

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08910

研究課題名(和文)ゲノム解析で導出した敗血症重症化因子SVEP1の機能解明と敗血症新規治療への展開

研究課題名(英文)Elucidation of the function of SVEP1 in sepsis and development of novel treatment for sepsis

研究代表者

栗田 健郎 (Kurita, Takeo)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60802569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では敗血症におけるSVEP1の動的変化を明らかにすることを目的とし、マウスを用い、手術なしモデル、単開腹モデル、腹腔内敗血症モデル(盲腸結紮穿孔)を作成し、SVEP1の遺伝子発現・タンパク質産生、細胞ごとの動的変化を比較した。肺でSVEP1の遺伝子発現とタンパク質産生が有意に高く、敗血症により、肺でのSVEP1遺伝子発現やタンパク質量が減少した。肺において敗血症の早期に、SVEP1を有する血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞が減少し、SVEP1を有する血球系細胞が増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、敗血症における細胞外マトリックスタンパク質であるSVEP1の遺伝子発現・タンパク質産生・細胞ごとの動態を明らかにすることができた。生体におけるSVEP1と敗血症に関する報告はこれまでになく、本研究で得られた結果は新規性が高い。本研究結果をもとに、SVEP1の敗血症における機能を解明するさらなる研究に展開することが期待でき、その結果、敗血症のさらなる病態解明や、新規治療法の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association studies of sepsis identified SVEP1 as a genetic risk factor. However, investigation on SVEP1 in sepsis is few. Therefore, we investigated how gene expression and protein levels of SVEP1 alter after sepsis stimulation in mice. No surgery, sham surgery, and abdominal sepsis mice were compared.

Lung has significantly high gene expression and protein production of SVEP1 in the baseline condition. After septic stimulation, SVEP1 gene expression and protein production significantly decreased in the lung. In the flow-cytometry analysis, sepsis mice have significantly decreased CD31^{high} / SVEP1^{high} and LYVE-1^{high} / SVEP1^{high} cells and increased CD45.2^{high} / SVEP1^{high} cells compared to the sham surgery model.

Sepsis mice had decreased SVEP1 gene expression and protein production in the lung. Sepsis mice had decreased SVEP1^{high} vascular endothelial cells and lymphatic endothelial cells, and increased SVEP1^{high} hematopoietic cells.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：敗血症 SVEP1 遺伝子多型 血管透過性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は未だ致死率の高い病態の一つであり、病態解明や新規治療法の創出は世界的な課題である。敗血症の転帰には遺伝的素因が関係し、網羅的な遺伝子多型解析により、細胞外マトリックスタンパク質 SVEP1 に関する遺伝子多型が敗血症の重症化と強く関係することが明らかとされた。SVEP1 の機能について、近年、胎生期のリンパ管形成や血管内皮安定化に重要な機能を果たすことが明らかとなったが、未だ機能の全容は解明されておらず、敗血症における機能はほとんど解明されていない。SVEP1 の敗血症において果たす機能を明らかにすることは、敗血症の病態に関する知見を深め、今後新規治療法の創出に寄与しうると考えられる。

そこで、敗血症における細胞外マトリックスタンパク質 SVEP1 の機能を明らかにすることを目的に、本研究を計画した。

2. 研究の目的

敗血症と SVEP1 の関係を研究することは、敗血症の病態のさらなる解明につながり、新規治療の開発の可能性を拓げるものと期待できる。そこで、「敗血症において細胞外マトリックスタンパク質 SVEP1 がいかなる機能を果たすのか」を問いとした。

- (1) SVEP1 いかなる臓器で発現が多いのか明らかにすること
 - (2) 敗血症において、SVEP1 の遺伝子発現量やタンパク質量が変化するか明らかにすること
 - (3) 敗血症時に、細胞ごとに SVEP1 がそのような動態を示すのかを明らかにすること
- を目的とした。

3. 研究の方法

野生型 C57BL/6, 8-12 週齢マウスを用いた。

(1) 侵襲を全く加えない状態で、心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓・小腸・大腸を対象臓器に、qRT-PCR 法で各臓器における SVEP1 遺伝子発現を比較した。また Western-blot 法で各臓器におけるタンパク質量を比較した。

