

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09031

研究課題名（和文）敗血症における血管内皮細胞で産生されるsFlt-1の役割の解明

研究課題名（英文）Role of sFlt-1 produced by vascular endothelial cells in sepsis

研究代表者

池田 崇之（IKEDA, Takayuki）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：00374942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：テトラサイクリン依存性血管内皮細胞特異的sFlt-1ノックダウンマウス作製のためのmiRNA発現ベクターを作製した。テトラサイクリン依存的にmiRNAが発現し、sFlt-1がノックダウンされることを培養細胞で確認した。現在、トランスジェニックマウス作成を進めている。血管内皮細胞ではLPSによりsFlt-1の産生が亢進し、血管内皮細胞の増殖が抑制され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

本研究成果は、敗血症の進展と重症化におけるsFlt-1の役割を明らかにするための基礎的実験である。これらの結果とともにトランスジェニックマウスを用いて敗血症とsFlt-1の関係が明らかになれば、敗血症重症化の予防や敗血症の有効な治療法の開発へとつながることが期待される。また、未だ不明な点が多いmiRNA選択的ポリA付加というsFlt-1産生制御機構が明らかになることは学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：We constructed a miRNA expression vector for the creation of tetracycline-dependent vascular endothelial cell-specific sFlt-1 knockdown mouse. It was confirmed in cultured cells that miRNAs are expressed in a tetracycline-dependent manner and sFlt-1 is knocked down. Currently, transgenic mice are being created. We showed that LPS enhances sFlt-1 production in vascular endothelial cells and suppressed vascular endothelial cell proliferation.

研究分野：分子生物学

キーワード：sFlt-1 敗血症 血管内皮細胞 VEGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症や敗血症性ショックにおいて血管内皮障害が多臓器不全への進展に重要な役割を果たしている。血管内皮機能は、血管透過性の亢進、白血球の活性化によるグリコカリックス(血管内皮細胞の表面を覆う糖タンパク質層)の崩壊により破綻すると考えられている。血管内皮細胞の機能において最も重要な分子が血管内皮増殖因子(VEGF)であり、血管内皮細胞の増殖および血管透過性の亢進を促進する。敗血症患者では血中の VEGF 濃度が高く、それにより血管透過性が亢進し、血管内皮障害につながると考えられている(*SHOCK* 45:259, 2016)。敗血症患者ではまた、可溶性の VEGF 受容体である sFlt-1 の血中濃度が重症化に伴い上昇していることから、重症化のバイオマーカーとして有益であることが多数報告されている(*J. Clin. Med. Res.* 10:700, 2018)。血管内皮細胞では VEGF は感染後早期に発現誘導され、その後も高い発現が続くものに対して、sFlt-1 産生は数時間遅れて上昇してくる。ところが、敗血症患者での VEGF 濃度と sFlt-1 濃度が必ずしも相関しないとの報告と、さらに上記のように重症例で sFlt-1 の血中濃度が高いことから、VEGF による重症化の結果として sFlt-1 産生が亢進しているわけではなく、sFlt-1 自身の産生制御が重症化に重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、敗血症の進展と重症化における sFlt-1 の役割は明らかになっていない。

VEGF は、血管内皮細胞表面に発現する受容体(Flt-1/VEGFR-1 および Kdr/VEGFR-2)に結合するが、主にシグナルを伝えるのは Kdr であり、Flt-1 はシグナルをほとんど伝えていないと考えられている。ところが、上述のように Flt-1 の細胞外ドメインは可溶性受容体(sFlt-1)として分泌され、細胞外で VEGF をトラップするデコイ受容体として機能している。VEGF、sFlt-1 はいずれも血管内皮細胞から分泌され、グリコカリックスで内皮細胞表面に保持されることで、血管内皮細胞の増殖と透過性に対して、前者は促進的に、後者は抑制的に作用する。sFlt-1 は、細胞膜受容体である Flt-1 と同一の遺伝子から mRNA 選択的ポリ A 付加により産生されているが、その制御機構はまだ未解明であり、さらに sFlt-1 の生物学的意義は依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 血管内皮特異的 sFlt-1 ノックダウンマウスを作成し、敗血症モデルで敗血症の進展や重症化を解析することで、血管内皮細胞で産生される sFlt-1 の敗血症重症化における役割を明らかにする。

