

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16538

研究課題名(和文)敗血症性ショックに対する骨髄由来単核球細胞移植療法の有効性の検証

研究課題名(英文)Efficacy of bone marrow-derived mononuclear cell transplantation therapy for septic shock

研究代表者

梅村 穰(Umemura, Yutaka)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20743561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：CLPラットに対して骨髄由来単核球細胞を5百万個/ratを尾静注投与し(BMMNCs群)、コントロール群との比較を行った。7日間生存率はcontrol群では25%であったのに対して、BMMNCs群では75%とcontrol群と比較して有意に高かった( $p < 0.05$ )。暴露後3、6、12時間後の種々の血清サイトカイン濃度はcontrol群と比較してBMMNCs群では上昇が抑えられていた。また24時間後の肺の間質の浮腫、炎症細胞浸潤はBMMNCs群で軽微で、血管内皮の免疫染色所見、および走査電子顕微鏡所見より、血管表面のグリコカリックス層の脱落がBMMNCs群で軽微であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、BMMNCs投与により血管内皮のグリコカリックス層の保護を介して、敗血症による全身性炎症反応、遠隔臓器障害が抑制され、生命転帰の改善につながる可能性が示唆された。BMMNCsが敗血症などの急性炎症病態に対して有効性を発揮するメカニズムの一端を解明したことで、本治療法の臨床応用を進めていくための礎を築くことができた。今後、BMMNCs投与の有用性と安全性が臨床的に確立されれば、敗血症診療の成績を劇的に向上させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The 7-day survival rate significantly improved in the CLP-BMMNCs group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). BMMNCs Transplantation significantly suppressed serum levels of pro-inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and histone H3 at 3, 6, and 12 h after CLP. In the BMMNCs group, serum syndecan-1 levels, a main component of the vascular endothelial glycocalyx layer, were significantly lower than those in the control group at 6 h after CLP. Histological analysis revealed edema of the alveolar septum and pulmonary vascular endothelial injury in the control group 6 h after CLP, whereas the morphological alteration was ameliorated in the CLP-BMMNCs group. Ultrastructural analysis of lung vascular endothelial glycocalyx was performed by using scanning electron microscopic (SEM) with lanthanum nitrate staining. Shedding of vascular endothelial glycocalyx improved in the CLP-BMMNCs group.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：敗血症 幹細胞移植 全身炎症反応 多臓器障害 血管内皮障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の医療水準の向上にも関わらず、全世界では年間約 2700 万人が敗血症 (Sepsis) を発症し、800 万人が死亡するといわれている。経済的喪失も大きく、2011 年の米国の敗血症治療に費やした医療費は 200 億ドルを超え、これは全ての疾患の中で最多であった。患者の社会生活の破綻、介護の必要性、長期間の療養など、敗血症に関連した総費用を考慮した場合の経済的喪失は巨額に及ぶと推定される。従来、敗血症性ショックに対しては輸液と血管収縮薬、強心薬を組み合わせた治療が行われてきた。こうした対症療法的な病態管理ではなく、急性炎症反応から全身の血管内皮障害を経て多臓器不全に至る一連のカスケードを制御して、根本的に病態を改善することを目的として、これまでに数多くの抗炎症療法が研究されてきた。しかし、現時点で敗血症性ショックの生存転帰を改善させることが証明された治療は皆無である。

近年、脳梗塞や虚血性心疾患、脊髄損傷などの侵襲病態に対する再生医療として、骨髄由来単核球細胞移植療法の有効性が注目されている。これまでに我々は骨髄由来単核球細胞移植療法の持つ強力な抗炎症作用、組織保護、再生作用に注目し、クラッシュ症候群や重症熱中症などの急性炎症病態における有効性や作用メカニズムを研究してきた。これらの一連の研究から骨髄由来単核球細胞移植療法によって血管内皮障害が抑えられることが示されてきたが、詳細なメカニズムは解明されていなかった。我々は敗血症性ショックに対する骨髄由来単核球細胞移植療法が、血管内皮のグリコカリックス層の保護を介して全身性の著しい炎症反応を制御し、組織侵襲を改善している可能性が高いと考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス敗血症モデルに対し骨髄由来単核球細胞移植療法の血管内皮保護を介した炎症の制御、臓器保護、および生命転帰の改善を評価し、またそれに関与するメカニズムを解明することである。これらが明らかとなれば、敗血症性ショックに対する骨髄由来単核球細胞移植療法による新規治療戦略を確立し、臨床応用への架け橋を作ることが可能となり、将来的に敗血症性ショックに対する新規根本治療薬の開発に繋がることを期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 有効性およびそのメカニズムの解明：盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) モデルにおいて、骨髄由来単核球細胞移植を行い、臓器障害および生存率の改善が得られるかを評価する。また敗血症に伴う血中の炎症性メディエーター動態を経時的、定量的に測定し、HE 染色法、免疫染色法における臓器障害、血管内皮の評価も同時に行う。以上から骨髄由来単核球細胞が敗血症モデルの急性炎症反応と臓器障害を制御するメカニズムを解明する。

