

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17856

研究課題名（和文）血管内皮グリコカリックスの菲薄化が炎症細胞動態に与える影響についての検討

研究課題名（英文）Inflammatory cells and Vascular Endothelial Glycocalyx

研究代表者

柿野 圭紀 (Kakino, Yoshinori)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50869352

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）：ヘパラン硫酸の合成酵素であるEXT-1を血管内皮特異的にノックアウトしたマウス（VCRE-EXT1KOマウス）を作成し、肺組織における血管内皮グリコカリックスの形態学的変化を経時的に観察した。また、リポ多糖(LPS)を15 mg/kg腹腔内注射して敗血症性血管炎を惹起し、採取した肺組織において免疫染色での解析を行った。VCRE-EXT1KOマウスにおいて肺の血管内皮グリコカリックスが減少しているおり、LPSを投与すると、肺における炎症細胞浸潤が明らかに増加していた。血管内皮におけるヘパラン硫酸の減少は組織の炎症増悪に關与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病、心不全、透析など炎症が遷延しやすい病態においても血管内皮におけるGCXの障害が生じていることが報告されており、本研究によりグリコカリックスの障害が炎症増悪に關与する共通の病態として存在する可能性が示唆されたことで疾患の重症化に血管内皮障害が關与している可能性が示唆されたことは社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Vascular endothelial cell-specific knockout mice (VCRE-EXT1KO mice) of EXT-1, a heparan sulfate synthase, were generated and morphological changes of vascular endothelial glycocalyx in the lung tissue were observed over time. Lipopolysaccharide (LPS) was injected intraperitoneally at 15 mg/kg to induce septic vasculitis, and the collected lung tissue was analyzed by immunostaining. LPS treatment clearly increased inflammatory cell infiltration in the lungs. Decreased heparan sulfate in vascular endothelium may contribute to exacerbated tissue inflammation.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：血管内皮グリコカリックス 重症感染症 ヘパラン硫酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮グリコカリックスは、健康な血管内皮の表面を覆い、微小血管と内皮の生理に極めて重要な役割を担っている。糖鎖の構成要素には、細胞結合型プロテオグリカンであるコアタンパク質、グリコサミノグリカン側鎖、およびシアロタンパク質が含まれる。GAGの一つであるヘパラン硫酸糖鎖は、分岐のない直鎖状の多糖類であり、細胞表面に存在するコアタンパク質と共有結合する形で存在している。ヘパリン硫酸 (HS) の構造は、N-アセチルガラクトサミンなどのウロン酸二糖単位とグルクロン酸またはイデュロン酸が繰り返されたものである。HS には様々な硫酸転移酵素が作用するため、HS の各部に硫酸基が付加される。HS の合成は、Ext1、Ext2 などの exostosin ファミリーの糖転移酵素によって維持されている。特に Ext1 は HS 合成に必須であり、Ext1 欠損マウスでは、機能的な Ext1 対立遺伝子を欠く細胞では HS が合成されず、胃形成異常による胚性致死となる。

外科的侵襲、急性腎障害、慢性腎臓病、心血管疾患、糖尿病、加齢、高トリグリセリド血症などにより、内皮グリコカリックスが傷害され、分解を引き起こすことが、これまでのいくつかの報告で明らかになっている。これまでも、糖尿病下で炎症が起きると内皮グリコカリックスが傷害され、炎症が拡大することが報告されている。また、糖尿病状態では Ext1 の発現が低下し、内皮グリコカリックスが傷害されることが報告されている。同様に、近年、内皮の状態と免疫反応との関連性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Ext-1 によって合成された内皮グリコカリックスのヘパラン硫酸が、内皮細胞を介した免疫反応に関与しているかどうかについて検討をおこなうことである。

