

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462819

研究課題名(和文) 低酸素再酸素化ストレスが血管内皮細胞機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of ischemia and reperfusion injury on the endothelial cells

研究代表者

小幡 由佳子 (Obata, Yukako)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90432210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮は炎症や虚血再灌流障害の際に臓器と同様に重要な役割を果たし、メディエータとして働いていることがわかっている。ブタ下行大動脈血管内皮を用いエネルギー枯渇状態を作り、細胞機能評価として細胞内カルシウム濃度を測定した。シアン化カリウムと2-デオキシ-D-グルコースを用いて細胞をエネルギー枯渇状態にし、再度エネルギー供給すると、ブラジキニン、サブシガーゲンによる細胞刺激で細胞内カルシウム反応が通常時より小さくなることがわかった。これらから細胞の機能の一部が変化することがわかり、臨床上の低酸素再灌流時においても、血管内皮細胞が何らかの変化を起こしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Endothelial cells play important roles such as organs during inflammation and ischemia and reperfusion injury and it has been known that they work as mediator. We measured the intracellular Ca²⁺ concentration of porcine aortic endothelial cells as endothelial function, when the energy depletion by chemical agents and the energy supply with medium was caused on the cells. We found that the bradykinin-induced Ca²⁺ response and the thapsigargin-induced Ca²⁺ response partly suppressed after the energy depletion with KCN and 2-Deoxy-D-glucose and the energy supply with medium. These findings suggest that endothelial function was altered, at least in part, by the energy depletion and that the change of endothelial function occurs in the clinical hypoxia and reperfusion.

研究分野：麻酔、集中治療

キーワード：虚血再灌流 低酸素 血管内皮 エネルギー枯渇

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流障害は虚血中に起きた組織障害が、血流の再開（再灌流）とともに悪化する病態である。その初期障害には血管内皮細胞や白血球由来の活性酸素種が関与し、微小循環障害を生じる。活性酸素種は炎症性メディエータ（サイトカインの誘導、白血球接着因子の発現）として働く以外に、脂質やタンパク質と反応して直接細胞障害を引き起こすことが知られている。臨床的には虚血再灌流の状態は頻繁に見られ、脳梗塞、心筋梗塞、睡眠時無呼吸症候群、敗血症、大血管手術、移植術などが大きく関わってくる。

血管内皮細胞は組織と血液との機械的バリアとして働くだけでなく、微小循環を適切に制御するために血管内皮由来弛緩因子（EDRFs; PGI₂, Nitric oxide）EDHFを産生している。血管内皮細胞は虚血耐性に優れているが、虚血再灌流時において、PGI₂、Nitric oxideの低下が報告されており、この血管内皮機能障害には活性酸素種の関与も示唆されている⁽¹⁾。しかし、低酸素負荷およびその後の再酸素化過程における経時的な血管内皮機能の変化については詳細が明らかではなく、不可逆的障害を生じさせる低酸素負荷時間についても不明である。さらに、虚血再灌流時にはアポトーシスとネクローシスという2つの細胞死が出現するが、アポトーシス、ネクローシスを規定する上流シグナルについては多くの点が明らかではない。

今まで報告されている血管内皮細胞を用いた低酸素再酸素化の研究では静止モデルを使い、実際に灌流したものはほとんどない。我々は実際に血管内皮細胞に対して灌流を行うことで、より生理的条件下で低酸素再酸素刺激を作成し、その時の内因性活性酸素種の定量、細胞内シグナル、内皮細胞機能を検討する。このことは今までにない新たな試みであり、虚血再灌流障害の基礎研究に重要な役割を果たすと思われる。

