

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591581

研究課題名(和文) 血管内皮細胞タイトジャンクションの動的評価によるウイルス関連急性脳症の病態の解明

研究課題名(英文) Clarification of pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy by evaluating the function of tight junctions in vitro

研究代表者

細矢 光亮 (Mitsuaki, Hosoya)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80192318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス関連急性脳症の病態解明のため、血管内皮細胞モデルであるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用し、TNF α を作用させた時の、血管透過性の変化を経内皮細胞電気抵抗(TER)、透過性試験、タイトジャンクション蛍光免疫染色によって経時的に観察した。いずれの評価法においても、TNF α 濃度依存的に、TERの低下度合いが大きく、血管透過性が増大し、タイトジャンクションの非局在化の程度が大きくなった。本評価法は急性脳症時の高サイトカイン血症における血管内皮細胞障害の細胞モデルとしてさらなる病態解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of endothelial injury caused by cytokines in severe virus-associated acute encephalopathy(AE) remains unclear. We established a method for estimating endothelial injury caused by TNF α , proinflammatory cytokine in vitro. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) monolayers were treated with TNF α , subsequently transendothelial electric resistance (TER) and permeability were measured using a impedance spectroscopy(cellZscope $\text{\textcircled{R}}$), and FITC-conjugated dextran, respectively. Moreover, TNF α -induced morphological changes in claudin-5, one of the tight junction proteins, were observed by immunofluorescent staining. The decrease in TER, the time to TER recovery, and the increase in permeability were all dependent on TNF α concentration. Delocalization of claudin-5 was also observed after TNF α treatment. These methods are useful to clarify the mechanism of AE and subsequent vascular endothelial cells injury, and aid in the development of treatment options.

研究分野：感染症

キーワード：脳症 血管内皮 サイトカイン タイトジャンクション

研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症を始めとしたウイルス性急性脳症は本邦の調査において年間1000例発症しており、インフルエンザ脳症ガイドラインが発表された2005年以前には急性脳症全体での死亡率は30%であったが診断・治療法の進歩によりそれ以降は10%に低下していた。

本研究開始当初時には、本症の臨床症状、検査所見、画像診断を用いた分類がなされ、先天代謝異常によるもの、中枢神経細胞の興奮毒性が関与するもの、炎症性サイトカインによるサイトカインストームが関与するものなどに分類されてきた。この中でもサイトカインストームが関与する急性脳症は重症度が高く、死亡率もその他の分類と比較しても依然として高いことが分かってきた。

サイトカインストームが関与する急性脳症の病態は炎症性サイトカインによる血管透過性亢進とそれによる血管原性脳浮腫や組織のアポトーシスが病態の中心と考えられてきた。血管透過性を制御するタンパクとして、血管内皮細胞間に存在し、内皮細胞同士をシールし、物質の透過性を制御するタイトジャンクションという膜タンパクが関与すると言われており、その中でも血管内皮細胞に特異的に発現する claudin-5 の関与が大きいと報告されている。

急性脳症の病態があきらかになりつつあったが、その病態解明、治療法開発のための細胞モデルは存在せず、本症に対するより最適な治療法を確立するためには詳細な病態の解明が必要であった。

2. 研究の目的

急性脳症の病態を解明するために、血管内皮細胞障害による血管透過性とタイトジャンクションの変化に着目し、本症のさらなる病態解明を目指した。

高サイトカイン状態における血管透過性とタイトジャンクションの変化を動的に評価することによって、サイトカインストームを病態の中心とする急性脳症における血管内皮細胞障害の細胞モデルを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

概要

初代継代培養血管内皮細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell) を用いて、血管透過性を電気抵抗値 (TER: Transendothelial Electrical Resistance) 測定試験、溶質透過性試験、claudin-5 蛍光免疫染色によって、炎症性サイトカインの一つである TNF α による血管透過性に関する影響を動的に評価した。

帝王切開時に得られた臍帯から単離した HUVEC を TRANSWELL® (24well type, Corning 社) に単層に培養し、以下の実験に用いた。

(1) TER 測定試験

cellZscope®-The automated Cell Monitoring System (nanoAnalytics GmbH, Muenster, Germany) を用いて、TER を測定した。測定開始後、TER が安定したところで、段階希釈した TNF α を各 well に添加し、1 時間毎に TER を測定した。

(2) 溶質透過性試験

TER が安定するまで単層培養した TRANSWELL® に TER 測定時と同様に段階希釈した TNF α を添加し、一定時間培養したのち、上層に蛍光色素である FITC を標識した 70kDa デキストランを、下層に FITC 非標識 70kDa デキストランをそれぞれ 50 μ g/mL になるように添加した。添加 1 時間後、下層に漏出した FITC の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー (FLUOROSKAN, Thermo Fischer Scientific, inc, San Jose, CA) を用いて測定した。

