

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05960

研究課題名(和文)血管内皮細胞を起点とする抗炎症機構の解明

研究課題名(英文)The role of endothelial cells in regulation of inflammation

研究代表者

熊添 基文(Kumazoe, Motofumi)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：70737212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、cGMPによる抗炎症作用を解明するとともに、それらの誘導剤の生体保護作用について実際の病態モデルによる評価を実施した。その結果、cGMPによって肺が保護されることを明らかにした。また、その具体的な機構について具体的な分子機構の解明に成功した。それらのモデルを応用することで、複数の全く新規の抗線維化因子の同定に成功した。さらに、それらの分子機構について探索を行い、肺保護に重要な因子の解明に成功した。また、並行して肺血管内皮細胞について様々な条件にて培養を行い、安定して肺血管保護作用を評価する実験系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎は高齢者において特に予後不良となること、また急性呼吸窮迫症候群から回復後も認知機能や運動機能の低下が生じ、機能的予後に大きな問題を抱えることを鑑みれば、少子高齢化が進む我が国において肺疾患に対する有効な治療、予防法の確立は非常に重要である。本研究課題ではセカンドメッセンジャーの一種、cGMPが肺保護作用を有することをに着目し、肺保護を誘導可能な新たな経路、手法の確立を目指した。また、肺保護作用を有する成分を安定して探索できる実験系の確立を目指し、今後の研究の基盤確立を目指した。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary diseases, including pneumonia and fibrosis, are some of the most challenging diseases and represent a significant public health problem. Considering the serious issue of population aging in Japan, an efficient countermeasure with a low burden is strongly demanded. In this study, we demonstrated that (-)-Epigallocatechin-3-O-Gallate (EGCG), one of the major catechins in green tea, induces an anti-stress factor in the exosomes derived from Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). We also showed that this compound has a strong pulmonary protective effect against LPS-induced lung inflammation. Additionally, we established the assay conditions for testing the anti-inflammatory effect of compounds in Human Pulmonary Artery Endothelial cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子細胞生物学 病態モデル cGMP 食品成分 ケミカルバイオロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺疾患は我が国の主要な問題の一つとなっており、COVID-19 のみならず様々な感染症による死因の一つとである。さらに、肺炎は高齢者において特に予後不良となること、また急性呼吸窮迫症候群から回復後も認知機能や運動機能の低下が生じ、機能的予後に大きな問題を抱えることを鑑みれば、少子高齢化が進む我が国において肺疾患に対する有効な治療、予防法の確立は非常に重要である。

近年の疫学調査により、緑茶の摂取は肺炎死リスクの低下と関連していることが報告されている(Watanabe et al. Am J Clin Nutr. 2009 Sep;90(3):672-9)。また、我々はこれまでに緑茶中の主要なカテキンの一種である (-)-Epigallocatechin-3-O-Gallate (EGCG) が cGMP (Cyclic guanosine monophosphate; 環状グアノシンーリン酸) 産生誘導を介して顕著な抗炎症作用を有することを報告している (Kumazoe et al. J Immunol. 2017 Nov 1;199(9):3261-3269.)。そこで、cGMP の抗炎症作用に着目し、研究を進めたところ血管弛緩に関わるセカンドメッセンジャーの一種、cGMP が肺保護作用を有することを明らかにしてきたが、その分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

血管の保護に関与し、生体毒性が低いと考えられる cGMP 誘導に着目し、その肺保護経路の解明を実施できれば、cGMP 産生を誘導する因子を肺疾患の予防、治療に用いることが可能となる。そこで、本研究は cGMP の肺保護作用に着目し、そのメカニズム解明を実施した。また、肺血管内皮細胞による抗炎症、抗線維化評価法が確立されていないため、実験系を目指し検討を行った。

- ① 血管内皮細胞を標的とする cGMP 産生誘導を有するポリフェノール EGCG が誘導する生体保護因子の探索
- ② cGMP 産生誘導を有するポリフェノールによる肺保護作用の評価
- ③ 肺血管内皮細胞による抗炎症、抗線維化因子評価法の確立

3. 研究の方法

①血管内皮細胞を標的とする cGMP 産生誘導を有するポリフェノール EGCG が誘導する生体保護因子の探索

HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; ヒトヒト臍帯静脈内皮細胞) を 10% FBS (Fetal bovine serum)/EGM-2 培地にて 24 h 前培養後、1% BSA (bovine serum albumin)/Medium 199 に置換し、5 μ M の EGCG を添加した。その後、24 時間後に培養上清を回収し、2000 \times g 10 min の遠心にてデブリを除去し、上清をさらに超遠心(210,000 \times g for 38 min at 4°C)した。上清除去後、さらに、PBS にて懸濁後、超遠心(210,000 \times g for

