

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03778

研究課題名(和文) 霊長類術後ARDSモデルを用いた発症メカニズムの探求と予防への応用

研究課題名(英文) Exploration of pathogenesis mechanisms using a primate postoperative ARDS model and its application to prevention

研究代表者

後藤 行延 (Goto, Yukinobu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20451700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)： 外科手術後の全身性炎症反応症候群(SIRS) からARDSに至った場合の発症後死亡率は高く難治性であるが故に、その発症予防が重要である。

本研究では、CCL23 (recombinant human CCL23) 群 (CCL23を術前に静注し、骨髄の細胞分裂過程を制御して骨髄刺激に対する白血球前駆細胞の保護作用により、骨髄由来活性化白血球を制御する群) の実施結果を解析し、論文発表した。さらに、PMX-DHP群遂行のため、これまで開発したCPBモデルを基盤とし、その周術期にPMX-DHPを使用する吸着モデルを開発、発展させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術侵襲、および術後炎症性サイトカインストームから惹起され、循環血へ放出される骨髄由来白血球は未熟な活性化白血球であり、これらの肺循環への集積は肺障害の病態形成において重要なkey factorである。術後急性肺障害の死亡率は40-50%と報告され、救急治療、重症管理を要する重篤な病態で、その発症は補体活性化、炎症性サイトカイン、凝固異常を介した白血球の活性化が主な要因とされ、さらにARDSに至れば難治性となるが故に、その発症予防が重要である。骨髄由来白血球、および高サイトカイン血症の制御による術後肺障害発症メカニズムの解明と予防手段の解析に繋がると考える。

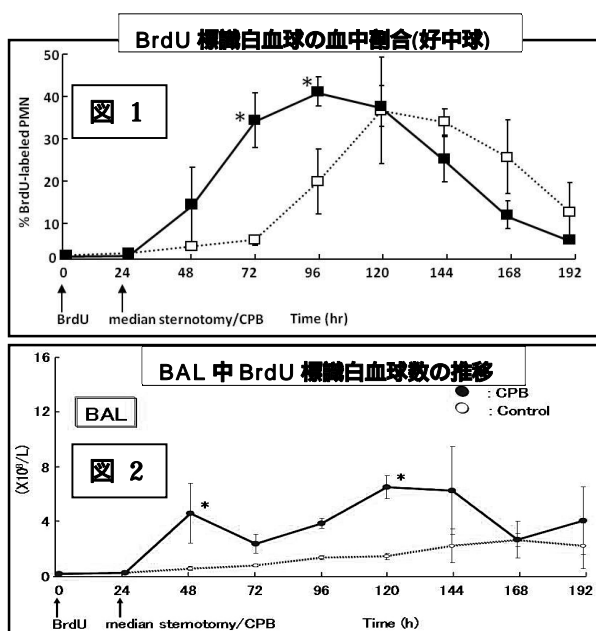
研究成果の概要(英文)： ARDS is characterized by pulmonary edema and extensive hyperinflammation (diffuse alveolar damage: DAD), and once ARDS develops, it is refractory to treatment, making it important to prevent its development. We reported here that CCL23, which regulates bone marrow function, significantly suppress blood cell-induced cytokine production and accumulation of bone marrow-derived leukocytes in the lungs. And also, we developed an in vivo model to analyze the effect of PMX-DHP (polymyxin-B direct hemoperfusion) therapy in primates to analyze the perioperative PMX-DHP therapy, its biological effects, and its preventive effects on the release of leukocytes from the bone marrow into the circulation and their accumulation in the lungs after surgery.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：ARDS 骨髄 白血球 CPB

