

平成23年6月1日現在

機関番号：24303  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20591842  
研究課題名（和文）組織因子産生・放出に関与する血液細胞のシグナル機構の解明と遺伝子治療への応用  
研究課題名（英文）Elucidation of the intracellular mechanisms concerning monocyte tissue factor production and release, and their applications of the gene therapy  
研究代表者  
中嶋 康文（NAKAJIMA YASUFUMI）  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70326239

## 研究成果の概要（和文）：

血液単球系細胞からの Tissue Factor (組織因子) の放出に Raf-MEK-ERK1/2 pathway 及びその下流の転写因子 Egr-1 の関与が RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン手技を用いて示唆された。カドメト前処理することで、血液中の単球系細胞を抑制したマウスにこれらの遺伝子ノックダウン単球系細胞を注入後、肺梗塞モデルマウスを用いて、肺梗塞の重症度及び生存率を検討したところ、Tissue Factor の発現、炎症系が抑制されることで重症度と生存率が改善した。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated the modification of tissue factor expression on THP-1 cell and mouse monocyte-macrophage by knocking down ERK1, ERK-1 and Egr-1. With injection of these gene knocked down monocytes into mouse, survival rate and severity of pulmonary embolism have improved in mouse experimental model. Further studies are necessary to undergo several analysis, and their application of the gene therapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：血栓止血学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：RNA干渉法、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、整形外科手術患者を対象にした臨床実験を基に、フローサイトメトリー法及び siRNA を用いた遺伝子ノックダウン手法で、血小板と単球とのクロストークにより (P-selectin/PSGL-1 及び CD40L/CD40 を介して)、Leukocyte-Platelet Conjugate (白血球血小板凝集細胞) 及び Tissue Factor (組織因子, CD142) が生成され、その血中レベルと術直後の肺血流シンチの欠損発生率に正の相関関係があることを示し、肺梗塞発生の新たなメカニズムを明らかにした (J Thromb Haemost. 5(4):738-45, 2007 他)。また周術期 PDEIII inhibitor 投与が、血小板内 p38MAPK のリン酸化を抑制する事で CD62P (P-selectin) 及び Leukocyte-Platelet Conjugate の発現を抑制、ERK1/2 及び AKT のリン酸化抑制により PAC-1 (activated GP IIbIIIa) の発現および血小板凝集抑制を引き起こす事を報告した (Anesthesiology. 2009;111(6):1227-37.)。また、同時に白血球に於いても阻害薬投与にて、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling を抑制する事により、単球からの Tissue Factor (組織因子) の放出、顆粒球の粘着能を抑制する事が示唆された。本申請は、この結果を基に血栓形成予防の為の遺伝子治療法の可能性を、RNA 干渉 (RNAi) 法を用いて検討するプロジェクトである。

## 2. 研究の目的

(In Vitro) 血液単球系培養細胞、及びマウス単球-マクロファージを用いて、ERK1, p38 $\alpha$ , AKT, Egr-1 を Nucleofection 法により siRNA を導入し、細胞内シグナリングをブロックする事で、血小板との共培養における系で、血小板、単球の活性の変化 (特に Tissue

Factor (組織因子)、TNF $\alpha$  放出)、及びそれに伴う血液凝固の変化を観察する。

(In Vivo) 当研究室において確立した肺梗塞動物モデルを用いて、1. で遺伝子ノックダウンした単球をマウスに再度静注後、実験的肺梗塞の生存率および肺組織における塞栓率の変化を、末梢血の血小板活性、凝固反応等のパラメーターと共に観察する。

## 3. 研究の方法

平成 20, 21 年度

(1) 血液単球系培養細胞 (THP-1, U937 cell), ヒト及びマウス単球に siRNA を導入する実験 (研究代表者中嶋、分担者溝部担当)

(siRNA の作成) Tissue Factor (組織因子), ERK1, p38 $\alpha$ , AKT, Egr-1 を遺伝子ノックダウンの標的にして、各々の siRNA を作成する。(Nucleofection 法による siRNA 導入、及び遺伝子発現抑制効果の確認)

2-5x10<sup>6</sup> cells/100  $\mu$ l に対し siRNA 1.5  $\mu$ g を添付後、Amaxa siRNA Nucleofection Program (現有設備) に従い siRNA 導入を行う。24-72 時間培養後に回収しノックダウンの効果を、リアルタイム PCR (7300 Applied Biosystems, 現有設備) により mRNA レベルでの定量評価、ELISA 法により蛋白レベルでの遺伝子ノックダウン効果を Negative Control と比較する。

