

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16496

研究課題名(和文) 生体蛍光イメージング解析を用いたアスコルビン酸の重症病態下内皮細胞機能への影響

研究課題名(英文) Effect of ascorbic acid on endothelial cell function under severe pathological conditions using fluorescence imaging analysis

研究代表者

安藤 直朗 (Ando, Tadao)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：10752199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症病態に対する治療としてのアスコルビン酸投与の予後改善効果が、血管内皮機能、末梢循環の改善によるものと仮定し、その関係を解明することを目的とし研究計画を立てた。背面皮膚透明窓を装着し血管内皮細胞の構造の評価を可能にしたアスコルビン酸合成酵素ノックアウトマウスを使用し、アスコルビン酸の血中濃度が低下した状態でlipopolysaccharide投与による敗血症モデルを作成することに成功した。また敗血症時のアスコルビン酸の投与による、血管内皮細胞の構造変化と末梢循環の変化を観察し、その障害の程度を解析し、アスコルビン酸の急速静脈投与および経口投与の実験系の確立を試み、その至適投与量の模索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスは本来、自身でアスコルビン酸を合成できる。本研究の最大の特徴は、アスコルビン酸合成酵素ノックアウトマウスを用い、ヒトにおける敗血症のアスコルビン酸欠乏状態をシミュレートするモデルを作成した点と、それに加えて背面皮膚透明窓を用いてその微小循環をリアルタイムに観察した点である。これにより、アスコルビン酸の投与による血管内皮細胞およびグリコカリックス層の変化を定量化することができるモデルが完成した。今後、アスコルビン酸の投与量や併用すると効果があるとされるチアミン、ステロイドの効果を実験することでもでき、敗血症における末梢循環変化の解明と、その治療の一助となるモデルを作成できることになる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the prognostic effect of ascorbic acid administration as a treatment for severe disease is due to the improvement of vascular endothelial function and peripheral circulation, and planned a study to elucidate the relationship between the two. Using ascorbate synthase-knockout mice with a transparent window on the back of the skin to evaluate the structure of vascular endothelial cells, we successfully created a sepsis model in which lipopolysaccharide was administered while the blood concentration of ascorbate was decreased. We also observed the structural changes in vascular endothelial cells and peripheral circulation induced by the administration of ascorbic acid during sepsis, and analyzed the degree of damage. We attempted to establish an experimental system for rapid intravenous and oral administration of ascorbic acid, and sought the optimal dosage.

研究分野：麻酔科学

キーワード：アスコルビン酸 敗血症 壊血病 グリコカリックス層 内皮細胞障害 微小循環 ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

世界的な重症敗血症患者の死亡率は未だに高く、30%前後と報告され、発展途上国では60%とも報告される。重症病態の患者死亡率の改善には、末梢循環の維持が必須であり、治療効果や病態をリアルタイムに把握することは治療の根幹である。しかし実際の臨床ではその両方とも満足に実施されていないのが現状である。特に重症敗血症では病態の進行が早く、乳酸値や混合静脈血酸素飽和度をモニターしている現在の治療法ではリアルタイムな病態把握が困難であり、しばしば治療が遅延する。

そこで本研究では、強力な抗酸化作用を持つビタミンC (VitC) や抗炎症作用を持つステロイドに注目し、動物実験で微小循環レベルでの事象を「生体顕微鏡画像技術」を用いてリアルタイムに観察し、変化に富む生体の血管内皮細胞における各種薬剤の効果を明らかにしたいと考えた。