3. 研究の方法

In vivo 動物実験

本研究を行うにあたり岐阜大学動物研究委員会 (30-190) から承認を得た。マウス Ext1flox 対立遺伝子は過去の報告に基づくものである [Science, 2003;302:1044-6]。VE-Cadherin-Cre マウスは NIBIOHN の Laboratory Animal Resource Bank から購入し [Circ Res, 2006;98:897-904]、Rosa26-CAG-LSL-tdTomato (Ai9, Jax#:007905) マウスは Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。16 時間の飢餓の後、マウスに LPS (15mg/kg-1; Millipore Sigma, Burlington, MA) を i. p. で注射した。偽操作マウスでは、LPS の代わりに PBS を注射した。マウスは盲検法で各群に分配した。生存率は、LPS 投与後 6 時間ごとに測定した。灌流固定と眼動脈からの採血は麻酔下で行った (塩酸メドミジン 0.3mg/kg-1、ミダゾラム 4mg/kg-1、酒石酸ブトルファノール 5mg/kg-1 の混合液を用い、i. p. 投与)。麻酔は、角膜反射と後肢の引き出し反射が消失すれば十分と判断した。

血清の調製および ELISA 検査

血液サンプルは 6 匹のマウスから、上顎動脈から分岐する頰動脈から採取し、25°C で 2 時間凝固させ、遠心分離した (2,000×g, 4°C, 20 分間)。その後、上澄み液 (血清) を採取した。血清 IL-6 は、マウス IL-6 用 ELISA 定量キット (Cat No. M6000B, R&D Systems) を用いて測定した。

In vivo 透過性アッセイ (In vivo permeability assay)

in vivo 透過性アッセイは、FITC-labeled dextran 法を用いて実施した。血清サンプルの蛍光強度を測定し (励起、492nm; 発光、525nm; Cytofluor 2300; ミリポア、ウォーターズクロマトグラフィ)、FITC デキストラン濃度は FITC デキストランの連続希釈により作成した標準曲線から求めた。透過率は、サンプル蛍光の線形回帰により算出した。

病理組織学的評価

LPS 投与 0 時間後または 48 時間後に、6 匹のマウスの肺の右葉全体を、10%ホルマリンを含む PBS で固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン切片 (4μm) を脱パラフィンし、再水洗した。最後に、スライドを HE で対比染色し、カバースリップした肺切片を肺水腫について以下のように採点した: 1=存在しない; 2=1~少数の肺胞に検出可能な血清タンパク質性液体; または 3=肺に多巣~合体パターンで血清タンパク質性液体に満たされた肺胞。好中球の浸潤をスコア化した: 1=存在しないか稀な孤立性好中球; 2=1 つまたは少数の気道および/または肺胞に小さな緩い細胞凝集体として観察される検出可能な血管外好中球; 3=肺構造物を多少浸出させた複数から合体の気道および/または肺胞に緩~コンパクト細胞凝集体として観察される検出可能な血管外好中球; 4=ほとんどの隣接肺構造物に浸出するコンパクト細胞凝集体として観察される検出可能な血管外好中球。これらの実験は、バイアスを避けるために盲検法で行われた。

レクチン染色強度のスコアリング

グリコカリックス損傷の定量的解析のために、小麦胚芽アグルチニン (WGA, B-1025-5; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 染色強度のスコアリングを、蛍光顕微鏡 (BX-X810, Keyence, Osaka, Japan) および ImageJ ソフトウェアを使用して行った。脱パラフィン後、切片 (4μm) を切り出し、WGA ビオチン結合体 (BK-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) と 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、切片を DyLight 594 Streptavidin (SA-5594, Vector Laboratories, Burlingame, CA) と 1:200 希釈で、PBS 中室温で 1 時間インキュベートした。WGA の発現強度は、1 サンプルあたり 10

高倍率フィールド（1 サンプルあたり n = 6）で、焦点面を手動でスコア化した。

免疫組織化学

脱パラフィン後、切片（4 μ m）を切り、CD11b（ab16667; Abcam, Cambridge, UK）および F4/80（bs-10701R; Bioss Antibodies, Woburn, MA, USA）に対する一次抗体とともにインキュベートした。ターゲットタンパク質は、VECTASTAIN Elite ABC システム（Vector Laboratories）を用いて可視化した。

電子顕微鏡観察

内皮グリコカリックスはの電子顕微鏡分析をおこなった。マウスを麻酔し、次に、左心室に設置したカニューレを通して、2%グルタルアルデヒド、2%スクロース、0.1-M カコジル酸ナトリウム緩衝液（pH7.3）、および 2%硝酸ランタンからなる溶液を、1ml \cdot min⁻¹ の安定流量で灌流した。マウスを殺した後、肺サンプルを、グルタルアルデヒドを含まない溶液で固定し、その後アルカリ性（0.03-M NaOH）2%スクロース溶液で洗浄した。走査型電子顕微鏡用試料の作製には凍結破砕法（S-4800, 日立, 東京, 日本）を用いた。