(2) 血小板と単球、又は単球系培養細胞の共培養による実験 (In Vitro 系)

ヒト又はマウス末梢血から精製した血小板 (洗浄血小板又は Platelet Rich Plasma) と、(1) でノックダウンした血液単球系培養細胞又は単球との共培養により以下の項目を確認する。研究結果として、ERK1, 又は転写因子 Egr-1 をノックダウンした単球又は単球系培養細胞と血小板の共培養にて Tissue

Factor(組織因子), TNF $\alpha$ , Microparticle の放出、及び凝固反応の抑制が、また AKT のノックダウンによりその抑制が解除されると考える。

(血液細胞表面抗原発現変化の定量) CD14+CD41+(Platelet-Monocyte Conjugate), CD61+CD62P+(P-selectin), CD61+PAC-1+, CD61+CD154+(CD40L), CD14+CD11b+, CD14+CD142+(Tissue Factor)の変化より血小板と単球活性レベルを定量する(フローサイトメトリー法)。

(凝集反応) Optical Aggregometry で血液又は培養液の凝集反応の測定。

(Flow Chamber を用いた血小板、単球接着能の解析) 倒立蛍光顕微鏡(Olympus IX71, 現有設備)下に、Flow Chamber に共培養した溶液を流し単位時間当たりにコラーゲン, ICAM-1, VCAM-1, Fibronectin コーティングのスライドガラスにおける血小板、単球接着度を定量評価。

(蛋白定量) 培養液中 Tissue Factor, CD40Ligand, TNF $\alpha$ , Microparticle 定量(ELISA法)。

(細胞内シグナリング解析) ERK, AKT, p38 のリン酸化定量(ELISA法, フローサイト法)。

(転写因子活性) Egr-1, NF-kB, AP-1 の DNA binding activity の測定(EMSA法)。

(Promoter 活性) Tissue Factor, TNF alpha の Promoter 領域遺伝子を含む Plasmid を単球系培養細胞に遺伝子導入後、ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を定量。

平成 21, 22 年度

(3) 動物モデルを用いた遺伝子ノックダウン単球(Monocyte)投与による静脈血栓症予防、治療への応用(In Vivo系)(代表者中嶋、分担者上野、橋本担当)

(肺梗塞動物モデルの作成)

Ketamine/Xylazine(150/15mg, ip)麻酔下の雄 CD-1 マウス(20-25g)に尾静脈より 1250U/kg のヒトトロンビン(80%のマウスが 5 分以内に死に至る量)、[又は collagen/epinephrine(800/60 $\mu$ g/kg、80%のマウスが 30 分以内に死に至る量)]及びコントロールとして生理食塩水を投与する事を基本として実験を行う。

(生存率) クロロネート前処理することで血液中の単球系細胞を抑制したマウスに、血小板凝集薬剤を投与してからの時間軸で見た生存率に関して、siRNA によりノックダウンされた単球を注入した群と negative control の siRNA を導入した単球を注入した群との、生存率の改善を検討する。

(肺梗塞重症度の定量化) 血小板凝集薬剤投与後一定時間(3-5min)に安楽死を行い採血及び肺組織の摘出を行う。肺組織は、気管より 10%ホルマリン投与により固定し 24 時間後に 5-6 $\mu$ m スライスのパラフィン切片を作り phosphotungstic acid にて血管内フィブリンを染色する。最低 10 視野程度の鏡検で視野中に存在する血管でフィブリンが栓塞している割合を確認する事で肺梗塞の重症度を定量化する(JCI 101:667-675, 1998)。

また平成 20, 21 年度に Vitro 実験で行った実験項目を測定し、Vivo に於いても Vitro と同じ実験結果が得られるか検討を行う。

予期される問題点に対する配慮と対応策  
十分な遺伝子発現抑制効果が得られない場合は siRNA の配列を再考する。1つの遺伝子発現抑制(シングルノックダウン)により結果の出ない場合は、2つの遺伝子発現抑制(ダブルノックダウン)系の実験を検討する。Vivo 実験系に於いては、Hydrodynamics 法を用いた siRNA 発現ベクターの導入又は、HVJ Envelope Vector を用いた siRNA の Vivo への導入法といったマウスに経静脈或いは経

