

氏名（本籍）	福田 哲也	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1115 号	
学位授与日付	令和 2 年 2 月 19 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	Neutrophil elastase inhibition ameliorates endotoxin-induced myocardial injury accompanying degradation of cardiac capillary glycocalyx	
審査委員	（主査）教授	飯田 宏樹
	（副査）教授	道上 知美 教授 永井 宏樹

論文内容の要旨

健常な毛細血管内皮にはプロテオグリカンやグリコサミノグリカンで構成される糖タンパク質の層であるグリコカリックスが存在し、毛細血管の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。血管内皮グリコカリックスは侵襲、炎症等で傷害され、血管内皮機能の破綻を来すと考えられている。

敗血症性心筋障害は過剰な炎症性メディエーターの産生を起因とする血管内皮障害によって生じると考えられている。好中球、特に炎症性メディエーターの一つである好中球エラスターゼ（NE）は急性呼吸促拍症候群の原因となることが知られているが敗血症性心筋障害に与える影響についてはいまだに明らかとなっていない。本研究では、エンドトキシンによって惹起される敗血症性血管炎モデルマウスを作成し、好中球ならびに NE が敗血症性心筋障害に及ぼす影響について評価した。

【対象と方法】

まず顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）がノックアウトされた 9-12 週齢オスのマウス（G-CSF-KO）に対してリポ多糖（LPS）を 20 mg/kg 腹腔内投与し敗血症性血管炎モデルを作成し、好中球の敗血症性血管炎ならびに心筋障害に及ぼす影響について検討した。対照群には同腹仔のオスを使用した。LPS 投与後の生存率、血中の NE、トロポニン I、インターロイキン 6（IL-6）の濃度、血管内皮障害の定量と形態学的変化について考察を行った。

次に NE の敗血症性血管炎や心筋障害に対する影響を検討するため、野生型マウス対し NE 阻害薬のシベレスタット 0.2 mg/kg を LPS 投与後 3, 6, 9, 12 時間後に腹腔内投与し、同様の検討を行った。

【結果】

LPS 投与前の G-CSF-KO マウスでは対照群に比べ血中 G-CSF 濃度、好中球数は有意に低かった。LPS 投与 48 時間後の生存率は対照群に比べて有意に高かった（G-CSF-KO vs 対照群: 80 % vs 17 %, $p < 0.05$ ）。血清 NE 濃度は対照群では LPS 投与後に上昇を認めたが、G-CSF-KO マウスではその濃度は抑制されていた。炎症性メディエーターとして IL-6 を測定すると、対照群に比べ G-CSF-KO 群で有意に低下していた（G-CSF-KO vs 対照群: 41.6 ± 6.2 ng/mL vs 47.9 ± 8.6 ng/mL, $p < 0.05$ ）。心筋障害を定量するために、LPS 投与 48 時間後のトロポニン I を測定したところ、対照群に比べ G-CSF-KO 群で有意に低下していた（G-CSF-KO vs 対照群: 0.9 ± 0.2 ng/dL vs 5.3 ± 0.7 ng/dL, $p < 0.05$ ）。また、電子顕微鏡像において、健常な心筋細胞の間に壊死した心筋細胞が確認され、細胞レベルでの心筋壊死に起因するものと考えられた。この変化は両群に認められたが、対照群で著明であった。次に、グリコカリックス傷害の程度を Wheat Germ Agglutinin（WGA）レクチンを用いて定量的に検討を行

った。蛍光色素で標識された WGA レクチンでグリコカリックスを描出し Intensity Score を測定したところ、LPS 投与によって対照群で投与前に比べ有意に低下する一方で、G-CSF-KO 群ではその低下は軽微であった。硝酸ランタンによる電子染色で超微形態学的にグリコカリックスを評価したところ、正常時には血管内皮を覆うようにグリコカリックスが存在していることが確認できた。LPS 投与により血管炎を誘発すると対照群では血管内皮グリコカリックスの構造が破壊され血管内皮表面が血管内腔に露出していたのに対し、G-CSF-KO 群ではグリコカリックスの構造が保たれていた。

次に野生型マウスに NE 阻害薬であるシベレスタットを投与し、同様の評価を行った。生存率はシベレスタット投与群で有意に改善し(シベレスタット vs 生理食塩水投与群: 81% vs 22%, $p < 0.05$), 血清 IL-6 濃度も LPS 投与後 6 時間, 12 時間の時点で有意に低下していた。トロポニン I はシベレスタット投与群で有意に低下しており(シベレスタット vs 生理食塩水投与群: 1.6 ± 0.2 ng/dL vs 5.5 ± 0.8 ng/dL, $p < 0.05$), WGA intensity score も改善していた。超微形態学的に観察を行ったところシベレスタット投与群でグリコカリックスの傷害の程度が抑えられていることが確認された。

【考察】

血管内皮グリコカリックスが傷害されると、血管内皮機能が破綻して臓器障害が生じると考えられている。本研究において敗血症性血管炎モデルを作成したところ、血管内皮グリコカリックスの層構造が破壊されており、また心筋細胞レベルでまだら状に壊死を来していることが確認され、心筋障害を来す機序として血管内皮グリコカリックスの傷害を通じた微小循環障害の関与が示唆された。

一方で G-CSF-KO マウスや NE 阻害薬であるシベレスタット投与によって LPS 誘発性の心筋障害が抑制された。さらに今回の研究では好中球から放出される NE を抑制することでエンドトキシン血症における血管内皮障害を軽減し、心筋障害を抑制することも確認できた。このことから敗血症性心筋障害に対して、好中球、特に好中球から放出される NE の関与が強く示唆された。

我々は過去にシベレスタットが血管内皮グリコカリックスの傷害を抑制して、敗血症性急性呼吸促拍症候群を改善することを報告している。本研究では NE を阻害することで血管内皮構造の傷害を抑制して、敗血症性心筋障害も抑制することを示唆した。

【結論】

敗血症に起因する血管内皮グリコカリックス傷害によって生じる心筋障害には NE の関与が示唆され、NE の阻害は敗血症性心筋障害を抑制する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 福田哲也は、敗血症性血管炎モデルマウスを用いることによって、血管内皮グリコカリックス傷害が敗血症性心筋障害に関与することを示した。また、その機序に好中球エラスターゼが関連することを明らかにした。本研究の成果は、救急医学ならびに集中治療医学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Tetsuya Fukuta, Hideshi Okada, Genzou Takemura, Kodai Suzuki, Chihiro Takada, Hiroyuki Tomita, Akio Suzuki, Kazumasa Oda, Akihiro Uchida, Saori Matsuo, Hirotsugu Fukuda, Hirohisa Yano, Isamu Muraki, Ryogen Zaikokuji, Ayumi Kuroda, Ayane Nishio, So Sampei, Nagisa Miyazaki, Yasuaki Hotta, Noriaki Yamada, Takatomo Watanabe, Kentaro Morishita, Tomoaki Doi, Takahiro Yoshida, Hiroaki Ushikoshi, Shozo Yoshida, Yoichi Maekawa, Shinji Ogura: Neutrophil elastase inhibition ameliorates endotoxin-induced myocardial injury accompanying degradation of cardiac capillary glycocalyx
SHOCK (2019 in press)