敗血症性ショックにおける 血管内皮細胞の機能異常

松田 直之^{1),2)}, 山本 誠士¹⁾, 畠山 登¹⁾, 服部 裕一¹⁾

要約：敗血症は感染を基盤とする全身性炎症反応症候群であり、ショックや多臓器不全に移行する重篤な病態である。重篤化した敗血症に対する根治的な治療法は現在も確立されておらず、未だ敗血症は集中治療領域での死因の第1位の病態である。敗血症に合併するショックの初期病態はNOやプロスタノイドの産生による体血管抵抗の減弱した血流分布異常性ショックである。しかし、敗血症の持続により血管内皮細胞障害が進行すると、ショック病態は体血管抵抗の高い末梢循環の損なわれた cold shock へ移行する。この血管内皮細胞障害を導く重要な因子として、血管内皮細胞のアポトーシスが関与する。敗血症血管では、Aktの活性が損なわれる傾向があり、血管内皮細胞のホメオスタシスが障害されるとともに、Badのリン酸化の低下によりアポトーシスが進行する。さらには、血管内皮細胞における Death 受容体ファミリーの細胞膜発現が高まり、FADDの増加とc-FLIPなどの抗アポトーシス因子の低下を伴うことにより、カスパーゼ8とカスパーゼ3が活性化する。このような敗血症病態における血管内皮細胞のアポトーシスの治療は今後注目されると考えられる。Akt活性を高めるHMG-CoA還元阻害薬の臨床応用や、カスパーゼ8およびカスパーゼ3、さらにはFADDの阻害を標的としたsiRNAを含めた創薬が期待される。

1. はじめに

ショックは急性循環不全と同義であり、血圧低下、組織低灌流、組織酸素代謝失調により、組織や臓器の恒常性が損なわれる病態である。敗血症性ショック、出血性ショック、アナフィラキシーショック、心原性ショック、神経原性ショック、外傷性ショック、熱傷

性ショックなどのさまざまな名称で呼ばれたショックも、1972年にはHinshawら(1)によりショックを導く心血管の病態機序を基盤として、循環血液量減少性ショック、血流分布異常性ショック、心原性ショック、拘束性ショックなどのように分類が再編成された。従来、ショックは、正常者であれば収縮期血圧90 mmHg以下、高血圧症患者であれば通常の収縮期血圧の60 mmHg以上の低下、また、収縮期血圧が110 mmHg以下の低血圧患者であれば20 mmHg以上の血圧低下で診断される。このような血圧低下状態では、速やかに微小循環障害を改善することが必要であり、ショックの診断と治療を急ぐことが必要とされる。Sepsis(敗血症)は、このようなショックを惹起する代表的病態として知られている。

現在、敗血症は、1991年の米国胸部疾患学会(American College of Chest Physicians)と米国集中治療医学会(Society of Critical Care Medicine)の合同会議における定義に従い、感染症を基盤とした全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)と説明されている(2)。2001年にAngusら(3)が報告した米国情勢調査の取りまとめでは、1995年の敗血症重症化に伴う死亡者数は米国7つの州におけるだけでも751,000名であり、死亡率は28.6%である。米国の救急救命センターで治療される重症敗血症患者数は、現在も年間50万人を超え、敗血症による死亡率は約30%と見積もられている(4)。本邦の国勢調査でも敗血症を主因とする死亡者数は年間約7000名レベルであり、癌や慢性心不全などの慢性病態における合併例を含めると年間推定約5万人以上が敗血症を契機にショックや播種性血管内凝固症候群(DIC)や多臓器不全を合併し、死亡していると推測される。現在

キーワード：敗血症、アポトーシス、遺伝子治療

¹⁾ 富山大学大学院医学薬学研究部 分子医科薬理学講座 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

²⁾ 京都大学大学院医学研究科 初期診療・救急医学分野 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54)

e-mail: nmatsuda@kuhp.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日：2007年10月4日、依頼原稿

Title: Vascular endothelial dysfunction in septic shock

Author: Naoyuki Matsuda, Seiji Yamamoto, Noboru Hatakeyama, Yuichi Hattori

NF- κ B の活性化により増加する代表的な炎症性物質

Proinflammatory cytokines

Tumor necrosis factor α
 Interleukin-1 β
 Interleukin-2
 Interleukin-6
 Granulocyte colony-stimulating factor
 Macrophage colony-stimulating factor

Chemokines

Interleukin-8
 Macrophage inflammatory protein 1 α
 Macrophage chemotactic protein 1
 Eotaxin
 Gro- α , - β , - γ
 ENA-78

