

平成 23 年 2 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19209055
 研究課題名（和文） 侵襲時再生応答に関する研究：血管内皮再生からみた新たな治療戦略
 研究課題名（英文） Regenerative response to insults: a novel strategy based on endothelial regeneration
 研究代表者
 小倉 裕司（OGURA HIROSHI）
 大阪大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：70301265

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、侵襲時にみられる血管内皮傷害に対する再生応答を評価し、多臓器障害モデルにおいて血管内細胞移植（骨髄間質細胞）の有効性を検討することである。sepsis 患者において血管内皮の活性化は長期間持続しており、再生応答の指標である血管内皮前駆細胞数の増加、細胞表面の VEGF receptor の発現亢進が見られた。また、多臓器不全モデルにおいて、骨髄間質細胞移植は抗炎症効果、血管内皮保護作用を発揮して生存率を有意に改善し、新たな治療戦略として有望と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this study were to evaluate the regenerative response of endothelium in patients with systemic inflammatory response syndrome and to examine the effects of mesenchymal stem cells in a rat model with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). In patients with sepsis, long-term endothelial activation was observed with increased endothelial progenitor cells in blood and enhanced VEGF receptors on these cells. Transplantation of mesenchymal stem cells inhibit the production of inflammatory cytokines, protect against endothelial damage and improve survival in a rat model with MODS. Transplantation of mesenchymal stem cells may be a novel strategy to attenuate MODS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2008 年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2009 年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	38,400,000	11,520,000	49,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：侵襲、再生、血管内皮、骨髄間質細胞、移植、前駆細胞、治療、多臓器障害

1. 研究開始当初の背景 | 侵襲にともない、全身性炎症反応が引き起こされ、重症例では多臓器障害に進行する。多
 重症外傷、広範囲熱傷、敗血症などの高度

臓器障害に陥ると治療に難渋するだけでなく救命が極めて困難となり、また集中治療に莫大な治療費を要する。近年、全身性炎症反応後の治癒機転には多くの再生現象が関与することが明らかとなり、侵襲にともなう再生応答を効果的に制御して多臓器障害の進行を防ぐことが急務と考えられる。我々は、多臓器障害に移行しやすい重度侵襲にともなう全身性炎症反応をいかに制御すべきかをテーマとして炎症反応、免疫応答に注目して臨床研究および動物実験を進めてきた (J Trauma 59;308-315, 2005, JTrauma 61;616-623, 2006)。しかしながら、侵襲後にみられる多臓器障害の進行は、炎症反応、免疫応答の制御だけでは十分にコントロールできず、臓器障害の修復過程で重要な鍵を握る再生応答の解明と制御が不可欠と考えるに至った。近年の研究において、全身性炎症反応の主要な標的は血管内皮であり、多臓器障害では血管内皮傷害の進行が顕著となることから、我々は、血管内皮の再生を担う細胞の増殖、分化が、侵襲にともなう再生応答を主に制御すると考えている。1997年、成人末梢血中に内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞が存在することが報告され、その後の研究により血管内皮前駆細胞は炎症や創傷の治癒過程で中心的役割を果たしていることが明らかとなった。血管内皮前駆細胞の組織への取り込みは血管新生を起こすことから、血中の血管内皮前駆細胞をとらえることにより再生能を評価できる可能性が出現した。血管内皮前駆細胞を利用して血管のみならず臓器の再生能を制御できる可能性もある。実際、重症虚血部位への血管再生を期待して慢性血管病に対する血管内皮前駆細胞の臨床応用が現在進められており、下肢虚血や虚血性心疾患において効果が期待されている (N Eng J Med 353:999-1007, 2005)。しかしながら、侵襲に伴う全身性炎症反応時の再生応答能を血中血管内皮前駆細胞としてとらえた報告はなく、血管内皮傷害—再生バランスを臨床例で評価する方法も確立されていない。また、重度侵襲時に多臓器で進行する血管内皮傷害に対する血管内皮前駆細胞の移植効果は現在まで全く検討されていない。本研究では、侵襲時にみられる血管内皮傷害に対する再生応答を血中に存在する血管内皮前駆細胞と増殖因子を評価し、血管内皮傷害—再生バランスに基づいた全身性炎症反応および臓器障害の制御をおこなうことを目指す。同時に侵襲時の骨髄機能不全の有無を評価する。また、多臓器障害モデルにおいて再生治療として血管内皮細胞移植 (骨髄間質細胞) の有効性を検討する。

2. 研究の目的

(1) 全身性炎症反応 (SIRS: systemic inflammatory response syndrome) 時の再生応答能を血中血管内皮前駆細胞としてフローサイトメトリー法でとらえ、血管内皮傷害—再生バランスを臨床例で評価する。また、血管内皮前駆細胞の血管内皮への分化機能、全身性炎症反応時の再生応答能に多大な影響を与える骨髄機能を同時に評価して、再生応答から見た SIRS 病態を解明することを目的とする。

(2) 血管内皮傷害—再生バランス、骨髄機能変化に基づいた新たな治療戦略として、血管再生治療—骨髄間質細胞の血管内移植を腹膜炎多臓器障害モデルで評価し、多臓器障害の新しい制御を目的とする。