38 min at 4°C)することでエクソソームを得た。得られたエクソソームの一部を細胞溶解バッファにて処理後、SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)を実施し、抗 CD9 抗体を用いてウエスタンブロットにてエクソソームの分離を確認した。このエクソソームをマイクロアレイ(東レ)に供することでエクソソーム中の miRNA (micro RNA) を評価した。また、EGCG 処理によって HUVEC 由来エクソソーム中にて上昇が確認された miRNA の肺保護作用を評価するために、ヒト肺線維芽細胞株 HFL1 細胞を 10% FBS/DMEM にて 24 h 前培養し、miR-6757-3p をトランスフェクションし、5 h 後 TGFβ (Transforming Growth Factor beta) を 5 ng/mL となるよう添加した。48 h 後 mRNA を回収し、cDNA 合成後、線維化関連遺伝子の発現に対する影響を評価した (Marugame et al. Biomed Rep. 2023 Mar; 18(3): 19. に掲載。申請者も共著者として執筆)。

② cGMP 産生誘導を有するポリフェノールによる肺保護作用の評価

(成果未発表であるため実験の概略)

cGMP 産生誘導による肺保護作用を評価するために、cGMP を介して抗炎症作用があると報告されているポリフェノールである EGCG をマウスに経口にて投与するとともに、イソフルラン麻酔下にて、炎症誘導物質であるグラム陰性菌外膜構成成分である LPS (Lipopolysaccharide) を気管内投与した。24 h 経過後、マウスをイソフルラン麻酔下にて安楽殺後、BALF (Bronchoalveolar Lavage Fluid)の回収を行い、肺における炎症状態の指標である BALF 中の細胞数を評価した。また、同様の方法にて解剖を行い、肺組織を取得後、活性化好中球の指標である MPO (Myeloperoxidase) に対する免疫組織染色、及び HE (Hematoxylin and Eosin) 染色にて肺の組織学的評価を行った。また、トランスクリプトーム解析を実施し、重要機構の探索を実施した。

③ 肺血管内皮細胞による抗炎症評価法の確立

(成果未発表であるため実験の概略)

HPAECs (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells ヒト肺動脈血管内皮細胞) を用いて抗炎症、生体保護因子を探索するにあたり、当該細胞を用いて炎症、障害を誘導する因子についてその作用強度、条件を比較検討した情報が必要である。そこで、HPAECs を様々な条件 (血清飢餓、低血清培地、通常培地)にて炎症、障害誘導が報告されている因子 (アンジオテンシン 2, CTGF (Connective Tissue Growth Factor), Endothelin, IL6 (Interleukin-6), TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), TGFβ) を添加し、各時間における炎症性サイトカイン、タイトジャンクション関連因子、障害関連因子についてリアルタイム PCR にて評価を行った。

4. 研究成果

①EGCGによって上方制御されるエクソソーム中に特徴的な miRNA の探索に成功し、その一部が cGMP 誘導剤と共通であることを確認した。また、このなかでも最も変化率が大きい(26 倍上昇) miR-6757 について機能に関する報告が無いため、肺線維芽細胞を用いて評価したところ、TGFβ投与によって誘導される線維化関連遺伝子である Fibronectin 及び aSMA (alpha-smooth muscle actin)の発現を低下させることを確認した。また、in silico による解析で miR-6757 の標的として TGFBR1 (transforming growth factor-β receptor 1 (TGFBR1)) が予想されたため、miR-6757 による TGFBR1 発現に対する影響を評価したところ、TGFBR1 の発現が抑制されることを確認した。これらのことから、cGMP 産生誘導作用を持つ EGCG は血管内皮細胞に対して、抗線維化因子を含む miRNA を内包するエクソソームの分泌を誘導することを発見した。

② cGMP 産生誘導を有するポリフェノールによる肺保護作用の評価

(成果未発表であるため概略)

炎症誘導物質であるグラム陰性菌外膜構成成分である LPS 気管内投与に起因する BALF 中の細胞数の増加が EGCG の経口投与によって改善されることが明らかになった。他の cGMP 産生誘導剤でも同様の作用が確認された。また、肺の組織学的解析を行ったところ、EGCG の経口投与により、肺組織の炎症状態、及び MPO 発現の抑制が認められた。他の cGMP 産生誘導剤でも同様の作用が確認された。さらに、トランスクリプトーム解析により、当該作用に関与する因子の探索に成功した。これらのことから、cGMP 産生誘導作用を持つ EGCG は LPS 誘導性急性肺障害モデルに対して、肺保護作用を有することを発見した。

③肺血管内皮細胞による抗炎症因子評価法の確立

(成果未発表であるため概略)

