

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19658

研究課題名(和文) グルココルチコイド受容体の遺伝子多型が血管透過性に及ぼす影響に関する検討

研究課題名(英文) The Influence of a Polymorphism of Glucocorticoid Receptor on Vascular Permeability

研究代表者

小笠原 啓 (Ogasawara, Kei)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00510348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：1) ハイドロコルチゾンを使用して溶質透過性試験を行った。ハイドロコルチゾン投与後に細胞の透過性は低下し、TERは上昇すると仮説を立てたが、仮説と異なる実験結果になった。グルココルチコイド受容体のアンタゴニスト(RU486)をHUVECに添加後にハイドロコルチゾンを投与してもTERは変化しないことも確認している途中である。2) HUVECからのGRのSNP解析を7例で行った。GRのBcl1遺伝子のSNP解析ではC/C 6例、C/G 0例、G/G 1例だった。今後、その他のHUVECのSNPも解析するとともに、SNPとハイドロコルチゾン投与後のTERの変化の違いを検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：1) Solute permeability test was conducted to examine the cell permeability after hydrocortisone. Although our hypothesis was made that the permeability of the cell decreased after administration of hydrocortisone and transepithelial electrical resistance (TER) increased. The result was different from the hypothesis. We have also confirmed that the value of TER does not change when hydrocortisone is administered after adding GR antagonist (RU 486) to HUVEC. 2) Single nucleotide polymorphisms (SNP) analysis of GR from HUVEC was performed in 7 cases. In the SNP analysis of the Bcl1 gene of GR, there were 6 cases in C/C, 0 cases in C/G, and 1 case in G/G. We will analyze SNPs of other HUVECs in the future as well as to investigate the influence of SNP on the value of TER after hydrocortisone administration.

研究分野：周産期医学

キーワード：血管透過性 グルココルチコイド受容体 SNP ハイドロコルチゾン

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) タイトジャンクション

血管内皮細胞はお互いに接着してシート構造を形成することに加えて、様々な水溶性物質が細胞同士の隙間を介して漏れるのを防ぐ必要がある。細胞間隙をシールして内皮バリア機能に大きく寄与する細胞間接着装置がタイトジャンクションである。

### 2) 内皮細胞における血管透過性

グルココルチコイド (GC) がグルココルチコイド受容体 (GR) を介してタイトジャンクションの tightning を制御していることは、網膜上皮細胞と血液脳関門で知られている。

### 3) GR の遺伝子多型

GC は人体の恒常性を維持するために必要なホルモンである。GR の SNP は 4 種類がある。我々は、低出生体重児 41 名の GR の遺伝子多型を調べ、*Bcl1* でのみ SNP が検出され、*Bcl1* 遺伝子多型と急性期難治性低血圧発症との関連性があることを報告した (平成 23-25 年度科研費: 若手研究 B、課題番号 23791232)。

## 2. 研究の目的

1) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) においても GR の働きによりタイトジャンクションの tightning が起こるかどうかを明らかにする。これを証明することで、通説とされていた「GC により血管透過性が抑制される」ことの証明になると考える。

2) 出生した児の HUVEC を使用し、同児の GR の遺伝子多型も調べた上で、ハイドロコルチゾン投与前・後の細胞の透過性の変化を測定する。*Bcl1* の C/C 群、C/G 群、G/G 群との 3 群に分け、細胞透過性を比較する。

## 3. 研究の方法

1) HUVEC の単離培養: 当施設で出生した早産児より臍帯を提供して頂き、HUVEC を単離培養する。

2) HUVEC の細胞透過性の測定: ハイドロコ

ルチゾン投与前後の細胞透過性を細胞リアルタイムモニタリングシステムにより、経上皮内皮電気抵抗値 (TER) を経時的に測定する。

### 3) 溶質透過性試験

起こしておいた HUVEC P-4 (在胎 29 週) を回収し、Transwell に 10 万 cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播いた。

3 日後上層の培地を捨て、TNF を 0.1ng/ml, 1.0ng/ml となるように上層、下層に添加した。

上層に蛍光色素である FITC を標識した 70kDa デキストランを、下層に FITC 非標識 70kDa デキストランをそれぞれ 50 μg/mL になるように添加した。

添加 1 時間後、下層に漏出した FITC の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー (FLUOROSKAN, Thermo Fischer Scientific, inc, San Jose, CA) を用いて測定した。

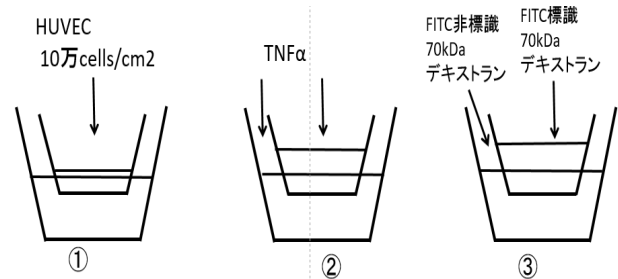


図 1 溶質透過性試験

### 4) Hydrocortisone, dexamethasone 添加後の透過性抑制効果の検証

HUVEC に control、hydrocortisone、dexamethasone を加えて 30 分後、60 分後の透過性を溶質透過性試験で測定した。

hydrocortisone、dexamethasone にグルココルチコイドのアンタゴニストである RU 486 をそれぞれに加え、30 分後、60 分後の透過性を同様に測定した。