重症病態では、グリコカリックスが崩壊し、内皮細胞機能障害が進行する。その後、血管透過性が亢進し組織低酸素に陥り、負のスパイラルが継続する。そしてその病態の改善がなければ最終的に患者は死に至る。つまり、内皮細胞機能の正常化、その状態の維持や改善は敗血症や手術後などの重症患者にとって非常に重要であり、予後に大きく影響する。Vit C に関する論文は、20年ほど前より年間約1000本のペースで報告されており、継続的に注目されている。2017年にCHESTに掲載されたVit C投与後の患者の死亡率改善の報告は、敗血症の治療にとって世界的に衝撃的であった。細胞レベルでは、「内皮細胞バリアの保護」(Nektarios et.al. CHEST 2017)動物実験レベルでは、「敗血症の初期血管内容量の減少抑制効果」(Björn P et. al. Intensive Care Medicine Experimental 2014)、疫学レベルでは、長期投与において、「強力な抗酸化作用によるアテローム性動脈硬化の減少」(Melissa A.et.al. Int. J. Mol. Sci. 2016)、や「糖尿病における内皮細胞障害の抑制」(Mohammadreza Sabri et.al. J Res Med Sci.2016)と様々報告されている。しかし、in vivoでVit Cのグリコカリックス保護効果に関して報告した論文は少なく、実際に動物実験レベルでグリコカリックスの障害の軽減を証明した研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、強力な抗酸化作用を持つVit Cや抗炎症作用を持つステロイドに注目し、動物実験で微小循環レベルでの事象を「生体顕微鏡画像技術」を用いてリアルタイムに観察し、変化に富む生体の血管内皮細胞における各種薬剤の効果を明らかにしたいと考えた。

本研究の目的は、重症病態下におけるVit C投与下の白血球粘着能、内皮細胞上層グリコカリックス層の変化やその修復効果を観察し、in vivoでの各種薬剤の内皮細胞保護効果を解明することである。

日常診療において、重症患者の集中治療患者管理は非常に困難であり、臨床的な疑問が多い。敗血症などの重症病態におけるVit C投与は重症患者の内皮細胞にどのように影響するのか、またVit Cが内皮細胞表層グリコカリックス層の保護作用を有するのかという問題に関して、臨床研究ではその答えを見つけることはできないので本研究のように動物実験での研究を立案した。

3. 研究の方法

『生体顕微鏡観察法(intravital microscopy)』の一種であり、軽量樹脂のフレームを背部皮膚に装着する『背側皮膚透明窓(Dorsal Skinfold Chamber: DSC)』が、皮膚の同一血管床を長期間にわたって観察が可能であり、これを使用しマウス皮膚の微小循環を観察した。対象のマウスには、1週間前にDSCを装着し、DSCが安定した時点で実験を行なった。

マウスは本来、自己でVit Cを合成できる。そこで、実験動物は、Vit C合成経路のうちSMP30/GNL(L-グルコノラクトナーゼ)のノックアウトマウス(以下SMP30-KO)を使用することで、より臨床での重症病態時に発生する低Vit C状態をシミュレートすることができると考えた。

先行研究により個体内のVit Cが十分低下するまで必要とわかっている期間である11週間、SMP30-KOをVit Cを含まない飼料と水分で飼育した後、lipopolysaccharide(以下LPS)を腹腔内投与することで、低Vit C状態の実験動物の敗血症モデルを作成した。この低Vit C敗血症状態のマウスにVit Cを投与することにより治療効果を評価することを試みた。Vit Cの治療投与量はヒトにおいて臨床で使われ、研究が行われている量を参照にし、内頸静脈経路による2.5mg/回とした。

評価項目はWGA-FITCを投与することで蛍光染色したグリコカリックス層の厚みの測定(GCX index)、グリコカリックス層の破壊の程度の指標としての血中Syndecan-1濃度の計測をした。

