

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：12102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792095
 研究課題名（和文）敗血症性多臓器不全の微小循環系異常に対する VEGF を基軸とした診断治療法の開発
 研究課題名（英文）VEGF as a Potential Candidate for Developing Novel Therapy and Diagnosis for MODS in Sepsis: Development of microcirculation-based therapeutic and diagnostic approach in sepsis
 研究代表者 ジェスミン サブリナ（JESMIN SUBRINA）
 筑波大学・医学医療系・助教
 研究者番号：60374261

研究成果の概要（和文）：敗血症性多臓器障害（MODS）患者を対象とする前向き研究として、(1)血管新生因子、同血液中可溶性受容体、臓器障害の相互関係、(2)播種性血管内凝固症候群（DIC）に伴う血小板減少、トロンビン産生、組織低酸素状態と同関連因子群の発現との関係を解析した。敗血症患者 50 人を DIC の有（37 人）、無（13 人）で 2 群に分けた。血管内皮増殖因子（VEGF）、同 1 型受容体、angiopoietin 2（Ang2）、Ang1/Ang2 比、特に Ang2 には、MODS 発症/進展病態への関与が示唆された。VEGF、同 1 型受容体、Ang2 には、血小板減少、トロンビン増加、乳酸レベルとの相関が見られた。

研究成果の概要（英文）：We prospectively studied (1) the relationships between angiogenic factors, their soluble receptors and organ dysfunction and (2) the effects of disseminated intravascular coagulation (DIC)-induced platelet consumption, thrombin generation, and tissue hypoxia on the expression of the factors and receptors. Fifty patients with sepsis were classified into two subgroups: 37 patients with DIC and 13 patients without DIC. We found, VEGF, sVEGFR1, Ang2, and Ang1/Ang2, especially Ang2, may have roles in the development of MODS in sepsis associated with DIC, and VEGF, sVEGFR1, and Ang2 serum levels correlated with the extent of DIC-induced platelet consumption, thrombin generation, and blood lactate levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：救急集中治療医学、循環病態内科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症、多臓器障害、VEGF、微小循環異常

1. 研究の背景

播種性血管内凝固症候群 (DIC) は、敗血症に伴う重篤な病態である。組織因子誘発性の血液凝固系の異常な活性化亢進と生理的な線溶系の破綻が見られる。その結果、フィブリン血栓の全身的な形成、微小循環系の閉塞、臓器組織への酸素供給低下、臓器不全が齎される。それらはまた、血管拡張、内皮細胞間結合の破綻、血管透過性の亢進を引き起こし、サイトカイン誘発性の白血球・内皮細胞接着の亢進から、微小血管系の異常、全身的な毛細血管系からの血液成分/体液リーク、間質組織の浮腫が齎され、血管内脱水と体液分布異常によるショックを引き起こす。

血管内皮増殖因子 (VEGF) とその 1 型・2 型受容体 (VEGFR1, VEGFR2) は、血管新生と透過性に関連する主要分子である。VEGFR2 は、内皮細胞の成長・生存に関与する。一方、VEGFR1 は、虚血や炎症などの病的環境においては血管透過性亢進に関与する。

Angiopoietin (Ang)-Tie2 のリガンド-受容体系もまた、血管新生、血管機能に関与する重要な分子系である。Angiopoietin 1 (Ang1) 由来の Tie2 活性化は、血管安定化を齎す。これは、アンタゴニストである Angiopoietin 2 (Ang2) によって不安定化され、血管系の新生や血管透過性亢進に向かう。

先行研究成果によれば、血液凝固系と VEGF-VEGF 受容体系、Ang-Tie2 系の相互には密接な関連性が示唆されている。臨床研究において、血中可溶性 VEGFR1 レベルが高い場合には、病態の重症度や死亡率との関係が高く、敗血症等の重症病態における予後不良因子である事が示唆される。しかし、VEGF レベルと臓器障害レベルや予後との相関については、各種の臨床データには一致が認められず、議論が分かれている。