(2) 血管内皮細胞での sFlt-1 産生制御機構を明らかにすることで敗血症重症化のメカニズムを解明し、sFlt-1 産生制御による敗血症治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウス作成用ターゲティングベクターの構築

LT3GEP ベクター(Addgene)の EGFP 下流にマウス sFlt-1 の miRNA 配列を挿入した(LT3GEP-sFlt-1miRNA)。LT3GEP-sFlt-1miRNA ベクターの miRNA 下流に bGH polyA 配列を挿入し、さらに TRE 上流に Rosa left arm を、polyA 配列下流に Rosa right arm を挿入した。

Tet-on U2OS 細胞にマウス sFlt-1 を発現させ、LT3GEP-sFlt-1miRNA をレンチウイルスにより導入した。U2OS 細胞から RNA を精製し、qPCR により sFlt-1 の発現量を解析した。

(2) LPS

初代培養ヒト血管内皮細胞(HMVEC)を 1 µg/ml の LPS で 0~48 時間処理したあと、RNA を単離し sFlt-1 の発現を qPCR で解析した。また、LPS で 72 時間処理したときの細胞増殖を Cell Counting Kit (DOJINDO) で測定した。

(3) RNA プルダウンと質量分析

通常酸素濃度と低酸素濃度(1%)で培養した HMVEC から核抽出液を調製した。sFlt-1 産生制御配列付近の RNA 配列(プローブ)を核抽出液と混合し、プローブに結合するビオチン化オリゴ DNA と Dynabeads-ストレプトアビジン(Thermo)を用いて、プローブに結合するタンパク質を単離した。SDS-PAGE で電気泳動したあと、通常酸素濃度と低酸素濃度で差のあるバンドを切り出し、質量分析によりタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) sFlt-1 ノックダウンマウスの作製

sFlt-1 ノックダウンマウスは、研究開始当初は Cre-loxP システムによるマウス sFlt-1 mRNA 特異的 miRNA の発現により作製する計画であった。しかしながら、sFlt-1 の機能をより正確に解明するために時期特異的に発現制御できるマウスが必要であると考え、Tet-off システムによるテトラサイクリン誘導型の miRNA 発現マウスを作製する計画に切り替えた。発現ベクターは

LT3GEP を使用し、EGFP の下流に miRNA 配列を挿入することで EGFP の 3'-UTR として miRNA が発現される。miRNA 配列はすでに shRNA で効果を確認していた配列を用いた。テトラサイクリンにより発現が誘導されること、3'-UTR としての配列が切断されて miRNA として機能することを確認するために、Tet-on U2OS 細胞を用いた。Tet-on U2OS 細胞は、マウス sFlt-1 安定発現株をクローニングした細胞を用い、miRNA は LT3GEP ベクターから作製したレンチウイルスの感染により過剰発現させた。U2OS にレンチウイルスを感染させ、1 $\mu\text{g/ml}$ のテトラサイクリンで発現誘導（48 時間）した後、RNA を精製し qPCR によりマウス sFlt-1 の発現を解析したところ、sFlt-1 miRNA 発現細胞ではコントロールに対して約 3 割まで発現が減少していた（図 1）。したがって、sFlt-1 miRNA はテトラサイクリンにより誘導され、マウス sFlt-1 の発現を抑制することが確認できた。この実験で用いた miRNA 配列は、膜貫通型の Flt-1 (mFlt-1) の発現には影響がないことはすでに確認済みであるため、sFlt-1 特異的にノックダウンできる系であることが示された。

ノックダウンマウス作製にあたり、安定に miRNA を発現させるため、Rosa 遺伝子内に組み込むことを計画している。現在 Rosa 遺伝子配列を挿入したベクターを作成しており、トランスジェニックマウスの作製に進む予定である。トランスジェニックマウスは、血管内皮細胞特異的テトラサイクリン制御性トランス活性化因子発現マウス (Cdh5-tTA マウス、The Jackson Laboratory) と掛け合わせるにより、最終的にテトラサイクリン誘導性 sFlt-1 ノックダウンマウスが得られる。

