

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09041

研究課題名（和文）血管内皮障害時の一次繊毛の超微形態とその機能の解析

研究課題名（英文）Primary Cilia under Endothelial Disorder

研究代表者

神田 倫秀（Kanda, Norihide）

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40421177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：一次繊毛とは体細胞に存在する細胞に1本のみ生えた非運動性の細胞小器官であるが、血管内皮における役割については不明な部分が多いため、一次繊毛の成分のひとつであるIFT88を血管内皮特異的にノックアウトしたマウスを作製し、機能解析を行った。IFT88 flox/floxマウスにVascular Cadherin Specific CRE強発現マウスを掛け合わせたが、胎生致死が疑われ現時点で生まれてきていない。そのため、tamoxifen誘導CreマウスとIFT88 flox/floxマウスを掛け合わせて成獣になってからIFT88をノックアウトできるマウスを作成して解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛と微小循環障害の直接的な関連を調べることができるため、血管内皮障害を引き起こすと考えられる様々な疾病に対する治療を新規に構築していくうえでも必要な情報を得られるため、本研究は社会的意義の大きい研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Primary cilia are non-motile cell organelles that grow only one cell in each somatic cell, but their role in vascular endothelium remains unclear. flox mice were crossed with mice that strongly express Vascular Cadherin Specific CRE, but these mice were suspected to be embryonic lethal and were not born at this time. Therefore, we crossed tamoxifen-inducible Cre mice with IFT88 flox/flox mice to create mice capable of knocking out IFT88 as adults for analysis.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：一次繊毛

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛とは脊椎動物のほとんどの体細胞に存在する細胞に 1 本のみ生えた非運動性の細胞小器官である。一次繊毛は、様々なシグナル経路の活性化の場であり、細胞分裂や分化への関与も指摘されている。この一次繊毛の機能異常により生じる疾病は、繊毛病と総称されている。例えば一次繊毛は尿細管では尿の流れを感知するセンサーとして臓器の極性保持に機能しており、その機能に異常を生じると嚢胞性腎疾患となることが知られている。この原因は一次繊毛が尿細管のかたち・太さを感知して正常な形態を維持しており、嚢胞腎は一次繊毛の異常により形成・維持機構が破綻した結果だと考えられている。このように様々な組織・臓器で重要な役割を果たしている一次繊毛は、血管内皮の管腔表面にも存在し血流の恒常性維持に重要な役割を担うと考えられているが未だに不明な部分も多い。

敗血症では同時多発的に臓器障害を生じる要因の一つとして血管内皮障害による微小循環障害が示唆されていて臓器への血液還流が障害されるが、申請者は、その一因としてメカノセンサーである一次繊毛が関与しているという仮説を立てた。

本研究ではまず各臓器での正常時の血管内皮一次繊毛の形態を同定し、次に血管内皮細胞障害時の形態学的変化について電子顕微鏡を用いて明らかにする。さらに血管内皮細胞特異的に一次繊毛をノックアウトしたマウスを用いて、一次繊毛の機能を明らかにする。

2. 研究の目的

一次繊毛は、1つの細胞に1つしかないこと、また他の細胞内小器官と異なり脂質膜で区切られていないために通常の生化学的・細胞生物学的実験の適用が困難なことなどからその研究が進まない領域であった。それに対し、本研究の特徴の1つは、正常時と障害時の血管内皮一次繊毛を走査型・透過型電子顕微鏡を用いて観察し、超微形態より視覚的にとらえ評価する。また血管内皮特異的に一次繊毛の構成タンパクである IFT88 をノックアウトした検討を行う。