Inflammatory enzymes

Inducible nitric oxide synthase
 Inducible cyclooxygenase-2
 5-lipoxygenase

Adhesion molecules

Intracellular adhesion molecule-1
 Vascular cell adhesion molecule-1
 E-selectin

Coagulation

Tissue factor
 Plasminogen activator inhibitor-1

もなお、本邦における集中治療室の死因の第1位は、敗血症である。

米国では敗血症救命率を高める目的で、2004年に米国集中治療医学会が中心となり、Surviving Sepsis Campaign guidelines (敗血症救命ガイドライン) が作成された(5)。この Surviving Sepsis Campaign guidelines においても、重症敗血症や敗血症性ショックにおける血管内皮細胞保護の治療が重視されている。本稿では、急性期の代表的病態である敗血症性ショックの病態を取り上げ、合併する血管内皮細胞障害を分子薬理学的観点より再考する。

2. 敗血症性ショックの2つの様相 — Warm Shock と Cold Shock —

敗血症性ショックの初期は、末梢血管拡張に伴う血流分布異常性ショックを主病態とする。Toll-like 受容体 (TLR), tumor necrosis factor 受容体 (TNF-R), interleukin 受容体 (IL-R) などの炎症性受容体は、マクロファージや好中球などの炎症性浸潤細胞だけではなく、血管内皮細胞や主要臓器のさまざまな細胞にも存在する(6-8)。これらの炎症性受容体は、各リガンド刺激により転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) (9) を活性化させ、NO やプロスタノイドなどの血管

図1 ウサギ敗血症モデルにおける敗血症性ショック

Lipopolysaccharide (LPS) 100 μ g を耳静脈より投与したウサギ敗血症モデルの血行動態を示した。LPS 投与直後に一過性の血圧 (BP) の低下と心拍数 (HR) の低下が生じるが、1時間以内に循環動態は一時的に改善する。LPS 投与約2時間後からHRの上昇を認めるが、LPS 投与後3時間までは血圧が維持される。その後3時間から6時間までは直腸温と耳介温の開離のない末梢の温暖な体血管抵抗の減弱した warm shock が惹起される。LPS 投与6時間後以降から耳介温の低下が具現化し、10時間後には直腸温と耳介温の極端な開離を伴う cold shock へ移行する。耳動脈を用いた観血的動脈圧測定は、LPS 投与後6～8時間以降に不可能となる。(文献11より改変)

拡張物質や、TNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子、および凝固活性化物質を転写段階から過剰産生する(表1)。敗血症性ショックでは、血管収縮物質として知られるエンドセリンの産生が高まることも示唆されているが(10)、上述した血管拡張物質による血管拡張作用が血管収縮物質作用を上回るため、罹患初期では血管拡張が主な特徴となる。しかし、敗血症性ショックの様相は、血管内皮細胞障害の進行に伴い、末梢循環の保たれた warm shock から、末梢循環の損なわれた cold shock へ移行する。敗血症病態の基盤である全身性炎症は血管内皮細胞や心機能にも及ぶことが、近年、明らかとされてきた。

我々は、TLR4のリガンドである lipopolysaccharide (LPS) 100 μ g/kg を耳静脈より投与したウサギ敗血症モデルで、耳動脈における観血的動脈圧測定を行い、循環動態を時系列で評価した(11)。この敗血症モデルでは、LPS 投与直後の一過性の循環抑制の後、循環は一時的に改善し、LPS 投与後3時間までは血圧が維持される(図1)。その後3時間から6時間までは末梢の温暖な体血管抵抗の減弱した warm shock に移行する。この時期より心収縮性は減弱するが、心後負荷の減弱により見かけ上、心拍出量は維持される(11)。しかし、LPS 投与6時間後以降から末梢温の低下が具現

化し, 10 時間後には末梢温の極端な低下を伴う cold shock へ移行し, 心収縮性低下も具現化する. この敗血症モデル 10 時間の腸間膜動脈におけるウエスタンブロット解析では, iNOS 発現が 6 倍以上に増加していたが, eNOS 発現は 40% レベルに抑制され, さらに eNOS リン酸化は正常の約 40% レベルに低下していた(12,13). ずり応力に依存しない血流の不均等分布は iNOS の過剰発現によりもたらされる. この敗血症ウサギモデルに iNOS 選択的阻害薬 FR260330 を静脈内投与すると, 一過性に血圧の上昇が得られるが, cold shock に転じる時期が早まることも観察できる. 敗血症性ショックにおいて eNOS の機能を維持することが, 血管ホメオスタシスを維持する上で重要となり, eNOS リン酸化の抑制には, PI3 キナーゼと Akt の活性の低下が関与していた(13).