(2) 血管内皮グリコカリックスへの影響の評価：走査電子顕微鏡を用いて侵襲後 24 時間後の CLP モデルの血管内皮を評価することで、骨髄由来単核球細胞移植療法の血管内皮グリコカリックス層への効果を詳細に評価する。これによって本研究の仮説である、骨髄由来単核球細胞移植療法の血管内皮保護作用を介した炎症および遠隔臓器障害の制御を評価する。

これらに関して、具体的な研究方法は以下の通りである。

#### マウス敗血症モデル作成

8 週齢雄性の C57BL/6 マウスに対し、全身麻酔下に開腹し、腹腔内より盲腸を取り出して盲腸根部を結紮、21 ゲージ注射針を用いて盲腸壁全層にわたり穿孔して CLP による敗血症性腹膜炎モデルを作製する。また Sham 群に対しては全身麻酔下に開閉腹のみを行う。

#### 骨髄由来単核球細胞移植療法

レシピエントマウスとは別個体の同種マウスの大腿骨および脛骨から骨髄液を回収する。採取した骨髄液により密度勾配遠心法を用いて、骨髄由来単核球細胞を採取して、単核球を単離、精製する。採取した単核球細胞は  $1 \times 10^6$  個を 0.1ml の PBS (phosphate buffered saline) に懸濁する。投与方法は静注 (尾静脈) により行い、敗血症マウスドナーに単回投与する。

#### 研究プロトコール

以下の評価は、マウス敗血症モデルを対象として、sham 群、非治療群、治療群の 3 群に割り付けして行う。骨髄由来単核球細胞の移植は CLP もしくは sham operation の直後に行う。病態評価は、7 日間の生存率、投与後 3・6・12・24 時間後に採取した血清・組織検体を用いて行う。

生存率の評価：生存率改善の観察は熱中症の急性期を脱する 7 日間で行う。

血清学的評価：熱中症に対する骨髄由来単核球細胞治療効果の作用メカニズムを明らかにするため、血清を用いて ELISA 法により以下の項目を定量化し評価する。

TNF-、IL-1、IL-6、IL-4、IL-10、TGF-、IL-8、MCP-1、RANTES、HMGB-1、ヒストン H3

組学的評価：各臓器 (脳、肺、心、腎、肝) 障害の形態変化を HE 染色により経時的に解析する。これから、骨髄由来単核球細胞移植療法による臓器損傷抑制効果を評価する。また免疫染色法により各臓器 (脳、肺、心、腎、肝) への白血球浸潤 (CD66, CD11b)、血管内皮障害 (vWF, Sudecan-1) および細胞死 (アポトーシス) (TUNEL) の観点から、骨髄由来単核球細胞移植による治療効果を免疫組織学的検索により評価する。

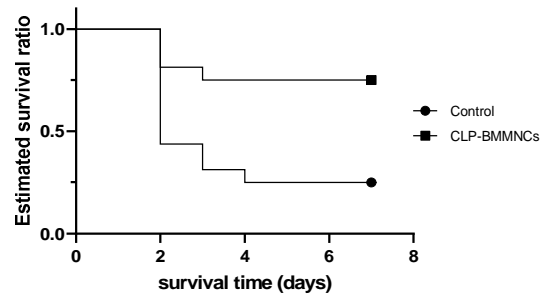
次年度は、以下 4, 5 の項目を評価する

走査電子顕微鏡を用いて各臓器 (脳、肺、心、腎、肝) における血管内皮表面のグリコカリ

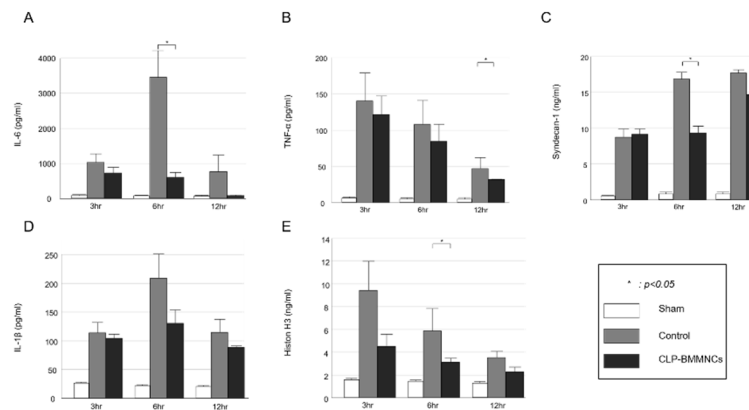
ックス層の形態的变化を評価する。コントロール群との差、およびそれが臓器ごとにどのように異なるかを評価することで、臓器毎の侵襲制御メカニズムを評価する。

