

令和元年5月29日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20106

研究課題名(和文)血管内皮グリコカリックスに対するアルブミン療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of albumin therapy for vascular endothelial glycocalyx

研究代表者

数馬 聡 (KAZUMA, SATOSHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20722060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット大動脈を使用して、過酸化水素の暴露で酸化ストレスを与え、グリコカリックスを障害させた。この障害によって内皮依存性弛緩反応は減弱した。セボフルランは、アルブミンと同様に血管弛緩反応の回復させた。レクチン染色でセボフルランのグリコカリックスに対する再生効果を確認した。また、グリコカリックスの回復効果はラット大動脈の免疫組織化学でも確認できた。セボフルランは回復促進因子としてのシアル酸転移酵素ST6Gal-1に影響していることが免疫組織化学で確認できた。さらに、ラットの左冠動脈結紮モデルを使用し、電子顕微鏡観察でアルブミンの前投与がグリコカリックスの障害を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルブミンやセボフルランによってグリコカリックスの保護、もしくは回復させるという点が本研究の特色であり、世界初の試みである。これらの結果は、臨床的に血管内皮障害が主体ともいわれる敗血症の治療する場合や、グリコカリックスの脱落が指摘されている出血性ショックでは、輸液管理を目的としたアルブミン投与というよりむしろグリコカリックスの保護もしくは回復を目的とした投与といった治療戦略が可能となり得る。また敗血症に関して、現在アルブミンと人工膠質液の有用性が比較されているが、グリコカリックス障害の回復という見地からアルブミンを選択する理論的根拠をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using rat aorta, exposure to hydrogen peroxide gave oxidative stress and impaired glycocalyx. This treatment attenuated the endothelium-dependent relaxation response. Sevoflurane, like albumin, regenerated the vasodilation response. Lectin staining confirmed the regenerative effect of sevoflurane on glycocalyx. The regenerative effect of glycocalyx was also confirmed by immunohistochemistry of rat aorta. It was confirmed by immunohistochemistry that sevoflurane affects the sialyltransferase ST6Gal-1 as a recovery promoting factor. Furthermore, using a left coronary artery ligation model in rats, it was found by confocal and transmission electron microscopy that pretreatment with albumin inhibited the damage of glycocalyx.

研究分野：麻酔科学

キーワード：グリコカリックス アルブミン セボフルラン 内皮依存性弛緩反応

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮細胞の内膜面には内皮グリコカリックスとよばれる糖鎖の層が存在し、糖タンパク質、プロテオグリカン、およびグリコサミノグリカンにより構成される。グリコカリックスは、その構造的特徴から強い負電荷を有しており、血漿中の陽イオンを引きつけ、さらに負の電荷をもつアルブミンと層を形成している。グリコカリックスの機能は、第1に血管透過選択性のある防護壁として、第2に酵素、補酵素、液性伝達物質(例えば、活性酸素消去酵素)の局所濃度調節領域として、第3にシェアストレスといった物理的刺激的シグナル伝達経路の一部としてはたらいっている。

(2) グリコカリックスに関する知見の増加に伴い、血管内皮の機能を維持する上でグリコカリックスそのものを治療の対象とする見方が生じている。すなわち、内皮グリコカリックスをいかにして保護し、修復させることができるかが論点となっている。グリコカリックスに対する障害は、虚血再灌流時、敗血症や炎症に伴うTumor necrosis factor- α の暴露、さらにhypervolemiaによって生じる。

(3) グリコカリックスの保護に関して、吸入麻酔薬であるセボフルランの投与、ヒドロコルチゾンの投与、新鮮凍結血漿の投与といった方法が報告されているが一般化していない。シアル酸は内皮グリコカリックスの構成要素の一つである。肺血管内皮細胞を用いた研究で、糖鎖分解酵素のシアリダーゼにより分解することで内皮防護作用を抑制したという報告がある。

私は本研究のパイロット研究として、ラット大動脈標本をシアリダーゼで処理することで、生体の血液灌流で重要なはたらきを担う内皮依存性弛緩反応が抑制され、さらにその抑制反応は、アルブミンを投与することにより改善されるという現象をとらえた。しかし、内皮グリコカリックスに関して、他に内皮依存性弛緩反応におけるアルブミン投与の効果を明らかにした報告はなく、アルブミンやセボフルランによる内皮グリコカリックス障害の改善効果の機序は明らかではなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、アルブミンおよびセボフルランがグリコカリックスの障害を抑制することにより、内皮依存性弛緩反応を回復させる効果があるという仮説をたて、内皮グリコカリックス障害時の内皮依存性弛緩反応におけるアルブミンおよびセボフルランの効果とその機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット下行大動脈を調整し、糖鎖分解酵素(シアリダーゼ)もしくは酸化ストレス暴露モデルとしての過酸化水素で処理した。その後、アルブミンもしくはセボフルランの存在下でアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応を比較し、グリコカリックス障害からの回復作用を検討した。同時に、グリコカリックスを特異的に認識するレクチンを用いた共焦点顕微鏡観察によってグリコカリックスを定量的に評価した。セボフルランのグリコカリックスへの保護効果に関して、シアル酸転移酵素であるST6Gal-1の動態を免疫組織化学で評価した。また、ラット *in vivo* における虚血再灌流障害に関して、アルブミンの保護効果を走査型および透過型電子顕微鏡で評価した。