HPAECs を用いて抗炎症、生体保護因子を探索するべく、HPAECs を様々な条件 (血清飢餓、低血清培地、通常培地)にて炎症、障害誘導が報告されている因子 (アンジオテンシン 2, CTGF, Endothelin, IL6, TNFα, TGFβ) を添加し炎症性サイトカイン、タイトジャンクション関連因子、障害関連因子を評価した。その結果、過去に報告されている多くの因子が本条件下では再現できないことが明らかになった。一方で、低血清条件による処理後、TNFα を添加することで、極めて安定的に炎症誘導を行えることを確認した。これらの条件に基づいて保護因子を評価したところ、これまで本条件下で報告の無い、cGMP 誘導関連因子が強力な血管保護作用を有することを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kumazoe Motofumi, Ogawa Fumiyo, Hikida Ai, Shimada Yu, Yoshitomi Ren, Watanabe Ryoya, Onda Hiroaki, Fujimura Yoshinori, Tachibana Hirofumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Plant miRNA osa-miR172d-5p suppressed lung fibrosis by targeting Tab1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29188-6	査読の有無 無
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 Murata Motoki, Marugame Yuki, Morozumi Mai, Murata Kyosuke, Kumazoe Motofumi, Fujimura Yoshinori, Tachibana Hirofumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Epigallocatechin-3-O-gallate upregulates the expression levels of miR-6757?3p, a suppressor of fibrosis?related gene expression, in extracellular vesicles derived from human umbilical vein endothelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2023.1601	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 Tanaka Yasutake, Kumazoe Motofumi, Onda Hiroaki, Fujimura Yoshinori, Tachibana Hirofumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Time-dependent increase of plasma cGMP concentration followed by oral EGCG administration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Bioscience	6. 最初と最後の頁 101017 ~ 101017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fbio.2021.101017	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 Motofumi Kumazoe, Kanako Takamatsu, Fuyumi Horie, Ren Yoshitomi, Hiroki Hamagami, Hiroshi Tanaka, Yoshinori Fujimura, Hirofumi Tachibana	4. 巻 s41598
2. 論文標題 Methylated (-)-epigallocatechin 3-O-gallate potentiates the effect of split vaccine accompanied with upregulation of Toll-like receptor 5	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 s41598
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 Motofumi Kumazoe, Yasutake Tanaka, Ren Yoshitomi, Yuki Marugame, Kwan-Woo Lee, Hiroaki Onda, Yoshinori Fujimura, Madoka Yonekura, Yasuyo Shimamoto, Hirofumi Tachibana	4. 巻 75
2. 論文標題 Glucosyl-hesperidin enhances the cyclic guanosine monophosphate-inducing effect of a green tea polyphenol EGCG	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nat Med .	6. 最初と最後の頁 1037-1042
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 Kumazoe M, Fujimura Y, Yoshitomi R, Shimada Y, Tachibana H.	4. 巻 70
2. 論文標題 Fustin, a Flavanonol, Synergically Potentiates the Anticancer Effect of Green Tea Catechin Epigallocatechin-3-O-Gallate with Activation of the eNOS/cGMP Axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem.	6. 最初と最後の頁 3458-3466
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 Tanaka Yasutake, Kumazoe Motofumi, Onda Hiroaki, Fujimura Yoshinori, Tachibana Hirofumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Time-dependent increase of plasma cGMP concentration followed by oral EGCG administration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Bioscience	6. 最初と最後の頁 101017 ~ 101017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fbio.2021.101017	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 Kumazoe Motofumi, Kadomatsu Mai, Bae Jaehoon, Otsuka Yushi, Fujimura Yoshinori, Tachibana Hirofumi	4. 巻 25
2. 論文標題 Src Mediates Epigallocatechin-3-O-Gallate-Elicited Acid Sphingomyelinase Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5481 ~ 5481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25225481	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 Kumazoe Motofumi、Fujimura Yoshinori、Tachibana Hirofumi	4. 巻 6
2. 論文標題 67-kDa Laminin Receptor Mediates the Beneficial Effects of Green Tea Polyphenol EGCG	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 280 ~ 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40495-020-00228-3	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 Bae Jaehoon、Lee Kwanwoo、Park Ji-Sun、Jung Jinseok、Tachibana Hirofumi、Fujimura Yoshinori、Kumazoe Motofumi、Lim Jae Sung、Cho Young-Chang、Lee Seung-Jae、Park Su-Jin	4. 巻 44
2. 論文標題 Phosphodiesterase 5 Inhibitor Potentiates Epigallocatechin 3-O-Gallate-Induced Apoptotic Cell Death via Activation of the cGMP Signaling Pathway in Caco-2 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 6247 ~ 6256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44120426	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 該当する

〔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
---------	---------