

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12061

研究課題名(和文) 生体内環境を構築したリアルタイムin vitro血管透過性評価法の開発と応用

研究課題名(英文) Detection of gap formation between vascular endothelial cells by biosensor

研究代表者

柳瀬 雄輝 (Yanase, Yuhki)

広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授

研究者番号：40452586

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)：表面プラズモン共鳴イメージング(SPRI)センサと、インピーダンス(IMP)センサを組み合わせることで、従来法では不可能であった時間的、二次元空間的分解能を持った細胞間結合状態を解析する装置を開発した。また、IMPセンサ上に血管内の環境を模擬した、in vitro血管透過性評価法を開発した。それを利用して、慢性蕁麻疹の増悪因子を加えると、いくつかの組み合わせで血管内皮細胞上に組織因子(TF)が高発現し、血漿存在下で強い血管透過性亢進が起こることを示した。さらに、単球、血管内皮細胞と血漿成分の共存存在下で、単球が発現するTFも血管透過性の亢進に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、インピーダンスセンサ等のバイオセンサを利用して血管内外起きるイベントをin vitro検出できることが明らかとなった。さらにその手法を利用して、センサ上に複雑な血管内外の環境を再現し、慢性蕁麻疹が起こる仕組みの一端を明らかにすることに成功した。本技術は、難治性慢性蕁麻疹の詳細な発症機序の解明と、新しい治療法の確立・治療薬の開発につながるものと期待する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a sensor which can detect distribution of refractive index (RI) and impedance changes on a sensor chip without any labeling in a real time manner. Using the impedance sensor, we demonstrated that tissue factor (TF)-expressed on vascular endothelial cells (HUVECs) activate extrinsic coagulation cascade and induce gap formation of vascular endothelial cells in the presence of plasma. Moreover, we clarified TF expression levels are increased in patients with chronic spontaneous urticarial (CSU), and TF expressed on monocytes also induce activation of extrinsic coagulation cascade and then cap formation of vascular endothelial cells in the presence of human plasma by means of impedance sensor.

研究分野：アレルギー、バイオセンサ

キーワード：バイオセンサ 表面プラズモン共鳴 インピーダンス 慢性蕁麻疹 血液凝固

1. 研究開始当初の背景

生体の組織界面には強固な細胞間結合に基づくバリアが形成されており、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。そのため、バリアを形成する上皮・内皮細胞間の結合の状態、機能、薬物に対する影響を解明・評価することは、臨床的に極めて重要な課題である。血管の内壁は血管内皮細胞が互いに強固に結合してバリア構造を形成することにより、通常、細胞・血漿タンパク質等の物質は通過できない。しかし、血管内外での炎症、腫瘍血管等の病的な状態では、血管外に血漿成分、免疫担当細胞が漏出し浮腫・膨疹(蕁麻疹)の形成、炎症の増悪に繋がる。血管透過性の亢進は血管内皮細胞の収縮に伴う細胞間隙の増加が原因であり、血管透過性を亢進する物質としては histamine、bradykinin、platelet-activating factor (PAF) 等が知られているが、未解明の血管透過性亢進機序が多く存在する。そのため、血管内外の細胞、血漿等の液性因子を含む生体内環境下で血管透過性変化の過程を *in vitro* で評価することができれば、血管内皮細胞に直接作用する物質の反応のみならず、長時間にわたり血管内・組織内の細胞・タンパク質の反応を複数回介する複雑な血管透過性亢進メカニズムの解明、さらに、血管透過性亢進が重要な疾患に対する効果的な治療薬の探索に応用できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、光学的原理に基づく表面プラズモン共鳴イメージング (SPRI) センサと、電気化学的原理に基づくインピーダンス (IMP) センサを個別に使用、または組み合わせることで、両者の長所を生かし、従来法では不可能であった時間的、二次元空間的分解能を持った細胞間結合状態の解析を可能にする。また、センサ上に血管内、皮膚真皮・表皮環境を構築することにより、生体内の反応を忠実に再現した次世代の *in vitro* 血管透過性評価法を提供する。さらに本手法は、血管透過性評価のみならず腸管上皮、血液脳関門等の細胞間結合が重要な役割を果たす組織のバリア機能評価と、その機能に影響を及ぼす物質の探索にも容易に応用できる。これまでに、光と電気化学センサの両方の長所を合わせ持った細胞計測技術が実用化された例は無い。今回提案する新しい評価法が確立されれば、細胞の機能・状態を評価するために単数、または複数の物理パラメータを用いる意義が示され、従来法とは異なる視点から生細胞を評価できる画期的な技術の先駆けになるものと期待される。

3. 研究の方法

研究計画を3つの項目に分けて遂行した。各課題は、「課題1：センサチップ上屈折率分布変化、インピーダンス変化同時解析 (SPRI-IMP) センサの開発」、「課題2：センサチップ上に生体内環境を模擬した *in vitro* 血管透過性評価モデルの開発」、「課題3：*In vitro* 慢性蕁麻疹モデルの構築と効果的な治療薬探索への応用」として、それぞれについて研究を行った。血管内皮細胞として、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を使用した。単球はヒト抹消血より単離した。血管内モデルを構築するためのインピーダンスセンサには iCELLigence (スクラム) を使用した。また、SPRI センサは、申請者が独自に開発・作製した装置を使用した。

