

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791956

研究課題名(和文) エンドトキシン血症肺毛細血管モデルにおけるヒスタミン受容体発現と血管透過性の関係

研究課題名(英文) A relation histamine receptor and vascular permeability in the model of lung microvascular with endotoxemia.

研究代表者

尾迫 貴章 (OSAKO, TAKAAKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30573844

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)：肺の急性炎症では、肺毛細血管の透過性は亢進し、結果として免疫細胞浸潤や組織浮腫を引き起こす。今回我々は、毛細血管細胞透過性に及ぼすn-3 PUFAsの効果を検討した。fibronectin-coated transwellのapical surfaceに播種したヒト肺毛細血管内皮細胞を用いた。細胞はn-3 PUFAsであるドコサヘキサエン酸(DHA)もしくはエイコサペンタエン酸(EPA)にて前処置をおこなったのちに、LPS投与にて急性肺障害モデルとした。LPS刺激前のDHAおよびEPA投与は、細胞透過性を有意に軽減させた。EPAはLPS刺激後に、ヒスタミン受容体1のmRNA発現を抑制した。

研究成果の概要(英文)：During acute lung inflammation, the lung microvasculature becomes hyperpermeable, resulting in immune cell infiltration and tissue edema. In this study, we examined the effects n-3 PUFAs on lung microvascular cell permeability. Human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) were seeded on fibronectin-coated transwell inserts. The cells were pretreated with docosahexaenoic acid (DHA) or eicosapentaenoic acid (EPA) (n-3 PUFAs), and then treated with LPS to simulate acute lung injury. Pretreatment with DHA and EPA prior to LPS stimulation significantly attenuated LPS-induced cell permeability. EPA decreased histamine receptor 1 (H1R) and mRNA expression following LPS stimulation. Interleukin (IL)-6 mRNA expression in response to LPS treatment was significantly reduced by both DHA and EPA pretreatment. DHA and EPA attenuated LPS-induced lung microvascular endothelial cell permeability through a mechanism that may involve IL-6. EPA pretreatment may influence H1R expression.

研究分野：救急集中治療

キーワード：ヒスタミン 血管透過性 多価不飽和脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

sepsis(敗血症)は、急性呼吸窮迫症候群や多臓器不全といった重篤な合併症を惹起せしめる全身性炎症反応(以下、SIRS)である。特にその呼吸不全は、ICU入室患者の死亡率に影響する。LPSは激しい肺の炎症を惹起しSIRSやsepsisに進展せしめるが、その本態はLPSによる血管透過性亢進による白血球遊走および肺水腫にある。細胞間透過性は接着結合(以下、AJ)と密着結合(以下、TJ)により規定され、ヒスタミンや血管内皮成長因子(以下、VEGF)はそれらの結合に作用し血管透過性を亢進せしめる。

魚油はn-3不飽和多価脂肪酸(以下、n-3 PUFAs)、特にドコサヘキサエン酸(以下、DHA)やエイコサペンタエン酸(以下、EPA)を多く含む。n-3 PUFAsに富む経腸栄養剤は好中球浸潤を減弱せしめ、またTJ再構築を通して血管内皮および上皮の血管透過性亢進を抑制することで、LPS誘発急性肺傷害を軽減させるとの報告がなされている。しかし血管透過性制御因子とn-3 PUFAsの関連性についての報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺毛細血管透過性に対するDHAやEPAの効果、およびLPS刺激下における透過性に関する遺伝子発現を検討することにある。n-3 PUFAsは肺毛細血管内皮細胞におけるLPS誘発透過性亢進を軽減させる、との仮説を立てた。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト肺毛細血管内皮細胞(以下、HMVEC-L)をfibronectin-coated transwellのapical底に播種しchamber内に100 μ Lの培養液を充填し培養。同時にbasal chamber内に600 μ Lの培養液を充填した。confluent monolayer形成は、TEERを24時間毎に測定し確認した。

n-3 PUFAs およびLPS 処置

EPA、DHAの培養液中濃度は40mMに調整した。ビタミンCおよびビタミンEは各々75mMおよび20mMに調整し、PUFAsと共に添加刺激とした。コントロール群はPUFAs投与無しとした。単層形成されたHMVEC-LはEPAもしくはDHAを混じた状態で24時間培養された後、LPS(1 μ g/mL)且つ、もしくはEPA、DHAを混じた培養液をapicalに投与した。

