

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17217

研究課題名(和文)血管透過性調節機構に基づくARDS治療の基盤構築

研究課題名(英文)Development of foundation for ARDS treatment based on controlling vascular permeability

研究代表者

赤嶺 孝祐(Akamine, Takahiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60799435

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):ARDSは肺胞の血管内皮細胞障害により血管透過性が亢進し、血液液体成分が肺胞内へ漏出・貯留する(非心原性肺水腫)ことで起こる予後不良かつ死亡率の高い疾患である。本来、血管透過性の亢進は炎症などに対する防御反応として免疫細胞や血漿成分の血管外移動に寄与するが、過剰な亢進は種々の疾患の病態と密接に関連している。本研究成果からROCK1/2コンディショナルノックアウトマウスの肺血管透過性が亢進することが明らかとなった。また、内皮細胞接着因子の発現量低下が認められた。このことからROCKが細胞接着因子の発現量を調節することで肺血管透過性を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非心原性肺水腫をはじめとして、血管透過性亢進による組織の恒常性破綻は生体にとって重篤な状況を引き起こす。本研究による血管透過性亢進に関わる分子機序の解明はARDSなどの血管透過性亢進が惹起される病態の理解の深化に資することが期待される。また、これまでのROCKに関する多くの研究は培養細胞と特異的なキナーゼ活性化阻害薬が用いられてきた。しかし、中にはROCKのリン酸化基質が明確でなく、分子機序の説明が不完全な反応も多く存在する。本課題の完遂はこれまで不完全であった分子機序に対してより明確な解答を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文):ARDS is a disease with a poor prognosis and a high mortality rate. This is caused by leakage of blood components in lung cells due to increased vascular permeability due to vascular endothelial cell damage of lung. Increased vascular permeability originally contributes to the extravasation of immune cells and plasma components as a protective response against inflammation, but excessive increase is closely related to the pathology of various diseases. The results of this study revealed that ROCK1/2 conditional knockout (ROCK DcKO) mice have enhanced pulmonary vascular permeability. In the lung tissue of ROCK DcKO mice, the intensity of phalloidin staining and VE-cadherin staining was obviously reduced. Thus, our study suggests ROCK might be involved in maintenance of lung homeostasis through actin cytoskeleton rearrangement.

研究分野：薬理学

キーワード：ARDS 血管透過性 ROCK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ARDS (acute respiratory distress syndrome, 急性呼吸促迫症候群) は肺胞の血管内皮細胞障害により血管透過性が亢進し、血液液体成分が肺胞内へ漏出・貯留する(非心原性肺水腫)ことで起こる予後不良かつ死亡率の高い疾患である。血管内皮細胞は血管内腔面でシート構造を形成し、血液と組織間での物質の透過性を制御することで組織の恒常性を維持している。本来、血管透過性の亢進は炎症などに対する防御反応として免疫細胞や血漿成分の血管外移動に寄与するが、過剰な亢進は種々の疾患の病態と密接に関連している。したがって、血管透過性調節機構の解析は ARDS の病態の理解に不可欠であるのみならず、学術的意義・波及効果も非常に高い。これまでに血管透過性に寄与する多くの分子が同定されており、低分子量 G 蛋白質 Rho もその 1 つである。Rho は下流標的蛋白質 (ROCK, mDia) を介してアクチン細胞骨格の再編成を調節していることが培養細胞を用いた解析で明らかとなっている。このことから、研究代表者は Rho-ROCK シグナリングを解析することで ARDS の病態解明に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、生体での ROCK の血管透過性調節機構への寄与とその分子機序を解明し、ARDS の病態理解を深めることで新たな治療法開発の基盤を作ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ROCK の生体(成獣)での機能を解析するために Ubc-Cre ERT2 マウスと ROCK1/2 double floxed マウスを交配させることで、タモキシフェン依存的に全身性で ROCK1/2 をノックアウトする Ubc-Cre ERT2;ROCK1/2 floxed (ROCK DcKO) マウスを作製し、実験に用いた。コントロールマウスとして、ROCK1/2 double floxed マウスを用いた。血管透過性の評価はエバンスブルー投与後の組織内エバンスブルー漏出量を吸光度から算出することで行った。タンパク質の発現量は western blot 法、mRNA の発現量はリアルタイム qPCR 法で測定した。細胞接着因子の細胞内局在は免疫染色法で評価した。

4. 研究成果

8 週齢の ROCK DcKO マウスにタモキシフェン(2mg/day)を 5 日間連日投与したところ、タモキシフェン投与後 5 日目から死にはじめ、約 10 日目にはほとんどの個体が死亡した。その死因を明らかにするために各臓器を肉眼で観察したところ、ROCK DcKO マウスの肺は黒褐色であり、毛細血管から血液成分の漏出が認められた。さらに、内皮細胞の接着因子である VE-cadherin などの発現量や細胞内局在を検討したところ、タモキシフェン投与後 5 日目の ROCK DcKO マウス肺においてコントロールマウスと比較して有意な低下が認められた。このことから ROCK が生体において、細胞接着因子の発現を制御することで血管透過性調節に寄与していることが示唆された。その機序を明らかにするために遺伝子解析を行ったところ、ROCK ダブルノックアウトにより NF- κ B シグナルの活性化が認められた。また、気管支肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカインやケモカイン量を ELISA およびリアルタイム qPCR により評価したところタモキシフェン投与後 3 日目からコントロールマウスと比較して IL6 や CCL2 の有意な上昇が認め

られた。さらに BALF 中の好中球の有意な増加が認められ、血管透過性の亢進に寄与していると考えられた。以上の結果から ROCK は NF- κ B シグナルを介して肺血管透過性の調節に寄与していることが示唆された。本研究結果が ARDS のさらなる病態解明や新規治療法の構築に貢献することが期待される。また、本モデルマウスは従来解析に使用されてきた ROCK 特異的キナーゼ阻害剤を用いたモデルとは異なる表現型を示しており、より詳細な検討を行うことで ROCK の分子機能に新たな概念を創出することも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤嶺孝祐、寺林健、佐々木隆子、石崎敏理
2. 発表標題 ROCKシグナリングから迫る新規肺血管透過性制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 赤嶺孝祐、寺林健、佐々木隆子、石崎敏理
2. 発表標題 The ROCK signaling regulates the pulmonary vascular permeability via maintenance of lung homeostasis.
3. 学会等名 第96回薬理学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------