#### 4. 研究成果

盲腸結紮穿孔 (CLP) ラットに対して骨髄由来単核球細胞を 5 百万個/rat を尾静注投与し (BMMNCs 群) コントロール群 (同量の PBS を尾静注投与) と 7 日間生存率、血清中サイトカイン濃度、組織学的所見の比較を行った。7 日間生存率は control 群 では 25% (4/16) であったのに対して、BMMNCs 群 では 75% (12/16) と control 群と比較して有意に高かった (ログランク法、 $p < 0.05$ )。

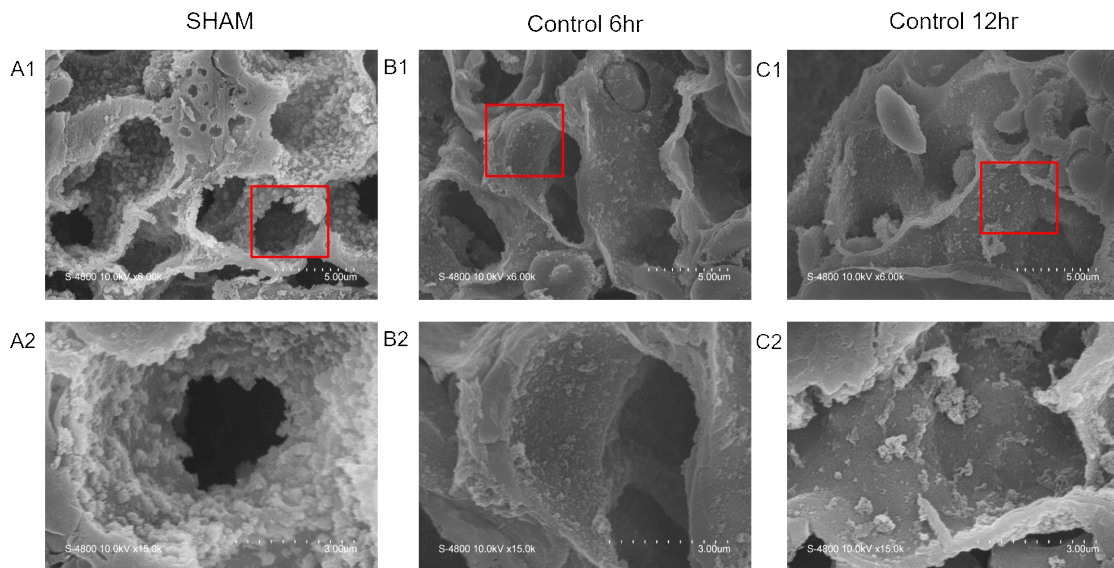


また CLP 暴露後 3、6、12 時間後の血清サイトカイン濃度 (血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、ヒストン H3) は sham 群と比較して、control 群で著明に上昇していたが、BMMNCs 群では上昇が抑えられていた。血清中の Syndecan-1 (グリコカリックス層の主成分) に関して、control 群と比較して BMMNCs 群で有意に上昇が抑えられていた。



また 24 時間後の肺における間質の浮腫、炎症細胞浸潤は control 群と比べて BMMNCs 群で軽微であり、血管内皮の Syndecan-1 の免疫染色所見からは、その脱落が抑えられていたことが示された。さらに肺の走査電子顕微鏡所見より、血管表面のグリコカリックス層の変化が BMMNCs 群では control 群と比べて軽微であることが示された。以上の結

果より、BMMNCs 投与により血管内皮のグリコカリックス層の保護を介して、敗血症による全身性炎症反応、遠隔臓器障害が抑制され、生命転帰の改善につながる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松原 庸博
2. 発表標題 TRANSPLANTATION OF BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS CAN ATTENUATE ACUTE INFLAMMATION AND ORGAN DYSFUNCTION IN RAT SEPSIS
3. 学会等名 43rd Shock Society 2020 Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----