透過性測定

血管内皮透過性は、FITC-アルブミンを用いて測定した。LPS添加4時間後および8時間後に、apical chamber内の培養液をFITC-アルブミン(800 μ g/mL)を混じた培養液に置換し、1時間後にbasal chamberから培養液を採取。励起:485nm/蛍光:535nmにて採取検体中のFITC-アルブミンを測定しコントロール群との比で表した。

RNA抽出・cDNA合成・real-time qPCR

総RNA量は、培養HMVEC-LからTRIzolを用いて抽出した。RNAはcDNAに逆転写され、real-time PCRにて増幅した。遺伝子発現はddCt法により測定した。

免疫蛍光染色

HMVEC-Lをfibronectin-coated 24 well plateに播種したものを、LPS添加4時間後に固定。処理をおこない、免疫蛍光染色とした。

統計学的検討

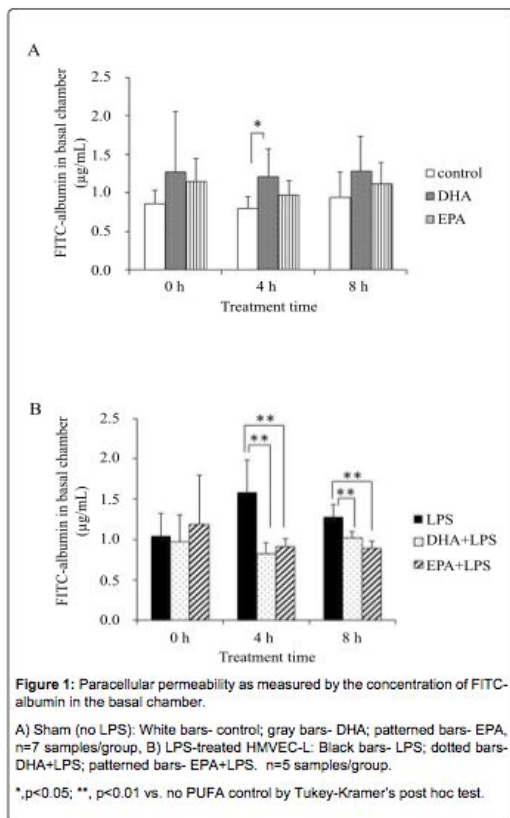
数値は平均 \pm 標準偏差にて表し、Tukey-Kramer's post hoc testにて解析した。p値<0.05を以て、統計学的有意とした。

4. 研究成果

DHA/EPA 前処置は、LPS 刺激による HMVEC-L の透過性を抑制する

LPS未投与の場合、DHAは添加4時間

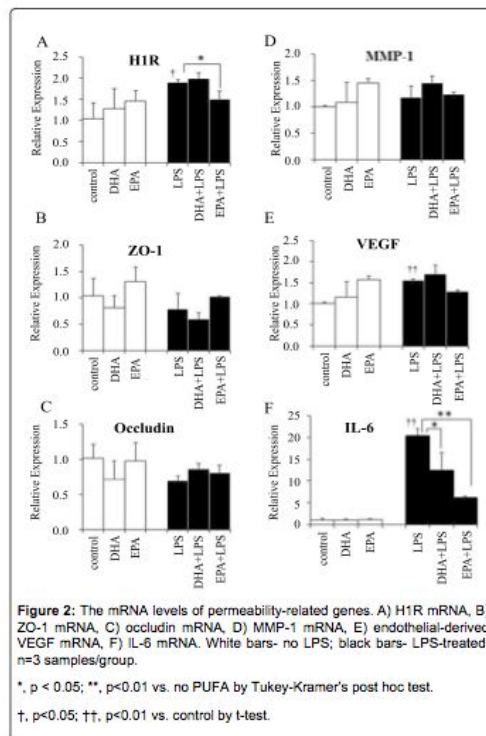
後の HMVEC-L の透過性を亢進させる (Figure 1A)。LPS 刺激による炎症存在下では、DHA/EPA は 4 および 8 時間後の透過性を有意に減少させる (Figure 1B)。