3. 研究の方法

A) 正常時の血管内皮一次繊毛の形態の同定

10 週齢のオスの C57BL6 マウスを屠殺し、グルタルアルデヒドを含んだリン酸バッファーを 100mmHg の圧で左心室心尖部より注入し 5 分間還流固定を行う。還流固定後素早く臓器を取り出し、還流液にさらに一晚浸す。このようにして得たサンプルを、液体窒素による凍結切断法を用いて走査型電子顕微鏡用のサンプルを作製する。また、同様にして作成したサンプルを脱水しエポキシ樹脂に埋め込み透過型電子顕微鏡用のサンプルとして使用する。これらサンプルを走査型電子顕微鏡 (S-4500, Hitachi) と透過型電子顕微鏡 (HT7700, Hitachi) を用いて観察を行う。

B) 血管内皮細胞障害下での一次繊毛の形態学的変化

血管炎においても同様の変化が生じるかどうかについて検討を行うために LPS を 20mg/kg の Dose でマウスに腹腔内注射を行い、血管炎モデルを作成する。また一次繊毛のマーカーである IFT88 による免疫染色、蛋白定量を行い障害の定量化も行う。

C) 血管内皮特異的・一次繊毛ノックアウトマウスを用いた検討

本研究では一次繊毛の成分のひとつである IFT88 を血管内皮特異的にノックアウトしたマウスを用いる。このマウスは Jackson Lab より購入した IFT88 flox/flox マウスに ascular Cadherin Specific CRE 強発現マウスを掛け合わせて作成する。また、同じく IFT88 flox/flox マウスに tamoxifen 誘導 Cre マウス (Vascular Cadherin-Cre-ERT2) を掛け合わせて成獣になってから IFT88 をノックアウトできるマウスを並行して作成する。

4. 研究成果

一次繊毛は極めて小さい構造物であるため、電子顕微鏡による形態的な観察は可能であったが、定量的な評価が困難であり、血管内皮細胞障害での観察も障害されているのかそもそもその部位に存在するののかという判断が困難であったため、ノックアウトマウス作成による機能と形態の評価を中心に行うこととした。当初作成していた IFT88 flox/flox マウスに Vascular Cadherin Specific CRE 強発現マウスを掛け合わせたマウスは胎生致死であったため、並行して作成していた tamoxifen 誘導 Cre マウスを掛け合わせた Vascular Cadherin Cre^{ERT2} IFT88 flox/flox を作製し検討を行った。10 週齢の上記マウスに 200mg/kg の tamoxifen を隔日で 5 回腹腔内投与し、3 週間後に Sacrifice して心臓、肝臓、腎臓、肺の組織について検討を行った。

HE 染色において、ノックアウトマウスにおいて心臓では心筋細胞の間に存在する毛細血管の拡張が認められ、肺の毛細血管の拡張も認められた。腎臓ではボーマン嚢の狭小化が認められた。肝臓においては著明な形態的な変化は認められなかった。

