

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861736

研究課題名(和文) HIF1 が関与する心停止後症候群の病態解明と治療法の確立

研究課題名(英文) The establishment of a control system for HIF1alpha activation pathway in post-cardiac arrest syndrome.

研究代表者

和田 剛志 (WADA, TAKESHI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：30455646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心停止後症候群(PCAS)に合併する播種性血管内凝固症候群(DIC)において、Hypoxia-inducible factor-1 (HIF1) が発現を誘導する plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)やエラスターゼが関与する線溶の抑制(線溶遮断)が臓器不全の重症化とその予後不良につながっていることを証明した。外傷、敗血症、心停止蘇生後症例で血清中のHIF1 レベルとDICや臓器不全発症について検討したが、有意な結果を得ることができなかった。HIF1 は細胞内で作用するため血液中の変化を来さない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I investigated the important role of fibrinolysis which are involved in neutrophil elastase and plasmin, which is affected by plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), which is induced by Hypoxia inducible factor-1 (HIF1) in post-cardiac arrest syndrome (PCAS). The results indicated that fibrinolytic shutdown plays important roles in the development of organ dysfunction in PCAS patients. Neutrophil elastase-mediated fibrinolysis cannot overcome the fibrinolytic shutdown that occurs in DIC patients with PCAS, thus resulting in the development of multiple organ dysfunction. In addition, I studied the relationship between the serum levels of HIF1 and the development of DIC or organ dysfunction in sepsis, severe trauma, and PCAS patients. These studies showed no significant results. This can be explained by the fact that HIF1 acts inside the cell.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体侵襲 臓器不全 凝固線溶系 VEGF Angiopoietin

1. 研究開始当初の背景

近年、心肺停止患者に対する病院前救護の普及や、心肺蘇生法、緊急心血管治療の飛躍的な進歩により、自己心拍再開率は著しく向上したが、自己心拍再開後の患者予後、また神経学的予後は極めて不良である。その原因として、心停止による虚血と心拍再開による再灌流障害を病態の本態とする。心停止後症候群(PCAS)という概念が注目されている。心停止後症候群(post-cardiac arrest syndrome: PCAS)の主病態の一つである虚血/再灌流障害により播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)を来することが知られている。DICに合併する臓器不全発症において重要な役割を果たすトロンビン、plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)あるいは、VEGF、angiopoietinなどの血管新生関連因子はHypoxia inducible factor1- α (HIF1 α)により制御される。

2. 研究の目的

Hypoxic-inducible factor1- α (HIF1 α)が関与する血管新生関連因子発現、凝固炎症反応を介した心停止後症候群(Post-Cardiac Arrest Syndrome:PCAS)の病態解明と、治療法の確立を目指す。

(1) PCAS病態における、HIF1 α の血管新生関連因子、凝固炎症反応への影響の評価・確認。

(2) HIF1 α の情報伝達系制御による血管新生関連因子の過剰発現と凝固炎症反応抑制の確認。

これらに基づきHIF1 α 制御がPCAS患者の予後および神経学的予後を改善させる可能性があることを証明することでPCASの病態(HIF1 α -血管新生関連因子-凝固炎症反応連関)を解明し、その治療戦略構築を目指すことが本研究の目的である。

(1) *in vivo*実験

目的1: PCAS病態におけるHIF1 α と血管新生関連因子、凝固線溶反応との関連の解明

①HIF1 α 蛋白の臓器発現(脳、心、肺、肝、腎)、および免疫組織染色によるHIF1 α の組織局在の確認

②HIF1 α と血管新生関連因子、特にAng/Tie2シグナル伝達系や組織因子(TF)、トロンビン、PAI-1蛋白発現の関連、およ

び組織局在の相同性の確認

③HIF1 α 発現と臓器障害の関連検討

目的2: PCASの新たな治療戦略構築に向けて

①ヘパリン、アンチトロンビン、トロンボモジュリンなど抗DIC薬がHIF1 α 発現に及ぼす影響の確認

②HIF1 α agonistまたはantagonistによる血管新生関連因子、凝固線溶系因子の変化、また臓器障害の変化を確認し、PCASの新しい治療標的としてのHIF1 α の可能性を検討する。

