

氏名（本籍）	柿野圭紀	（岐阜県）
学位の種類	博士	（医学）
学位授与番号	甲第1236号	
学位授与日付	令和5年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Recombinant thrombomodulin may protect cardiac capillary endothelial glycocalyx through promoting Glypican-1 expression under experimental endotoxemia.	
審査委員	（主査）教授	大倉 宏之
	（副査）教授	大西 秀典
		教授 永井 宏樹

論文内容の要旨

【緒言】

正常な血管内腔表面は、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンにより構成される糖タンパク質の層である血管内皮グリコカリックス（eGC）に被覆されており、血管の恒常性を維持している。一方、敗血症では臓器障害により放出された炎症性サイトカインが、血管内皮において eGC を障害し臓器不全に陥る。敗血症では様々な臓器不全を生じうるが、その中でも心不全は致命的である。その機序として、心臓毛細血管において eGC が障害された結果、心臓の微小循環が破綻し心筋が障害されて心不全に至る可能性が示されている。

トロンボモデュリンは抗炎症作用を示し、正常な血管内皮細胞において血管恒常性を維持する。一方で肺において、遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモデュリン（rhTM）は、Transforming growth factor- β (TGF- β) シグナル伝達経路や Janus kinase - Signal Transducers and Activator of Transcription (JAK-STAT) シグナル伝達経路を活性化するだけでなく、eGC の構成要素であるヘパラン硫酸合成を行う遺伝子の発現を活性化することが示されている。

そこで今回、リポポリサッカライド(LPS)投与により惹起された敗血症性血管炎モデルマウスに対して rhTM を投与することで、心臓毛細血管の eGC に与える影響を評価し、敗血症性心筋障害における rhTM の有用性を検討した。

【対象と方法】

10 週齢雄のマウスに LPS を 20mg/kg 腹腔内投与し、敗血症性血管炎モデルを作成した。rhTM 治療マウスでは LPS 投与 3 時間後および 24 時間後に rhTM を腹腔内投与し、対照群では生理食塩水を腹腔内投与した。両群の生存率、血清トロポニン I 濃度、インターロイキン-6 (IL-6) 濃度を測定するとともに、eGC の障害程度を評価するために血清シンデカン-1 濃度を測定した。さらに、免疫組織学検査や走査型電子顕微鏡(SEM)および透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた超微形態学的分析、ならびに DNA マイクロアレイ解析による網羅的解析を行った。

【結果】

LPS 投与 48 時間後の rhTM 群の生存率は、対照群に比べて有意に改善した(rhTM 群 vs 対照群：68% vs 17%, $p < 0.05$)。また rhTM 群の血清トロポニン I 濃度は対照群より有意に低値であり ($2.2 \pm 0.4 \text{ ng/dL}$ vs $9.4 \pm 1.1 \text{ ng/dL}$, $p < 0.05$)、LPS 投与 6 時間後、12 時間後の血清 IL-6 濃度も対照群より有意に低値であった (6 時間後： $45.2 \pm 18.3 \text{ ng/mL}$ vs $89.0 \pm 9.0 \text{ ng/mL}$ 、12 時間後： $65.3 \pm 15.3 \text{ ng/mL}$ vs $226.3 \pm 19.4 \text{ ng/mL}$, $p < 0.05$)。また eGC の障害を定量的に評価するために、蛍光色素で標識された Wheat

Germ Agglutinin (WGA) レクチンを用いて eGC を描出し、Intensity score を算出した。対照群では Intensity score が顕著に低下するのに反して、rhTM 群ではその障害が有意に抑制されていた。硝酸ラントランを用いた SEM ならびに TEM による超微形態学的解析において、対照群では心臓毛細血管内腔表面において eGC が脱落し血管内皮細胞表面が血管内腔に露出していたのに対し、rhTM 群では eGC 障害は軽減しており構造が保たれていた。マイクロアレイ解析では、rhTM 群で硫黄化合物異化過程、TCA サイクル、ピルビン酸代謝、心筋伝導による心拍数調整に対応する遺伝子セットの発現が上昇しており ($p < 0.01$)、特に硫黄化合物異化過程遺伝子セットでは eGC のコア蛋白であるグリピカン-1 (GPC-1) の発現が上昇していた。免疫組織学的解析では正常心毛細血管内皮において GPC-1 が発現しており、LPS 投与によりこれが減弱し、rhTM 投与によりこれが改善することが確認された。さらに GPC-1 と WGA レクチンの二重免疫染色を行ったところ、rhTM 群では GPC-1 と WGA レクチンが共局在しており、GPC-1 発現により心毛細血管において eGC 合成が促進される可能性が示唆された。

【考察】

既報告では rhTM は肺における炎症や細胞増殖・分化、糖鎖合成に影響を与え、血管内皮障害に起因する ARDS を抑制することが示されている。本研究では、LPS 投与による敗血症性血管炎において、rhTM が心臓血管内皮の eGC を保護することを示し、その要因の一つとして eGC を構成するプロテオグリカン合成を促進し、抗炎症作用により eGC 分解を抑制する可能性を示した。

今回は敗血症における eGC と血管内皮障害の直接的な関係を調べるために、敗血症性血管炎モデルを用いて検討したが、本来敗血症とは細菌感染症などが関与する複雑な病態であり、さらなる検討が必要である。また経腹腔内投与したことなどを踏まえ、rhTM の投与を 30mg/kg と高容量に設定したことにも留意が必要である。

【結論】

rhTM は GPC-1 の発現を増強、炎症性サイトカイン分泌を抑制することで、eGC を保護・増殖し、心臓における微小循環を改善する可能性がある。敗血症における血管内皮障害に対する新規治療戦略として期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者 柿野 圭紀は、リポポリサッカライド投与による敗血症性血管炎モデルマウスにおいて、遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモデュリン (rhTM) の腹腔内投与が心臓毛細血管内腔の血管内皮グリコカリックスを保護、増殖することを明らかにし、その機序として炎症性サイトカイン分泌の抑制であることを示唆した。本研究は rhTM が敗血症の急性期において新たな治療選択肢となる可能性を示唆し、集中治療分野の発展に少なからず貢献するものと認める。

[主論文公表誌]

Yoshinori Kakino, Tomoaki Doi, Hideshi Okada, Kodai Suzuki, Chihiro Takada, Hiroyuki Tomita, Hirotaka Asano, Soichiro Kano, Yugo Wakayama, Tomoki Okuda, Hirotsugu Fukuda, Ayane Nishio, Yuki Kawasaki, Ayumi Kuroda, Takuto Shimada, Shigeo Takashima, Keiko Suzuki, Genki Yoshimura, Ryo Kamidani, Ryu Yasuda, Tetsuya Fukuta, Yuichiro Kitagawa, Haruka Okamoto, Takahito Miyake, Akio Suzuki, Takahiro Yoshida, Nobuyuki Tetsuka, Shozo Yoshida, Shinji Ogura : Recombinant thrombomodulin may protect cardiac capillary endothelial glycocalyx through promoting Glypican-1 expression under experimental endotoxemia.
Heliyon, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11262.