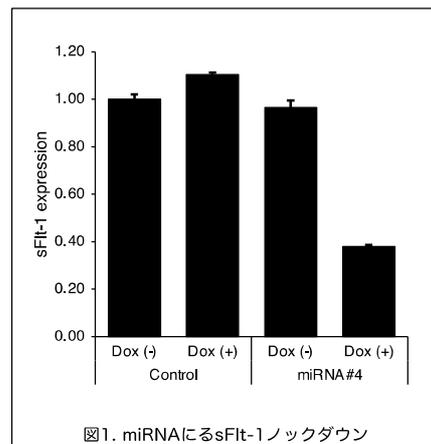


図1. miRNAによるsFlt-1ノックダウン

(2) 血管内皮細胞における LPS の影響

敗血症患者の血管内皮細胞動態を *in vitro* で明らかにするため、HMVEC を用いて LPS による血管内皮細胞への影響を検討した。血管内皮細胞に LPS を添加し 0~48 時間培養した後、RNA を単離し sFlt-1 の発現を調べたところ、sFlt-1 産生の増加が確認された（図 2）。このとき、血管内皮細胞の形態に顕著な差は観察されなかった。同時に mFlt-1 の発現も解析したところ、mFlt-1 も同様に増加していた。このことから、sFlt-1 の産生が特異的に促進されているのではなく、Flt-1 遺伝子の転写が促進されている可能性が示唆された。また、細胞増殖能を WST-8 を用いて測定したところ、LPS 処理後 72 時間の時点で増殖が抑制されていることが明らかとなった（図 3）。したがって、LPS により sFlt-1 産生が増加し細胞増殖が抑制されていることが示唆された。

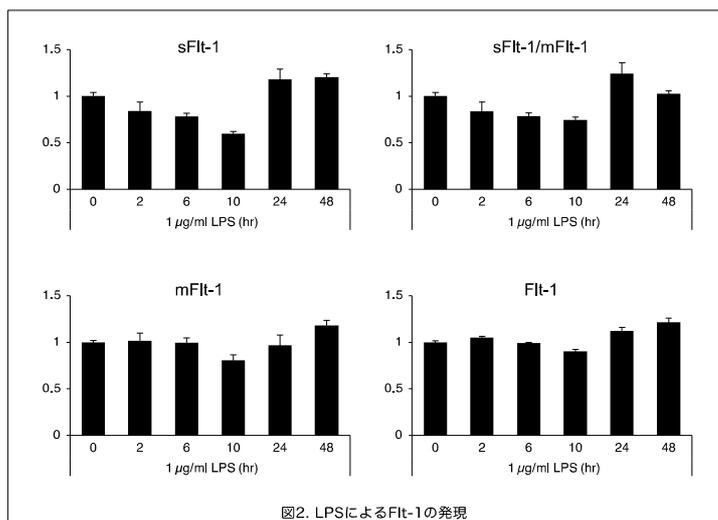


図2. LPSによるFlt-1の発現

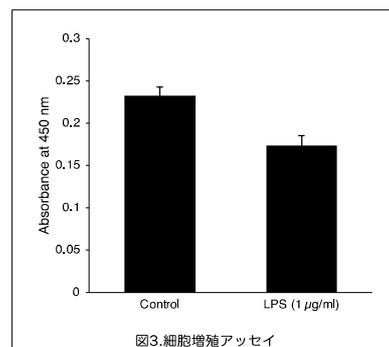


図3.細胞増殖アッセイ

Flt-1 遺伝子自体の転写制御により発現が増加した場合でも、sFlt-1 の産生は増加することになる。さらに、sFlt-1 と mFlt-1 の比を見ると、24 時間以降はわずかに sFlt-1 の発現が亢進していることから、転写制御に加え sFlt-1 に特異的な制御も sFlt-1 産生の増加に寄与していることが考えられる。いずれの場合も、LPS により sFlt-1 の増加が誘導されていることから、sFlt-1 の増加が LPS による血管内皮細胞機能にどう影響するかを過剰発現やノックダウンの系を用いて明らかにしていく予定である。

(3) sFlt-1 産生制御タンパク質の同定

LPS による sFlt-1 産生の特異的な制御がわずかであることから、sFlt-1 の産生制御タンパク質の同定には他の系が適していると考えられる。そこで、これまで低酸素濃度が特異的に sFlt-1 産生を制御していることを明らかにしていたことから、低酸素濃度で sFlt-1 pre-mRNA に特異的に結合するタンパク質を同定し、LPS による制御との関連を明らかにすることにした。通常酸