1. 研究開始当初の背景

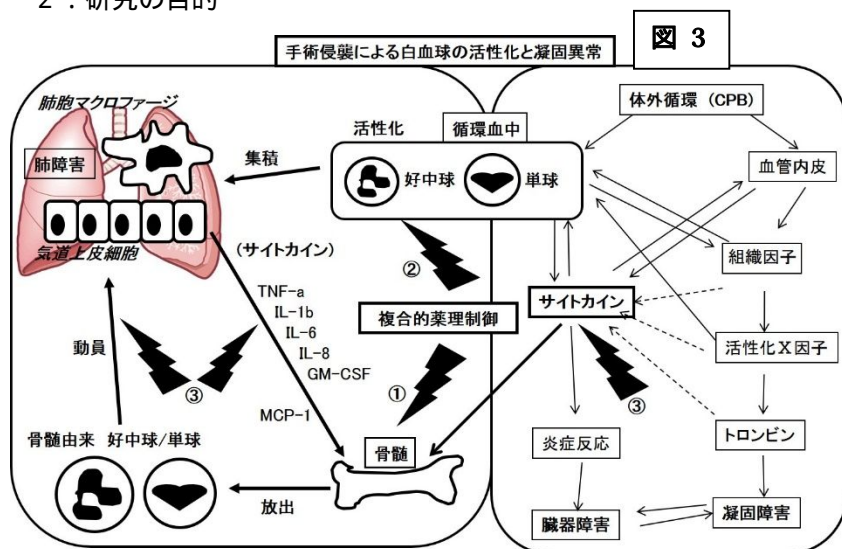
周術期合併症として、麻酔・手術侵襲による炎症機転亢進と高サイトカイン血症に基づく術後急性肺障害の死亡率は40-50%と報告され、救急治療、重症管理を要する重篤な病態である。その発症は補体活性化、炎症性サイトカイン、凝固異常を介した白血球の活性化が主なメカニズムとされる (Apostolakis E. et al. J Card Surg. 2010)。これら活性化白血球は、優先的に肺に集積し、急性呼吸促拍症候群 (ARDS) に代表されるような多臓器不全のリスクを高める。ARDSは好中球が主体となって肺胞上皮細胞、血管内皮細胞を傷害する結果、肺微小血管レベルでの血管透過性が亢進して起こる肺水腫とされる一方、種々の危険因子が誘因となって起こる広範な過剰炎症 (びまん性肺胞傷害、Diffuse alveolar damage: DAD) を特徴とし、難治性であるが故に、その発症予防が重要である。



本研究は平成 18-30 年度に及び、一連の基盤研究(B)、萌芽研究の上に成り立つ。この中で我々は、ヒトと同じ霊長類を用い、一般小児手術と同等のデバイス、体外循環を再現し、術後長期に生存可能な一方、術後急性期の肺障害の病態 (DAD) を忠実に再現できる、世界初のカニクイザル CPB/肺障害モデルの確立に成功した (Goto Y. et al. Ann Thorac Surg. 2014)。その結果、CPB による骨髄から循環血への未熟活性化白血球の放出促進 (図 1) と、これら骨髄由来白血球 (BrdU 標識細胞; 後述) の肺循環への集積 (図 2: 肺胞洗浄液 (BAL) 中への二峰性の出現) について、その臨床的意義を含め国内外

で発表してきた。従って我々は、これら骨髄由来白血球の制御が、外科侵襲による術後肺障害の新たな病態メカニズムの確立と革新的な予防手段の獲得に繋がるものと確信している。

2. 研究の目的



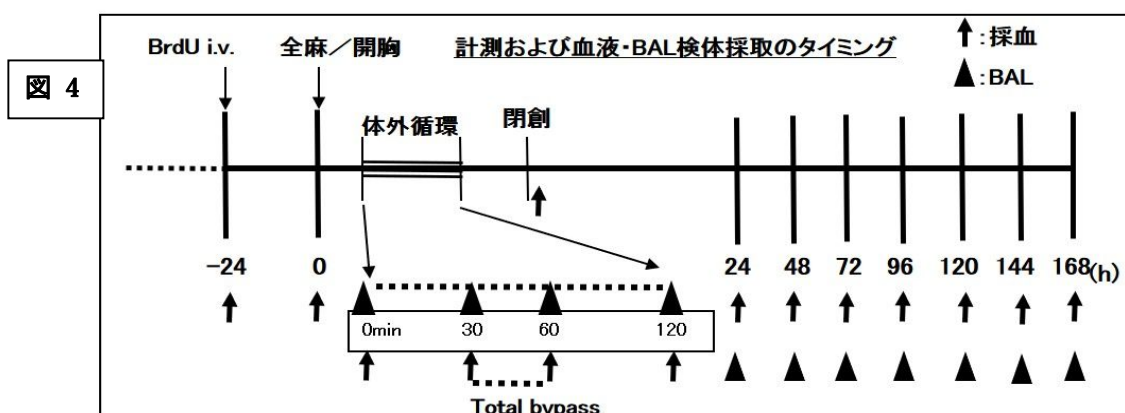
サル CPB/肺障害モデルを用いて術前から CCL23 (図 3: ①) による骨髄刺激抑制に加え、術中のトロンボモジュリン: rTM (図 3: ②) の好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を併用 (複合的薬理制御)、さらに術後に PMX-DHP (図 3: ③) による血中サイトカイン、および骨髄由来活性化白

