

機関番号：32665

研究種目：基礎研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20592129

研究課題名（和文）内皮細胞の低温下 LPS 刺激培養での炎症性サイトカイン mRNA の安定性の経時的变化に関する研究

研究課題名（英文）Implication for long-term hypothermia of degradation of cytokine mRNA in endothelial cells stimulated with lipopolysaccharides

研究代表者

櫻井 淳 (SAKURAI ATSUSHI)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40339320

研究成果の概要（和文）：内皮細胞を細菌由来物質の lipopolysaccharides (LPS) で刺激しながら長期の低温下で培養した際に、内皮細胞より分泌される interleukin (IL)-8 タンパクの産生と mRNA の発現と安定性を検討した。IL-8 のタンパクの分泌は 96 時間まで低温で抑制されるが、mRNA の発現は初期には抑制されたが 72 時間で増強し、mRNA の安定性も 24 時間では増大していた。長期間の低温は見かけ上の炎症反応の抑制が見られるが、mRNA の発現や安定性の増強がみられ炎症反応発現のポテンシャルを持っているため、臨床において長期間にわたる低体温療法を施行するときには注意が必要である。

研究成果の概要（英文）：This experimental study investigated the production of interleukin (IL)-8 protein and its mRNA expression and stability in endothelial cells stimulated by lipopolysaccharides (LPS) and undergoing long-term hypothermia. Under long-term hypothermia, IL-8 protein production was suppressed, while IL-8 mRNA was stabilized at the point of turn-over and expression increased. The potential of IL-8 production for the inflammatory stimulation in endothelial cells may persist during long-term hypothermia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：救急医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：内皮細胞、長期低温、炎症、LPS、IL-8、mRNA 安定性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳障害（心肺停止蘇生後、頭部外傷、新生児仮死等）後に、体温を低下させて脳の蘇生を図る脳低温療法が臨床で施行され、一部の症例で有効性が確認された。しかし、脳低温療法中の合併症として肺炎などの炎症

性病変が存在するため、低体温時の炎症反応に関し検討する必要があった。

(2) 急性呼吸窮迫症候群はいまだ有効な治療法が無く、低体温によって炎症を抑えることによる治療が期待されている。この時、低体温療法は長期に及ぶ可能性があるが、長期

間の低体温時に炎症反応がどのように変化するかは報告は少ない。よって、長期間低体温になったときの炎症反応の変化を知る必要があった。

## 2. 研究の目的

体温を長期に低下させた際の炎症反応の変化を知るために、人臍帯血内皮細胞を LPS 下で長期間低温培養した際の IL-8 のタンパクの分泌と mRNA の発現と安定性を検討すること。

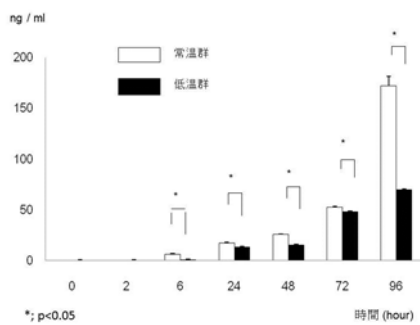
## 3. 研究の方法

(1) 人臍帯血内皮細胞を常温群 (37°C) と低温群 (30°C) の二群に分けて、LPS (1µg/mL) 下で 2、6、24、48、72、96 時間で培養し、上清の IL-8 のタンパクを ELISA 法で測定した。また、各群の各時間帯の細胞における mRNA の発現を real-time RT-PCR 法で測定した。  
 (2) 人臍帯血内皮細胞を常温群 (37°C) と低温群 (30°C) の二群に分けて、LPS (1µg/mL) 下に 24 時間培養した。その後 actinomycin D を加えて 2、4、6 時間培養し、mRNA が減少する率を測定し mRNA の安定性を検討した。