2. 研究の目的

血管内皮は炎症や虚血再灌流障害の際に臓器と同様に重要な役割を果たし、様々なシグナル伝達を介してメディエータとして働いていることがわかっている。生体内では血管内に血液が流れることによりシェアーストレスがかかり、血管内皮細胞が様々な反応を起こしている。しかし今まで報告されている血管内皮細胞を用いた虚血再灌流研究では静止モデルが使われており、実際に灌流したものはほとんどない。我々は実際に血管内皮細胞に対して灌流を行い、シェアーストレスに類似した、より生理的条件下で低酸素再酸素刺激をおこない、その時の内因性活性酸素種の定量、細胞内シグナル、内皮細胞機能を検討することを目的としていた。

3. 研究の方法

当初灌流下での虚血再灌流障害モデルの作

成を目指していたが、酸素が大気中に比較的高濃度で存在するため、低酸素状態を実現することが非常に困難であり、また灌流についても細胞障害を加えた後の細胞は剥がれやすくこれについても実施が不可能な状態となった。やむなくシアン化カリウム(KCN)と2-デオキシ-D-グルコースを用いて化学的エネルギー枯渇状態を作り、その前後の変化について研究することとした。

ブタ下行大動脈血管内皮細胞を2時間エネルギー枯渇状態にすると細胞のF-actinの構造が変化し、細胞の透過性亢進が見られる。この細胞をその後代謝阻害剤を除去し、3時間再培養するとこれらは正常化することは既に示されていた。しかし細胞のF-actin構造変化が可逆的であること以外の細胞機能の変化については詳細はわかっていないため細胞内エネルギー枯渇とその後のエネルギー再供給を行った血管内皮細胞のカルシウム応答の変化について調べた。

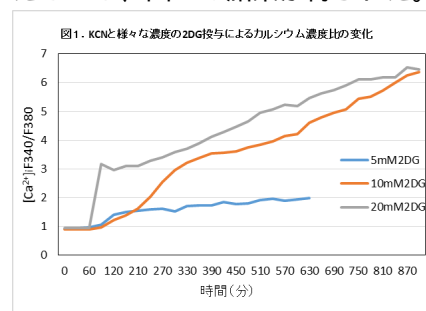
(1) エネルギー枯渇状態に最適な薬剤濃度と時間を調査するため、初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞に酸化リン酸化阻害剤KCN(5mM)と解糖系の阻害薬である2-DG(2-deoxy-D-glucose)(5mM, 10mM, 20mM)を用いて薬剤によるエネルギー枯渇状態を作り細胞内Ca²⁺濃度変化を調べた。内皮細胞内Ca²⁺濃度は、fura-2/AMを用いた蛍光色素測定法により測定しその比(F340/F380)の変化について評価した。

(2) 初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞に酸化リン酸化阻害剤KCN(5mM)と解糖系の阻害薬である2-DG(5mM)を用いて薬剤によるエネルギー枯渇状態を作り、2時間投与した後ウオッシュアウトし、3時間細胞培養液で再培養してからブラジキニン10nM刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度変化を調べた。内皮細胞内Ca²⁺濃度は、fura-2/AMを用いた蛍光色素測定法により評価した。

(3) (2)と同様な方法でエネルギー枯渇状態を作成し、2時間のエネルギー枯渇状態の後ウオッシュアウトし、3時間細胞培養液で再培養してからサブシガーゲン1μM刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度変化を調べた。

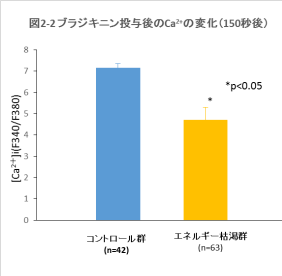
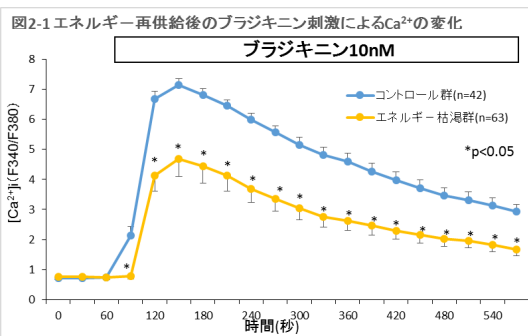
4. 研究成果