また、実臨床に頻用されている患者の予後予測と適切な治療方針の決定に重要な各種の病態指標 (APACHE スコア、SOFA スコア等：後述) においても、現実的には、評価を行うタイミング、各種の支持療法におけるスコアの易変動性、各種薬剤による鎮静や挿管下における意識障害の評価法などの複数の問題点も指摘されている。これらの短所を解決する、病態に即した新たな臨床評価指標の開発も必要であると考えられる。

2. 研究の目的

敗血症性の DIC 病態における血管新生因子系 (可溶性受容体分画を含めて) に関する臨床データには乏しい。

本研究では、

(1) 血管新生因子とその可溶性受容体分画の血清中の濃度を、敗血症性 DIC 患者を対象として測定する。(2) これらの測定値と、臓器障害の程度、DIC 性の血小板減少の程度、トロンビン濃度、組織虚血の程度などの各因子との相関関係を解析する。

3. 研究の方法 (1) 患者登録

研究プロトコールは倫理委員会審査を経た。患者さんご本人または状態に応じてその近親者に対して、文書による説明と同意の確認を行った。その結果、軽度から重度の敗血症、更に敗血症性ショック患者、合計 50 人が登録された。50 人の健常人をコントロールとした。

(2) 定義

入院時の病態重症度評価法としては、APACHE II スコア (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) を用いた。これは、入院予測死亡率を求める方法としての国際基準の一つであり、生理学的パラメーター (体温、血圧、心拍数、呼吸数、動脈血酸素、pH、血清ナトリウム、血清カリウム、血清クレアチニン、ヘマトクリット、白血球数、意識レベル)、年齢、合併慢性疾患 (心、肺、腎、肝、免疫系等) の各因子を基に算出される。

多臓器障害の評価には SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) スコアを用いた。これは、呼吸、凝固、肝、心血管、中枢神経、腎の 6 臓器の不全の有無を 0~4 の 5 段階で点数化して合計した指標であり、ICU 患者の予後予測における有用性が知られている。多臓器障害 (Multiple organ dysfunction syndrome: MODS) の基準としては、SOFA スコア ≥ 12 とした。

全身性炎症性反応症候群 (Systemic inflammatory response syndrome: SIRS)、敗血症、重症敗血症、敗血症性ショックの診断は、ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine consensus conference: アメリカ胸部疾患学会/集中治療学会) の診断に従った。

感染症の診断は、身体所見、血液所見、画像診断所見、各種検体からの微生物学的所見 (塗抹、培養、同定、抗体検査、PCR 等) に基づいた。DIC 診断は、日本救急医学会 (JAAM) 基準に従った。

(3) 研究プロトコール

敗血症診断後の 24 時間以内 (day 1) に、

血液検体は動脈ラインから採取し、以後、day 3, day 5にも採取した。測定項目は、フィブリン, VEGF, 可溶性 VEGFR1, 可溶性 VEGFR2, Ang1, Ang2, 可溶性 Tie2 受容体。

(4) 統計学的解析

全ての統計値は平均値±標準誤差 (means±SEM) で表記した。IBM SPSS 19版にて、MAC OSX ソフトプログラム (IBM SPSS Inc. Chicago)を使用した。

4. 研究成果

血液中の血管新生系の各分子レベルは、健康人と敗血症患者との比較において、あるいは敗血症患者でも DIC を発症した群と発症しなかった群において、それぞれ相違が見られた。即ち、

- (1) 健康人に比較して、敗血症患者においては、VEGF, 可溶性 VEGFR2, Ang1, Ang 1/Ang 2 比には低下が認められ、また、可溶性 VEGFR1, Ang 2 には増加が認められた。
- (2) この時、VEGF, 可溶性 VEGFR1, Ang 2, Ang1/Ang2 の変化は、DIC 発症群においてより顕著であり、その程度と SOFA スコアの間には相関関係が認められた。
- (3) 特に、血中 Ang 2 レベルには MODS 発症進展及び DIC 患者予後との強い相関が見られた。
- (4) DIC 関連の血小板減少には VEGF レベル低下との関係が示唆された。
- (5) 血中乳酸の上昇レベルと DIC 誘発性トロンビン産生は、可溶性 VEGFR1 増加, Ang2 増加に関する独立した予測因子であった。