気管的に直接 siRNA を導入する実験も検討。

#### 4. 研究成果

血液単球系細胞からの Tissue Factor (組織因子) の放出に Raf-MEK-ERK1/2 pathway 及びその下流の転写因子 Egr-1 の関与が RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン手技を用いて示唆された。クロマト前処理することで、血液中の単球系細胞を抑制したマウスにこれらの遺伝子ノックダウン単球系細胞を注入して、肺梗塞モデルマウスを用いて、肺梗塞の重症度及び生存率を検討したところ、Tissue Factor の発現、炎症系が抑制されることで重症度と生存率が改善した。

#### 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 4 件)

- ① How much dosage of heparin do you administer? The relationship between heparin dosage and activated coagulation time (ACT) value during cardiovascular surgery: a multi center investigations. Shibasaki M, Nakajima Y, Kojima A, Kitagawa H, Tanimoto K, Mizobe T. Masui. 2010 ;59:535-9. (査読有)
- ② Prediction of pediatric endotracheal tube size by ultrasonography. Shibasaki M, Nakajima Y, Ishii S, Shimizu F, Shime N, Sessler DL. Anesthesiology. 2010 ;113:819-24. (査読有)
- ③ 高橋正裕, 古家仁, 中嶋康文, 細川豊史. 特集「ペインクリニックと抗血栓療法の基本と臨床～抗血栓療法を受けている患者に安全に神経ブロックを行うために～」によせて. ペインクリニック 31(10): 1271-1272, 2010. (査読無)
- ④ Beppu, S., Nakajima, Y, Shibasaki, M., Kageyama, K., Mizobe, T., Shime, N., Matsuda, N. Phosphodiesterase 3 inhibition reduces platelet activation and monocyte tissue factor expression in knee arthroplasty patients. Anesthesiology. 2009, 111:1227-37. (査

読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 中嶋康文. 教育講演 周術期の血小板変化とその対策 平和物産 社内勉強会, 2010.10.9, 東京
- ② 中嶋康文. 教育講演 周術期における血小板変化と血栓-止血の制御. 日本麻酔科学会関西地方会, 2010.9.4, 大阪.
- ③ Murase M, Nakajima Y, Sessler DI, Shibasaki M, Mizobe T. Time-dependent changes in intraplatelet signaling pathways relevant to platelet function defect with cardiopulmonary bypass surgery. Euroanesthesia 2010. 2010 June12; Helsinki, Finland.
- ④ 中嶋康文. 周術期血小板研究における最新の話 (シンポジウム 血液凝固・炎症反応の関連と臓器障害). 第 57 回日本麻酔科学会, 2010.6.4., 福岡.
- ⑤ Nakajima Y, Murase M, Shibasaki M, Kageyama K, Matsuda N. Time-dependent changes in intraplatelet signaling pathways relevant to platelet function defect with cardiopulmonary bypass surgery. 13th Asian Australasian Congress of Anesthesiologists. 2010 June 4. Fukuoka, Japan.
- ⑥ Mizobe T, Nakajima Y, Nishi M Making a transgenic mouse with alpha2A adrenergic receptor fused with green fluorescent protein. 13th Asian Australasian Congress of Anesthesiologists. 2010 June 4. Fukuoka, Japan
- ⑦ 開心術患者の血小板機能に関する細胞内情報伝達系の時系列解析 (優秀演題) 村瀬

百子、中嶋 康文、柴崎 雅志、廣瀬 宗孝、  
影山 京子、松田 直之 日本麻酔科学会第  
57回学術集会、2010.6.4. 福岡

⑧ 稲見直子，中嶋康文，別府 賢，柴崎雅志，溝部俊樹，松田直之．血小板細胞内情報伝達に対するヒドロキシエチルスターチの影響．(優秀演題) 第56回日本麻酔科学会学術集会．2009.8.16.，神戸．

⑨ 別府賢，中嶋康文，村瀬百子，柴崎雅志，志馬伸朗，松田直之．人工膝関節形成術周術期におけるミルリノンの血小板活性化正常化作用－全血を用いた血小板機能測定－．第56回日本麻酔科学会学術集会．2009年8月17日，神戸．

[図書] (計1件)

柴崎雅志，中嶋康文，溝部俊樹．大動脈弁手術の麻酔管理．徹底ガイド心臓麻酔 Q&A．澄川耕二編(分担執筆)．総合医学社，東京：pp951-6，2009．

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中嶋 康文 (NAKAJIMA YASUFUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70326239

### (2) 研究分担者

上野 博司 (UENO HIROSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20381965

溝部 俊樹 (MIZOBE TOSHIKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50239266

橋本 悟 (HASHIMOTO SATORU)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：90167578