## 4. 研究成果

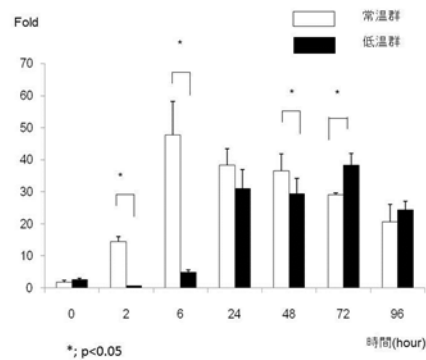
(1) IL-8 タンパクと mRNA の長期低温培養による変化

### ①IL-8 タンパクの長期低温培養での変化



IL-8 のタンパクの分泌は 6 時間から 96 時間まで、常温群に比して低温群が有意に抑制された。

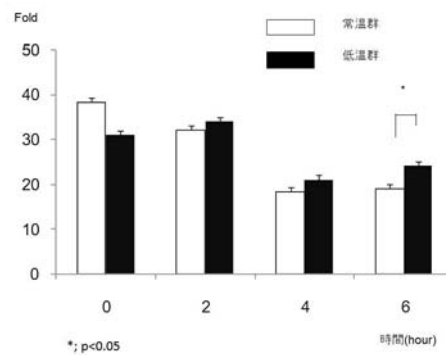
### ②mRNA の長期低温培養での変化



mRNA は 2、6、48 時間で常温群に比して低温群が有意に抑制された。しかし、72 時間ではその関係は逆転して、低温群が有意に mRNA の発現が増強した。

### (2) mRNA の安定性の検討

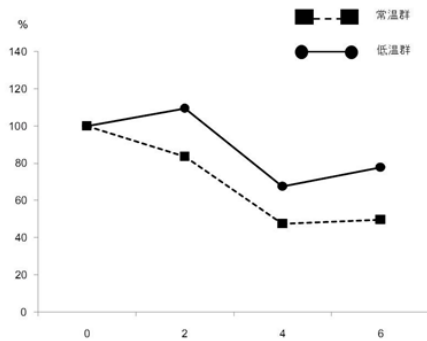
#### ①mRNA の減少



mRNA は actinomycin D を添加後減少した。6 時間の時点で低温群が常温群に比して有意に mRNA が多かった。

#### ②mRNA の減少率

mRNA の減少率を計算した。各時間の mRNA の発現量を 0 時間の発現量で除した。値が大きいほどより多くの mRNA が残っていることを示す。



常温群に比して低温群がより多くの mRNA が残っていることが示された。すなわち、低温により mRNA の安定性が増加することが示唆された。

以上より、LPS 刺激下の内皮細胞の長期培養において、IL-8 のタンパク分泌は低温により抑制されるが、mRNA の発現は増強し安定性は増加する。これは、低温により一見炎症反応が抑制されているように見えても、炎症反応が増強するポテンシャルを持っている可能性があることを示唆している。

### (3) 得られた成果の位置づけ

脳低温療法は、心肺停止蘇生後や新生児仮死に対して有効性が臨床的に証明されたため、現在世界的にこの治療の施行症例が増加している。この治療法を行う際には、肺炎といった合併症が併発するが、本研究のように低体温により炎症反応が抑制されているが、炎症反応を起こすポテンシャルは残っている可能性が示唆される。よって、症例を復温するときには急激に炎症反応が増強する可能性があるため、注意が必要である。

また、急性呼吸窮迫症候群での体温を低下させて炎症反応を抑える治療に関しても、炎症反応が抑えられて病態が改善したように見えても、炎症のポテンシャルが残っている可能性が考えられ、復温とともに再び症状が悪化する可能性が示唆される。

臨床的に体温を低下させる治療を行う際には、一見改善したと見られる病体も復温とともに増悪する可能性があるため注意が必要である。

### (4) 今後の展望

本研究で得られた結果より、脳低温療法では復温時の変化が一つのキープポイントとなる。今後は、内皮細胞を低温の状態から常温に戻した際に、IL-8 のタンパク分泌や mRNA にいかなる変化が生じるか検討が必要である。臨床においては、脳低温療法施行中の復温期にいかなる変化が生じるかを炎症反応

を中心に検討する必要があると考えられた。

## 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 1 件)

- ① Atsushi Sakurai, Kosaku Kinoshita, Rikimaru Kogawa, Tsukasa Kuwana, Takashi Moriya, Akihiro Noda and Katsuhisa Tanjoh, Changes caused by hypothermia in interleukin-8 mRNA stability in human endothelial cells stimulated by lipopolysaccharide, Critical Care Medicine, 査読無、37 巻 12 号 (suppl)、2010、A57p

[学会発表] (計 6 件)

- ① Atsushi Sakurai, Changes caused by hypothermia in interleukin-8 mRNA stability in human endothelial cells stimulated by lipopolysaccharide. Society of critical care medicine 39<sup>th</sup> critical care congress 2010 2010. 1. 11, Miami (USA)
- ② 櫻井 淳, Lipopolysaccharide 刺激で長期低温培養した内皮細胞での interleukin-8 の蛋白産生と mRNA 発現の経時的変化、第 15 回日本エンドトキシン研究会、2009. 11. 14、東京
- ③ 櫻井 淳, Lipopolysaccharide 刺激下に低温培養した人臍帯血内皮細胞での Actinomycin D による IL-6 と IL-8 の mRNA の安定性の検討、第 37 回日本救急医学会 2009. 10. 29、盛岡
- ④ 櫻井 淳, Lipopolysaccharide 刺激下に培養した人臍帯血内皮細胞での低

温による IL-6 と IL-8 の mRNA の安定性変化の検討、第 13 回日本脳低温療法学会、2009. 7. 3、札幌

⑤ 櫻井 淳、長期低温下培養に lipopolysaccharide で刺激した人臍帯血内皮細胞における interleukin-8 の蛋白産生と mRNA 発現の経時的変化、第 36 回日本救急医学会、2008. 10. 14、札幌

⑥ 櫻井 淳、Lipopolysaccharide 刺激下に長期低温培養した人臍帯血内皮細胞での interleukin-8 の蛋白産生と mRNA 発現の経時的変化、第 11 回日本脳低温療法学会、2008. 7. 4、岐阜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻井 淳 (SAKURAI ATSUSHI)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：40339320

### (2) 研究分担者

木下浩作 (KINOSHITA KOSAKU)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号：90260968

### (3) 連携研究者

なし