

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16586

研究課題名(和文)臓器・組織特異的グリコカリックス構成因子の局在とその特徴の解析

研究課題名(英文)Characterization of tissue-specific glycocalyx components

研究代表者

館 正仁(Tachi, Masahito)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70646504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ConA, DBA, PNA, RCA1, SBA, UEA1, WGAの7種類のレクチンを用いた染色を脳、肺、腎、心、肝、小腸、大腸組織で行った。臓器毎、組織毎(腎なら、尿細管と糸球体など)にその結果をみると、染色濃度は低いの特異性の高い臓器や染色されるが、いろんな細胞に染まり、非特異性が高い臓器など、複雑さが明らかとなった。DBAレクチン結合は、N-アセチルグルコサミンに結合性があることから、ヒアルロン酸は脳血管に非常に特異的あることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療への応用を考え、将来、ヒト組織や非侵襲的画像検査によって、簡易にグリコカリックスを可視化することにつながるためには、より簡易で、臓器ごとの毛細血管におけるグリコカリックスに適した結合レクチンを用いて、観察する。今あるレクチン染色を最適化、最大化し、将来、ヒト組織や非侵襲的画像検査によって、簡易にグリコカリックスを可視化することにつなげたい。

研究成果の概要(英文)：Staining with seven lectins (ConA, DBA, PNA, RCA1, SBA, UEA1, and WGA) was performed on brain, lung, kidney, heart, liver, small intestine, and colon tissue. The DBA lectin binding was due to its binding to N-acetylglucosamine, and the WGA lectin binding was due to its ability to bind to N-acetylglucosamine, Hyaluronan is highly specific to cerebral blood vessels.

研究分野：救急医学

キーワード：glycocalyx

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮グリコカリックスは、内皮細胞の内腔表面を覆うゲル状の網目である。グリコサミノグリカン、糖タンパク質、プロテオグリカン、ヒアルロン糖鎖などで構成され、血管内皮グリコカリックスは毛細血管の機能維持に重要な役割を果たしていることがわかってきた(Ushiyama A, J Intensive Care. 2016)。その中でも、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、そして、コア蛋白のシンデカン 1 は、グリコカリックスがゲル状の膜として存在を維持する上で、重要であることもわかってきた(Uchimido R, Crit Care. 2019)。

我々の研究グループは、血管内皮グリコカリックスの超微細構造の3次元形態解析により、肺、脳など各臓器により、毛細血管内皮細胞にある血管内皮グリコカリックスは厚さが異なること、さらには、臓器間で血管内皮グリコカリックスの形態に違いがあることを明らかにしてきた。そして、敗血症など血管内皮グリコカリックスの傷害による減少や欠損が、重症化、炎症の遷延化に關与することをヒト血清や動物モデルで示してきた(Suzuki K, Am J Pathol. 2019; Ando Y, Sci Rep. 2018; Inagawa R, Chest. 2018)。

世界をみても、未だグリコカリックスの研究グループは多いとは言えない。腎臓の血管のグリコカリックスの研究グループ(オランダ)、肺の血管のグリコカリックスの研究グループ(ドイツ)などと、臓器別に研究されている場合が多い。日本では、救急、麻酔科領域のグループが少なく、全身をみているものの、主に輸液など血管のみを研究するにとどまっている。申請社のグループで、病理学の共同研究者(岐阜大医・腫瘍病理・富田弘之)とともに、組織学からのアプローチを行ってきた。その中で、各臓器ごとにその毛細血管の血管内皮細胞の違いがあること、グリコカリックスの量が違うこと、臓器内でもグリコカリックスを構成する成分が違うことが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2つである。

1. マウス各臓器の毛細血管特異的結合レクチン抗体の同定と解析
2. 血管内皮特異的グリコカリックス構成因子欠損マウスにおけるグリコカリックスの変化とレクチン抗体の結合性の解析

3. 研究の方法

1. マウス各臓器の毛細血管特異的結合レクチン抗体の同定と解析

ConA, DBA, PNA, RCA1, SBA, UEA1, WGA の7種類のレクチンを用いた染色を脳、肺、腎、心、肝、小腸、大腸組織で行う

2. 血管内皮特異的グリコカリックス構成因子欠損マウスにおけるグリコカリックスの変化とレクチン抗体の結合性の解析

Ext1 (ヘパラン硫酸伸長酵素)の flox/flox マウスを、VE-cadherin-CreER マウス(タモキシフェン誘導性血管内皮壁特異的 Cre 蛋白発現マウス)マウスを交配することで、タモキシフェンの腹腔内投与で上記の遺伝子発現を欠失させることで、グリコカリックスの構成を変えてしまいうマウスを作製する。そして、解析する。