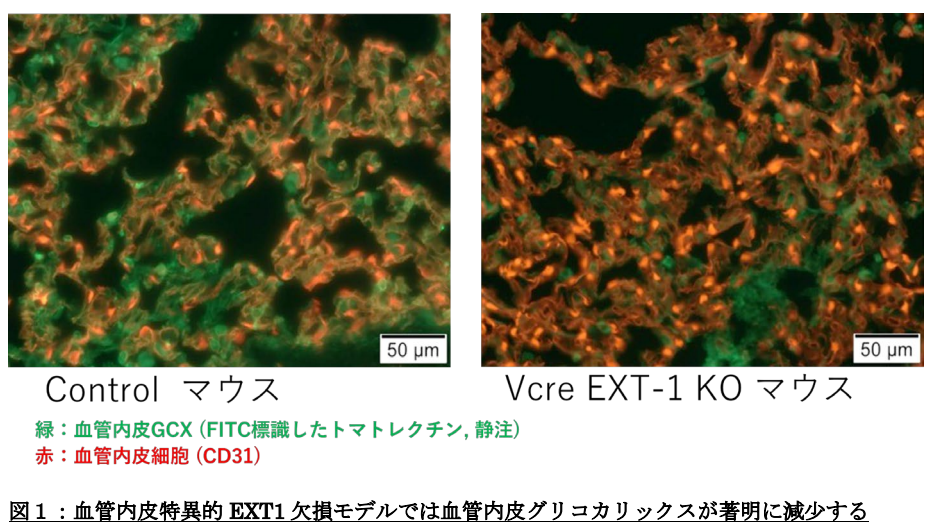
データおよび統計解析

データは、平均値 \pm SEM として示される。2つのグループの比較には Student の両側 t 検定を使用し、生存データはログランク検定を使用して分析した；P < 0.05 を有意とみなした。すべての計算は、GraphPad Prism (Ver. 7.02; La Jolla, CA)を用いて行った。

4. 研究成果

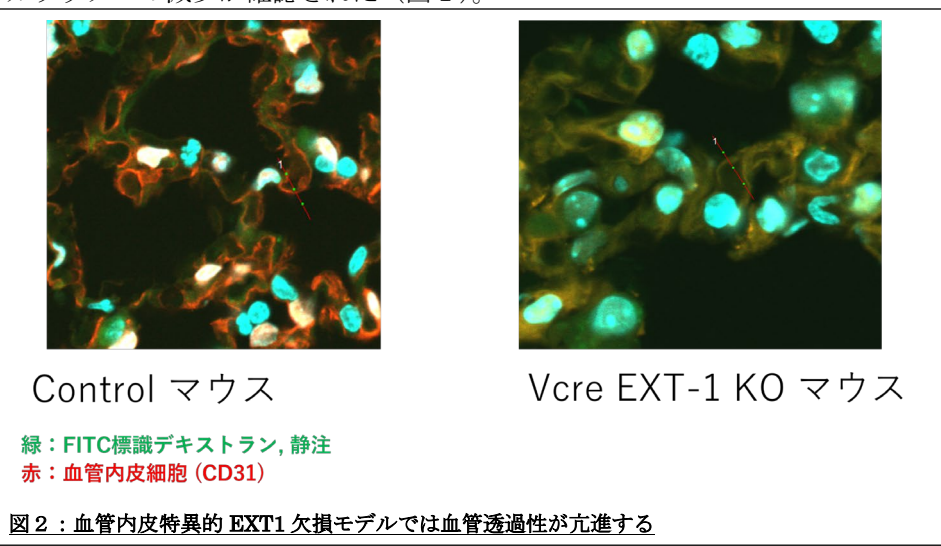
EXT-1 flox/flox マウスに Vascular Cadherin Specific CRE 強発現マウスを掛け合わせ、EXT-1 を血管内皮特異的にノックアウトしたマウス（VCRE-EXT1KO マウス）を作成した。対照として Vcre (-) EXT-1 flox/flox マウス（Control）を用いた。

このマウスの血管内皮グリコカリックスを描出し FITC で標識したトマトレクチンをマウスの経静脈より投与して、CD31 との二重染色を行うと、EXT1 ノックアウトマウスで緑色に標識された血管内皮グリコカリックスの減少が確認された（図1）。