比較は、非敗血症群、敗血症群、敗血症後Vit C治療群の3群間で、行なった。

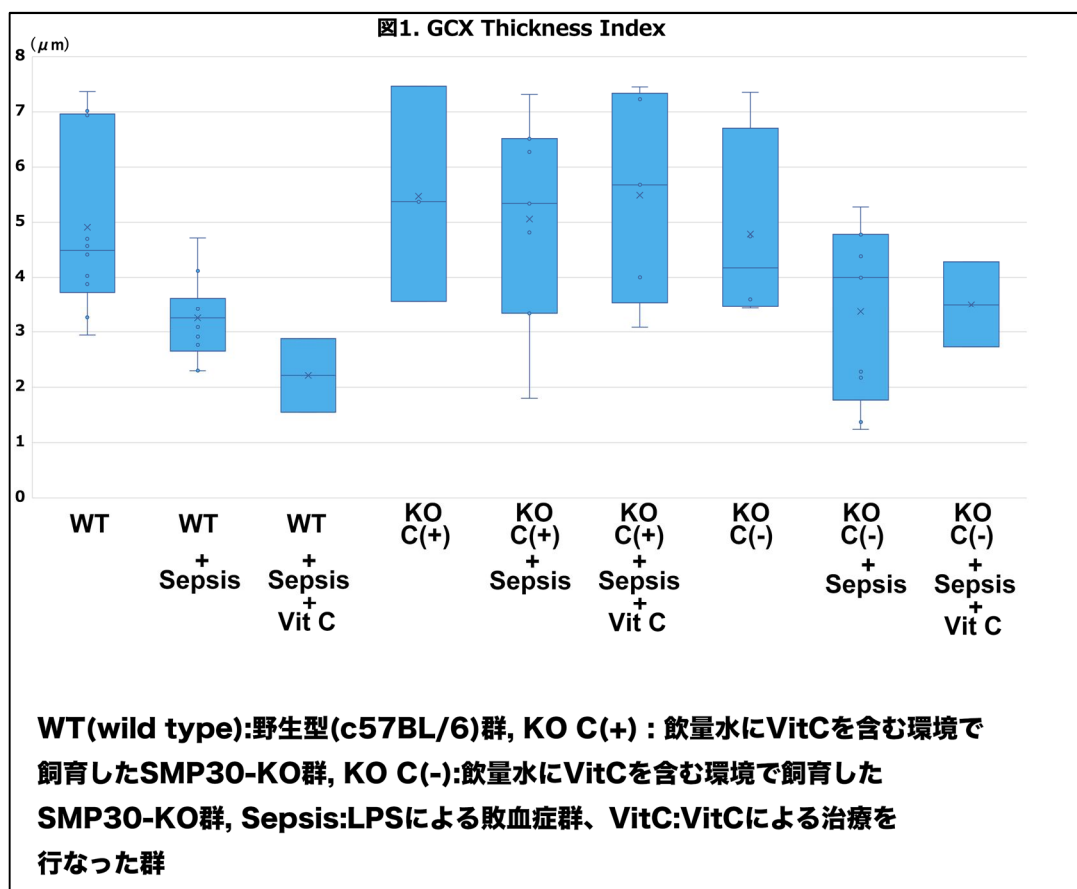
また用いる実験動物による群わけでは、SMP30-KOをVit C非投与で飼育した低Vit C状態と比較するため、SMP30-KOをVit Cを投与しながら同期間飼育した群、Wild typeとしてのc57BL/6の3タイプのマウスで実験を行い、その比較を行なった。

4. 研究成果

4-1. グリコカリックス層の厚みの測定

GCX index を用いた、グリコカリックス層の厚みの測定の結果は以下に示す図 1. のようになった。正常状態において、WT (wild type, c57BL/6) と SMP30-KO マウスには有意差はみとめられなかった。しかし、SMP30-KO マウスを Vit C 投与で飼育した場合、GCX が厚い傾向が認められた。

