

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08914

研究課題名(和文) リコンビナントトロンボモジュリンの血管内皮グリコカリックス増生効果の検討

研究課題名(英文) Recombinant thrombomodulin protects against LPS-induced endothelial glycocalyx injury via increasing glycocalyx synthesis

研究代表者

鈴木 浩大 (Suzuki, Kodai)

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：80724583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症血管炎時においては全身の血管内皮グリコカリックスが傷害されることで複数臓器が傷害され、多臓器不全の末、死に至る。これまでリコンビナントトロンボモジュリン投与により血管内皮グリコカリックスの傷害が抑制されることが知られていたが、本研究によりその作用が抗炎症効果による間接的な傷害抑制効果だけでなく、薬剤による直接的なグリコカリックス増生効果が見られること、そしてその増生するタンパク質が臓器によって異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症に限らず様々な疾患で、重症化する際には血管内皮グリコカリックスの傷害が認められることが指摘されている。これまで血管内皮グリコカリックスの保護効果を抗炎症効果より説明されることはあったが、本研究のように薬剤の作用から直接的なグリコカリックスの増生効果を明らかにしたものはほとんどなく、学術的意義は大きい。また本知見はその他の疾患にも応用できる可能性があり、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Severe sepsis leads to multiple organ failure and after that death. One of the causes is endothelial glycocalyx injury throughout the body. It has been known that the recombinant thrombomodulin inhibits damage to the vascular endothelial glycocalyx, but this mechanism is still unclear. This study revealed that the recombinant thrombomodulin not only inhibits damage indirectly through its anti-inflammatory effect, but also has a direct glycocalyx proliferation effect, and that the proteins proliferated differ depending on the organ.

研究分野：集中治療

キーワード：血管内皮グリコカリックス 血管内皮障害 リコンビナントトロンボモジュリン

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染から臓器障害をきたした状態であり、全身に炎症が生じ、多臓器不全に至る。その機序は病原微生物からのリポ多糖 (LPS) などの病原体関連分子パターン (PAMPs) や壊死細胞から放出される HMGB1 などの alarmin を認識し、活性化した単球、好中球より放出される TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの過剰な炎症性サイトカインにより全身で血管内皮傷害が生じることが一因であるが、近年、敗血症時に血管内皮細胞内腔にあるグリコカリックスが傷害されることが報告され注目を集めている。#1 グリコカリックスは血管内皮表面に糖タンパク、硫酸プロテオグリカンなどからなるブッシュ様の構造物で、透過性の調節、浸透圧較差の保持、白血球接着の調整など血管内のホメオスタシスに関わっているとされるが、不明な点も多い。

トロンボモジュリンは血管内皮細胞上のトロンピン受容体であり、敗血症時にはトロンピンと結合しプロテイン C を活性化することで、凝固線溶調節作用に加え、抗炎症作用を有する。リコンビナントトロンボモジュリン (rhTM) は遺伝子工学的にトロンボモジュリンの細胞外ドメインを合成し開発され DIC 治療時に投与される薬剤であり、前述の凝固調節反応、抗炎症反応に加えて、直接的に炎症惹起物質である LPS、HMGB1 を中和する働きがある。#

申請者は平成 28-29 年度若手(B)研究において、敗血症マウスを作製し、rhTM 投与群においてグリコカリックス傷害抑制効果を確認し、報告している。しかしながら、その機序は十分にわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、rhTM のグリコカリックスに対する直接的ならびに間接的障害抑制効果を検討し、敗血症時に薬剤によるグリコカリックス傷害抑制効果を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

実験 1: 敗血症時における多臓器不全の病態解析

#### 1-1. 敗血症血管炎モデルマウスの作製

前日より絶食させた C57BL/6 マウスに LPS 20mg/kg を腹腔内投与し、敗血症モデルマウスを作製する。このモデルはすでに先行研究で確立しており、投与 48 時間後の生存率は 20%程度である。

#### 1-2. 血管内皮障害の超微形態解析

・凍結切断法による走査型電子顕微鏡 (SEM) の臓器サンプルの作製

対象マウスに硝酸ランタンによる電子染色と 2.5%グルタルアルデヒドによる灌流固定を施行。臓器を摘出し脱水した後、凍結切断を行った後にオスミウムコーティングし、試料作製する。