-EPAはLPS刺激によるH1RおよびIL-6 mRNA発現を減少させる-

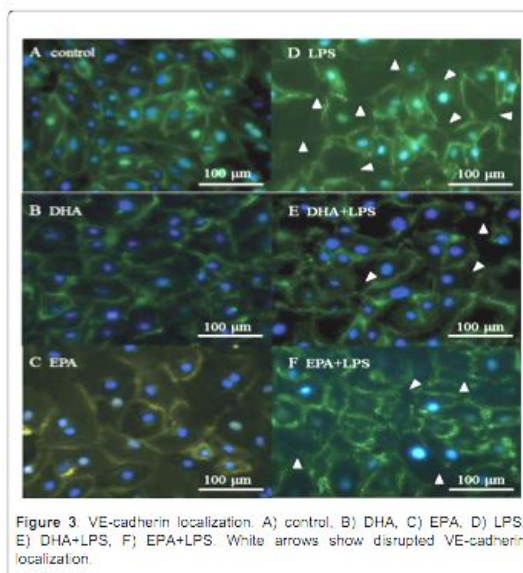
EPA および DHA による肺血管透過性の調節機序を検討するため、肺血管透過性に関わる幾つかの因子の mRNA を測定した。

LPS 未投与の場合、EPA および DHA はどの種類の mRNA 発現に対して有意に作用しなかった (Figure 2)。LPS 刺激且つ n-3 PUFAs 未添加の場合、H1R、VEGF、および IL-6 値は増加した (Figure 2A/2E/2F)。EPA は LPS 刺激による H1R-mRNA および IL-6 mRNA 誘導を有意に減弱させた (Figure 2A/2F)。DHA は LPS 刺激による IL-6 mRNA 誘導を有意に減弱させた (Figure 2F)。



-EPAはLPS刺激により減少したVE-cadherin発現を減弱させる-

単層形成した HMVEC-L における AJ の状態を調査するために、VE-cadherin に対し免疫蛍光染色をおこなった。LPS 未投与では VE-cadherin は細胞間隙に局限し、DHA および EPA によってもその局在に変化は無い (Figure 3A-3C)。LPS 刺激により、VE-cadherin は部分的に崩壊する (Figure 3D)。DHA および EPA 投与は VE-cadherin の崩壊を減少させた (Figure 3E/3F)。



本研究では DHA もしくは EPA による前処置は、LPS 刺激下での肺毛細血管透過性を減少させることを示した。しかし非炎症下での DHA による透過性亢進機序は明らかにされていない。その機序に関しては、更なる検討が必要であろう。

n-3 PUFAs は TJ タンパクを変化させることで、炎症存在下での血管上皮防御障害を改善させることが知られている。本研究でも DHA と EPA は LPS 刺激下での透過性を軽減させた。一方で、DHA と EPA の両者ともに ZO-1 や occludin の mRNA 発現に変化を与えなかった。

血管内皮細胞は VE-cadherin を接着分子として特異的に発現し、AJ は血管内皮透過性の主要調節因子である。DHA や EPA は LPS 刺激による VE-cadherin の崩壊を減少させ、EPA は同条件下での H1R mRNA 発現増加を有意に減少させる。ヒスタミンは血管内皮透過性亢進を惹起し、 β -catenin と VE-cadherin のような AJ タンパクの一時的もしくは不可逆性の崩壊を誘導する。故に、肺血管内皮細胞においては、DHA や EPA は TJ よりも AJ により強く作用するのかもしれない。

n-3 PUFAs は、IL-6 発現の重要な調節因子である NF- κ B を調節する。LPS 刺激下における HMVEC-L において、IL-6 発現を減少させた DHA や EPA の抗炎症作用を確認した。IL-6 は血管内皮透過性を増強させることから、IL-6 の減少は DHA や EPA が HMVEC-L 透過性を抑制する理由を説明している可能性がある。故に、EPA 処置後の H1R mRNA 減少は IL-6 発現に影響した可能性がある。以上の結果を鑑みれば、ICU 入室重症患者、特に急性肺傷害を有する患者に対し、n-3 PUFAs 特に EPA は、新たな治療戦略を有する可能性を秘めていると言えよう。今後は *in vivo* における効果の評価、効果的な EPA 投与方法・経路などが検討課題である。