敗血症モデルでは、SMP30-KO マウスを Vit C 投与で飼育した場合、GCX が厚い傾向が認められた。WT では、敗血症では GCX は有意に薄くなり、さらに Vit C 投与で GCX が薄くなった。しかし、SMP30-KO マウスは、敗血症にした場合、治療としての Vit C 投与で GCX の厚さは変わらなかった。SMP30-KO マウスを Vit C 非投与で飼育したマウスでは、有意差は無いものの敗血症状態では GCX は薄い傾向にあった。以上より、Vit C によるグリコカリックスの保護的に働く可能性があると考えられたが、持続的に投与し続けた群での GCX index が他に比べて、厚い傾向があることから、治療としての Vit C 投与方法に関しては、検討の余地があると考えられた。



4-2. 採血結果のデータ (Syndecan-1 血中濃度)

Syndecan-1 血中濃度に関して、図 2 の通りとなった。

非敗血症状態において、WT と SMP30-KO には有意差は認めなかった。敗血症により全群で Syndecan-1 の血中濃度は上昇するが、さらに SMP30-KO マウスでは Vit C を含む飲水環境での飼育であっても含まない飲水環境での飼育でも、Syndecan-1 の血中濃度が上昇した。自ら Vit C を合成する WT とノックアウトされても飲水から補充できる SMP30-KO の Vit C(+)群は、条件は同じかと考えて実験系を構築していたが、敗血症での飲水力の低下も影響した可能性もあるが、SMP30-KO マウスにとっては、LPS 投与による敗血症の重症度は、想定よりも大きなものであった可能性がある。

また有意差はないものの治療群での Vit C 投与により、さらに Syndecan-1 濃度が上昇する傾向にあった。侵襲が加わっている状態または低 Vit C からの、急激な Vit C 濃度の上昇は、GCX を障害している可能性があると考えられ、その機序を解明するためには、Vit C 投与量、投与方法の検討や、血中 Vit C 濃度の変化の追跡が必要だと考えられた。