(2) 臨床研究

PCAS患者の血液中のHIF1 α 、血管新生関連因子、上記凝固線溶系因子を測定し、DIC群とnon-DIC群、神経学的予後良好群と神経学的予後不良群、生命予後不良群と生命予後良好群などの比較を行う。またPCAS治療のスタンダードとなりつつある低体温療法がHIF1 α やその他の因子に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*実験: 心肺停止蘇生再灌流モデルを作成し、今まで我々が報告してきた侵襲発生後、1, 3, 6, 10時間のタイミングで採血、犠牲死させ臓器を摘出し解析することで、PCASに伴う血管新生関連因子、凝固線溶反応を介したHIF1 α のPCAS病態への関与を明らかにする。また、PCASに対するHIF1 α アンタゴニストの治療効果を検証する。

①実験モデル: ラット Utstein-style 準拠心停止・虚血再灌流傷害モデル

②標的臓器: 脳、心、肺、肝、腎

③標的分子: western blot, RT-PCR, ELISAを使用して定量。Immunohistochemistry and immunofluorescent labelingで組織・細胞発現確認。

i. HIF1 α 、HIF2 α 、HIF3 α 、HIF1 β (protein, mRNA)

ii. Ang1, 2, sTie2 (protein, mRNA), VEGF, soluble VEGF-R1/R2 (protein, mRNA)

iii. Tissue factor, FVIIa, FXa, Thrombin, PAI-I, Fibrin (protein, mRNA)

④臓器不全確認:

病理学的検討、臓器特異的傷害マーカー: 脳、s100、NSE、Glial fibrillary acidic protein (GFAP); 心、CKMB、TnT、ET-1; 肺、血液ガス、肺湿乾重量比、¹³⁵I-albumin

permeability index ; 肝、T.Bil、AST/ALT、LDH ; 腎、BUN、creatinine、NAG、 β 2MG

中枢神経傷害評価 ; マイクロダイアリースによる微小循環代謝障害の評価 (Brain Res Bull 2012 など)。Glucose, lactate(L), pyruvate(P), L/P ratio, glyceol

モリス水迷路による認知機能評価 (Morris R: J Neurosci Methods 1984, Neuropathology 2009)

⑤ 使用薬剤

Mimosine (HIF1 α アゴニスト ; J Infect Dis 2008), 2-Methoxyestradiol (HIF1 α インヒビター ; SHOCK 2011)、Tanshinone IIA (フェナントレンキノン誘導体 ; Am J Respir Cell Mol Biol 2011)

(2) 臨床研究 : 症例の血液検体採取とバイタルサイン、血液データ、SOFA スコア、APACHE II スコアなどデータ収集を行う。

4. 研究成果

(1) PCAS において多臓器不全を来す群で soluble fibrin(トロンビン活性を反映)、tPAIC(PAI-1 を反映)は高値であったが、EXDP(エラスターゼによるフィブリン分解産物)に有意差はみられなかった。tPAICはSOFA増加の独立した予測因子であった。DIC患者の非多臓器不全群で認めた tPAIC と EXDP の正相関は多臓器不全群で確認できなかった。つまり、PCASに合併するDICでは、トロンビン活性亢進とPAI-1起因性線溶抑制に対して、プラスミン・エラスターゼによる線溶活性不足が臓器不全を惹起する可能性が示唆された。

(2) 我々の他研究において、外傷、敗血症、PCASなど生体侵襲の種類を問わず、血管新生関連因子が同様の動態を示し、特にangiopoietin2が臓器不全発症と予後不良に関与していることが示されている。上述のトロンビンやPAI-1、血管新生関連因子を制御するHIF1 α も同様の動態を示すだろう、という予測のもと患者血清中のHIF1 α の測定を行ったが、有意な結果を得ることはできなかった。HIF1 α は細胞内で働くため血液中での変化に乏しい、という可能性が示唆された。

(3) in vivo 実験に関しては、心停止を起こすために必要な電気刺激装置とカテーテルの接続がうまくいかないなどで思うように進まず、現在も動物モデル作成中で予定通り

