

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791773

研究課題名（和文）グレリンの抗炎症-抗凝固作用の細胞内シグナリング解明と静脈血栓塞栓症治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the intracellular mechanisms about antiinflammatory and anticoagulative effects by ghrelin, and its application of therapy for venous thromboembolism

研究代表者

深澤 まどか（FUKAZAWA MADOKA）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30530357

研究成果の概要（和文）：

THP-1細胞、及びマウス単球-マクロファージを用いて、グレリン受容体（GHS-R）、レプチン受容体（Leptin-R）の遺伝子ノックダウンにてグレリン、レプチン各々の作用が抑制され、また細胞内シグナリングにおいて、ERK1のノックダウンで炎症-凝固に関するシグナリングが抑制され、AKTのノックダウンで炎症-凝固系のシグナリング（具体的にはトロンビン刺激に対して組織因子の発現）の活性化が抑制された。また、薬剤及び抗体によりマウス血中の単球と好中球数を抑制後、Vitroで遺伝子ノックダウンした単球及び好中球をマウスに静注後の実験的肺梗塞の生存率、塞栓率の変化を観察したところTissue Factorの発現が抑制されることで、生存率、塞栓率の改善を見た。詳細に関しては、更なる検討を予定している。

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 GHS-R, leptin-r, ERK-1. With injection of these gene knocked down monocytes, survival and severity of pulmonary embolism have modified in mouse experimental model. Further studies are necessary to undergo detail analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：血栓止血学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：周術期管理学、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

グレリンは1999年にラットおよびヒトの胃のオーファン受容体 GHS-R (growth hormone secretagogue receptor: 成長ホルモン放出促進因子受容体) の内因性リガンドとして発見された強力な成長ホルモン (GH) 分泌促進活性をもつペプチドである。グレリンは、下垂体からの GH 分泌の促進だけでなく、摂食亢進、エネルギー代謝、抗炎症、交感神経抑制、心血管保護など多彩な生体調節機能を有していることが解明された。また、最近の動物モデルを用いた実験結果から、グレリンが皮膚や骨格筋、脊髄神経細胞の増殖作用、肝グリコーゲン貯蔵作用、膵β細胞に対するアポトーシス抑制作用などを有していることが解明され、これらの新たに発見された生理作用によるグレリンの臨床応用が期待されている。

一方でレプチンは摂食抑制およびエネルギー消費亢進という生理作用を持つが、ヒトの一般の肥満者や後天性肥満モデル動物では脂肪組織でのレプチン遺伝子の発現およびレプチン血中濃度は、逆に亢進していることが多くみられる。そしてその血中濃度は、体脂肪量(%fat)およびBMI (body mass index) によく相関する。また、一般にグレリンとレプチンは摂食行動に関して拮抗的に作用するといわれている。

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、血小板と白血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)

我々は本研究にて血液凝固-炎症系に対

するレプチンとグレリンの相反する作用に注目している。静脈性血栓塞栓症の発生においては肥満患者に多いとされているが、これらは高レプチン血症から来る白血球 (特に単球) への炎症惹起作用が、一つの要因ではないかと考える。これらの現象がグレリンの全身投与により抑制することができれば、静脈性血栓塞栓症に対する新しい治療が見出されると考える。

2. 研究の目的

単球系培養細胞 (THP-1 細胞)、初代細胞 (ヒト又はマウス 単球及び好中球) を用いてグレリン及びレプチンの相反する炎症-凝固系に及ぼす作用を、細胞内シグナリング及びサイトカイン産生の変化を定量する事で評価し、更に RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン法を用いて、分子生物学的に検討すること。
(*In Vitro* 系)

当研究室において確立した肺梗塞動物モデルを用いて、グレリン及びレプチンを投与したときの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、末梢血の単球、好中球の活性、凝固反応等のパラメーターと共に観察する。また、薬剤及び抗体によりマウス血中の単球と好中球数を抑制後 1. で遺伝子ノックダウンした単球及び好中球をマウスに静注後の実験的肺梗塞の生存率、塞栓率の変化を観察すること。(*In Vivo* 系)

3. 研究の方法

細胞培養液中にレプチン (10^{-6} - 10^{-9} M)、及びグレリン (10^{-6} - 10^{-9} M, アシル型及びデスアシル型) を添加し、トロンビン刺激及び無刺激による反応 (以下の測定項目) を観察する。

1. サイトカイン発現の定量 (Flow Cytometry 法、又は ELISA 法)

細胞内及び培養液中 TNF- α の発現、細胞表面及び Soluble Tissue Factor の発現定量

2. Tissue Factor Procoagulant Activity の定量 (吸光度測定) プロトコール

(American Diagnostica 社) 通り、サンプルに

FVII, FX を添加後、FXa を加え 405nm の吸光度測定。

3. 細胞内シグナリングの解析 (ELISA 法、又は Flow Cytometry 法)