以上の結果より、VEGF, 可溶性 VEGFR1, Ang 2, Ang 1/Ang 2 は、敗血症患者の DIC と多臓器障害の発症進展の病態や予後に関与している可能性が示唆された。

Table 1 The baseline clinical characteristics of the patients

	Non-DIC (n=13)	DIC		p Value
		JAAM DIC (n=22)	ISTH overt DIC (n=15)	
Age (years)	52±6	61±4	67±3	0.131
Gender (male/female)	7/6	16/6	8/7	0.383
Sepsis/Severe sepsis/Septic shock	6/7/0	7/13/2	2/9/4	0.136
APACHE II score	24.7±2.0	27.8±1.8	28.3±2.2	0.465
SOFA score max	8.6±1.2	12.5±0.8	12.7±1.2	0.023
MODS (yes/no)	3/10	14/8	10/5	0.033
SIRS max	3.0±0.2	3.5±0.1	3.5±0.1	0.086
JAAM DIC score max	2.6±0.3	5.1±0.2	7.5±0.2	0.000
ISTH DIC score max	1.6±0.4	3.5±0.1	5.9±0.2	0.000
Outcome (survive/died)	10/3	14/8	10/5	0.712

Table 2 A multiple regression analysis with the stepwise method for prediction of the SOFA score

	B (SE)	β	p value	95% CI	R ²	p-value (ANOVA)
Total Angiopoietin2	0.000(0.000)	0.621	0.000	0.000-0.000	0.386	0.000
DIC Angiopoietin2	0.000(0.000)	0.561	0.000	0.000-0.000	0.315	0.002

Table 3 The multiple regression analysis with the stepwise method for prediction of VEGF, VEGFR1, and angiopoietin2 in 37 DIC patients

	B(SE)	β	p	95%CI	R ²	p value (ANOVA)
VEGF						
Lactate	-7.56(3.3)	-0.362	0.028	-14.2 - -8.9	0.131	0.028
sVEGFR1						
Lactate	277(84)	0.475	0.003	105 - 450	0.206	0.007
Soluble fibrin	17.0(6.4)	0.386	0.021	4.0 - 30.0	0.355	0.007
Angiopoietin2						
Lactate	1050(229)	0.611	0.000	584 - 1517	0.374	0.000

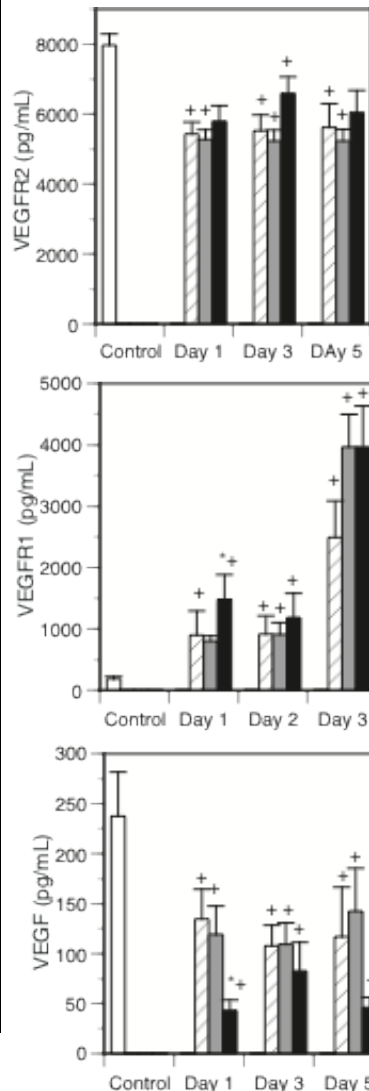


Figure 1.

VEGF 系の血中レベル
:sVEGFR2(最上段);
sVEGFR1(中段);
VEGF(最下段).

