

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20091

研究課題名(和文)敗血症性ショックにおいて腹部臓器から放出される細胞外小胞が多臓器不全へ与える影響

研究課題名(英文)The ability of human extracellular vesicles to augment inflammatory host response in septic shock

研究代表者

坂倉 庸介 (SAKAKURA, YOSUKE)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50608940

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)：患者の血漿中に存在する細胞外小胞(Extracellular vesicles：EV)は細胞接着分子を発現して接着部位を制御するだけでなく、免疫チェックポイント分子のリガンドを発現しリンパ球の活性化や増殖を抑制するメカニズムに関与している。しかしながらSIRSの病態におけるEVの役割は依然として不明のままである。我々は健常人を含む敗血症患者、非敗血症患者のEVを分離し、EV上の細胞接着分子と免疫チェックポイント分子のリガンドの発現量を比較した。その結果、敗血症患者では細胞接着分子の発現量が増加していた。また免疫チェックポイント分子のリガンドの発現量も正常人と比較して有意に増加していた。

研究成果の概要(英文)：Circulating extracellular vesicles (EVs) in plasma have been shown to mediate important inter-cellular communications in the pathogenesis of several disorders. EVs express not only cell adhesion molecules that regulate target specificities but also immune checkpoint molecules that suppress lymphocyte activation and proliferation. However, the roles of these molecules on EVs in systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis remain elusive. In order to clarify this issue, we measured the EV expression of cell adhesion molecules and immune checkpoint molecule ligands using immunofluorescent flow cytometry on EVs immobilized on beads. We found that these molecules might differ in SIRS (n=27) and sepsis(n=27), compared with healthy controls (n=18).

研究分野：麻酔科学

キーワード：敗血症 細胞外小胞 細胞接着分子 免疫チェックポイント分子 敗血症性ショック

1. 研究開始当初の背景

炎症刺激や組織傷害ストレスに晒された時に、マクロファージなどの免疫細胞に加え肝臓や腸管などの腹部実質臓器の細胞も含めほぼすべての細胞は、ナノサイズ微粒子エキソソームなどの細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EV) を細胞外に分泌し、その一部は血流中に出現し遠隔臓器への情報伝達に参与していることがわかってきた。

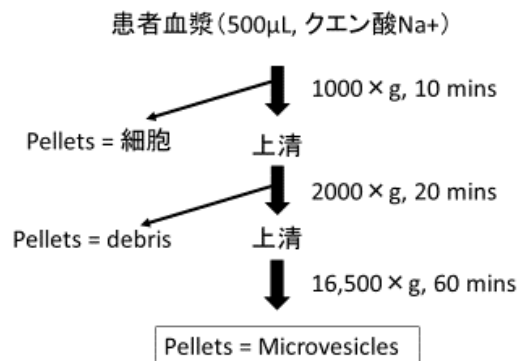
EV は表面に様々なレセプターやリガンドを発現し、miRNA やシグナル分子など多様な生理活性物質を内包する。分泌された EV は血中を介して遠隔臓器に到達した後、標的細胞の表面レセプターに結合しシグナルを伝達、又は内包分子を標的細胞内にデリバリーし、標的細胞を活性化することができる。このように EV は細胞間や臓器間の重要な情報伝達に関わり、がんや炎症性疾患を始め様々な疾患の病態生理で重要な役割を果たしている。敗血症性ショックにおいても血小板やマクロファージ由来の EV が、炎症性組織障害に参与している可能性を示唆する報告があるが、その詳細は十分には解明されていない。

2. 研究の目的

そこで我々は炎症刺激や組織傷害ストレスに反応して様々な細胞から分泌されるエキソソーム・マイクロベジクルなどの EV が、敗血症性ショックで多臓器不全発症の根底にある血管内皮傷害の病態に参与している新規メディエーターである可能性を患者検体を用いて検討する。

3. 研究の方法

三重大学救命救急センターICU に入室した SIRS および Sepsis 患者 57 名から同意を得て血漿を得た。血漿から血液細胞を除去し、無血小板血漿を得た後、16500G, 60 分、4 で細胞外小胞を分離した。(図 1)



