

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390482

研究課題名（和文）

敗血症における血管内皮細胞病態の解明と新規遺伝子核酸試薬の開発に関する研究
研究課題名（英文）Detection of Circulating Endothelial Cells in Severe Sepsis

研究代表者

小池 薫 (KOIKE KAORU)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10267164

研究成果の概要（和文）：敗血症は現在も単一の根治的治療法が存在せず、死亡率の高い病態として知られている。敗血症の重症化には、血管内皮細胞障害が関与することが知られているものの、血管内皮細胞の分子レベルでの創薬には、未だ根治的なものが認められない。本研究は、敗血症モデル動物として盲腸結紮穿孔による雄性 BALB-C マウスを用い、敗血症の時系列で遊離型血管内皮細胞（CEC：circulating endothelial cell）が出現することを明らかとした。この CEC の発現には、nuclear factor- κ B (NF- κ B) が強く関与すること、FADD や TAK-1 の siRNA が部分的に抑制効果を持つこと、activator protein-1 (AP-1) のデコイ核酸は CEC の発現を干渉しないことなどが確認された。敗血症病態において CEC の増加は、血管内皮細胞障害による播種性血管内凝固の指標となる可能性を確認した。

研究成果の概要（英文）：Sepsis is a severe disorder as systemic inflammation with infection. In this illness, vascular endothelial damage proceeds to induce disseminated intravascular coagulation (DIC). This study revealed that circulating endothelial cell (CEC) was increased and plasma platelet count was decreased in the time dependent manner after sepsis induction by cecal ligation and puncture in male BALB-C mice. Nuclear factor-kappaB decoy oligonucleotides more strongly decreased CEC count than inactivation of FADD, TAK-1, and activator protein-1. The CEC count could be a reliable marker to evaluate DIC and dysfunction of vascular endothelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：(1) 敗血症 (2) 遊離型血管内皮細胞 (3) CEC (4) AP-1 (5) TAK-1 (6) NF- κ B (7) 播種性血管愛凝固症候群 (8) DIC

1. 研究開始当初の背景

敗血症は単一の根治的治療法が存在せず、死亡率の高い病態として知られている。敗血症の重症化には、血管内皮細胞障害が関与することが知られているものの、血管内皮細胞の分子レベルでの創薬には、未だ根治的なものが認められない。

このような敗血症病態では、炎症性サイトカインシグナルや Death 受容体シグナルの活性化を介して、血管内皮細胞の機能と構造を変容させ、播種性血管内凝固症候群を進展させる可能性がある。

一方、敗血症病態の血管内皮細胞は、基底膜から脱落する傾向を示す。脱落した血管内皮細胞は血液中を流れる circulating endothelial cells (CEC) となる可能性がある。この CEC を定量することが播種性血管内凝固症候群 (DIC) の診断に有用かもしれない。CECs は、臨床病態における血管内皮細胞障害の直接的指標 (検査マーカー) として応用の可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、敗血症病態における血管内皮細胞の変容を同定し、DIC の評価に CEC を用いることができるかを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

動物研究は、京都大学および名古屋大学の動物研究審査委員会の承認を得て、研究指針に準拠して行われた。研究動物には雄性 Balb-C マウス (8-12 週) を用

いた。敗血症モデル動物は、盲腸結紮穿孔により作成した。セボフルラン麻酔下で左臍下に約 2 mm の切開を行い、虫垂を膨出した後、虫垂の先端に糞便を充満させ、先端約 5mm を結紮し、23G 針で 2 箇所穿孔を加えた。対照群は、腹膜切開と虫垂先端の膨出のみを行ったものを用いた。虫垂を腹腔内にもどした後、皮膚切開部は縫合され、正常、敗血症 6 時間、敗血症 10 時間および敗血症 24 時間を研究対象とした。