血球そのものの吸着を施行し、手術侵襲が惹起する循環血中、および骨髓由来白血球の肺への集積制御を目的とする。

本研究によって得られる骨髓由来好中球・単球の術後肺集積、及びこれらの周術期制御に関連した知見・結果は、救急、外科手術に伴う全身炎症としての ARDS の病態メカニズムの解明とその予防に大きく貢献し得る独創的な理論である。 先行研究で我々が確立した霊長類体外循環モデルを基盤とし、複数科の連携により強力に推進される、国内外を通じて未踏峰な ” 術後 ARDS の発症予防 ” への応用を目的とした創造的戦略である。

### 3 . 研究の方法

BrdU を静注(100mg/kg)しカニクイザル(Adult male; B.W. 5kg 前後)の骨髓前駆細胞を標識する。24 時間後(BrdU 標識白血球が血中に出現し始める)体外循環実験を開始する。全身麻酔下に胸骨正中切開、30 分間の完全体外循環(肺虚血モデル)を含む、計 120 分間の体外循環をおこなう。開始後 120 分後に体外循環から離脱し、止血ののち閉創する。その後は鎮静、人工呼吸器管理とし、術中、および術後一週にわたり経時的に血液検体、気管支肺胞洗浄(BAL)液、肺組織の採取、および画像撮影をおこなう。これを基本モデル(コントロール群)とするが、本群は先行研究にて既に終了している。



従って本研究では、treated 群として、以下の 4 群を追加し、比較検討する。

**[CCL23 群]** ; コントロールと同様の操作に加え、CCL23 ( recombinant human CCL23, 100  $\mu$ g/kg) を術前 3 日より連日静注し、骨髓の細胞分裂過程を制御して骨髓刺激に対する白血球前駆細胞の保護作用を通じて骨髓由来活性化白血球を制御する (*Shih CH., Goto Y., et al. Exp Hematol.. 2005*) 。

**[トロンボモジュリン ( rTM) 群]** ; 血管内皮細胞上のトロンピン受容体であるトロンボモジュリン ( recombinant TM, 380 U/kg) を術直前に添加し、術中の凝固促進活性を直接阻害、より広範な凝固遮断を図り、さらには好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を發揮させる。 (*Morizumi S, Goto Y, et al. J Card Surg. 2014*)

**[PMX-DHP 群]** ; コントロールと同様の操作に加え、エンドトキシン吸着カラムを使用した PMX-DHP を術後 3 日間(4hr/日)施行(後述)し、サイトカインによる骨髓刺激とともに、先行研究で示した術後遅発性の骨髓由来白血球そのものの肺集積を制御する。

**[複合制御群]** ; 上記、①～③のうち、有効であった群の組み合わせによる効果を検証。

**[測定項目]** <循環・体温モニター> 心拍数、血圧、血ガス。 <血液凝固・線溶マーカー> 血球算定、Ht、TAT (以下 ELISA) 、D-dimer、total TFPI、可溶性組織因子。 <血小板マーカー> 血小

板数、血小板 ADP 凝集能、出血時間 (flow cytometry)。<炎症マーカー>好中球および単球 CD11b、L-selectin、好中球 F-actin (flow cytometry)、好中球エラスターゼ、C5b-9、IL-8、TNF-、HMGB1 (以上 ELISA)、白血球分画。<骨髄刺激>好中球・単球の骨髄通過時間を解析し、体外循環による骨髄刺激と血球放出動態を評価。<肺組織浸潤>気管支肺胞洗浄(BAL)液、および肺組織中に存在する BrdU 標識細胞を免疫組織学的に染色・同定し、肺循環への集積と肺胞腔への遊走・滲出を評価。術後肺水腫、肺障害を施設内動物用 Xp, CT を用いて画像的に比較、経時的評価する。