各バーは、
白:健康人(対照群);
斜線: DIC 非発症群;

灰白色: JAAM 診断基準 DIC;
黒: ISTH 顕性 DIC、を表す。

+ p < 0.05 vs. 対照群。

* p < 0.05 vs. DIC 非発症群。

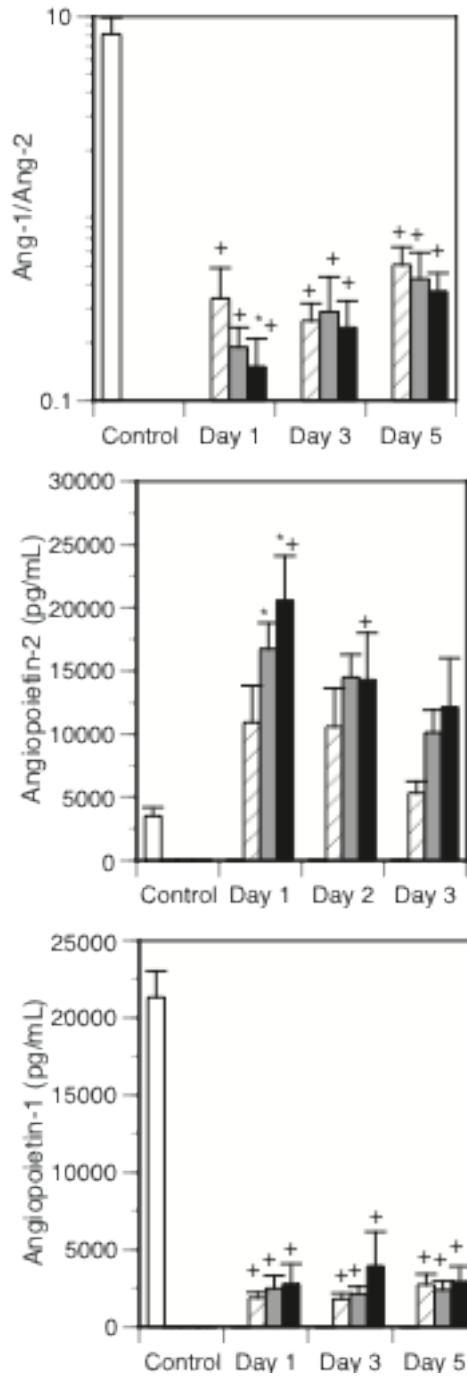


Figure 2. Angiopoietin 1, 2 の血中レベル:
 最下段 Angiopoietin 1 (Ang1), 中段 Angiopoietin 2 (Ang2), 最上段 Ang1/Ang2。
 各バーは、白:健康人(対照群); 斜線:DIC 非併発群; 灰白色:JAAM 診断基準 DIC; 黒:ISTH 顕性 DIC、を表す。+ $p < 0.05$ vs. 対照群, * $p < 0.05$ vs. DIC 非併発群。

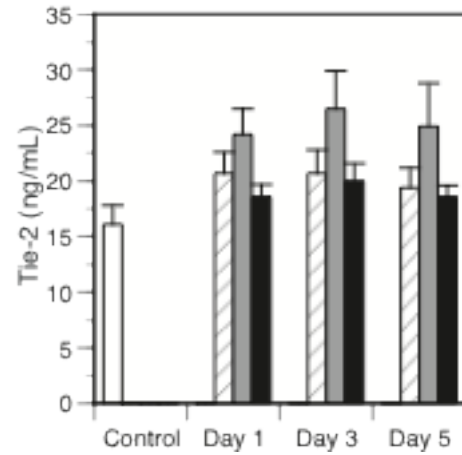


Figure 3. 可溶性 Tie 2 レベル:各バーは、白:健康人(対照群); 斜線:DIC 非併発群; 灰白色:JAAM 診断基準 DIC; 黒:ISTH 顕性 DIC、を表す。