(2) 手術なしモデル(no surgery: N.S.), 単開腹モデル(Sham), 腹腔内敗血症モデル(盲腸結紮穿孔, cecal ligation and puncture: CLP)を作成した。Sham モデルおよび CLP モデルでは、刺激後 2 時間/6 時間/24 時間のタイムポイントで評価した。N.S, Sham 2h/6h/24h, CLP 2h/6h/24h の 7 つのモデルにおいて、肺を対象臓器に、qRT-PCR 法で SVEP1 の遺伝子発現・Western-blot 法でタンパク質産生、Flowcytometry 法で細胞ごとの動的変化を評価し、比較した。

4. 研究成果

(1) 各臓器での SVEP1 遺伝子発現とタンパク質量の比較

SVEP1 遺伝子発現は、心臓・肝臓・腎臓・小腸・大腸などの他の臓器に比べて、肺と脾臓で高発現していた。肺では 34.7 倍、脾臓では 13.1 倍であった(Fig.1)。

SVEP1 タンパク質は、肺で SVEP1 90 kDa のバンドを確認することができた(Fig.2)。

以上から、SVEP1 の遺伝子発現やタンパク質量は肺で多いことが明らかとなった。

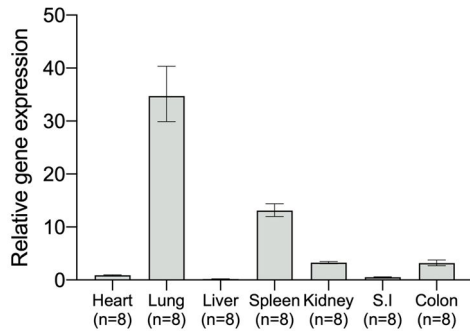


Fig.1

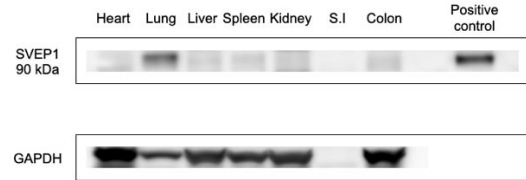


Fig.2

(2) 敗血症刺激における肺での SVEP1 遺伝子発現量の変化

敗血症刺激における肺での SVEP1 遺伝子発現は、侵襲なし(N.S.)に比較して、Sham2h, CLP2h, CLP6h, CLP24h で有意に低下し、さらに各タイムポイントにおいて Sham に比較し CLP で有意に発現量が低下した(Fig.3)。この結果から、外科侵襲早期には SVEP1 遺伝子発現が低下すること、および敗血症刺激により SVEP1 遺伝子発現はさらに低下し低い状態のままとなることが明らかとなった。

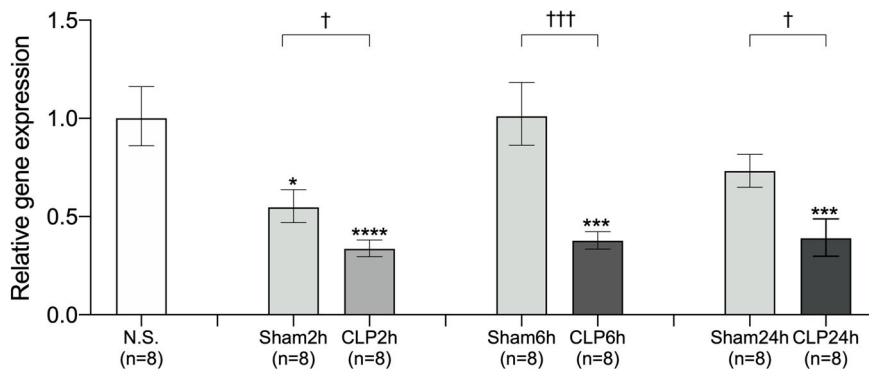


Fig.3

(3) 敗血症刺激におけるハイデの SVEP1 タンパク質量の変化

SVEP1 のタンパク質量は、侵襲なし(N.S.)に比較して、Sham2h, CLP2h, で有意に減少し、さらに Sham2h に比較し CLP2h で有意に減少した(Fig.4)。外科侵襲および敗血症刺激早期でタンパク質量が減少すること、さらに敗血症刺激が SVEP1 タンパク質量の減少を助長することが明らかとなった。