Akt は AKT8 と呼ばれるレトロウイルス由来の癌遺伝子 v-akt に対応する癌原遺伝子であり, その構造が PKA や PKC に類似するため, PKB とも呼ばれるセリン・スレオニンキナーゼである. Akt は, 血管内皮細胞にも豊富に存在し, ずり応力, VEGF, angiopoietin-1, アドレノメデュリン, スフィンゴシン 1-リン酸などの刺激により, PI3 キナーゼを介してリン酸化される(14,15). 一方, eNOS は, 血管内皮細胞の直径 50-80 nm のカベオラに多く存在し, その Ser1177 がリン酸化 Akt によりリン酸化されことで持続的に活性化される. Akt は, eNOS の活性調節以外にも, mTOR を介した蛋白合成, Bad を介したアポトーシスの抑制, さらには GLUT4 の細胞膜移動を介したグルコース代謝にも関与し, 血管内皮細胞のホメオスタシスの維持に不可欠であることが示唆されている(14,15).

前述したウサギ敗血症モデルを用いて Akt リン酸化の評価を行った結果, 我々は, 敗血症性ショック 10 時間の腸間膜動脈で Akt リン酸化が約 40% に低下することを確認した(13). この状態では, eNOS のみならず, Bad のリン酸化も約 40% に減弱していた. 水溶性 HMG-CoA 還元阻害薬として知られるフルバスタチンは, このような急性期敗血症病態においても, 血管内皮細胞の Akt 活性を改善し, eNOS や Bad のリン酸化を維持し, 敗血症病態を改善した(13). HMG-CoA 還元阻害薬は, 血管内皮細胞における Kruppel-like transcription factor 2 (KLF2) の活性化を介して, eNOS やトロンボモジュリン, 活性化プロテイン C の産生を高め, エンドセリン 1 の産生を抑制することも示唆されている(16). 敗血症性ショックでは, その進行に伴い血管内皮細胞における Akt の活性化が損なわれるため, 現在用いることのできる治療

薬として, HMG-CoA 還元阻害薬の臨床応用が期待される(17).

3. 敗血症性ショックと血管内皮細胞のアポトーシス

敗血症病態の進行に伴い, アポトーシスを生じた血管内皮細胞が血中に検出される可能性が, 示唆されている(18,19). Circulating apoptotic endothelial cells(CAECs)は, 全身性エリテマトーデス (SLE), 血小板減少性紫斑病, sickle cell anemia などでも観察され, 血管内皮細胞障害を示唆する臨床所見として注目されている. SLE の増悪期では, 血中を巡回する血管内皮細胞が検出され, その約 89% が CAECs と報告されている(20). このような CAECs が, 敗血症病態の増悪期に検出される可能性が示唆されている.

これまでに, 血管内皮細胞の生存シグナルは, ずり応力, vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), インスリン, angiopoietin-1, fibroblast growth factor-2 (FGF-2) などの成長因子や, $\beta 1$ インテグリン, および NF- κ B 活性などを介することが知られてきた(15, 21, 22). ずり応力や成長因子や インテグリンシグナルは, PI3 キナーゼを介して前述した Akt シグナルを活性化させることにより, カスパーゼ 9, Bax, Bad などのアポトーシス促進因子を不活化させるとともに, 抗アポトーシス因子である Bcl-2 や inhibitors of apoptosis protein (IAPs) を増加させる(22). 炎症病態における NF- κ B 活性は, FLICE-inhibitory protein (FLIP), IAPs, BclX などの転写を高め, 血管内皮細胞においても抗アポトーシスとして働く可能性も示唆されている(23). しかし, 敗血症病態の血管内皮細胞では, 経時的に Akt 活性が損なわれるばかりか, NF- κ B 活性は 2 相性のピークの後に減じる傾向があり, 抗アポトーシス因子の転写段階での産生が減じることが観察できる.

