

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09066

研究課題名（和文）敗血症における細胞外マトリックスタンパク質の機能解明と革新的治療の創出

研究課題名（英文）Elucidation of the function of extracellular matrix proteins in sepsis

研究代表者

栗田 健郎（Kurita, Takeo）

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60802569

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）：細胞外マトリックスタンパク質SVEP1は、肺での発現が多い。敗血症刺激によりSVEP1の遺伝子発現が低下し、血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞におけるSVEP1の応答が変化する。SVEP1ヘテロノックアウトマウスは、野生型マウスに比較して、敗血症刺激後の生存率が低く、肺の組織学的評価ではSVEP1ヘテロノックアウトマウスはリンパ管形成が未熟で、敗血症刺激での肺の浮腫が強い可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、敗血症と、これまで機能があまり解明されていない細胞外マトリックスSVEP1の関係を明らかにするものである。これまでの結果から、敗血症においてSVEP1がリンパ管機能に関与する可能性が示唆された。本研究により、敗血症の生体反応について新たな知見を得ることができ敗血症の病態解明が進むこと、そして敗血症の新たな治療方法の開発の可能性を拓けることが期待できる。さらには、敗血症のみならずさらに広い病態に応用できる可能性があり、重症患者の生命予後改善に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The extracellular matrix protein SVEP1 is highly expressed in the lungs. Septicemic stimulation reduces gene expression of SVEP1 and alters the response of SVEP1 in vascular and lymphatic endothelial cells. SVEP1 heterozygous knockout mice have a lower survival rate after septic stimulation compared to wild-type mice, and histological evaluation of the lungs suggests that SVEP1 heterozygous knockout mice have immature lymphangiogenesis, and that septic stimulation may cause severe edema of the lungs.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：敗血症 SVEP1 遺伝子多型 リンパ管新生 血管透過性 リンパ管内皮細胞 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、未だ致死率が高い病態である。敗血症では、感染の侵襲により惹起された生体の宿主反応が制御不能となり、高サイトカイン血症が引き起こされ、その結果、血管透過性亢進、凝固異常などから組織酸素代謝失調・細胞死を起し臓器障害に至る。これらの高サイトカイン血症や、血管透過性の亢進、凝固異常などを制御することが敗血症の治療において重要と考えられ、病態のさらなる解明が生命予後の改善につながる可能性がある。

感染の侵襲に対する個体の反応は、個々の宿主で差異があり、敗血症においても遺伝的素因が敗血症の転帰に影響を与えることが知られている。網羅的な遺伝子多型解析から、SVEP1 遺伝子多型を有する敗血症患者において、炎症性サイトカイン・細胞接着因子に関連する humoral mediators の血中濃度が高く臓器障害が重症で死亡率が高いことを報告され、SVEP1 が敗血症の病態に関与する可能性が初めて見いだされた。

SVEP1 は細胞外マトリックスタンパク質であり、未だその機能解析に関する研究は少なく十分ではないが、その機能の重要性が近年になり報告され始めた。SVEP1 ノックアウトマウスを用いた研究で、SVEP1 が胎生期のリンパ管のリモデリングに重要な役割を果たすことが報告された。また、SVEP1 は血管内皮の安定化・血管透過性に働く angiopoietin-2 と結合し、Tie1/Tie2 システムを活性化させることも示唆されている。

以上の結果から、SVEP1 はリンパ管形成・血管内皮の安定化にも関与し、その作用機序が敗血症の病態においても影響を与えている可能性が考えられる。

これまで、敗血症と SVEP1 の関係についての研究はなされていない。敗血症と SVEP1 の関係を研究することは、敗血症の病態のさらなる解明につながり、新規治療の開発の可能性を拓げるものと期待できる。そこで、

「敗血症において細胞外マトリックスタンパク質 SVEP1 がいかなる機能を果たすのか」を問いとし、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞外マトリックスタンパク質 SVEP1 が敗血症の病態で果たす役割を解明することを目的とした。そのために、以下に示す二つの Research Question (RQ)の答えを明らかにすることを目標とした。

RQ.1 敗血症において、SVEP1 の遺伝子発現やタンパク質産生が、各臓器および細胞単位でどのように変化するのか。

RQ.2 敗血症において、SVEP1 がいかなる因子を刺激し、生体反応にどのような影響を与えるのか。

3. 研究の方法

(1) 敗血症に関連の深い臓器における SVEP1 遺伝子発現の評価

野生型マウスの刺激なしモデルを用いて、心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓・腸における SVEP1 の遺伝子発現を、qRT-PCR 法で比較した。

(2) 敗血症刺激での SVEP1 の動態変化の評価

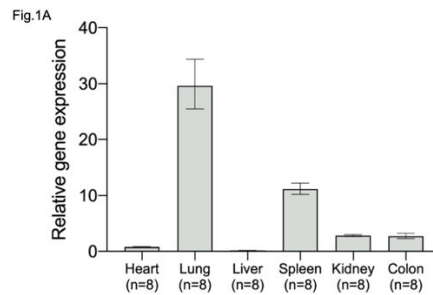
野生型マウスを用い、敗血症刺激として盲腸結紮穿孔モデルで、肺における SVEP1 の遺伝子発現、タンパク質産生、血管内皮/リンパ管内皮細胞の応答の変化を、それぞれ qRT-PCR 法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法で比較した。刺激なし・単開腹モデ

ル 2 時間/6 時間/24 時間 (Sham2h/Sham6h/Sham24h)・盲腸結紮穿孔後 2 時間/6 時間/24 時間 (CLP2h/CLP6h/CLP24h) の 7 群で比較した。

