

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08915

研究課題名(和文) 障害を受けた灌流下培養血管内皮細胞に高血糖、高酸素が及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of hyperglycemia and hyperoxia on impaired perfusion cultured vascular endothelial cells

研究代表者

小幡 由佳子 (Obata, Yukako)

浜松医科大学・医学部附属病院・協定訪問共同研究員

研究者番号：90432210

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)：虚血再灌流や重症感染症といった種々のストレスは生体に急性の耐糖能障害を引き起こす。周術期管理や重症患者管理においても血糖値の管理が生命予後に重要と言われ、これらの患者では血糖管理は必須となっている。また高血糖の持続は、それ自体が酸化ストレスを生じる。このことから、我々は高濃度グルコース群と通常濃度グルコース群の培養細胞に蛍光色素を投与し、蛍光顕微鏡で蛍光強度の変化を測定し活性酸素の産生量を比較したが、今回の条件下では両群に差は見られなかった。実験条件の再検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮は炎症や虚血再灌流障害の際に重要な役割を果たし、様々なシグナル伝達を介してメディエータとして働いている。生体内では血管内に血液が流れることによりシェアストレスがかかり、血管内皮細胞が様々な反応を起こしている。しかし今まで報告されている血管内皮細胞を用いた研究では静止モデルが使われており、灌流したものはほとんどない。我々は実際に培養開始時期から血管内皮細胞に対して灌流を行い、シェアストレス下で生体の血管内皮に類似した細胞を作成した。今後、このモデルを更に発展させて高血糖や高酸素のストレス下での実験を実現できれば、臨床での重症病態を再現でき、病態の解明に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Various stresses such as ischemia-reperfusion and severe infections can cause acute glucose intolerance in the body. In perioperative management and critical care, management of blood glucose levels is said to be important for prognosis, and blood glucose management is essential for these patients. Furthermore, sustained hyperglycemia itself causes oxidative stress.

For this reason, we administered a fluorescent dye to cultured cells in the high-concentration glucose group and the normal-concentration glucose group, measured the change in fluorescence intensity with a fluorescent microscope, and compared the amount of reactive oxygen produced, but no difference was observed between the two groups under the conditions used in this study. It was considered necessary to reconsider the experimental conditions.

研究分野：敗血症

キーワード：高血糖 活性酸素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流時や高血糖状態において発生する活性酸素種は組織障害をもたらす。活性酸素種の発生源は白血球や血管内皮細胞であり、活性酸素種は炎症性メディエータとして働く以外に、脂質やタンパク質と反応して直接細胞障害を引き起こす。

虚血再灌流や重症感染症といった種々のストレスは生体に急性の耐糖能障害を引き起こす。周術期管理や重症患者管理においても血糖値の管理が生命予後に重要と言われ、これらの患者では血糖管理は必須となっている。また高血糖の持続は、それ自体が酸化ストレスを生じる。

一方で組織低酸素症の治療では、低酸素障害の改善のため高濃度酸素がしばしば投与される。臨床の場では特に肺炎などの重症感染症の際には低酸素状態を併発することがほとんどであるため高濃度酸素が投与される。また脳梗塞や心筋梗塞などの臓器虚血の際にも酸素投与が行われることが多い。酸素は細胞が生きて行く上で必要不可欠であるが、反面、活性酸素種は酸素分子から生じるため高濃度酸素は障害性に作用すると考えられている⁽¹⁾。臨床の場でも高濃度酸素が予後に悪影響を及ぼす可能性は考えられているが、まだ確実な結果が得られていないため低酸素を避けるために高濃度酸素投与が行われているのが現状である。この研究で低酸素後の高酸素がどのような影響を引き起こしているのか、またそのメカニズムも明らかにしていきたいと考えた。

2. 研究の目的

糖も酸素も細胞が生きて行く上で必要不可欠である。我々は以前、低酸素再酸素刺激を受けた血管内皮細胞に対して、低酸素時における低血糖は更なる酸化ストレスにはならないことを報告した⁽²⁾。しかし虚血再灌流後や重症感染症のストレス後の血管内皮細胞に対して急性高血糖状態と同時に高濃度酸素投与が行われた場合、酸化ストレスのシグナルが変化するか、また細胞障害や機能に変化が生じるかについての報告は今までない。更に今まで報告されている血管内皮細胞を用いた研究では静止モデルを用いたものが多く、実際に灌流したものはほとんどない。細胞を還流下で培養することにより、細胞の形態や機能に違いが起こることが知られている。我々は実際に血管内皮細胞に対して細胞培養開始時期から還流を行うことで、より生理的条件下で培養細胞を完成させる予定である。これは実際の血管内皮に類似する構造や性質を持つと考えられ、更にこの細胞に灌流下で低酸素再酸素刺激または感染刺激を与えた後に高血糖、高酸素状態で灌流するモデルを作成し、その時の内因性活性酸素種の定量、細胞内シグナルおよび細胞機能の変化、細胞障害作用を示すかどうかを検討する。