一方, アポトーシスを進行させる細胞死の促進要因として, 血管内皮細胞における Death 受容体 (DR) ファミリーの発現が関与している(24). アポトーシス誘導受容体として知られている TNF-R1, CD95 (Fas), および DR4 (TRAIL 受容体 1), DR5 (TRAIL 受容体 2) は, 血管内皮細胞にも存在する. これらの DR ファミリーは, Fas-interacting death domain (FADD), procaspase8, procaspase10, および c-FLIP と会合し, death-inducing signal complex (DISC) を血管内皮細胞で形成している (図 2). カスパーゼ 8 の活性部位を阻害することが知られている C-FLIP は, 敗血症の進行に伴い血管内皮細胞を含めた肺などのさまざまな

図2 血管内皮細胞と Death 受容体シグナル

リンパ球や樹状細胞などで解明されてきた Death 受容体 (DR) シグナルは、血管内皮細胞でも同定できる。血管内皮細胞にも、アポトーシス誘導受容体として知られている TNF-R1, Fas (CD95), および DR4 (TRAIL 受容体 1), DR5 (TRAIL 受容体 2) の発現が認められ、TRADD, IKK を介した NF- κ B の活性化および、FADD を介したアポトーシス誘導の 2 つの主なシグナル伝達が存在する。NF- κ B の活性化により過剰産生される FLIP や BclX などは、アポトーシス抑制因子として働く。しかし、敗血症進行とともに、DR ファミリーの細胞膜発現が高まり、さらに FADD が増加することにより、血管内皮細胞は炎症性細胞としての機能を終え、アポトーシスを起こす可能性がある。TNF-R1: tumor necrosis factor receptor 1, TRADD: TNF receptor-associated death domain protein, IKK: inhibitory- κ B kinase, TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor, FADD: Fas interacting death domain protein, NF- κ B: nuclear factor- κ B, FLIP: FLICE inhibitory protein.

図3 マウス大動脈における敗血症病態のアポトーシス

A: 正常 BALB-C マウスの大動脈のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色像 ($\times 400$). B: 盲腸結紮・穿孔 (CLP) 後 24 時間の BALB-C マウスの大動脈の HE 染色像 ($\times 400$). C: 正常 BALB-C マウスの大動脈の TUNEL 染色像 ($\times 400$). D: CLP 作成 24 時間後の BALB-C マウスの大動脈の TUNEL 染色像 ($\times 400$). CLP マウスの大動脈では、血管内皮細胞の膨隆や剥離所見 (B; 矢印) とともに、TUNEL 染色陽性像 (D; 矢印) が観察された。(文献 26 より改変)

臓器で減少する傾向を示す(25). さらに、最近の我々の研究では、DR ファミリーや FADD が敗血症病態の血管内皮細胞で過剰発現することが確認された。敗血症病態でも、DISC の活性化の後にカスパーゼ 3 が活

性化し、アポトーシスが進行する可能性がある。

雄性 BALB-C マウスの盲腸先端の約 5 mm 結紮し、23G 針を貫通させて作成する盲腸結紮・穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) により、敗血症病態マウ

スを作成できる。この CLP マウスは、約 2 日以内に死亡するが、NF- κ B 活性は約 10 時間と約 15 時間レベルで 2 相性にピークを示し、その後、徐々に減弱する。正常マウスと CLP 後 24 時間のマウス大動脈のヘマトキシリン・エオジン染色像とタネル染色像を図 3 に示した。マウス大動脈では、約 5 層の平滑筋層の表面に 1 層の血管内皮細胞層が観察される。正常状態の大動脈では血管内皮細胞の膨隆や脱落は観察されないが、敗血症の進行とともに、血管内皮細胞の膨隆や脱落が観察できる。TUNEL 染色では、膨隆した血管内皮細胞の核に一致した TUNEL 染色陽性像が観察される。さらに、血管平滑筋細胞も、血管内皮細胞に遅れてタネル陽性像を呈するようになる。この所見からも、血管内皮細胞の脱落や機能低下にはアポトーシスが関与することが示唆される。摘出した大動脈におけるウエスタンブロット解析では CLP 後 24 時間でカスパーゼ 8 とカスパーゼ 3 の活性化が確認され、さらに、DNA 断裂化が観察された(26)。このアポトーシス進行の時期に一致して、PI3 キナーゼの細胞膜へのリクルートメントと、Akt、および Bad のリン酸化が低下していた。

