニカルクエスチョン 101 診断と治療社, 2016 年 5 月発行

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：増田陸雄

ローマ字氏名：Masuda Rikuo

研究協力者氏名：西村晶子

ローマ字氏名：Nishimura Akiko

研究協力者氏名：片岡華恵

ローマ字氏名：Kataoka Hanae

研究協力者氏名：今野歩

ローマ字氏名：Konno Ayumi

研究協力者氏名：越智英行

ローマ字氏名：Ochi Hideyuki

研究協力者氏名：牛山明

ローマ字氏名：Ushiyama Akira

研究協力者氏名：川上速人

ローマ字氏名：Kawakami Hayato

研究協力者氏名：秋元義弘

ローマ字氏名：Akimoto Yoshihiro

研究協力者氏名：松原幸枝

ローマ字氏名：Matsubara Sachie

研究協力者氏名：吉田優子

ローマ字氏名：Yoshida Yuuko

研究協力者氏名：阿部響子

ローマ字氏名：Abe Kyoko

研究協力者氏名：福井理恵

ローマ字氏名：Fukui Rie

研究協力者氏名：上條竜太郎

ローマ字氏名：Kamijo Ryutaro

研究協力者氏名：山田篤

ローマ字氏名：Yamada Atsushi

研究協力者氏名：鈴木大

ローマ字氏名：Suzuki Dai

研究協力者氏名：美島健二

ローマ字氏名：Mishima Kenji

研究協力者氏名：田中準一郎

ローマ字氏名：Tanaka Kenji

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。