細胞からタンパクを抽出し、p38MAPK, ERK1/2, AKT のリン酸化を Total p38MAPK, ERK1/2, AKT と共に測定。Flow Cytometry 法の場合、表面マーカーにて血液細胞別の測定が可能。

4. 転写因子活性の測定 Egr-1, NF-kB, AP-1 等の DNA binding activity を定量 (EMSA 法)

細胞の核抽出物を用いて行う。

5. Promoter 活性の測定 Tissue Factor, TNF α の Promoter を含むプラスミドを単球系培養細胞 (THP-1) に遺伝子導入後、ルシフェラーゼ活性を測定する。

RNA 干渉法による分子生物学的アプローチによる実験

(siRNA の作成) GHS-R, Leptin-R, ERK1, AKT を遺伝子ノックダウンの標的にして各々の siRNA を作成。Negative Control として同等の GC を含有する既製品 (Invitrogen) を使用。

(遺伝子導入プロトコール) 細胞を Nucleofector Solution 内に $2-5 \times 10^6$ cells/100 μ l に播種し siRNA 1.5 μ g を添付後、Amaxa siRNA Nucleofection Program (Amaxa, 現有設備) に従い siRNA の導入を行う。24-72 時間 CO2 インキュベーターにて培養後に細胞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 レベルにおいて定量評価、Western Blot にて蛋白レベルの半定量評価を行い、遺伝子発現が抑制されていることを確認する。以上の遺伝子ノックダウンした細胞を用い、上記の凝固-炎症系に及ぼす影響を観察する。

実験結果として、GHS-R, Leptin-R の遺伝子ノックダウンにてグレリン、レプチン各々の作用が抑制され、また細胞内シグナリングにおいて、ERK1 のノックダウンで炎症-凝固に関するシグナリングが抑制され、

AKT のノックダウンで炎症-凝固系のシグナリングが活性化すると考える。また、我々はデスアシルグレリンの作用にも注目している。デスアシルグレリンにも抗炎症、抗凝固作用があり、GHS-R ノックダウンにても同様の現象を確認した場合、他のレセプター経由でも作用していると考ええる。

(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 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にして実験を行う。

(生存率) 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、レプチン又はグレリン投与時の生存率の変化を検討する。

(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 μ 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)

(血液細胞の凝固-炎症系の定量)

平成 21 年度に Vitro の実験で測定した項目を検討する。

サイトカイン発現の定量 (Flow Cytometry 法、又は ELISA 法)

Tissue Factor Procoagulant Activity の定量 (ELISA 法)

細胞内シグナリングの解析 (ELISA 法、又は Flow Cytometry 法)

転写因子活性の測定 Egr-1, NF-kB, AP-1 等の DNA binding activity を定量 (EMSA 法)

(マウス単球、好中球抑制)

Etoposide (MBL) を 1/10 濃度の PBS で希釈し、12.5mg/kg body weight を静注 (Monocyte depletion)、及びモノクローナル抗体 (RB6-8C5, R&D systems) を、1mg 静注

(Neutrophil depletion)することにより、マウス単球、好中球を抑制する。

4. 研究成果

THP-1 細胞を用いて、グレリン受容体 (GHS-R)、レプチン受容体 (Leptin-R) の遺伝子ノックダウンにてグレリン、レプチン各々の作用が抑制され、また細胞内シグナリングにおいて、ERK1 のノックダウンで炎症—凝固に関するシグナリングが抑制され、AKT のノックダウンで炎症—凝固系のシグナリング (具体的にはトロンビン刺激に対して組織因子の発現) の活性化が抑制された。また、薬剤及び抗体によりマウス血中の単球と好中球数を抑制後、Vitro で遺伝子ノックダウンした単球及び好中球をマウスに静注後の実験的肺梗塞の生存率、塞栓率の変化を観察したところ Tissue Factor の発現が抑制されることで、生存率、塞栓率の改善を見た。

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)

小児悪性腫瘍患者の疼痛管理

深澤まどか、細川豊史、深澤圭太、上野博司、大西佳子 日本ペインクリニック学会誌 2009, 16: 3. 408. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 深澤圭太、細川豊史、上野博司、大西佳子、須藤由香里、原田秋穂、清水文浩、深澤まどか、柿原健. 頭頸部がん患者の疼痛管理. 日本ペインクリニック学会第 43 回大会. 2009 年 7 月 17 日, 名古屋.

② 深澤まどか、細川豊史、深澤圭太、上野博司、大西佳子、須藤由香里、原田秋穂、清水文浩、柿原健. 小児悪性腫瘍患者の疼痛管理. 日本ペインクリニック学会第 43 回大会. 2009 年 7 月 18 日, 名古屋

[図書] (計 1 件)

神経ブロック・鍼療法／医歯薬出版株式会社
細川豊史・石丸圭荘 編著／大西佳子・山下智充・小西千陽・深澤圭太・大森美佐子・上野博司・深澤まどか・高取真由美・柿原健・原田秋穂 著

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 まどか (FUKAZAWA MADOKA)

京都府立医科大学・医学部附属病院・
専攻医

研究者番号：30530357