4. 研究成果

課題1

光学的原理に基づく表面プラズモン共鳴イメージング (SPRI) センサと、電気化学的原理に基づくインピーダンス (IMP) センサは、それぞれ屈折率、インピーダンス (交流における電気抵抗) を無標識、リアルタイムに検出することができるバイオセンサである。これらのセンサを組み合わせることで、両者の長所を生かし、従来法では不可能であった時間的、二次元空間的分解能を持った細胞間結合状態を解析するシステムを開発した。SPRI センサ、インピーダンスセンサはどちらもセンサチップに金薄膜を使用するため、チップを融合することが可能となる。そこで我々は、高屈折ガラス (屈折率 1.72) 上に櫛型の電極 (膜厚は 50nm 程度) を作成し、両パラメータの同時解析を可能とした。さらに開発したセンサを使って、RBL-2H3 細胞 (ラット好塩基性白血球細胞) やヒト末梢血好塩基球をはじめとする様々な生細胞の刺激応答を、屈折率の分布とインピーダンス変化の両面からモニタリングすることに成功した。その結果は *Sensors* 誌に掲載された (*Sensors*, 2019 May 3; 19(9):2067.)。このように、これまでは検出できなかった屈折率とインピーダンスの同時解析を行うことで、複数の物理パラメータを利用して様々

な細胞機能の解明につながると期待される。

課題2 課題3

IMP センサ上に HUVEC 細胞を培養し単層膜を構築し、培地中に血漿成分を加え血管内の環境を模擬した *in vitro* 血管透過性評価技術を開発した(血管内モデル)。さらに上述のように作製した血管内モデルを利用して、この環境内に histamine、vascular endothelial growth factor(VEGF)、Lipopolysaccharide(LPS)、tumor necrosis factor(TNF)、IL-33、IL-1 等の慢性蕁麻疹の増悪因子を組み合わせる血管内皮細胞を刺激すると、いくつかの組み合わせ(例えば histamine と LPS、VEGF と TNF、histamine と TNF、VEGF と LPS 等)で血管内皮細胞上に相乗的に組織因子(TF)が高発現し、ヒト血漿存在下で強い血管透過性亢進が起こることを明らかにした。それらの結果から、LPS、TNF、IL-33 をグループ1、histamine と VEGF をグループ2 と分類することで、異なるグループの物質で刺激をすると、創薬的な TF の発現が引き起こされることを解明した。その成果は Journal of Dermatology 誌に掲載された(J Dermatol. 2020 Nov;47(11):1293-1300.)。

さらに慢性蕁麻疹において、単球の TF 発現が増加しているか検討するため、慢性蕁麻疹患者と健常人、他のアレルギー疾患において TF 発現の増加が起きているかフローサイトメトリ法を使って検討した。その結果、慢性蕁麻疹患者の単球では膜上の TF 発現が増加していることを明らかにした。さらに、上記の血管内モデルに TF を高発現した単球とヒト血漿成分が存在すると、単球の TF が外因系血液凝固反応を駆動し、産生された活性化血液凝固因子(特に Xa, IIa)が血管内皮細胞上の受容体に作用することにより、血管透過性の亢進が引き起こされることを明らかにした。その成果は Allergy 誌に掲載された(Allergy. 2020 Apr;75(4):971-974.)。また、センサチップ上に、皮膚の真皮、表皮を模擬した血管外モデルについても作製中であり、今後は血管外からの刺激による血管透過性評価メカニズムの解明に利用できると考えられる。

以上のように本研究では、血管透過性を *in vitro* で、リアルタイムかつ無標識で評価する新しい技術の開発と、それを利用して慢性蕁麻疹発症機序の一端と解明することに成功した。今後さらに研究を進めて行くことで、複雑な慢性蕁麻疹の病態解明や、その他の血管透過性の亢進が引き金となる様々な疾患に対する新しい治療法・治療薬の開発につながるものと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito R, Yanase Y, Kamegashira A, Takahagi S, Tanaka A, Uchida K, Kawaguchi T, Hide M.	4. 巻 75
2. 論文標題 Increase of tissue factor expression on the surface of peripheral monocytes of patients with chronic spontaneous urticaria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy.	6. 最初と最後の頁 971, 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanase Y, Takahagi S, Hide M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Role of TF-triggered activation of the coagulation cascade in the pathogenesis of chronic spontaneous urticarial.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Treat Options Allergy	6. 最初と最後の頁 383, 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanase Y, Matsuo Y, Kawaguchi T, Ishii K, Tanaka A, Iwamoto K, Takahagi S, Hide M	4. 巻 20
2. 論文標題 Activation of human peripheral basophils in response to high IgE antibody concentrations without antigens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanase Y, Yoshizaki K, Kimura Kaiken, Kawaguchi T, Hide M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of SPR imaging-impedance sensor for multi-parametric living cell analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳瀬雄輝、亀頭晶子、川口智子、内田一恵、秀 道広
2. 発表標題 血管内皮細胞のヒスタミン応答性に対するLPSとTNF の影響
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳瀬雄輝、亀頭晶子、川口智子、内田一恵、秀 道広
2. 発表標題 Effects of LPS and TNF on the histamine responsiveness of vascular endothelial cells
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 慢性蕁麻疹の病態における好塩基球・マスト細胞の役割とin vitro研究から予想されるオマリズマブの作用機序
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 In vitro研究から予想される慢性蕁麻疹の病態と血液凝固反応の関係
3. 学会等名 Urticaria Expert Summit（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 慢性蕁麻疹の病態におけるIgE抗体と血液凝固反応の役割
3. 学会等名 第49回日本免疫アレルギー学会総会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 ヒト好塩基球・マスト細胞の活性化制御機構
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuhki Yanase, Satoshi Morioko, Kazumasa Iwamoto, Shunsuke Takahagi, Kazue Uchida, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Michihiro Hide
2. 発表標題 Synergistic expression of tissue factors on vascular endothelial cells induce intercellular gap formation in the presence of plasma via extrinsic coagulation cascade and PAR-1
3. 学会等名 WCP2018（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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