(1) KCN(5mM)に様々な濃度の2-DGを加えて薬剤の濃度とエネルギー枯渇時間を検討したところ、図1の結果が得られた。

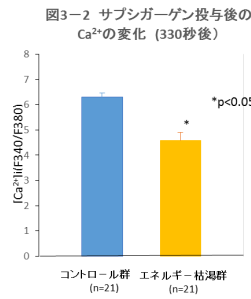
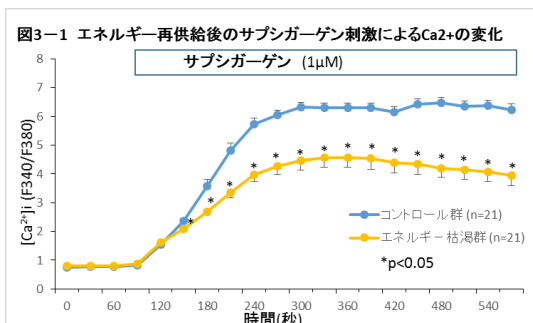


10mM、20mM ではエネルギー枯渇のみで大きな反応が見られており、細胞内カルシウムオーバーロードを示唆する所見と考えられたため、障害が大き過ぎると判断し5mMを選択した。また、枯渇時間は2時間を境に変化が大きくなることから、2から3時間が最適とした。

(2) コントロール群のブラジキニン刺激後の fura-2/AM の ratio (F340/F380) は 7.14 ± 1.4 で、エネルギー枯渇再供給群ではベースラインでは有意差が無かったが、ブラジキニン刺激後の値は 4.7 ± 2.3 で有意に低くなった。代謝阻害剤を用いたエネルギー枯渇と再供給はブタ下行大動脈血管内皮細胞におけるブラジキニン誘発性内皮細胞内カルシウム応答を抑制した。(図2-1、2-2)



(3) コントロール群のサブシガーゲン刺激後の fura-2/AM の ratio (F340/F380) は 6.3 ± 0.2 で、エネルギー枯渇再供給群ではベースラインでは有意差が無かったが、サブシガーゲン刺激後の値は 4.6 ± 0.3 で有意に低くなった。代謝阻害剤を用いたエネルギー枯渇と再供給はブタ下行大動脈血管内皮細胞におけるサブシガーゲン誘発性内皮細胞内カルシウム応答を抑制した。(図3-1、3-2)



これらの結果から代謝阻害剤でのエネルギー枯渇再供給モデルでは、血管内皮細胞でのカルシウム応答が変化することがわかった。カルシウム濃度の変化は様々な遺伝子発現や細胞内シグナリングに關与しており、見かけ上の細胞構造変化は可逆的であるが、細胞機能には何らかの障害があったと考えられる。

ブラジキニンとサブシガーゲンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機序は異なるが、エネルギー枯渇状態にすることにより、これらの経路のどこかに異常が起こったと予想される。

少なくとも一部は細胞外からの Ca^{2+} 取り込み (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) を抑制したことによる可能性がある。

以上から KCN と 2-DG を用いた代謝阻害剤でのエネルギー枯渇再供給モデルではカルシウム応答が抑制され、細胞機能の変化が示唆された。

これまではカルシウムの変化の結果が得られたがその他のシグナル伝達や細胞機能に関する因子については現在のところ一定のデータを得るに至っていない。今後は更に発展させてこのモデルでの細胞内のシグナル変化を解明することが課題である。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

小幡由佳子、袴田晃央、小田切圭一、渡邊裕司²⁾、土井松幸、中島芳樹：代謝阻害剤を用いた細胞内エネルギー枯渇と再供給が血管内皮細胞機能に及ぼす影響、第43回日本集中治療医学会、2016年2月13日、神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 由佳子 (YUKAKO OBATA)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90432210

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

無し