引用文献

1. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349, 2000.
2. Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, Matthay MA; Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164:231-236, 2001.
3. Altemeier WA, Matute-Bello G, Gharib SA, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. Modulation of lipopolysaccharide-induced gene transcription and promotion of lung injury by mechanical ventilation. *J Immunol* 2005;175(5):3369-3376.
4. Shapiro H, Kagan I, Shalita-Chesner M, et al. Inhaled aerosolized insulin: a "topical" anti-inflammatory treatment for acute lung injury and respiratory distress syndrome? *Inflammation* 35:315-319, 2010.
5. Goddard LM, Iruela-Arispe ML. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thromb Haemost.* 109: 407-415, 2013.
6. Niimi N, Noso N, Yamamoto S. The effect of histamine on cultured endothelial cells. A study of the mechanism of increased vascular permeability. *Eur J Pharmacol.* 221: 325-331, 1992.
7. Harris ES, Nelson WJ. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr Opin Cell Biol.* 22:651-658, 2010.
8. Shen L, Black, ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J. Cell Sci.* 119:2095-2106, 2006.
9. Tressel SL, Kaneider NC, Kasuda S,

- Foley C, Koukos G, Austin K, Agarwal A, Covic L, Opal SM, Kuliopulos A. A matrix metalloprotease-PAR1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med.* 3:370-384, 2011.
10. Kohama K, Nakao A, Terashima M, Aoyama-Ishikawa M, Shimizu T, Harada D, Nakayama M, Yamashita H, Fujiwara M, Kotani J. Supplementation of parenteral nutrition with fish oil attenuates acute lung injury in a rat model. *J Clin Biochem Nutr.* 54(2):116-21, 2014.
 11. Li Q, Zhang Q, Zhang M, Wang C, Zhu Z, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. *FEBS J* 275:411-420., 2008.
 12. Beguin P, Errachid A, Larondelle Y, Schneider YJ. Effect of polyunsaturated fatty acids on tight junctions in a model of the human intestinal epithelium under normal and inflammatory conditions. *Food Funct.* 4:923-931, 2013.
 13. Oh-I S, Shimizu H, Sato T, Uehara Y, Okada S, Mori M. Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain. *Cell Metab.* 1:331-341, 2005.
 14. Roig-Pérez S1, Cortadellas N, Moretó M, Ferrer R. Intracellular mechanisms involved in docosahexaenoic acid-induced increases in tight junction permeability in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 140(9):1557-63, 2010.
 15. Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Xu G, Li J. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 45:1356-65, 2008.
 16. Crosby CV, Fleming PA, Argraves WS, Corada M, Zanetta L, Dejana E, Drake CJ. VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2771-6.
 17. Guo M1, Breslin JW, Wu MH, Gottardi CJ, Yuan SY. VE-cadherin and beta-catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Apr;294(4):C977-84.
 18. Singer P1, Shapiro H, Theilla M, Anbar R, Singer J, Cohen J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med.* 2008 Sep;34(9):1580-92.
 19. Desai TR1, Leeper NJ, Hynes KL, Gewertz BL. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. *J Surg Res.* 2002 May 15;104(2):118-23.
 20. Li Y1, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res.* 2001 May;61(3):253-62.
- 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)
- Takaaki Osako, Michiko Aoyama-Ishikawa, Hayato Yamashita, Makoto Usami, Atsunori Nakao, Joji Kotani ;Eicosapentaenoic Acid Decreases Histamine Receptor 1 Expression on Lung Microvascular Endothelial Cells and Cell Permeability during LPS stimulation.; *International Journal of Respiratory and Pulmonary Medicine* (Vol.1 issue 1, p.1-4; on-line December 26, 2014)
<http://clinmedlibrary.com/articles/ijrpm/ijrpm-1-007.php?jid=ijrpm>; 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

TAKAAKI Osako;Eicosapentaenoic Acid Decreases Histamine Receptor 1 Expression on Lung Microvascular Endothelial Cells and Cell Permeability during LPS stimulation.; 8th. Asian Conference for Emergency Medicine; Nov. 7, 2015; Taipei (Taiwan)

〔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：
出願年月日：
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

尾迫 貴章 (OSAKO, Takaaki)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：30573844

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：