・透過型電子顕微鏡 (TEM) の臓器サンプルの作製

対象マウスより臓器を摘出し、硝酸ランタンによる電子染色と 2.5%グルタルアルデヒドによる灌流固定を施行。サンプルは樹脂で包埋する。

#### 1-3. 全身性炎症反応の血清生化学的評価

対象マウスの血液を採取、遠心分離し、血清中の炎症性サイトカイン (IL-6)、血管内皮障害の使用となる HMGB1、他各種生化学を ELISA 法により測定する。

#### 1-4. 血管内皮傷害の組織学的評価

対象マウスを屠殺後、各臓器を採取。ホルマリン固定の後、パラフィンブロック、凍結ブロックを作製。薄切切片とし、血管内皮傷害マーカーを免疫染色し、傷害の局在、程度を評価する。

#### 1-5. 臓器障害の定量的評価

対象マウスを屠殺後、各臓器を採取。血管内皮傷害マーカーである Syndecan を定量し、血管内皮傷害を評価する。

実験 2 : rhTM による重症敗血症に対する治療効果の解析

#### 2-1. サバイバルスタディ

LPS のみ投与したコントロール群と rhTM 群で生存率を検討する。

#### 2-2. rhTM の治療効果の検討

敗血症モデルマウスに rhTM を投与し、実験 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 と同様検討を行い、臓器における血管内皮障害の抑制効果、全身炎症反応抑制効果を確認する。

実験 3: マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

sham マウス、敗血症血管炎モデルマウスに rhTM を投与し、対象臓器を摘出。マイクロアレイ解析を行い、pathway 解析により変動する遺伝子の中で血管内皮、特にグリコカリックスに関わる遺伝子をピックアップする。

### 4. 研究成果

LPS の腹腔内投与 (20mg/kg) により敗血症性血管炎モデルマウスを作成し、rhTM 治療群では LPS 投与後 3、24 時間後に rhTM を腹腔内投与、生食群には同様に生食を投与して、各治療群を

準備した。

敗血症性血管炎モデルマウスは rhTM 投与により、炎症性サイトカインである IL-6、Damage-associated molecular pattern である HMGB-1 は低く抑えられ、48 時間後の生存率は改善していた。(図 1)

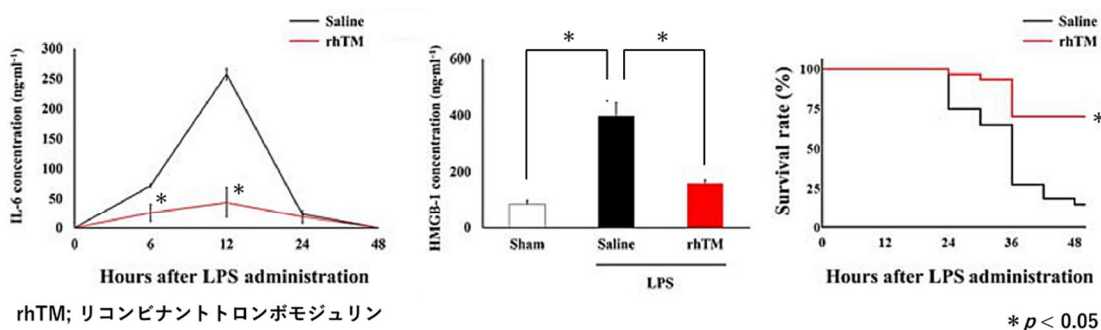


図1 敗血症性血管炎マウスはrhTM投与により、炎症性サイトカインであるIL-6、Damage-associated molecular patternであるHMGB-1は低く抑えられ、生存率は改善する。(Suzuki K, et al. *Br J Pharmacol.* 2020. より一部改変)

次いで、rhTM の保護効果を定量的に解析した。我々は他の実験で敗血症性血管炎時に臓器の中で肺、次いで心臓の血管透過性が炎症により亢進することを報告しており (Ando Y, et al. *Sci Rep.* 2018) それらの血管内皮グリコカリックスに着目しその傷害について解析を行った。まずウエスタンブロッティングで肺組織中のグリコカリックスのコア蛋白である Syndecan-1 の発現を評価した。結果、LPS 投与後も未治療敗血症性血管炎群と比較して rhTM 投与群では保たれていることがわかった。(図 2)