これらの動物の右心房より採取した静脈血約 1 mL を、ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) 採血管に各々を回収し、4°C の 1%PBS 緩衝液 (phosphate buffered saline) 6 ml で希釈し、白血球系細胞の接着を抑制する目的で FcR 拮抗薬 (Miltenyi Biotec, Germany) を 50 μ L 加えた。この静脈血に抗 CD146 抗体を接合させたビーズを用いて CECs を沈下させ、沈降微小ビーズとして Dynabeads M450 sheep anti-rabbit IgG (DynaL Biotech, Norway) 50 μ L (10 μ g/mL) を用い、遊離型血管内皮細胞を回収した。4°C の条件下で、上記血液サンプルを 30 分間軽振盪させ、マグネットスタンドでビーズを固定した状態で血液サンプルを除去し、ビーズに付着する残りの血液を除去する目的で、1%PBS 緩衝液で 10 回、ピペティング洗浄を行った (図 1, 図 2 および図 3)。



図1 抗CD146抗体ビーズと反応させた血液希釈サンプル



図2. 30分間軽振盪させた後の抗CD146抗体ビーズ含有血漿のマグネットスタンド固定



図3. マグネットスタンドでのビーズ吸着を用いた残存血液を除去する目的での1%PBS緩衝液による洗浄操作

その後、ビーズに付着したCECsを蛍光標識する目的で、Ulex Europaeus lectin液 (Sigma-Aldrich, Japan) を100 μ L (2 mg/mL) 加え、1時間暗室で軽振盪反応させた。1%PBS緩衝液100 μ Lで2回、ピペティング洗浄を行った後、1%PBS緩衝液200 μ Lに溶解し、蛍光顕微鏡下でデンシトメータを用いて細胞数

をカウントし、血液約1 mLに含まれるCECs数を定量した。

以上に対する治療群として、転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) および activator protein-1 (AP-1) のおとり核酸、さらに、さまざまな細胞内情報伝達分子の siRNA を作成し、それらの活性を抑制した条件で、敗血症進行に伴う臓器炎症とCEC発現を評価した。

4. 研究成果

動物は敗血症の時系列に沿って、正常群、敗血症6時間群、敗血症10時間群および敗血症24時間の順にCECの検出を高めた。CECはハリエニシダ由来のレクチンとして知られる抗 Ulex europaeus agglutinin I (UEA I) 抗体、抗CD146抗体で検出され、これらはヒト肺動脈血管内皮細胞の培養系でも図4および図5のような陽性が確認できた。

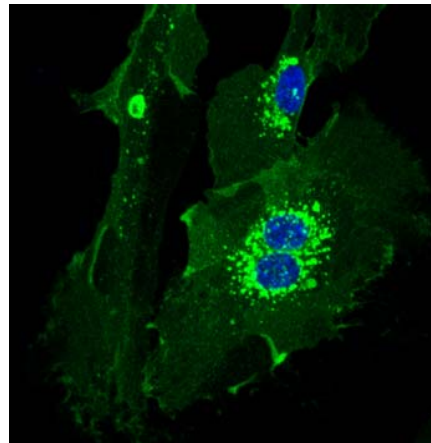


図4. ヒト肺動脈血管内皮培養細胞におけるUEA I (FITC 標識) の発現

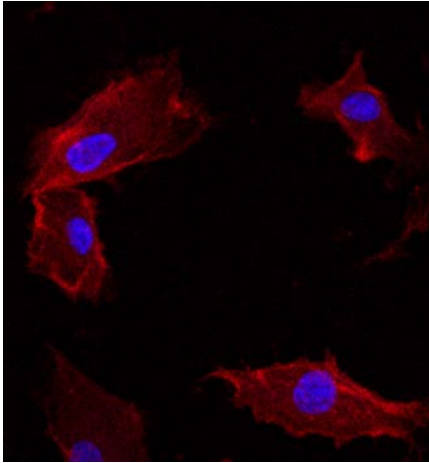


図 5. ヒト肺動脈血管内皮培養細胞における CD146 (Cy3 標識) の発現

敗血症発症後の Balb-C マウスの各群 (n=5) の CEC 数の解析では、正常群では平均 0.2 個/mL, 敗血症 6 時間群では 16 個/mL, 敗血症 10 時間群では 28 個/mL, 敗血症 24 時間群では 97 個/mL だった。抗 CD146 抗体ビーズで回収された CEC は UEA I 陽性であり, 図 6 および図 7 のようなものとして確認され, さらに von Willebrand 因子が陽性だった。