4. 研究成果

グリコカリックスに対するアルブミンおよびセボフルランの保護効果の検討として、ラット胸部下行大動脈を用い、虚血再灌流障害モデルとして過酸化水素の暴露を行い、グリコカリックスを障害させた。この暴露処理の結果、血管内皮依存性弛緩反応は減弱することを確認し、その後アルブミン、もしくはセボフルランの存在下での弛緩反応の回復効果を比較検討した。さ

らに，セボフルランに関しては，血管内皮依存性弛緩反応の回復，蛍光標識したレクチン染色におけるグリコカリックスの保護効果，さらに再生効果を確認した．セボフルランの効果に関しては，過酸化水素暴露処理の前に投与してもその保護効果はみられず，グリコカリックス障害後のセボフルランの後処理でのみ，回復効果が得られた．また，この効果を弛緩反応と同様にラット大動脈を用いた免疫組織化学でも同様に確認し，これらの回復効果の促進因子として，グリコカリックスの重要な構成成分であるシアル酸を付加するシアル酸転移酵素 ST6Gal-1 に注目し，セボフルランがこの因子に影響を与えていることが示唆された．血管内皮依存性弛緩反応に関しては，ST6Gal-1 の阻害薬で，セボフルランの回復効果が消失することも確認した．さらに，虚血再灌流障害モデルとしてラットの左冠動脈結紮モデルを使用し，電子顕微鏡観察でアルブミンの前投与がグリコカリックスの障害を抑制することを見出した．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kazuma S, Tokenaga Y, Kimizuka M, Azumaguchi R, Hamada K, Yamakage M. Sevoflurane Promotes Regeneration of the Endothelial Glycocalyx by Upregulating Sialyltransferase. J Surg Res. 2019; 241: 40-7.

数馬 聡, 時永泰行, 君塚基修, 東口隆, 濱田耕介, 山蔭道明. セボフルランは酸化ストレスによる血管内皮依存性弛緩反応およびグリコカリックスの障害を回復させる．体液・代謝管理 2018;34: 11-17.

〔学会発表〕(計 4 件)

Kazuma S, Tokenaga Y, Kimizuka M, Azumaguchi R, Hamada K, Yamakage M. Sevoflurane promotes regeneration of endothelial glycocalyx damaged by oxidative stress by restoring the sialyltransferase, ST6Gal-1. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting. 2018 Oct 13-16. San Francisco, USA.

数馬 聡, 時永泰行, 東口 隆, 君塚基修, 濱田耕介, 山蔭道明. セボフルランは酸化ストレスによるグリコカリックスの障害および血管内皮依存性弛緩反応の減弱をシアル酸転移酵素 ST6Gal-1 の発現増強を介して回復させる (最優秀演題). 日本麻酔科学会北海道・東北支部第 8 回学術集会. 2018.9.1.旭川.

数馬 聡, 時永泰行, 君塚基修, 東口 隆, 濱田耕介, 山蔭道明. セボフルランは酸化ストレスによる血管内皮依存性弛緩反応およびグリコカリックスの障害を回復させる (優秀演題). 第 33 回体液代謝管理研究会. 2018.1.27.札幌.

数馬 聡, 時永泰行, 東口 隆, 君塚基修, 濱田耕介, 山蔭道明. セボフルランは酸化ストレスによるグリコカリックスの障害および血管内皮依存性弛緩反応の減弱を回復させる. 日本麻酔科学会北海道・東北支部第 7 回学術集会. 2017.9.1.秋田.

〔図書〕(計 2 件)

時永泰行, 数馬 聡, 山蔭道明: 3. 血管透過性と内皮グリコカリックス. 垣花泰之編. 救急・集中治療 エキスパートに学ぶ ショック管理のすべて. 東京: 総合医学社; 2018. pp 343-8.

時永泰行, 数馬 聡, 山蔭道明: 2. 内皮グリコカリックス障害が発生する?. 垣花泰之編. 救急・集中治療 ショック管理-ショックと臓器障害連関のメカニズム-. 東京: 総合医学社; 2017. pp 327-32.

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：時永 泰行

ローマ字氏名：TOKINAGA YASUYUKI

所属研究機関名：札幌医科大学医学部

部局名：麻酔科学講座

職名：講師

研究者番号（8桁）：60438281

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。