酸素濃度と低酸素濃度（1%）で培養した HMVEC から核抽出液を調製し、sFlt-1 産生制御配列付近の RNA 配列をプローブとして、RNA プルダウンによりタンパク質を単離した。通常酸素濃度と低酸素濃度で単離したタンパク質を SDS-PAGE で展開したところ、低酸素濃度に特異的ないくつかのバンドが得られた。これらを質量分析により解析したところ、100 以上の RNA 結合タンパク質が同定された。そのうち、泳動結果と分子量が合う 13 種類のタンパク質について、RNA プルダウンのサンプルでウエスタンブロットを行ったが、低酸素濃度で RNA に結合したタンパク質として検出されなかった。RNA プルダウンでは RNA 結合タンパク質を中心に単離されていることから、実験条件などは適切であると考えられる。したがって、今後は RNA プルダウンのサンプルをすべて質量分析し、通常酸素濃度と低酸素濃度で差のあるタンパク質を同定することを予定している。sFlt-1 産生制御機構の詳細なメカニズムが明らかになり次第、LPS と制御機構との関係を証明していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito-Takatsuji Hidehito, Yoshitomi Yasuo, Yamamoto Ryo, Furuyama Takafumi, Ishigaki Yasuhito, Kato Nobuo, Yonekura Hideto, Ikeda Takayuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Transthyretin Is Commonly Upregulated in the Hippocampus of Two Stress-Induced Depression Mouse Models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3736 ~ 3736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043736	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 Ikeda Takayuki, Yoshitake Yoshino, Yoshitomi Yasuo, Saito-Takatsuji Hidehito, Ishigaki Yasuhito, Yonekura Hideto	4. 巻 11
2. 論文標題 EPAC2 acts as a negative regulator in Matrigel-driven tubulogenesis of human microvascular endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19453 ~ 19453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98906-9	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 Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Saito-Takatsuji Hidehito, Yonekura Hideto	4. 巻 22
2. 論文標題 Emerging Role of AP-1 Transcription Factor JunB in Angiogenesis and Vascular Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2804 ~ 2804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062804	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 Saito-Takatsuji Hidehito, Yoshitomi Yasuo, Ishigaki Yasuhito, Yamamoto Shoko, Numata Noriaki, Sakai Yasuo, Takeuchi Masayoshi, Tomosugi Naohisa, Katsuda Shogo, Yonekura Hideto, Ikeda Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Protective Effects of Collagen Tripeptides in Human Aortic Endothelial Cells by Restoring ROS-Induced Transcriptional Repression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2226 ~ 2226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13072226	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 Kawakita Emi, Yang Fan, Kumagai Asako, Takagaki Yuta, Kitada Munehiro, Yoshitomi Yasuo, Ikeda Takayuki, Nakamura Yuka, Ishigaki Yasuhito, Kanasaki Keizo, Koya Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Metformin Mitigates DPP-4 Inhibitor-Induced Breast Cancer Metastasis via Suppression of mTOR Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 61 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.mcr-20-0115	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高辻英仁、吉富泰央、池田崇之、山本亮、加藤伸郎、米倉秀人
2. 発表標題 うつモデルマウスの脳海馬で発現変動する遺伝子の探索と役割の解明
3. 学会等名 分子病理学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田崇之、吉竹佳乃、吉富泰央、高辻英仁、石垣靖人、米倉秀人
2. 発表標題 EPAC2はヒト微小血管内皮細胞の管腔形成において負の制御因子として働く
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高辻英仁、吉富泰央、石垣靖人、山本祥子、沼田徳暁、酒井康夫、竹内正義、友杉直久、勝田省吾、米倉秀人、池田崇之
2. 発表標題 コラーゲン・トリペプチドは血管内皮細胞を酸化ストレスから保護する効果を持つ
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉富泰央、池田崇之、高辻英仁、米倉秀人
2. 発表標題 発生期の血管ネットワーク形成におけるTip cell転写因子JunBの役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	米倉 秀人 (YONEKURA Hideto) (80240373)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究分担者	吉富 泰央 (YOSHITOMI Yasuo) (80399039)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	
研究分担者	高辻 英仁 (齋藤) (SAITO-TAKATSUJI Hidehito) (40768959)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	

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