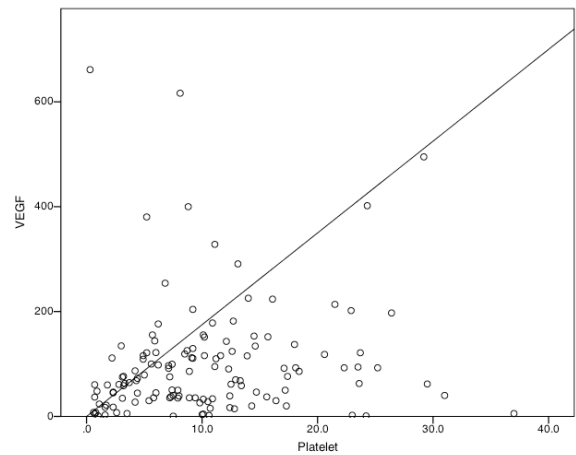


Figure 4
 敗血症患者における血中 VEGF レベルと血小板数との間には相関関係が見られる。
 (Spearman rho = 0.235, $p = 0.007$)

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9件)

① Yanagida Y, Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Uegaki S, Kubota N, Homma T, Ono Y, Honma Y, Wada T, Jesmin S. Normal prothrombinase activity, increased systemic thrombin activity, and lower antithrombin levels in patients with disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma: Comparison with acute coagulopathy of trauma-shock. *Surgery*. 査読有, 2013 May 15. doi:pii:S0039-6060(13)00056-1. 10.1016/j.surg.2013.02.004. [Epub ahead of print]

② Wada T, Jesmin S, Gando S, Yanagida Y, Mizugaki A, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H. : The role of angiogenic factors and their soluble receptors in acute lung injury (ALI)/ acute respiratory distress syndrome (ARDS) associated with critical illness. *Journal of Inflammation (Lond)*, 査読有, 11;10(1), 6, 2013.

③ Wada T, Jesmin S, Sultana S.N, Zaedi S, Gando S, Yokota H. : Using angiogenic factors and their soluble receptors to predict organ dysfunction in patients with disseminated intravascular coagulation associated with severe trauma. *Critical Care*, 査読有, 12;16(2), R63, 2012.

④ Murakami H, Gando S, Mineji H, Sawamura A, Sugano M, Uegaki S, Jesmin S. : Disseminated intravascular coagulation (DIC) at an early phase of trauma continuously proceeds to DIC at a late phase of trauma. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 査読有, 18(4), 364-9, 2012.

⑤ Hayakawa M, Sawamura A, Gando S, Jesmin S, Naito S, Ieko M. : A low TAFI activity and insufficient activation of fibrinolysis by both plasmin and neutrophil elastase promote organ dysfunction in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis. *Thrombosis Research*, 査読有, 130(6), 906-13, 2012.

⑥ Wada T, Jesmin S, Gando S, Yanagida Y, Mizugaki A, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H. : Angiogenic factors and their soluble

receptors predict organ dysfunction and mortality in post-cardiac arrest syndrome. *Critical Care*, 査読有, 16(5), R171, 2012.

⑦ Jesmin S, Wada T, Gando S, Sultana SN, Zaedi S. : Angiogenic factors and their soluble receptors for predicting organ dysfunction in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis. *Inflammation*, 査読有, Aug 26. [Epub ahead of print], 2012.

⑧ Jesmin S, Zaedi S, Islam AM, Sultana SN, Iwashima Y, Wada T, Yamaguchi N, Hiroe M, Gando S. : Time-dependent alterations of VEGF and its signaling molecules in acute lung injury in a rat model of sepsis. *Inflammation*, 査読有, 35(2), 484-500, 2011.

⑨ Jesmin S, Sultana S. N, Prodhan SH, Yamaguchi N, Zaedi S, Sawamura A, Iwashima Y, Gando S. : Time-dependent expression of endothelin-1 in lungs and the effects of TNF- α blocking peptide on endothelin-1 levels in lungs in endotoxemic rat model. *Biomedical Research*, 査読有, 32(1), 9-17, 2011.