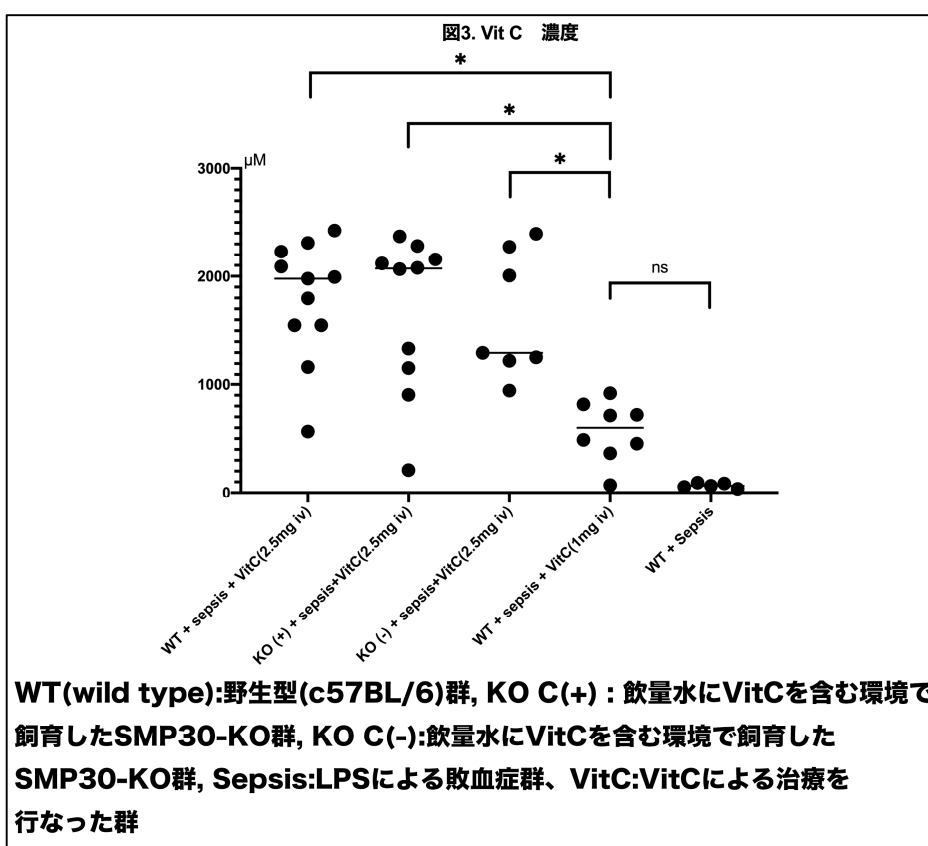
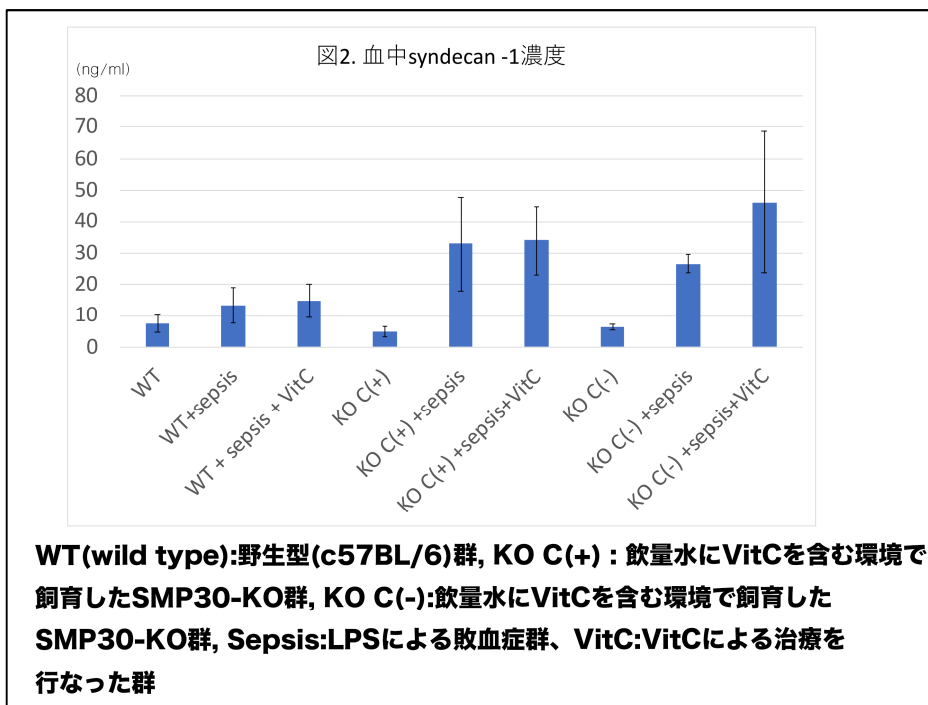
4-3. Vit C 濃度の測定、投与方法の検討

上記 4-1, 4-2 の結果を受け仮説として侵襲が加わっている状態での Vit C の投与は、血管内皮細胞と GCX に対し障害性をもつ側面も検討しなければならなくなった。仮説とし、静脈投与の速度が早すぎる、投与量と濃度が侵襲的である、投与方法に問題があるなどが考えられた。

そこで、Vit C 投与量を 2.5mg から 1.0mg へ変更した WT + sepsis + Vit C 群を設置し、また

治療としての Vit C の投与のない群も含めて、血中 Vit C 濃度の計測を行なった。その結果を図 3 に示す。Dunnett の検定では、Vit C 2.5mg 投与の全種類のマウスの群と比較して、WT + sepsis +Vit C(1.0mg iv)では有意な差をもって Vit C 濃度の低下が認められ、また有意差はないものの、Vit C 投与しない WT + sepsis より血中濃度が上昇していると考えられる結果となった。毒性を減らし、治療量としての Vit C の投与量の滴定を行い、GCX の厚みの再測定や、Syndecan-1 の濃度の再測定が必要かと考えられた。

また投与方法については、現在、経口投与の方法と、その濃度、投与のタイミングなどについて、実験方法の検討し、計画中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|