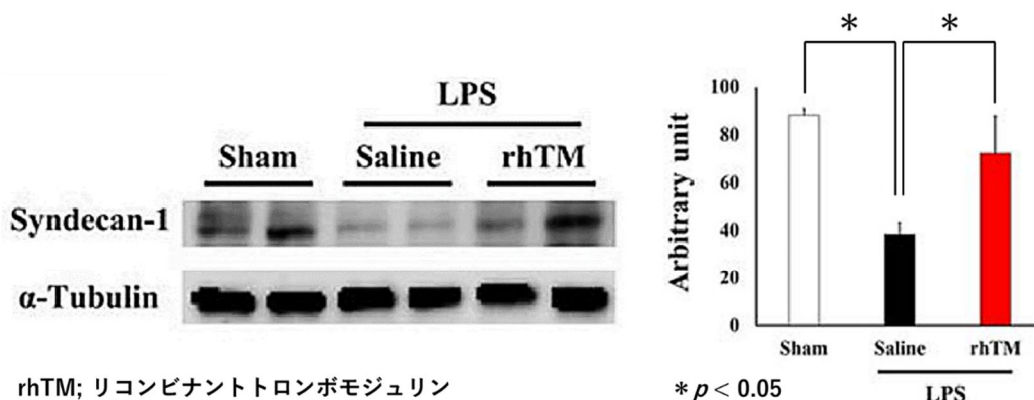


図2 肺組織において未治療敗血症性血管炎群ではグリコカリックスのコア蛋白であるSyndecan-1の発現が健常マウス、rhTM投与敗血症性血管炎マウスと比較して有意に低下していた。(Suzuki K, et al. *Br J Pharmacol.* 2020. より一部改変)

次いで、肺に心臓組織も加えてレクチン染色による血管内皮傷害の検討を行った。スコアリングし比較すると rhTM 投与群は未治療敗血症性血管炎群と比較して有意にグリコカリックスが傷害されずに保たれていることが分かり、rhTM のグリコカリックス保護効果は定量的にも明らかであった。(図 3)

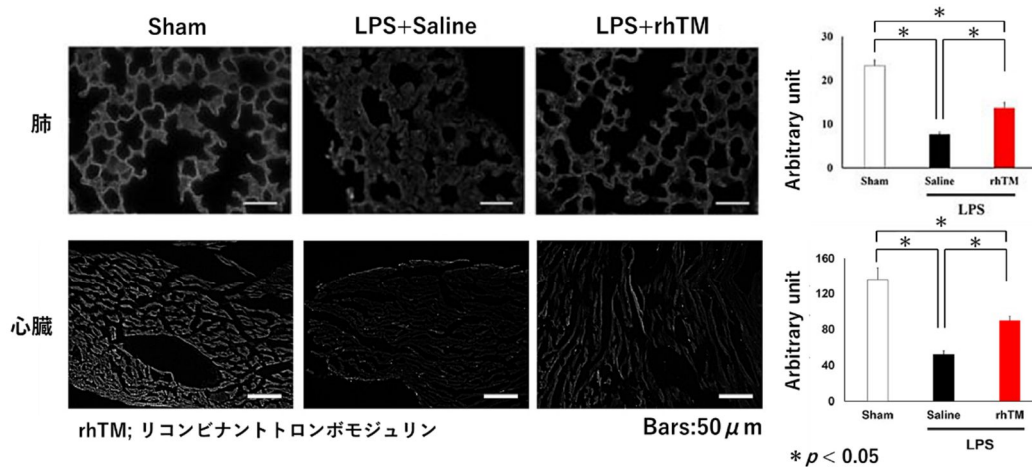


図3 肺、心臓の組織においてリコンビナントトロンボモジュリン投与群は未治療敗血症性血管炎群と比較して有意にグリコカリックスが傷害されずに保たれていた。(Suzuki K, et al. *Br J Pharmacol.* 2020.、Kakino Y, et al. *Heliyon.* 2022より一部改変)

通常の固定方法ではグリコカリックスは観察できない。そこで、硝酸ランタンを使用した電子染色を行い、肺、心臓の血管内皮グリコカリックスを観察した。比較するとリコンビナントトロンボモジュリン投与群は未治療敗血症性血管炎群と比較して有意にグリコカリックスが傷害されずに保たれていることが分かり、rhTM のグリコカリックス保護効果は超微形態を見ても明らかであった。(図4)