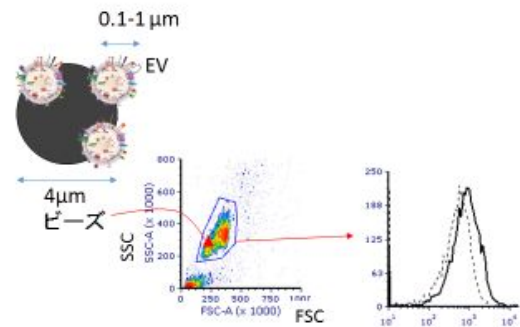
(図 1 細胞外小胞の分離方法)

細胞外小胞はビーズに固相化してフローサイトメトリーを用いて EV 上に発現する細胞接着分子および目覚来チェックポイント分子のリガンド量を測定した。

さらに敗血症で血液中に現れる EV の多様性と不均一性に着目し、白血球由来 (CD45 陽性)、血小板由来 (CD41 陽性)、上皮由来 (EpCAM)、内皮由来 (CD144) の 4 つの異なる EV フラクシオンの動態を定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) MV の大きさはフローサイトメトリーの検出限界以下のため直接 FACS で蛋白質の発現量を確認することは困難であった。この困難を克服するため我々は直径 4µm のビーズに EV を固相化して発現量を敗血症患者、健常人、非敗血症患者の 3 群で確認した。



(図 2 EV をビーズに固相することでフローサイトメトリーで容易に細胞接着分子の発現量を比較できる。点線は isotype control, 実線は細胞接着分子に対する抗体)

(2) 敗血症患者の細胞外小胞の数は健常人や非敗血症患者と比較して有意に増加していた。

(3) 敗血症患者の細胞外小胞表面には健常人と比較して細胞外接着分子が強く発現していることを見いだした。

(4) また、敗血症患者および SIRS 患者の細胞外小胞表面には免疫チェックポイント分子のリガンドが健常人と比較して有意に高発現していることを新たに確認した。

(5) さらに我々はこれらの細胞接着分子および免疫チェックポイント分子のリガンドと患者の臨床データとの相関を検討した。その結果、I) 敗血症患者の細胞外小胞の細胞接着分子はショックインデックスと相関し、II) SIRS 患者における細胞外小胞の免疫チェックポイント分子の発現量は白血球数の減少と相関していることを発見した。

以上からこの細胞外小胞表面の細胞接着分子発現増強現象は敗血症性ショック状態における細胞外小胞と細胞の接着・相互作用のメカニズムに参与する可能性があると考えられた。

さらに SIRS 患者の細胞外小胞の免疫チェックポイント分子のリガンド発現増強現象は、リンパ球表面の免疫チェックポイント分子と結合して細胞間で認められる免疫抑制機構と同様のメカニズムで免疫抑制、ひいては重症多臓器不全下にある患者の免疫麻痺病態に関与している可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

西中文、亀井 政孝、坂倉 庸介、木村 準之介、中西 まどか、吉住 祐紀、生川 未菜、宮部 雅幸. 新生児動脈管結紮術を胸部硬膜外と全身麻酔で管理し早期抜管できた1例. Cardiovascular Anesthesia Vol.21, No.1, 75-78, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

中西 まどか、木村 準之介、大内 由貴、坂倉 庸介、亀井 政孝、宮部 雅幸. 鎖骨下動脈狭窄が術後に判明した大動脈弁狭窄症合併患者の肝切除術の一例 日本臨床麻酔学会第 37 回大会 2017 年 11 月

大内 由貴、木村 準之介、中西 まどか、坂倉 庸介、亀井 政孝、宮部 雅幸、吉住 祐紀. リクルートメント手技により術中気管チューブが逸脱し低換気となった RALP の 1 例 日本臨床麻酔学会第 37 回大会 2017 年 11 月

中西 まどか、坂倉 庸介、木村 準之介、吉住 祐紀、亀井 政孝、宮部 雅幸. 小児心臓手術後の手術室抜管における硬膜外麻酔の有用性 日本小児麻酔学会第 23 回大会 2017 年 10 月