敗血症進行の結果として生じるカスパーゼ 8 とカスパーゼ 3 の活性化に対して、カスパーゼ 8 とカスパーゼ 3 の siRNA を作成し、リポゾーム法で尾静脈より投与する試みを行った(26)。正常マウスでは、大動脈への siRNA の十分な導入が期待できないものの、敗血症の進行に伴いリポゾーム法による大動脈への siRNA の取り込みが確認できた。結果として、NF- κ B 活性の高まる CLP 作成後 10 時間レベルで siRNA を導入することにより、CLP マウスにおける導入効率を最も高めることができた。約 25 g のマウスに対して、50 μ g レベルのカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 3 の siRNA の同時投与により、大動脈をはじめとする血管系での血管内皮細胞のアポトーシスが抑制され、生存率が 100% に高められた(26)。これら検討からも、敗血症病態における血管内皮細胞のアポトーシスは、敗血症死亡率を高める重要な因子であると考えられる。敗血症大動脈ではカスパーゼ siRNA を用いたアポトーシスの抑制により、PI3 キナーゼの細胞膜へのリクルートメントが改善し、Akt および Bad のリン酸化が高められることも確認できた(26)。

4. 今後の研究および創薬の展望

敗血症は、感染を基盤とした全身性炎症反応症候群である。この進行過程において、血管内皮細胞の NF- κ B 活性を中心とする炎症性シグナルが、DR F

ァミリーを介したアポトーシスシグナルにスイッチし、血管内皮細胞のアポトーシスや脱落が生じる。DISC の活性化を阻止するためのカスパーゼ阻害薬の臨床応用、また、FADD やカスパーゼをターゲットとした siRNA などの遺伝子創薬は、長期化した敗血症管理に不可欠と考えられる。現在臨床使用することのできる HMG-CoA 還元阻害薬も、Akt の活性化をもたらす点で敗血症病態の血管内皮細胞保護に有効と期待される。以上のように、急性期病態における血管内皮細胞障害として、敗血症性ショックを再考した。敗血症の重症化を阻止する治療法の考案が、現在も期待されている。

文 献

- 1) Hinshaw LB, et al. The fundamental mechanisms of shock. Plenum Press; 1972.
- 2) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Crit Care Med. 1992;20:864-874.
- 3) Angus DC, et al. Crit Care Med. 2001;29:1303-1310.
- 4) Vincent JL, et al. Contrib Nephrol. 2007;156:64-74.
- 5) Dellinger R, et al. Crit Care Med. 2004;32:858-873.
- 6) Frantz S, et al. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007;4:444-454.
- 7) Matsuda N, et al. J Pharmacol Sci. 2006;101:189-198.
- 8) Zauli G, et al. Cytokine Growth Factor Rev. 2006;17:245-257.
- 9) Matsuda N, et al. Mol Pharmacol. 2005;67:1018-1025.
- 10) Iskit AB, et al. Acta Pharmacol Sin. 2003;24:953-957.
- 11) Matsuda N, et al. Anesthesiology. 2000;93:1465-1473.
- 12) Matsuda N, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2003;307:175-181.
- 13) Matsuda N, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2006;319:1348-1354.
- 14) Shiojima I, et al. Circ Res. 2002;90:1243-1250.
- 15) Somanath PR, et al. Cell Cycle. 2006;5:512-518.
- 16) Atkins GB, et al. Circ Res. 2007;100:1686-1695.
- 17) Matsuda N. Cardiovasc Anesth. 2007;11:57-61.
- 18) Mutunga M, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:195-200.
- 19) Hotchkiss RS, et al. Crit Care Med. 2004;32:901-902.
- 20) Rajagopalan S, et al. Blood. 2004;103:3677-3683.
- 21) Downward J. Semin Cell Dev Biol. 2004;15:177-182.
- 22) Munoz-Chapuli R, et al. Cell Mol Life Sci. 2004;61:2224-2243.
- 23) Karin M, et al. Nat Immunol. 2002;3:221-227.
- 24) Hehlhans T, et al. Immunology. 2005;115:1-20.
- 25) Matsuda N. J Anesth. 2007;21:118-119.
- 26) Matsuda N, et al. Cardiovasc Res. 2007;76:132-140.

著者プロフィール

松田 直之 (まつだ なおゆき)

京都大学大学院医学研究科 初期診療・救急医学分野 准教授、京都大学病院救急部 副部長。

◇北海道大学医学部卒業、北海道大学大学院医学研究科博士課程修了、北海道大学大学院医学研究科救急医学分野助手、

富山大学大学院医学薬学研究部分子医科学講座准教授、富山大学病院麻酔科診療教授を経て、2007 年 9 月より現職。日本集中治療医学会認定専門医、日本救急医学会認定専門医、日本麻酔科学会認定専門医・指導医、博士 (医学)。◇研究テーマ：全身性炎症反応症候群と多臓器不全の病態解析。◇趣味：魚釣り、哲学、芸術全般。