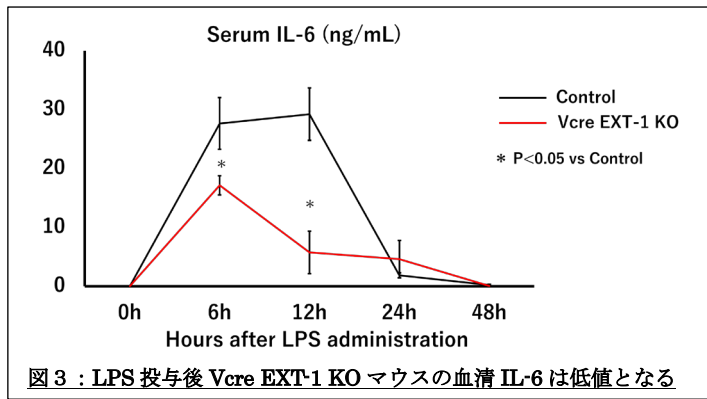
血管内皮グリコカリックスの減少が確認された（図1）。

次に FITC で標識したデキストランを用いて血管の透過性を評価したところ control 群ではFITCは血管内に留まっている一方で、VCRE-EXT1KO マウス群ではFITCの血管外漏出を示した（図2）。この結果から EXT1 を血管内皮特異的にノックアウトすると血管透過性が更新することが示唆された。

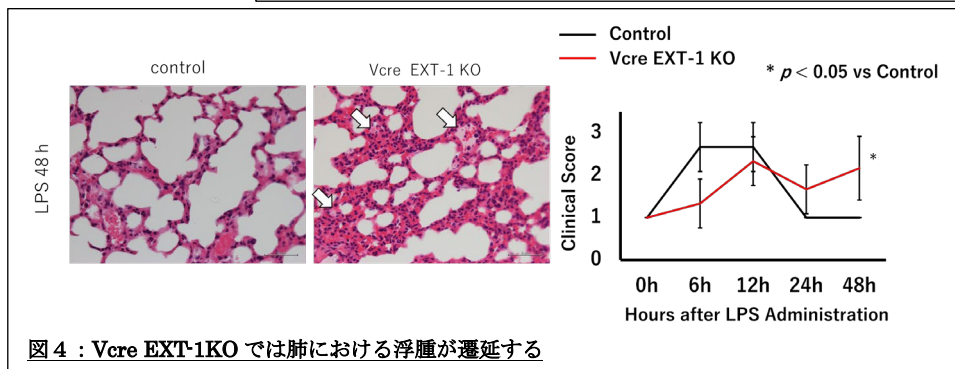


この結果から EXT1 を血管内皮特異的にノックアウトすると血管透過性が更新することが示唆された。

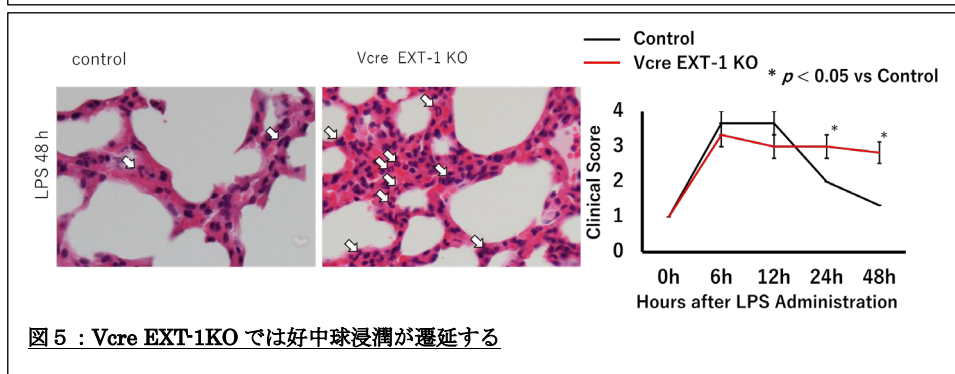
次に Vcre EXT-1KO マウスにリポ多糖 (LPS) を 15mg/kg で腹腔内投与し炎症を惹起させ、6, 12, 24, 48 時間後にマウスを屠殺し検討を行った。Vcre EXT-1 KO マウスおよびコントロールマウスに LPS を投与し、LPS 投与前、投与 6, 12, 24, 48 時間後の血清 IL-6 値を計測したところ、コントロールマウスにおいては LPS 投与 6~12 時間で IL-6 値がピークに達したのに対し、Vcre EXT-1 KO