大川 真駒、坂倉 庸介、大内 由貴、生川 未菜、亀井 政孝、宮部 雅幸. 小児の食道異物を McGRATHMMAC と小児用 SUZY 型鉗子を用いて摘出した 3 例 日本小児麻酔学会第 23 回大会 2017 年 10 月

大内 由貴、宮部 雅幸、亀井 政孝、坂倉 庸介、中西 まどか、木村 準之介. 胎児巨大頸部腫瘍に対してデスフルランによる吸入麻酔を行った EXIT の 1 例 日本小児麻酔学会第 23 回大会 2017 年 10 月

川本 英嗣、坂倉 庸介、島岡 要. 敗血症患者の細胞外小胞にはインテグリン、PD-L1、PD-L2 が発現する—細胞外小胞 PD-L1 が免疫麻痺を引き起こす可能性— 第 32 回日本 shock 学会総会 2017 年 9 月

吉住 祐紀、亀井 政孝、坂倉 庸介、木村 準之介、大内 由貴、宮部 雅幸. CoreValve で術中上行大動脈破裂を合併した 1 症例 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 15 回学術集会 2017 年 9 月

坂倉 庸介、亀井 政孝、坂本 良太、森井 秀幸、島岡 要、宮部 雅幸. 気管挿管手技のバイオメカニクス: 熟練医の技のしなやかさを 3D モーションキャプチャで解析する 日本麻酔科学会第 64 回学術集会 2017 年 6 月

中西 まどか、亀井 政孝、坂倉 庸介、宮部 雅幸. 病的肥満患者の慢性血栓塞栓肺高血圧症に対する肺動脈血栓内膜摘除術の麻酔管理 日本臨床麻酔学会第 36 回大会 2016 年 11 月

木村 準之介、亀井 政孝、吉住 祐紀、中西まどか、坂倉 庸介、宮部 雅幸. 経カテーテルの大動脈弁留置術でバルサルバ洞破裂をきたした症例 日本臨床麻酔学会第 36 回大会 2016 年 11 月

中西 まどか、亀井政孝、坂倉 庸介、宮部 雅幸. TAVI 導入初期に連続して経験した大動脈弁論破裂の 2 症例 日本麻酔科学会東海北陸支部第 14 回学術集会 2016 年 9 月

木村 準之介、坂倉 庸介、吉住 祐紀、中西 まどか、亀井 政孝、宮部 雅幸. 当院における小児分離肺換気への取り組み 日本麻酔科学会東海北陸支部第 14 回学術集会 2016 年 9 月

吉住 祐紀、坂倉 庸介、木村 準之介、中西 まどか、亀井 政孝、宮部 雅幸. 当院における成人のクリオプレシテートの投与基準 日本麻酔科学会東海北陸支部第 14 回学術集会 2016 年 9 月

川本 英嗣、坂倉 庸介、今井 寛、島岡 要. トロンボモジュリンはインテグリンに結合し、白血球の接着と遊走を制御する 第 23 回外科侵襲とサイトカイン研究会 2016 年 7 月

坂倉 庸介、宮部 雅幸. 腹腔内温熱化学療法併用腫瘍減量手術後の腎機能障害の要因の検討 日本麻酔科学会第 63 回学術集会 2016 年 5 月

〔図書〕(計 1 件)

川名 信、蔵谷 紀文、坂倉 庸介 他
書名:エビデンスで読み解く小児麻酔
題目:保護者同伴入室
克誠堂出版 286 (p5-8) 2016 年 11 月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/molpath/>

6．研究組織

(1)研究代表者

坂倉 庸介 (SAKAKURA, Yousuke)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50608940

(4)研究協力者

川本 英嗣 (KAWAMOTO, Eiji)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20577415

伊藤 亜沙実 (ITOU, Asami)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80740448

江口 暁子 (EGUCHI, Akiko)

三重大学・大学院医学系研究科・特任助教(研究担当)

研究者番号：00598980

今井 寛 (IMAI, Hiroshi)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00184804

岡本 貴行 (OKAMOTO, Takayuki)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：30378286

朴 恩正 (PARK Eun Jeong)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20644587

島岡 要 (SHIMAOKA, Motomu)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40281133