4. 研究成果

1. マウス各臓器の毛細血管特異的結合レクチン抗体の同定と解析

図1のように、申請者は、ConA, DBA, PNA, RCA1, SBA, UEA1, WGA の7種類のレクチンを用いた染色を脳、肺、腎、心、肝、小腸、大腸組織で行った。臓器毎、組織毎(腎なら、尿細管と糸球体など)にその結果をみると、染色濃度は低いが高特異性の高い臓器や染色されるが、いろんな細胞に染まり、非特異性が高い臓器など、複雑さが明らかとなった(図1:各臓器・各レクチンの染色結果)。しかし、その中で、脳の血管に特異的な DBA レクチンを同定できた。DBA レクチン結合は、N-アセチルグルコサミンに結合性があることから、ヒアルロン酸は脳血管に非常に特異的あることがわかった。

		<input type="checkbox"/> Specifically positive <input type="checkbox"/> Specifically negative						
lectins		Con A	DBA	PNA	RCA1	SBA	UEA1	WGA
brain 脳	parenchyma	±	+	±	++	±	-	±
	choroid plexus	+	-	-	+	-	-	+
lung 肺	bronchi central	±	±	±	±	-	-	±
	periphery	+	±	±	+	±	-	+
kidney 腎	glomerulus	+	-	-	+	-	-	+
	medulla	+	±	±	+	±	-	+
	middle	+	±	±	+	±	-	+
heart 心	peripheralis	+	-	±	+	±	-	+
	Glisson's capsule	+	-	-	+	-	-	+
liver 肝	central vein	±	-	-	+	-	-	±
	pancreas	±	+	-	±	-	-	±
intestine 小腸	surface area	±	-	-	±	±	-	±
	deep area	-	±	-	±	-	-	±
colon 大腸	surface area	-	-	-	±	-	-	-
	deep area	-	-	-	±	-	-	-

図1: 各臓器・各レクチンの染色結果

2. 血管内皮特異的グリコカリックス構成因子欠損マウスにおけるグリコカリックスの変化とレクチン抗体の結合性の解析

Ext1 flox/flox; VE-cadherin-CreER マウスを作製し、血管内皮グリコカリックスの状態を確認した (図2)。

肺や腎臓など主要な臓器でのグリコカリックスの減少やヘパラン硫酸の減少が走査型電子顕微鏡を用い、確認出来た。このマウスは正常に生まれ、成体となり、1年以上生き続けた。この結果は、血管内皮グリコカリックスは減少しても、通常ホメオスタシスでは大きな影響を与えないことが示唆された。

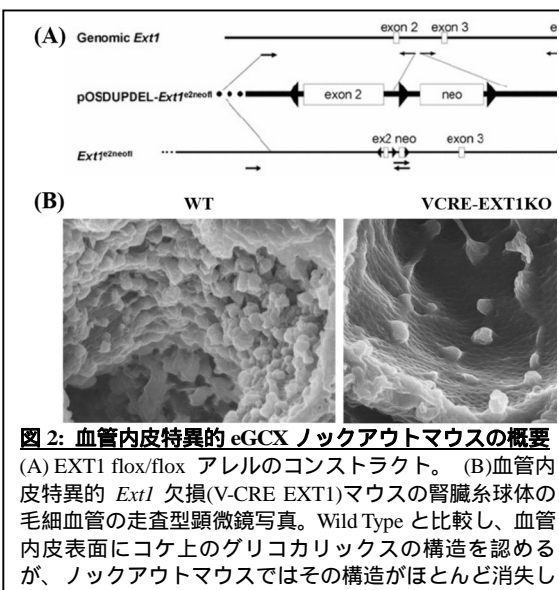


図2: 血管内皮特異的 eGCX ノックアウトマウスの概要

(A) EXT1 flox/flox アレルのコンストラクト。(B)血管内皮特異的 *Ext1* 欠損(V-CRE EXT1)マウスの腎臓系球体の毛細血管の走査型顕微鏡写真。Wild Typeと比較し、血管内皮表面にコケ上のグリコカリックスの構造を認めるが、ノックアウトマウスではその構造がほとんど消失し

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------