#### 4. 研究成果

本研究期間では、上記 treated 群のうち、先行研究(挑戦的萌芽:16K15757)から継続した CCL23 群の追加実験、および PMX-DHP 群のモデル開発までで終了となり、学会発表、論文作成に至っている。

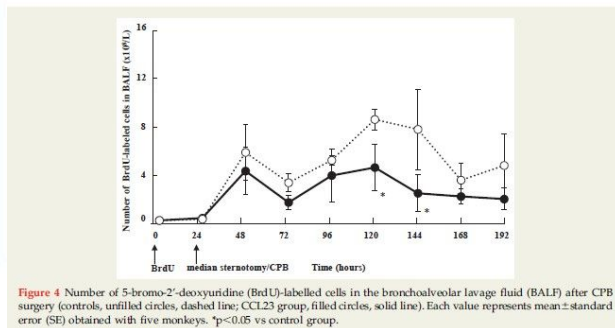
CCL23 投与群では CPB による好中球および単球の骨髄通過時間(Transit time)を有意に延長(Table 2)し、時に単球の骨髄プールを減少させ、循環血中への白血球放出を抑制した。また、BrdU 陽性白血球の肺 BAL 液中への出現数は、投与群で有意に減少した(Fig.4)。CCL23 投与による骨髄由来白血球の肺への動員抑制が、術後急性肺障害の発症予防に寄与する可能性が示唆される。

**Table 2 Leukocyte bone marrow transit times.**

Group (n)	PMNs (hr)	Monocytes (hr)
CPB (controls: 5)	95.5±4.1	62.0±3.0
CCL23 (5)	118.4±11.7*	91.6±5.0*

All values represent the means±SE.  
\*p<0.05 versus control group.  
Abbreviations: CPB, cardiopulmonary bypass; n, number of experimental monkeys; hr, hours; SE, standard error.

Heart, Lung and Circulation (2023) 32, 424-433



一方 PMX-DHP 群では、polymyxin-B direct hemoperfusion (PMX-DHP) は、エンドトキシンのみならず活性化好中球、さらには MMP9、VEGF-A、sIL-1、IL-8、GM-CSF 等のサイトカインの吸着効果が明らかとなり、その骨髄由来白血球制御への有用性が期待される。

	PMX-01R	PMX-05R	PMX-20R
血流量	8~12mL/min	20~40mL/min	80~120mL/min

(トレミキシン添付文書より引用)

- 施行方法: 直接血液灌漑法
- 治療時間: 原則2時間
- 抗凝固剤
- メシル酸ナフモスタット 持続注入: 30~40mg/hr
- ヘパリン ファンシヨット: 40~60単位/kg 持続注入: 40~60単位/hr

我々は、ヒトと同じ霊長類(カニクイザル)を用いて、周術期に細径ダブルルーメンカテーテルによる吸着回路を導入し PMX-DHP 療法を行い、その生体への影響、および手術後の骨髄から循環系への白血球放出と、それらの肺への動員、集積への予防効果を解析する in vivo モデルを開発した(上図)。今後、骨髄由来白血球、および高サイトカイン血症の制御による術後肺障害発症メカニズムの解明と予防手段の解析に繋がると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto Yukinobu, Hiramatsu Yuji, Ageyama Naohide, Mathis Bryan J., Maki Naoki, Matsubara Muneaki, Inoue Yoshiaki, Sato Yukio	4. 巻 32
2. 論文標題 Myeloid Progenitor Inhibitory Factor-1 (CCL23) Inhibits Lung Leukocyte Recruitment in a Primate Cardiopulmonary Bypass-Induced Pulmonary Ischaemia Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heart, Lung and Circulation	6. 最初と最後の頁 424 ~ 433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hlc.2022.11.017	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤行延、佐藤幸夫
2. 発表標題 霊長類CPB肺虚血モデルを用いた術後急性肺障害の解明と発症予防戦略
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021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	平松 祐司 (Hiramatsu Yuji) (30302417)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	
研究分担者	揚山 直英 (Ageyama Naohide) (50399458)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター・主任研究員  (84420)	
研究分担者	松原 宗明 (Matsubara Muneaki) (30743679)	筑波大学・医学医療系・講師  (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	井上 貴昭  (Inoue Yoshiaki)  (60379196)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	
研究分担者	佐藤 幸夫  (Sato Yukio)  (10312844)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

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