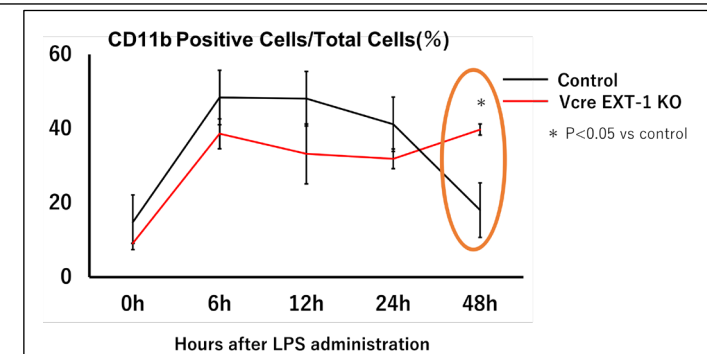
マウスにおいては、6 時間でピークに達しその後低下が認められた。また全体として LPS 投与後の血清 IL-6 値はコントロールと比較し有意に低いことが確認された (図3)。



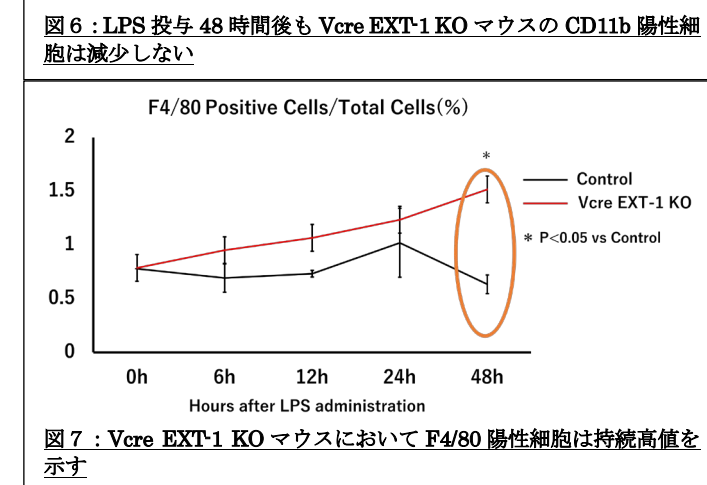
肺における浮腫の程度をスコアリングすると、Vcre EXT-1KO では肺における浮腫の回復が遅延しており、LPS 投与後 48 時間で有意に浮腫が残存していた (図4)。



好中球の浸潤も同様で、LPS 投与後 24h、48h の時点で Vcre EXT-1KO は有意にスコアが高く、好中球浸潤が遷延することが確認された (図5)。



さらなる評価のため炎症細胞のマーカーを用いた免疫染色を行った。LPS 投与後、CD11b 陽性細胞数はコントロールマウスでは LPS 投与 6 時間後にピークを迎え、その後漸減する一方で、IL-6 濃度が低かった Vcre EXT-1 KO マウスでも同程度の上昇が認められた。LPS 投与 48 時間後になっても Vcre EXT-1 KO マウスの CD11b 陽性細胞はコントロールに比べて有意に多い状態が持続していた (図6)。また、マクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞は両群とも LPS 投与後から上昇するが、コントロールでは LPS 投与 48 時間後に低下するのに対し、Vcre EXT-1 KO マウスにおいては持続高値を示し、コントロール群に比べ有意に増加していた (図7)。



走査型電子顕微鏡を用いたグリコカリックスの観察では、LPS 投与前の control 群のマウスでは肺血管内腔にコケ様のグリコカリックスが描出されているが、Vcre EXT-1 KO マウスでは LPS 投与前であっても血管内皮の構造が剥き出しになっている箇所が多く、その構造は破綻している (図 8)。