の実験を遂行することができなかった。科学研究費の助成期間は終了となったが、今後も同研究を継続していき、研究結果を海外学会発表、英文誌投稿につなげていきたいと考えている。

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) 和田剛志 : DIC と抗凝固療法 救急医学 Vol. 39 No. 2 p185-191, 2015

査読有り

(2) 和田剛志 : コリン作動性抗炎症反応経路と敗血症、臓器不全、Thrombosis Medicine、査読有、4巻、pp. 28-33、2014

査読有り

医中誌 ID : 2014144073

(3) 丸藤哲、和田剛志 : 神経内分泌・自律神経反応と炎症反応、Thrombosis Medicine 4巻 p. 5-14, 2014

査読有り

医中誌 ID : 2014144070

(4) 丸藤哲、和田剛志 : 神経内分泌・自律神経反応と凝固線溶反応、Thrombosis Medicine 4巻 p. 15-19, 2014

査読有り

医中誌 ID : 2014144071

(5) 和田剛志 : 心停止後症候群 救急・集中治療 (徹底ガイド) DICのすべて 26-5・6 p824-828, 2014

査読有り

医中誌 ID : 2014296375

(6) Wada T, Gando S, Mizugaki A, Yanagida Y, Jesmin S, Yokota H, Ieko M.

Coagulofibrinolytic changes in patients with disseminated intravascular Coagulation associated with post-cardiac arrest syndrome—Fibrinolytic shutdown and insufficient activation of fibrinolysis lead to organ dysfunction.

Thrombosis Research 132:e64-e69, 2013.

査読有り

doi: 10.1016/j.thromres.2013.05.010.

〔学会発表〕(計7件)

① 和田剛志、ジェスミン・サブリーナ、小野雄一、宮本大輔、柳田雄一郎、早川峰司、澤村淳、丸藤哲、敗血症性DICに合併する臓器不全と血管新生関連因子の連関
第18回エンドトキシン血症救命治療研究会
2014年11月17日-18日、日本橋三井ホール、中央区、東京都

② Wada T. The overproduction of nitric oxide included by anglogenetic and coagulation factors leads to multiple organ dysfunction syndrome associated with post-cardiac arrest syndrome.
The European Society of Intensive Care Medicine 27th Annual Congress.
September 27-October 1, 2014. CCIB, Balcerona, SPAIN.

③ 和田剛志、柳田雄一郎、小野雄一、宮本大輔、早川峰司、澤村淳、丸藤哲、外傷急性期の血液凝固線溶系-プロントロンビナーゼ活性測定によるDICとACoTSの比較-
2014年6月25日-26日、東京ビッグサイトTFTホール、江東区、東京都

④ 和田剛志、生体侵襲下における凝固線溶反応-播種性血管内凝固(DIC)、臓器不全発症におけるエラスターゼによる線溶の役割-
2013年10月21日-23日、東京国際フォーラム、千代田区、東京都

⑤ Wada T. Coagulofibolytic changes in patients with disseminated intravascular coagulation associated with post-cardiac arrest syndrome- Fibrinolytic shutdown and insufficient activation of fibrinolysis lead to organ dysfunction.
26th European Society of Intensive Care Medicine LIVE 2013 Congress.
October 5-9, 2013. The palais des Congres, Paris, FRANCE.

⑥ Gando S, Yanagida Y, Sawamura A, Hayakawa M, Kubota N, Wada T. Ono Y,

Tamamoto H.

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.
XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.
June 29 - July 4, 2013. h Amsterdam RAI, Amsterdam, NETHERLANDS

⑦ Gando S, Yanagida Y, Sawamura A, Hayakawa M, Kubota N, Ono Y, Wada T. Yamamoto H.
Increased thrombin activation and lower antithrombin levels in patients with DIC and acute coagulopathy of trauma-shock (ACOTS).
17th International Meeting of the Danubian League against Thrombosis and Haemorrhagic disorders (DLTH)
May 22-23, 2013, Congress Center ALDIS, Hradec Kradec, CZECH REPUBLIC

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 剛志 (WADA TAKESHI)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号: 30455646

(2) 研究分担者

なし