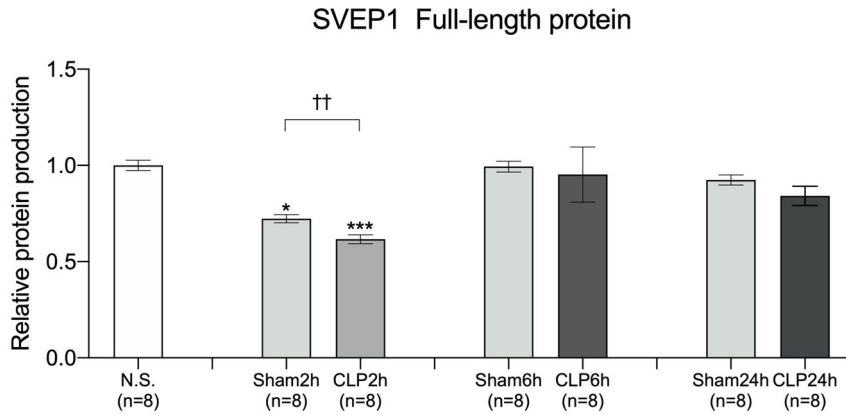


Fig.4

(4) 敗血症刺激による肺細胞での、SVEP1 の動態

肺において、敗血症刺激で細胞ごとに SVEP1 がどのような動態をとるのか、フローサイトメトリーで比較した。

血管内皮細胞に関して CD31 抗体を用いて評価した。侵襲なし(N.S.)に比較して、CLP2h, CLP6h, Sham24h で CD31^{high}/SVEP1^{high} 細胞の割合が有意に少なく、Sham と CLP の比較では刺激後 2 時間 6 時間において CLP で有意に CD31^{high}/SVEP1^{high} 細胞の割合が低下した(Fig.5)。この結果から、CD31^{high}/SVEP1^{high} 細胞の割合は敗血症刺激により減少することが明らかとなった。

続いて、リンパ管内皮細胞に関して LYVE-1 抗体を用いて評価した。侵襲なし(N.S.)に比較して、CLP6h, CLP24h で LYVE-1^{high}/SVEP1^{high} 細胞の割合が有意に少なく、さらにいずれのタイムポイントでも Sham に比較して CLP で LYVE-1^{high}/SVEP1^{high} 細胞の割合が少なかった(Fig.6)。この結果から、LYVE-1^{high}/SVEP1^{high} 細胞の割合は、敗血症刺激により減少することが明らかとなった。

最後に血球系細胞に関して、CD45.2 抗体を用いて評価した。Sham と CLP を比較すると、刺激後 2 時間 6 時間のタイムポイントで CD45.2^{high}/SVEP1^{high} の細胞の割合が有意に増加した(Fig.7)。この結果から CD45.2^{high}/SVEP1^{high} の細胞の割合は敗血症刺激により早期に増加することが明らかとなった。