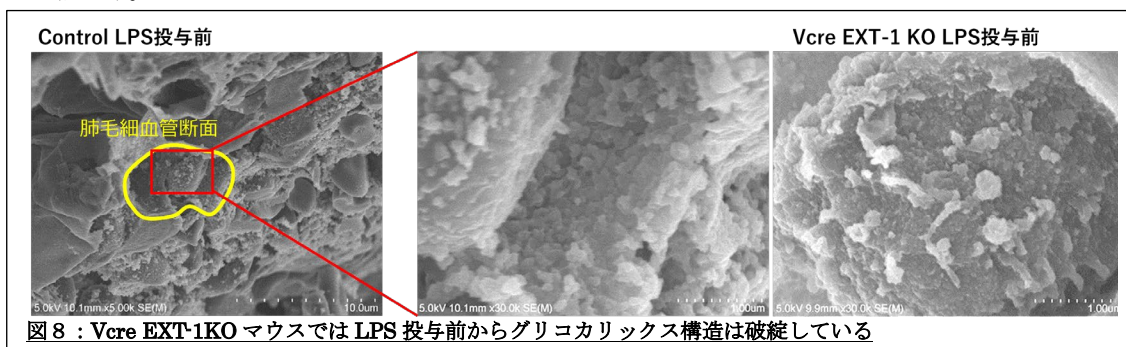


図 8 : Vcre EXT-1KO マウスでは LPS 投与前からグリコカリックス構造は破綻している

LPS 投与 48 時間後ではいずれのマウスにおいても血管内皮グリコカリックスの構造が崩壊した箇所がみられたが、コントロールマウスでは一部にグリコカリックスの回復を認めた。しかし EXT1KO マウスでは血管内皮の表面が血管腔に露出し、その残渣が血管内表面に存在していた (図 9)。