[学会発表] (計14件)
(international)

① Jesmin S, Wada T, Islam M, Shimojo N, Mizutani T, Gando S : Organ specific expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia. 42nd Critical Care Congress, San Juan, Puerto Rico, USA, January 19-23, 2013.

② Wada T, Jesmin S, Gando S, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H : Angiogenic factors and their soluble receptors in patients with DIC associated with severe trauma. 32th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, Belgium, March 20-23, 2012.

③ Jesmin S, Wada T, Zaedi S, Shimojo N, Sultana SN, Moroi M, Watanabe T, Gando S : Amelioration of acute liver injury through the suppression of upregulated levels of Endothelin-1 and TNF- α in a rat model of endotoxemia with the blockade of protease activated receptor-2 (PAR2). ESICM 2012: The 25th Annual Congress of the European Society of Intensive Care

Medicine, Lisbon, Portugal, October 13-17, 2012.

④ Wada T, Jesmin S, Gando S, Yanagida Y, Mizugaki A, Yokota H : Angiogenic factors and their soluble receptors in acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) in critically ill patients. ESICM 2012: The 25th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, Lisbon, Portugal, October 13-17, 2012.

⑤ Jesmin S, Mowa CN, Naoto Y, Zaedi S, Sultana SN, Gando S : Time-dependent expression of Endothelin-1 in lungs and the effects of TNF-alpha blocking peptide on acute lung injury in an endotoxemic rat model. FASEB meeting, Washington DC – USA, April 9-13, 2011.

⑥ Wada T, Jesmin S, Zaedi S, Gando S : Time dependent alterations of VEGF and its signal in molecules in acute lung injury in a rat model of sepsis. 24rd European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress, Berlin, Germany, Oct 1-5, 2011.

⑦ Jesmin S, Wada T, Zaedi S, Suhana SN, Yamaguchi Y, Iwashima A, Gando S : Time-dependent expression of endotheline-1 in lungs and the effects of TNF- α blocking peptide on endothelin-1 levels in lungs in endotoxemic rat model. 24rd European Society of Intensive Care Medicine Annual Congress, Berlin, Germany, Oct 1-5, 2011.

⑧ Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Sugano M, Uegaki S, Kubota N, Jesmin S : Low TAFI activity promotes organ dysfunction and poor progress in DIC associated with sepsis. Chest 2011, Honolulu, Hawaii, Oct 22-26, 2011.

⑨ M, Uegaki S, Kubota N, Gando S, Jesmin S : Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor and organ dysfunction in DIC associated with sepsis. Sepsis 2011, Beijing, China, Oct 29-30, 2011.

(Domestic)

① Wada T, Higashiyama A, Jesmin S, Gando S, Yokota H : The role of angiogenesis-related factors in cardio-pulmonary arrest. The 27th Japan

Shock Society General Meeting, Tokyo, Japan, May 12, 2012.

② Wada T, Hayakawa M, Higashiyama A, Jesmin S, Gando S, Yokota H : Fibrin degradation by neutrophil elastase in trauma. The 26th The Japanese Association for the Surgery of Trauma General Meeting, Tokyo, Japan, May 24-25, 2012.

③ Jesmin S, Wada T, Gando S : Therapeutic options to restore pulmonary VEGF level in a rat model of LPS-induced acute lung injury. 40th Annual Meeting of the Japan Association for Acute Medicine, Kyoto, Japan, November, 13-15, 2012.

④ Wada T, Jesmin S, Gando S : The relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and coagulofibrinolysis in trauma patients. The 38th Annual Meeting of the Japanese Society of Intensive Care Medicine, Yokohama, Japan, Feb 24-26, 2011.

⑤ Wada T, Jesmin S, Gando S, Yokota H : The relationship between the angiogenic factors and coagulofibrinolysis in trauma patients. The 39th Annual Meeting of the Japanese association for Acute Medicine, Tokyo, Japan, Oct 18-20, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ジェスミン サブリナ (JESMIN SUBRINA)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号 : 60374261