3. 研究の方法

まず最初に灌流下培養血管内皮モデルの作成にとりかかった。

具体的には、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) を培養液 {EGMTM-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 (Lonza 社) に BulletKitTM (Lonza 社) を添加} を用いて培養後 ReagentPackTM 継代培養試薬 (Lonza 社) を用いて 3 世代まで継代した細胞を使用した。

この 3 世代目の HUVEC を灌流培養用の ibidi 社製 μ -Slide に播種し、培養開始から 1 日後に細胞が μ -Slide に接着したことを確認後、培養庫の中でベリスタポンプを使用し培養液を連続的に灌流しながら培養を開始した。

1. 灌流下培養血管内皮モデルを用い、低酸素再酸素化刺激を受けた血管内皮細胞に図 2 の装置を用い、急性高血糖状態、または高酸素状態のいずれか一方、または同時に両方の状態を作り後述の項目を測定し、通常血糖、通常酸素濃度の場合と比較する。
2. 灌流下培養血管内皮モデルを用い、リポポリサッカライドやインターロイキン、TNF- α などによる炎症刺激を受けた血管内皮細胞に急性高血糖状態または高酸素状態のいずれか一方、または同時に両方の状態を作り後述の項目を測定し、通常血糖、通常酸素濃度の場合と比較する。
3. 同様の状態を静置モデルでも作成し、灌流下モデルとの違いを調べ、シェアストレスの影響についても調査する。

測定項目

1) 活性酸素種の経時的变化、細胞障害 (ネクローシス) の測定

2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)、propidium iodide (PI) の蛍光色素を還流液中に 50 μ M の濃度で投与し、蛍光顕微鏡でコンフリオン状態の細胞の蛍光強度 (平均値) の変化を経時的に測定する。

2) 細胞障害 (アポトーシス) の検討

ミトコンドリアの膜電位は tetramethylrhodamine ethyl esters (TMRE)、細胞死 (アポトーシ

ス)の評価に Annexin 5 または CaspaTag™ Pan-Caspase In Situ Assay Kit, Fluorescein を蛍光顕微鏡で測定する。

3) 内皮細胞機能の評価

細胞内カルシウム濃度の変化 (fura-2/AM の蛍光値の解析)、血管拡張性物質 PGI₂ や NO の分泌反応性、細胞接着分子の発現量の変化などを測定する。

以上のことを予定していたが、灌流培養細胞モデルの作成に時間を要し、またそのモデルを用いた実験そのものが不成功となり、大幅な変更となった。

4. 研究成果

細胞を還流下で培養することにより、細胞の形態や機能に違いが起こることが知られており、我々は実際に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) を用い、灌流培養用の ibidi 社製 μ -Slide を使用し培養を行った。

培養開始から 1 日後に細胞が μ -Slide に接着したことを確認後から培養液を用いて灌流培養を開始した。その結果、6 日後には図 1 のような細胞を得ることができた。

一方で、静置培養も行いその形態を比較すると(図 2)、静置培養では無秩序に細胞が育っており、灌流された細胞群では一方方向に向かって細胞が列を為して育つことがわかった。

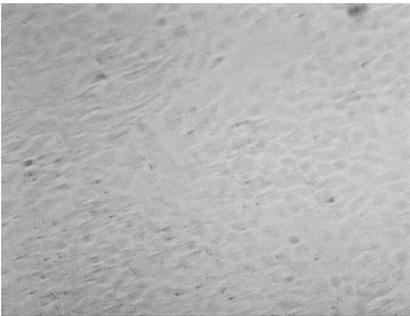


図 1

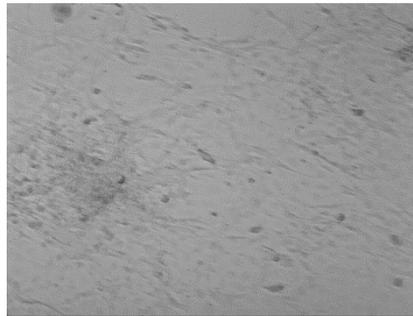


図 2

1) 活性酸素種産生の経時的变化

1)-1) 高濃度グルコース群と通常濃度グルコース群

静置培養で培養され、コンフリオン状態となった HUVEC を高濃度グルコース (250mg/dL) の環境に 4 時間置いた群と通常の培地 {グルコース濃度 (100mg/dL)} 群に分け、2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (50 μ M) の蛍光色素を投与し、蛍光顕微鏡で蛍光強度 (平均値) の変化を経時的に測定し活性酸素の産生量を比較した。