4) HUVEC からの GR の SNP 解析: DNA を分離後、TaqMan 法を用い、GR に関して報告されている既知 4 種の SNP 解析を行うがその中でも *Bcl1* を重点的に解析する。

#### 4. 研究成果

1) 現在までに 19 例が採取できている。在胎 24 週から 38 週までの HUVEC を用い経時的に TER を測定したが、在胎週数と TER に関連性は見いだせなかった。

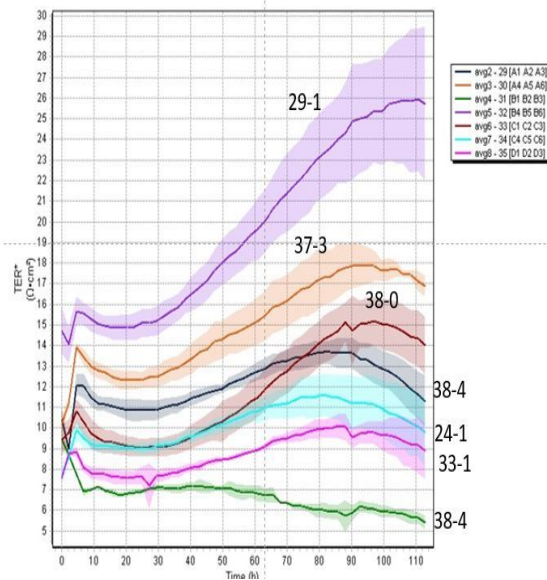


図 2 在胎 24 週から 38 週で出生した児の HUVEC の TER

#### 2) TNF を使用した溶質透過性試験

コントロールを 1 としたときのそれぞれの蛍光強度を下記に示す

TNF 濃度依存性、時間依存性に蛍光強度が増しており、つまり透過性が亢進したという結果であった。

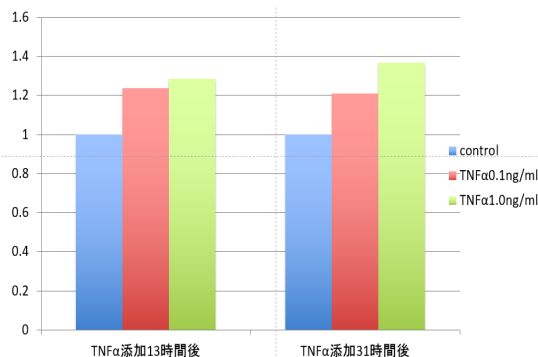


図 3 TNF 投与後の溶質透過性

#### 3) hydrocortisone, dexamethasone 添加後の透過性抑制効果の検証

hydrocortisone (500ng/mL) dexamethasone (50ng/mL) の投与では、30 分後、60 分後において control と比較して透過性は抑制されていなかった。理論上では hydrocortisone、dexamethasone を投与した場合、control よりも透過性が抑制されるのだが、抑制されていなかった。これは hydrocortisone、dexamethasone の濃度が高く細胞が破壊されて透過性が亢進した可能性が考えられた。今後、濃度を調整して再度研究する予定である。

hydrocortisone, dexamethasone に RU486 を加えた場合、hydrocortisone, dexamethasone 単独よりも透過性が抑制されていた。

hydrocortisone, dexamethasone に RU486 を加えると透過性は亢進するはずであるが、実験結果は逆であった。原因は不明であった。

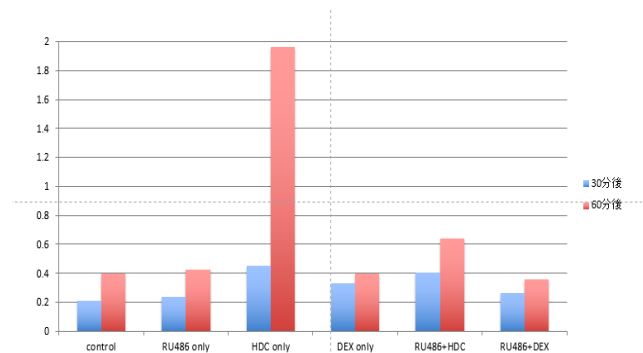


図 4 hydrocortisone, dexamethasone, RU486 を投与した溶質透過性試験結果

4) GR の *Bcl1* の SNP が血管透過性に関わることを検討するため、HUVEC8 検体から DNA の分離を行い、C/C 群 6 例、C/G 群 0 例、G/G 群 1 例だった。今後、その他の HUVEC の SNP も解析するとともに、SNP とヒドロコルチゾン投与後の TER の変化の違いを検討する予定である。

#### 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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 啓 (OGASAWARA Kei)

福島県立医科大学小児科科学講座・助教

研究者番号：00510348

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

藤森敬也 (FUJIMORI Keiya)

橋本浩一 (HASHIMOTO Koichi)

宮崎恭平 (MIYAZAKI Kyohei)

佐藤真紀 (SATO Maki)

郷勇人 (GO Hayato)