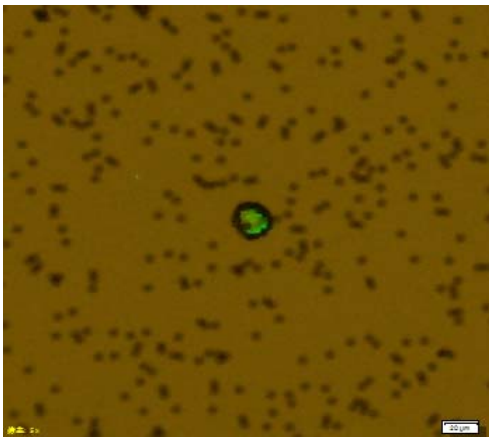


図 6. 抗 CD146 抗体ビーズで回収された血管内皮細胞における UEA I 陽性の確認

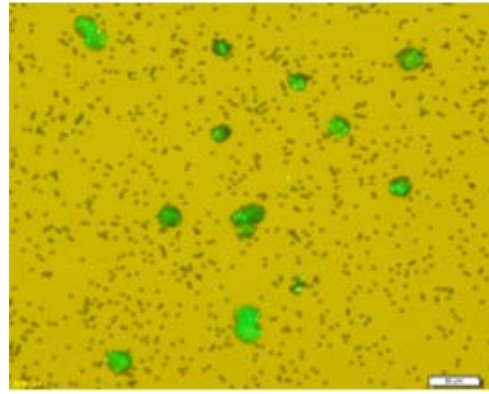


図 7. 敗血症病態の血液で増加する CD146 および UEA I の共陽性を示す CEC の増加

このような敗血症病態では, 時系列で血小板数低下が観察され, 播種性血管内凝固を示すものだった。電子顕微鏡像では血管内皮細胞異常 (雑誌論文 2 参照) が観察され, さまざまな臓器において毛細血管領域の血管内皮細胞の脱落が観察された。

このような血管内皮細胞の脱落と CEC の出現に対して, 敗血症作成直後に, リポゾーム法を用いた siRNA やデコイ核酸の静脈内導入を行った結果, NF- κ B デコイ核酸が強い抑制作用を持つこと, Fas-associated death domain protein (FADD) と TGF- β -Activated Kinase 1 (TAK-1) の siRNA が部分的に抑制効果を持つこと, AP-1 デコイ核酸は CEC の発現を干渉しない傾向などが確認された。

以上より, 本研究では, 抗 CD146 抗体と UEA I 抗体で血液中に遊離される CEC 数をカウントできることを確認し, さらに敗血症病態の進行により血管内皮細胞障害と血小板数減少を伴う DIC が出現すること, これらの敗血症に起因する DIC 所見に付随して CEC 数が増加すること, CEC 増加には細胞内情報伝達蛋白として FADD と TAK-1 が関与すること, また, 転

写因子では NF- κ B が関与することを確認した。以上を踏まえて、ヒト培養血管内皮細胞にも、CD146 および UEA I が発現することを確認した。ヒト敗血症における血管内皮細胞障害と DIC のマーカーとして、CEC カウントの有用性が示唆される研究結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Matsuda N, Teramae H, Futatsugi M, Takano K, Yamamoto S, Tomita K, Suzuki T, Yokoo H, Koike K, Hattori Y. Up-regulation of histamine H4 receptors contributes to splenic apoptosis in septic mice: counteraction of the antiapoptotic action of nuclear factor-kappaB. J Pharmacol Exp Ther 2010;332:730-7.

2. Matsuda N, Teramae H, Yamamoto S, Takano K, Takano Y, Hattori Y. Increased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse aorta: effect of systemic delivery of FADD siRNA. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;298:H92-101.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 薫 (KOIKE KAORU)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：10267164

(2) 研究分担者

松田 直之 (MATSUDA NAOYUKI)
名古屋大学・医学研究科・教授
研究者番号：50332466