- (3) SVEP1 の遺伝子型の異なるマウスの準備と作成
- (4) 敗血症刺激アッセイ系の確立, 及び, 野生型と SVEP1 遺伝子改変マウスの Survival Study
糞便注入による腹膜炎敗血症刺激アッセイを確立した。野生型マウスと SVEP1 ヘテロノックアウトマウスの生存比較を行なった。
- (5) 野生型と SVEP1 遺伝子改変マウスにおける敗血症刺激での肺の組織学的評価
糞便注入モデルによる敗血症刺激モデルを用い, 野生型マウスの刺激なし/敗血症刺激後 12 時間, SVEP1 ヘテロノックアウトマウスの刺激なし/血症刺激後 12 時間, の 4 群のマウスを用い比較した。HE 染色・免疫染色 (CD31 及び LYVE-1) で評価した。

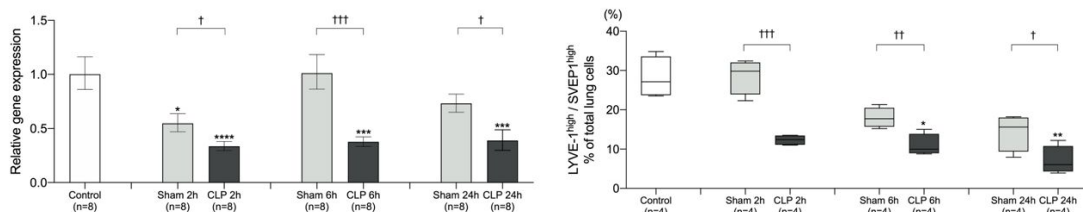
4. 研究成果

- (1) 敗血症に関連の深い臓器における SVEP1 遺伝子発現の評価



肺や脾臓で SVEP1 遺伝子発現量が相対的に多い。

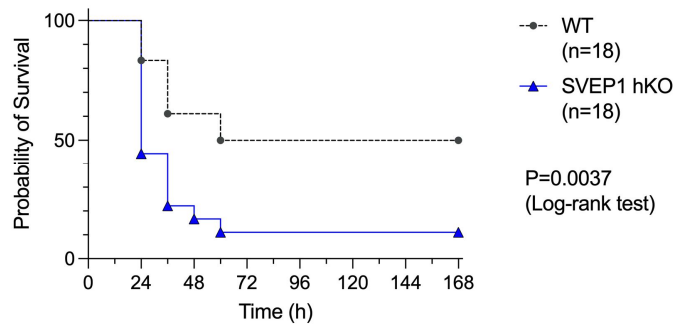
- (2) 敗血症刺激での SVEP1 の動態変化の評価



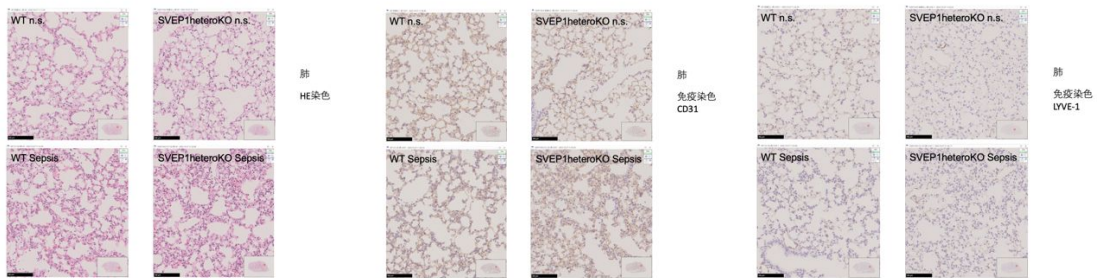
盲腸結紮穿孔による敗血症刺激により, SVEP1 の遺伝子発現は低下する。SVEP1⁺/LYVE-1⁺の細胞の割合が低下する。

- (3) SVEP1 の遺伝子型の異なるマウスの準備と作成
SVEP1 ヘテロノックアウトマウスは共同研究(大阪大学蛋白質研究所 関口清俊教授)より供与を受け繁殖・継代した。SVEP1 遺伝子多型(Gln581His)ホモマウス, SVEP1 遺伝子多型 (Gln581His)ヘテロマウスを Crispr-Cas9 法で作成した。
- (4) 敗血症刺激アッセイ系の確立, 及び, 野生型と SVEP1 遺伝子改変マウスの Survival Study
腹腔内糞便注入モデル(糞便濃度 100 µg/mL, 体重あたり 0.8 mg/g で腹腔内投与), 野生型マウスで 7 日間生存が 50 %, となる刺激アッセイ系を確立した。この刺激アッセイ系を用い, 野生型マウスおよび SVEP1 ヘテロノックアウトマウスにおける敗血症刺激後の 7 日間生存率を比較し, 野生型 50 %に対し SVEP1 ヘテロノックアウトマウス 11.1 %

($P=0.0037$, Log-rank test)と、SVEP1 ヘテロノックアウトマウスで有意に死亡率が高いことが示された。



(5) 野生型と SVEP1 遺伝子改変マウスにおける敗血症刺激での肺の組織学的評価



SVEP1 ヘテロノックアウトマウスではリンパ管形成が未熟である可能性が示唆され、SVEP1 ヘテロノックアウトマウスでは野生型に比較して敗血症刺激での肺の浮腫の程度が強い可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeo Kurita, Takehiko Oami, Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Ryoko Sato-Nishiuchi, Kiyotoshi Sekiguchi, Masahiko Hatano	4. 巻 -
2. 論文標題 Sepsis decreases lung SVEP1 expression in a murine model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 F1000Research	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） なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗田健郎、大網毅彦、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦、中田孝明
2. 発表標題 敗血症マウスにおけるSVEP1の動的変化
3. 学会等名 第35回日本Shock学会総会
4. 発表年 2021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	中田 孝明 (Nakada Takaaki) (20375794)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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