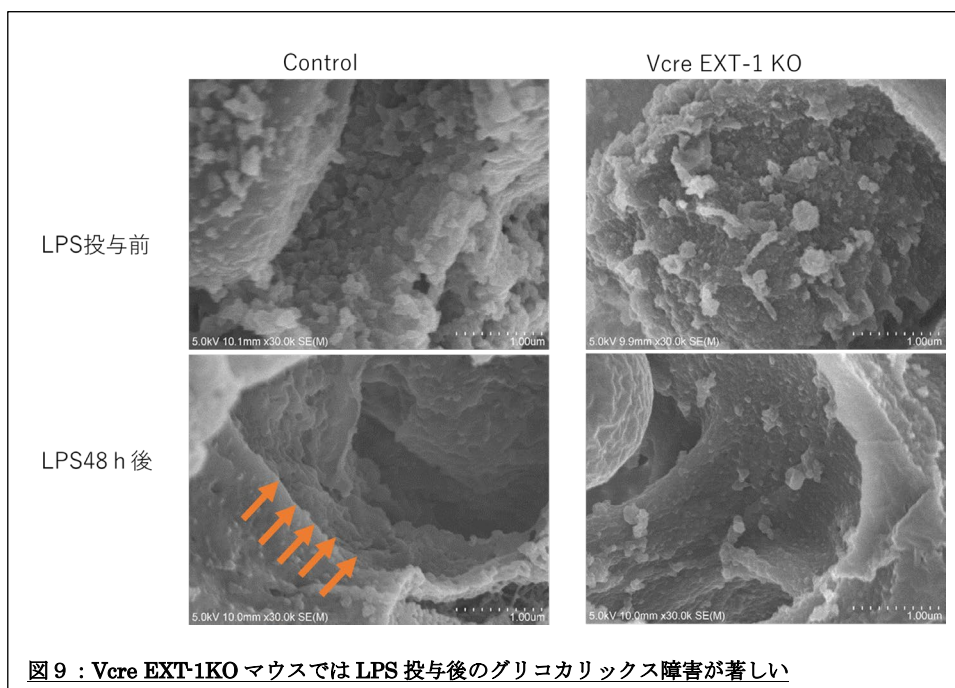


図 9 : Vcre EXT-1KO マウスでは LPS 投与後のグリコカリックス障害が著しい

考察

これらの結果より Vcre EXT-1KO マウスでは血管内皮 GCX が著明に減少し、血管透過性が亢進することが確認された。血清 IL-6 が低値にもかかわらず、Vcre EXT-1 KO マウスにおいて組織への炎症細胞の遊走は有意に多かった。この現象は血炎症細胞の管内皮への接着が亢進したためと考えられ、血管内皮グリコカリックスの障害が関与していることを示唆すると考えられた。糖尿病、心不全、透析など炎症が遷延しやすい病態においても血管内皮における GCX の障害が生じていることが報告されている。グリコカリックスの障害が炎症増悪に関与する共通の病態として存在する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suzuki Keiko, Okada Hideshi, Sumi Kazuyuki, Tomita Hiroyuki, Kobayashi Ryo, Ishihara Takuma, Kakino Yoshinori et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum syndecan-1 reflects organ dysfunction in critically ill patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88303-7	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 Okamoto Haruka, Muraki Isamu, Okada Hideshi.....Kakino Yoshinori et al.	4. 巻 191
2. 論文標題 Recombinant Antithrombin Attenuates Acute Respiratory Distress Syndrome in Experimental Endotoxemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1526 ~ 1536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2021.05.015	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 Kitagawa Yuichiro, Kawamura Itta, Suzuki Keiko, Okada Hideshi.....Kakino Yoshinori et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Serum syndecan-1 concentration in hospitalized patients with heart failure may predict readmission-free survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0260350	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 Hirohisa Yano 1, Ayumi Kuroda, Hideshi Okada, Hiroyuki Tomita.....Yoshinori Kakino, Ryu Yasuda, Yuichiro Kitagawa, Tetsuya Fukuta, Takahito Miyake, Norihide Kanda, Nagisa Miyazaki, Tomoaki Doi, Takahiro Yoshida, Akio Suzuki, Shozo Yoshida, Shinji Ogura	4. 巻 13
2. 論文標題 Ultrastructural alteration of pulmonary tissue underconditions of high oxygen concentration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The International Journal of Clinical and Experimental Pathology	6. 最初と最後の頁 3004-3012
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 Suzuki Keiko, Okada Hideshi, Tomita Hiroyuki, Sumi Kazuyuki, Kakino Yoshinori.....Ogura Shinji	4. 巻 19
2. 論文標題 Possible involvement of Syndecan-1 in the state of COVID-19 related to endothelial injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	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) 10.1186/s12959-021-00258-x	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 Kamidani Ryo, Okada Hideshi, Kitagawa Yuichiro, Kusuzawa Keigo, Ichihashi Masahiro, Kakino Yoshinori.....Yoshida Shozo, Ogura Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Severe heat stroke complicated by multiple cerebral infarctions: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case 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) 10.1186/s13256-020-02596-2	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉村絃希、北川雄一郎、吉田省造、上谷遼、楠澤佳悟、柿野圭紀、三浦智孝、大岩秀明、安田立、岡本遥、長屋聡一郎、土井智章、岡田英志、柚原利至、小倉真治
2. 発表標題 自殺のため市販薬である無水カフェイン製剤を大量内服し急性血液浄化療法を実施した13歳女性の一例
3. 学会等名 第32回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田陽平、岡田英志、塚田真菜、上谷遼、三浦智孝、柿野圭紀、水野洋佑、安田立、北川雄一郎、三宅喬人、小倉真治
2. 発表標題 肺炎における好中球組織動態と役割についての考察
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎雄輝、岡田英志、富田弘之、柿野圭紀、鈴木浩大、北川雄一郎、三宅喬人、土井智章、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 血管内皮におけるヘパラン硫酸の減少は組織の炎症増悪に關与する
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅喬人、吉田省造、柿野圭紀、土井智章、神田倫秀、市橋雅大、水野洋佑、岡本遥、熊田恵介、牛越博昭
2. 発表標題 多発四肢外傷後の集中治療管理後症候群（PICS）に対してリハビリテーションの積極的な介入に難渋した一例
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田法顕、吉田隆浩、名知祥、福田哲也、安田立、北川雄一郎、柿野圭紀、三宅喬人、大岩秀明、館正仁、小倉真治
2. 発表標題 消防本部常駐型ドクターカーの有効性に関する検討
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅喬人、副田明男、岡田英志、吉田省造、神田倫秀、山田法顕、柿野圭紀、棚橋裕吉、安藤知広、松尾政之、小倉真治
2. 発表標題 頭部MRIを用いた長幹骨折/骨盤骨折に合併した脳脂肪塞栓症症例の検討
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

血清シンデカン-1が重症患者の臓器障害を反映
<https://medical.jiji.com/topics/2149>

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