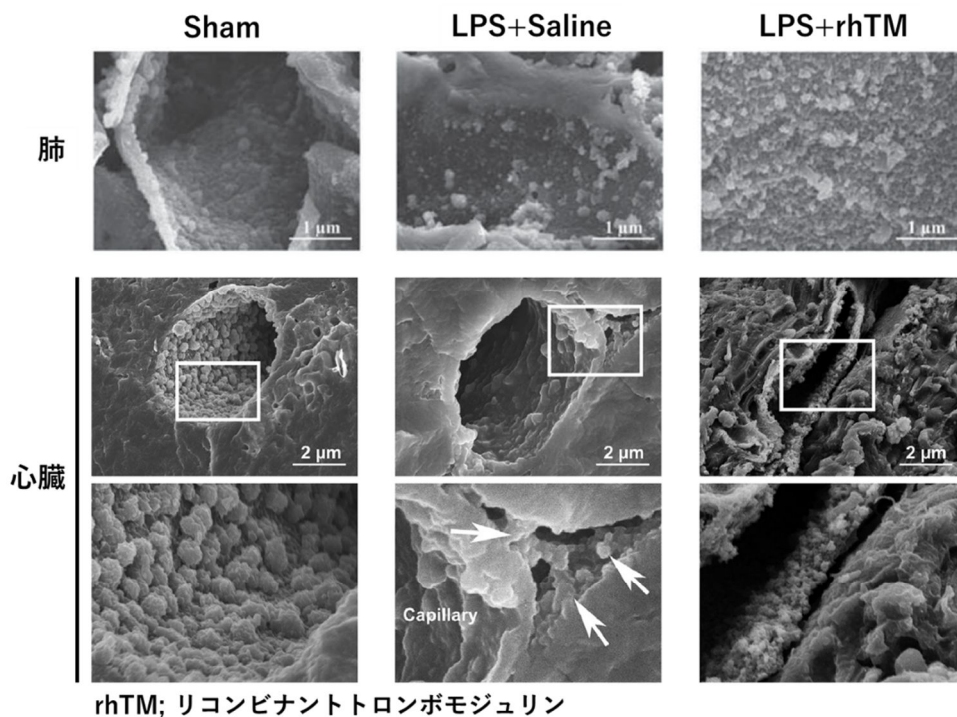


図4 グリコカリックス染色をした、電子顕微鏡による超微形態像。肺、心臓の組織においてリコンビナントトロンボモジュリン投与群は未治療敗血症性血管炎群と比較して有意にグリコカリックスが傷害されずに保たれていた。(Suzuki K, et al. *Br J Pharmacol.* 2020.、Kakino Y, et al. *Heliyon.* 2022より一部改変)

ここまでの結果は、LPS による全身炎症反応が rhTM の作用である抗炎症効果によって抑制され、血管内皮グリコカリックスの逸脱を抑制したことを明らかとしているに過ぎない。そこで次に、rhTM のグリコカリックス増生効果を検討するため、血管炎マウスと rhTM 治療マウスの肺、心臓組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を施行した。

結果、肺では血管内皮グリコカリックスの構成成分である HS6ST1 と ESM1 遺伝子が治療群で

有意に増加していることを明らかにした。さらに rhTM Full 治療群マウスの肺切片を蛍光免疫染色し、肺血管内皮細胞で HS6ST1 と ESM1 の発現が増加していることが確認され、rhTM の投与による血管内皮グリコカリックスの増生が示唆された。

さらに心臓についても解析し、硫黄化合物の異化プロセスに関連する遺伝子セットである Gene set enrichment analysis (GSEA) の遺伝子オントロジーおよび京都遺伝子ゲノム百科事典 (KEGG) 分析、クエン酸回路 TCA 回路、ピルビン酸代謝、および心臓伝導による心拍数の調節能が、生理食塩水投与したマウスよりも rhTM 治療マウスで有意に発現しており、これにより、有酸素代謝が心臓で強化され、心拍数と心臓伝導を調節する遺伝子セットに影響を与えることを明らかにした。また硫黄化合物異化過程遺伝子セットでは、rhTM 投与によりグリコカリックスのコア蛋白の一つであるグリピカン-1 が促進されていた。免疫組織化学染色でも LPS 投与により逸脱したグリピカン-1 が rhTM の投与により修復されており、rhTM は心臓の血管内皮保護だけでなく、グリコカリックス増生にも密接に関連していることが分かった。