IFT88 の免疫染色を行ったところ、肺の気管上皮細胞の繊毛構造は保たれており、その部分での発現の低下は認められなかったが、腎臓の糸球体近傍の緻密班にあたる部分での発現が低下していることが確認された。心臓は前述したように形態学的な変化は認められたものの、IFT88 の発現が野生型マウスでの発現がそれほど明確ではなかったこともあり、比較検討が困難であった。このように一次繊毛は非常に小さい構造物である一方で様々な細胞に存在するため、血管内皮、さらには血管内皮の一部のみでノックアウトしている本検討では血管内皮を単離してそこでの発現を比較する必要があると考えられる。このマウスを用いて、まずは正常状態での一次繊毛の形状、機能について検討を進め、敗血症などの疾患モデルにおける検討につなげていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kanda Norihide et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Prospective study examining the probability of cerebral fat embolism based on magnetic resonance imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e14073 ~ e14073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e14073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Keiko, Okada Hideshi,Kanda Norihide et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Syndecan-1 as a severity biomarker for patients with trauma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 985955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.985955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamidani Ryo, Miyake Takahito, Okada Hideshi.....Kanda Norihide et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of cryoprecipitate transfusion therapy in patients with postpartum hemorrhage: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97954-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyake Takahito, Futamura Kentaro, Baba Tomonori, Hasegawa Masayuki, Tsuihiji Kanako, Kanda Norihide, Tsuchida Yoshihiko, Mogami Atsuhiko, Obayashi Osamu, Ogura Shinji	4. 巻 in press
2. 論文標題 A novel technique for stabilising sacroiliac joint dislocation using spinal instrumentation: technical notes and clinical outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Trauma and Emergency Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00068-021-01873-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田隆浩、山路文範、水野洋佑、福田哲也、三宅喬人、神田倫秀、小倉真治
2. 発表標題 岐阜県メディカルコントロール協議会が目指す重症外傷診療システムの現状と課題
3. 学会等名 第36回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野洋佑、三宅喬人、岡田英志、鈴木景子、石原拓磨、山路文範、福田哲也、北川雄一郎、鈴木浩大、神田倫秀、吉田隆浩、小倉真治
2. 発表標題 外傷患者の予後予測における血中 SDC-1測定の有用性の検討
3. 学会等名 第36回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅喬人、神田倫秀、福田哲也、水野洋佑、山路文範、吉田隆浩、吉田省造、岡田英志、小倉真治
2. 発表標題 バイタルサイン不安定な骨盤骨折症例の病院前救急診療の有無による治療経過の比較
3. 学会等名 第36回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅喬人、吉田省造、土井智章、北川雄一郎、神田倫秀、水野洋佑、岡田英志、小倉真治
2. 発表標題 “先手必勝”クラッシュ症候群
3. 学会等名 第33回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南山徹、上谷遼、水野洋佑、三宅喬人、神田倫秀、岡田英志、吉田隆浩、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 小児重症頭部外傷に合併した環軸椎回旋位固定の一例
3. 学会等名 第50回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田倫秀、水野洋佑、市橋雅大、小倉真治
2. 発表標題 整形外科医が行うTrauma Tertiary Surveyは見落とし外傷を減らす
3. 学会等名 第47回日本骨折治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田倫秀、水野洋佑、三宅喬人、市橋雅大、岡田英志、吉田隆浩、熊田恵介、吉田省造、牛越博昭、小倉真治
2. 発表標題 救急医と整形外科医のダブルボードであること
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅喬人、岡田英志、神田倫秀、水野洋佑、福田哲也、山路文範、名知祥、土井智章、吉田省造、吉田隆浩、小倉真治
2. 発表標題 骨盤骨折の経皮的動脈塞栓術においてDecision-TAE時間が与える影響の解析
3. 学会等名 骨盤骨折の経皮的動脈塞栓術においてDecision-TAE時間が与える影響の解析
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上谷遼、安田立、水野洋佑、北川雄一郎、福田哲也、三宅喬人、神田倫秀、岡田英志、吉田隆浩、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 当院における雪上スポーツ重症外傷治療の検討
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦智孝、水野洋佑、三宅喬人、柴將人、神田倫秀、岡田英志、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 長時間の鼠径部圧挫により臀部及び大腿・下腿のコンパートメント症候群を呈した一例
3. 学会等名 長時間の鼠径部圧挫により臀部及び大腿・下腿のコンパートメント症候群を呈した一例
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田知輝、岡田英志、川崎雄輝、中島優介、島田卓人、吉田知生、柴將人、神田倫秀、名知祥、吉田隆浩、小倉真治
2. 発表標題 横紋筋融解症に伴う急性腎障害に対するアンチトロンピン治療の考察
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅喬人、吉田省造、柿野圭紀、土井智章、神田倫秀、市橋雅大、水野洋佑、岡本遥、熊田恵介、牛越博昭
2. 発表標題 多発四肢外傷後の集中治療管理後症候群（PICS）に対してリハビリテーションの積極的な介入に難渋した一例
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	岡田 英志 (Okada Hideshi) (30402176)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	
研究分担者	富田 弘之 (Tomita Hiroyuki) (50509510)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	
研究分担者	鈴木 昭夫 (Suzuki Akio) (80775148)	岐阜大学・医学部附属病院・准教授 (13701)	

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
---------	---------