以下に結果を示す(図 3)が、この条件下では 2 群の活性酸素産生量に有意差は見られなかった。

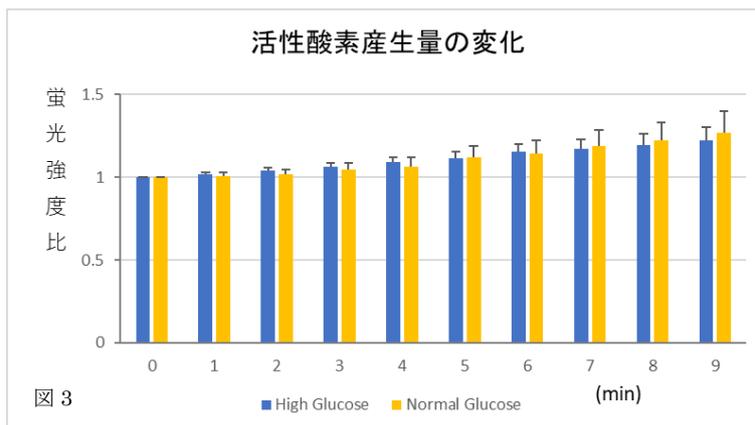


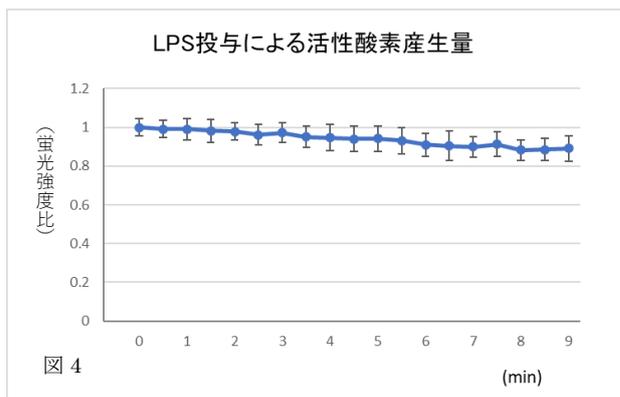
図 3

今後、高濃度グルコースへの暴露時間や更に高濃度のグルコースによる影響などを検討する必要があると考えられた。

2) LPS (Lipopolysaccharide) 投与下での活性酸素産生量

同様に静置培養群での LPS (Lipopolysaccharide) 投与下での活性酸素産生についても検討した。HUVEC を LPS に 5 時間暴露後、DCFH-DA (50 μ M) の蛍光色素を投与し、蛍光顕微鏡で蛍光強度 (平均値) の変化を経時的に測定し活性酸素の産生量を測定した。グラフ (図 4) に示す結果は通常のグルコース濃度で培養したもので、この状態においては活性酸素産生量は徐々に減少していた。

しかし、計測開始は LPS 投与後 5 時間以上経過してからであったため、その間の活性酸素産生量については検討しておらず、課題が残った。



当初の予定では灌流培養細胞モデルでの実験を目標としていた。しかし、細胞が空気泡に非常に弱く、一旦灌流液中や灌流ルート中に空気泡が混入してしまうと細胞に傷害が生じて剥離してしまうということが判明した。これに対応するように様々なことを試したが問題解決には至らず、また、同時に複数の細胞群を作成することができず、実験が進まない原因となった。このようなことから、灌流モデルでの実験は完遂することができなかった。

<引用文献>

- (1) Yukio Suzuki, Takuya Aoki, Osamu Takeuchi, Kazumi Nishio, Kouichi Suzuki, Atsushi Miyata, Yoshitaka Oyamada, Tomoaki Takasugi, Masaaki Mori, Hirofumi Fujita, Kazuhiro Yamaguchi
Effect of hyperoxia on adhesionmolecule expression in human endothelial cells and neutrophils.
Am. J. Physiol 1997; 272: 418-425
- (2) S. therade-Matharan, E. Laemmel, S. Carpentier, Y. Obata, T. Levade, J. Duranteau, E. Vicaut
Reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to reoxygenation after hypoxia and glucose depletion in mediated by ceramide.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005; 289: 1756-1762

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------