これらの結果より、心臓と肺で rhTM の治療効果解析と異なる遺伝子が促進されており、これは同型の連続型毛細血管をもつ臓器でもグリコカリックスの構成成分が異なり、同薬剤でも臓器によって促進される遺伝子が異なる可能性が示唆された。(図5)

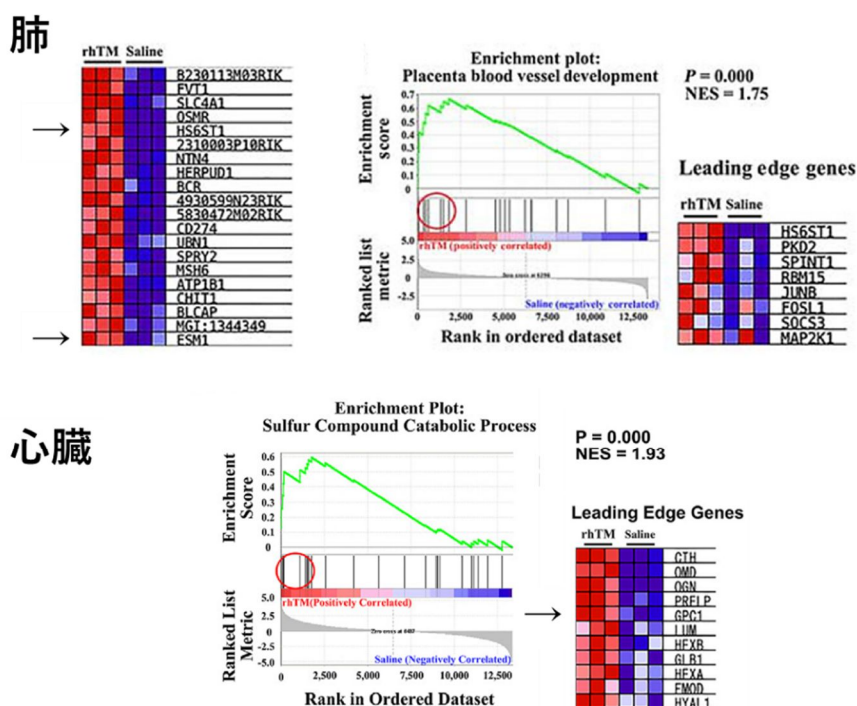


図5 敗血症性血管炎モデルマウスはrhTM投与により、肺ではHS6ST1とESM1遺伝子が、心臓ではグリピカン-1の発現が有意に増加していた。(Suzuki K, et al. *Br J Pharmacol.* 2020.、Kakino Y, et al. *Heliyon.* 2022より一部改変)

以上より、敗血症性血管炎時に rhTM 投与により血管内皮グリコカリックス傷害が抑制される機序は抗炎症による間接的傷害抑制効果だけではなく、薬剤投与による直接的なグリコカリックス増生効果も作用していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kakino Yoshinori, Doi Tomoaki, Okada Hideshi, Suzuki Kodai et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Recombinant thrombomodulin may protect cardiac capillary endothelial glycocalyx through promoting Glypican-1 expression under experimental endotoxemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e11262 ~ e11262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e11262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kodai, Okada Hideshi, Takemura Genzou, et al.	4. 巻 177
2. 論文標題 Recombinant thrombomodulin protects against LPS induced acute respiratory distress syndrome via preservation of pulmonary endothelial glycocalyx	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 4021 ~ 4033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木浩大
2. 発表標題 微小循環障害部位を標的とした新たな敗血症治療戦略
3. 学会等名 第50回 日本救急医学会総会・学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木浩大
2. 発表標題 血管内皮障害に着目した新規敗血症治療戦略
3. 学会等名 第50回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirohisa Yano, Kodai Suzuki
2. 発表標題 Recombinant Thrombomodulin Attenuates Sepsis-induced Pulmonary Injury via Protection of Endothelial Glycocalyx Structure
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 英志  (Okada Hideshi)  (30402176)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授   (13701)	
研究分担者	長屋 聡一郎  (Nagaya Soichiro)  (60444311)	岐阜大学・医学部附属病院・助教   (13701)	
研究分担者	土井 智章  (Doi Tomoaki)  (00444307)	富山大学・学術研究部医学系・教授   (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------