3. 研究の方法

(1) SIRS 患者における最背応答の研究—血中造血幹細胞、血管内皮前駆細胞、血管内皮増殖因子の評価

全身性炎症反応がみられる敗血症 (sepsis) 患者を対象に、血管内皮再生応答を経時的に評価した。血管内皮の再生応答能として、血中に存在する血管内皮前駆細胞の数と機能を特異的膜抗原である CD34 および VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor)-2 をマーカーにフローサイトメトリー法で定量評価した。また、血管再生因子として血中血管内皮成長因子 (VEGF) 値を同時に測定した。骨髄機能の経時的な変化を評価するために、血中に存在する造血系前駆細胞 (CD34 陽性) をフローサイトメトリー法で定量評価し、さらに骨髄間質幹細胞の成長促進因子である stromal-derived factor-1 (SDF-1) の血中濃度を測定する。以上の測定より、血管内皮傷害—再生バランスと骨髄機能の関連を経時的に評価した。同時に全身性炎症反応の指標として血中 C-reactive protein (CRP)、IL-6、8、10 濃度を測定し、多臓器障害の推移を SOFA score として各臓器ごとに評価した。血管内皮の活性化指標である血中 E-selectin 値、血管内皮の傷害指標である血中 thrombomodulin 値、von Willebrand factor 値を ELISA 法で同時に評価した。

(2) 多臓器障害モデルにおける再生治療に関する研究—骨髄間質細胞移植の効果の評価

多臓器障害モデルにおいて、経血管内皮細胞移植による再生治療が血管内皮の再生を促進して多臓器障害を軽減するか否かを検討した。

敗血症・多臓器不全モデルとしては、ラットにおいて盲腸結紮穿孔法：cecal ligation and puncture、以下 CLP) を用いて作成し、骨髄間質細胞を経静脈的に投与して抗炎症効果、臓器保護効果を評価した。

経血管内細胞移植には、健常ラットの脛骨、腓骨から採取する骨髄間質細胞を使用した。この際、骨髄間質細胞は、採取した骨髄細胞を特殊培地に接触させ、ex vivoで培養増殖させて回収した。骨髄間質細胞は 5×10^6 個を1単位とし、細胞1単位をCLP作成後2時間で血管内移植するグループと移植しないコントロール群を比較検討した。血管内移植にともない、血管内皮傷害、炎症反応指標の変動、ケミカルメジャーの動き、病理組織診断による各臓器障害、および生存曲線が改善するか否かを評価した。病理組織診断では、臓器障害の形態、白血球浸潤など炎症所見の程度を捉えると共に、各臓器における血管内皮細胞をvon Willebrand factor染色で評価した。また、各臓器における細胞死(アポトーシス)をTUNEL染色で評価した。さらに、レトロウイルスもしくはPKH67を使用して血管内移植細胞をあらかじめ蛍光ラベリングすることにより、移植細胞がどの臓器に集まり血管再生を促進するか局在の評価を行った。

評価のスケジュールとしてCLP後7日目まで移植による生存効果を追跡した。炎症反応を評価するために、CLP6, 12, 24時間後に血清を採取し、サイトカイン・ケモカインをELISAにて測定した。CLP24時間後に還流固定の上、凍結組織切片を作成し、HE染色による臓器損傷の評価、免疫染色による血管内皮細胞障害の評価を行った。

4. 研究成果

(1) SIRS 患者における最背応答の研究—血中造血幹細胞、血管内皮前駆細胞、血管内皮増殖因子の評価

SIRS 患者として、sepsis 患者 18 人において Sepsis 診断後 4 日以内に血液をサンプリングし、血中造血幹細胞数、血管内皮前駆細胞数、VEGF 値を測定した。また、対象患者 18 人の内、当センターで 2 週間以上治療を行った Sepsis 患者 6 人に対象をしばり、血管内皮前駆細胞数と血清因子を経日的に測定し、Sepsis 病態の変化と EPC の動向について検討した。なお、観察期間中の sepsis 死亡例はなかった。

Sepsis 患者末梢血中の血管内皮前駆細胞数を測定した結果、Sepsis 患者では健常人と比較して有意に上昇していた(血管内皮前駆細胞数; Sepsis 4192 ± 329 /mL vs 健常人 2780

± 108 /mL, $p < 0.05$)。

また、sepsis 患者の血中 VEGF 値と血管内皮前駆細胞上の VEGF receptor 発現を測定した結果、血清 VEGF 値は、Sepsis 患者において著明に上昇しており (858.2 ± 171.3 pg/ml)、VEGF receptor の発現は、健常人(平均 38.1 ± 1.5 (平均蛍光強度))に比べ、Sepsis 患者では平均 73.7 ± 6.9 (平均蛍光強度)と有意に亢進していた。

さらに、Sepsis 患者の炎症マーカーと血管内皮傷害マーカーを測定した結果、Sepsis 患者では血清 CRP 20.4 ± 2.1 mg/dl、IL-6 436.3 ± 191.8 pg/ml と著明に上昇していた。血管内皮の傷害の指標である血中 E-selectin 値の上昇も認めた (142.0 ± 24.4 ng/ml)。