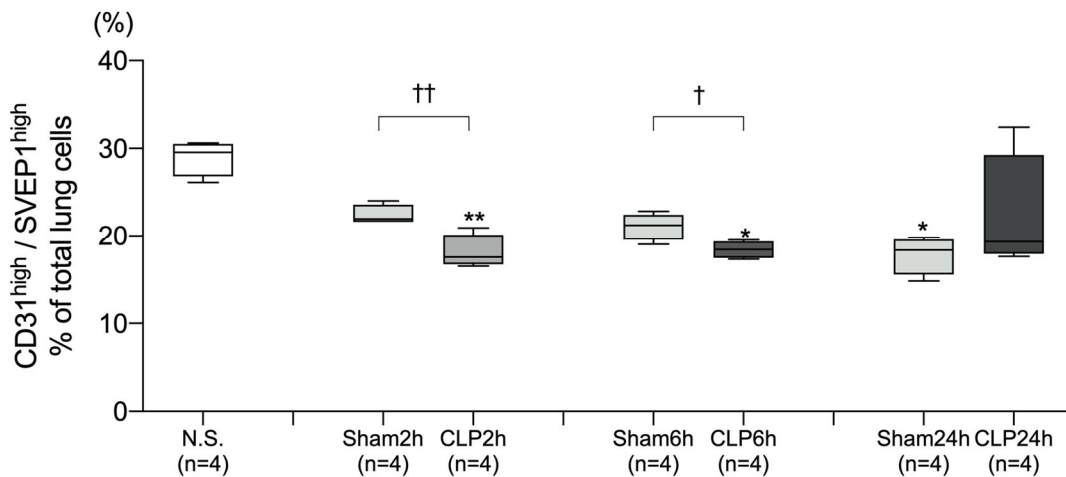


Fig.5

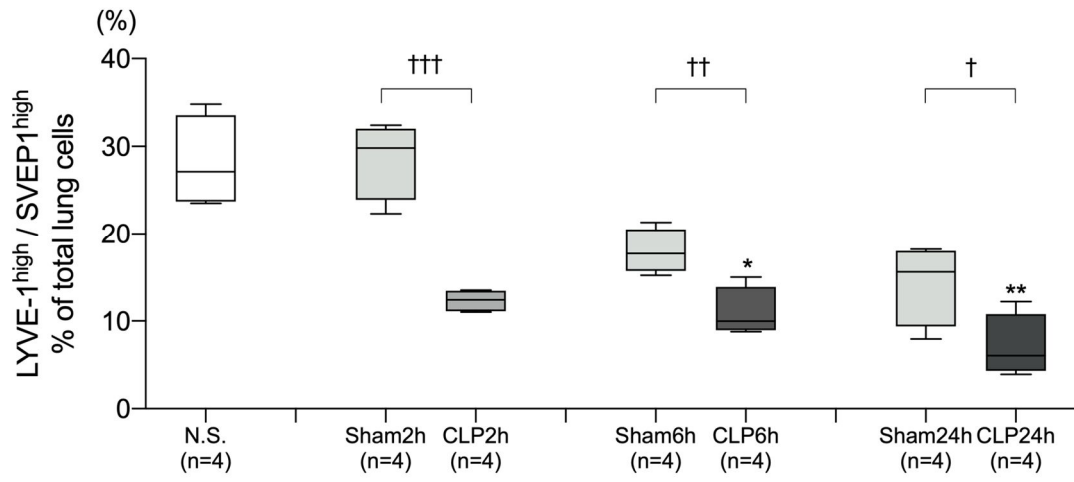


Fig.6

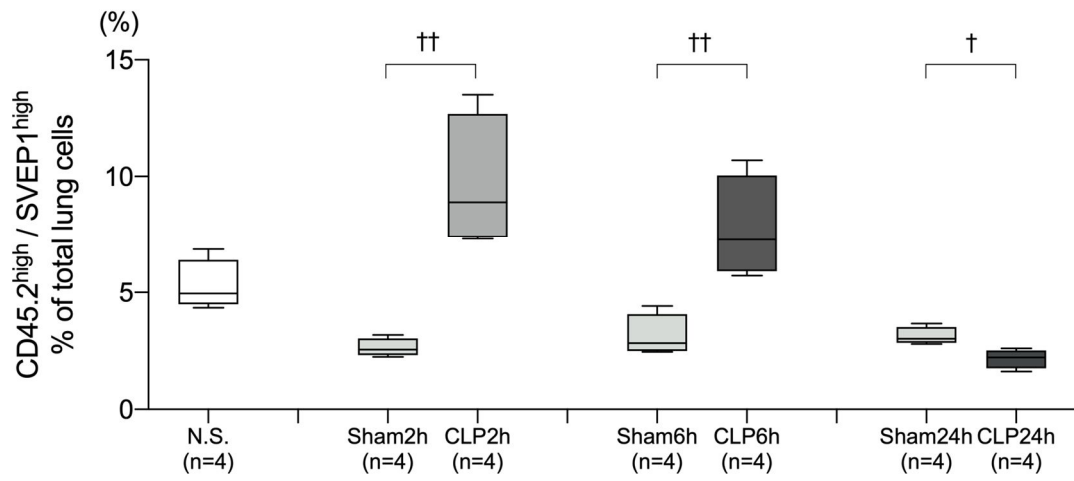


Fig.7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗田 健郎
2. 発表標題 敗血症における細胞外マトリックスタンパク質SVEP1の機能解明
3. 学会等名 第34回千葉集中治療研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田 健郎、中田 孝明、島居 傑、岩瀬 信哉、坂本 明美、藤村 理紗、幡野 雅彦、織田 成人
2. 発表標題 細胞外マトリックス蛋白質SVEP1の敗血症での動態
3. 学会等名 第33回千葉集中治療研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中田 孝明 (Nakada Taka-aki) (20375794)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------