Sepsis 患者の血管内皮傷害と再生応答の推移を評価した結果、Sepsis 患者の末梢血中の血管内皮前駆細胞数は、血中 CRP 値の経日的な低下にも関わらず、約 2 週間にわたり有意な上昇を示していた。

また、Sepsis 患者の血中 VEGF 値と血管内皮前駆細胞上の VEGF receptor 発現の推移をみると、血清 VEGF 値も、2 週間の経過中高値を保ったが、血管内皮前駆細胞上の VEGF receptor は、健常人より有意に高い値で推移したものの、血中 CRP 値の低下とともに徐々に発現は低下した。

さらに、Sepsis 患者の炎症マーカーと血管内皮傷害マーカーの推移を評価した結果、入院後の血清 CRP、IL-6 値は、治療に反応して全身状態の回復とともに低下した。しかしながら、血清 E-selectin 値は 2 週間以上に渡って高値をとり、血管内皮の傷害が続いていることが示唆された。

以上の結果より、sepsis 患者において血管内皮の活性化ならびに傷害は長期間持続しており、再生応答の指標である血管内皮前駆細胞数の増加、細胞表面の VEGF receptor の発現亢進、さらに血中 VEGF 値の上昇が見られることが明らかとなった(Shock 誌 2007)。

(2) 多臓器障害モデルにおける再生治療に関する研究として、骨髄間質細胞移植の効果を検討した結果、非移植群では腹膜炎作成後 24 時間以内に半数以上が死亡し、7 日目の生存率が 17%であったのに対し、骨髄間質細胞移植群では生存率 50%と有意な生存率の改善を認めた。

また、炎症性サイトカインである血中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 値は、いずれも非移植群では腹膜炎作成後経時的に上昇したが、骨髄間質細胞移植群では有意に抑制された。同様に、好中球、単球それぞれのケモカインである

CXCL-1 及び CCL4 値も、非移植群では腹膜炎作成後経時的に上昇したが、骨髄間質細胞移植群では有意に抑制された。一方、興味深いことに、抗炎症効果を有するサイトカインである血中 IL-10 値は、非移植群に比べ骨髄間質細胞移植群において腹膜炎作成 6 時間後に一過性に有意な上昇を認めた。

さらに、各臓器における病理組織変化として、非移植群では腹膜炎作成 24 時間後には、肺において肺胞隔壁の肥厚、細胞浸潤を伴う肺胞構造の破壊、肝臓では肝細胞の空砲化変性、腎臓では尿細管周囲の間質の浮腫と出血が引き起こされた。一方、骨髄間質細胞移植群ではこれら各臓器の組織障害がいずれも軽減されていた。

敗血症に伴う多臓器不全の進行過程において、血管内皮細胞機能の障害がみられることに注目し、血管内皮細胞障害時に増強する von Willebrand factor の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、非移植群では腹膜炎作成後、肺胞、類洞、尿細管周囲の血管内皮に von Willebrand factor の発現が著明に増強したが、骨髄間質細胞移植群ではこれらの発現がいずれも抑制された。

また、移植細胞の生体内における定着を追跡するため、静注前に骨髄間質細胞を緑色蛍光を発する PKH67 で標識して移植した結果、腹膜炎作成 24 時間後には、移植細胞の多くは肺に認められ、数は減るものの肝臓、腎臓にも移植細胞が認められた。

以上より、ラット多臓器不全モデルに対して、骨髄間質細胞を経静脈的に投与することにより、移植細胞は主に肺に集積し、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CXCL1、CCL4 の発現抑制、IL-10 の一過性発現増強、血管内皮細胞における von Willebrand factor の発現抑制とともに、各臓器障害の軽減や生存率の有意な改善が認められた。

多臓器不全の進行過程において、骨髄間質細胞移植は抗炎症効果、血管内皮細胞保護作用を発揮すると考えられ、新たな治療戦略として有望であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Sonoi H, Matsumoto N, Ogura H, Hosotsubo H, Noguchi K, Kuwagata Y, Sugimoto H, The effect of antithrombin on pulmonary endothelial damage induced by crush injury. Shock, Vol32, 593-600, 2009、査読有

- ② 松嶋麻子、小倉裕司、康泰珍、松本直也、鉦方安行、田中裕、嶋津岳士、杉本壽ら、Sepsis 患者における血管内皮前駆細胞の動向、shock 誌、Vol22、100-105、2007、査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 松本直也ら、ラット敗血症・多臓器不全モデルにおける骨髄間質細胞移植による抗炎症効果の評価、第 38 回日本救急医学会、2010 年 10 月 9 日、東京
- ② 小倉裕司ら、急性期 DIC 病態、第 37 回日本救急医学会、2009 年 10 月 30 日、盛岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 裕司 (OGURA HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：70301265

(2) 研究分担者

杉本 壽 (SUGIMOTO HISASHI)
大阪大学・名誉教授
研究者番号：90127241

鉦方 安行 (KUWAGATA YASUYUKI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50273678

松本 直也 (MATSUMOTO NAOYA)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50359808