(3) タイトジャンクション蛍光免疫染色

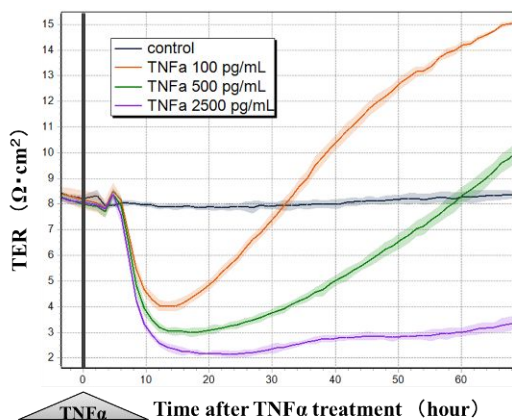
透過性試験施で使用した後の TRANSWELL® 膜を用いて蛍光免疫染色によってタイトジャンクションの一つである claudin-5 の局在変化を観察した。溶質透過性試験後、インサートを PBS (Phosphate Buffered Seline) で洗浄したのち、HUVEC を培養した TRANSWELL® 膜を ice cold acetone により -20 で 15 分間固定し、ice cold methanol により -20 で 15 分間透過処理後、3% BSA (Bovine Serum Albumin) / 0.3% Triton X-100 / PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体 Anti claudin-5 mouse polyclonal antibody (IBL, JAPAN) を用いて 4 で一晩静置したのち、二次抗体 Anti rabbit Alexa Fluoro 488 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA) と室温で 1 時間反応させた。Prolong Gold Antifade Reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA) で核染色、封入し、一晩硬化させたのち、蛍光顕微鏡 (FSX-100; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

4. 研究成果

TER 測定試験

段階希釈した TNF α (終濃度 control, 100 pg/mL, 500 pg/mL, 2500 pg/mL) を添加後、TNF α 添加群では 12~24 時間程度で最も TER 値は低下し、その後 TER の回復を認めた。TNF α 濃度依存性にその低下度は大きく、回復までに時間を要した。TNF 濃度が低い時は回復時に control よりも高くなる現象が観察されたが、高濃度時は回復まで至らなかった。(図 1)

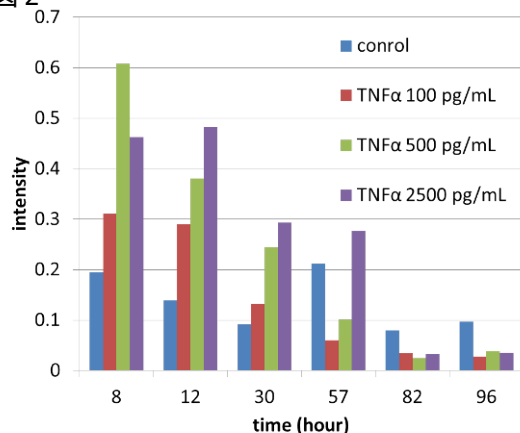
図 1



透過性試験

TER 測定試験と同様に段階希釈した TNFα 添加後、一定時間培養した時点での 70kDa のデキストランによる溶質透過性試験を行った。12 時間での下層に漏れ出た FITC の蛍光強度を測定したところ濃度依存性に蛍光強度が増強していた。その後、30 時間、57 時間、82 時間、96 時間ではいずれの濃度においてもコントロールと比較して同程度まで改善していた。(図 2)

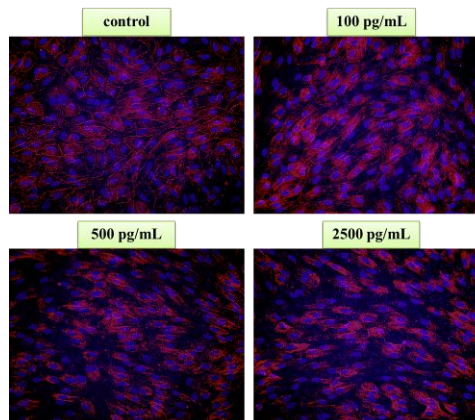
図 2



claudin-5 蛍光免疫染色

タイトジャンクションの一つである claudin-5 の蛍光免疫染色を施行した(図 3)。HUVEC の細胞膜に一致して claudin-5(赤色)の発現を認めた。TNFα 添加後、12 時間では TNFα 濃度依存性に claudin-5 の染色性が低下し、細胞が紡錘形に変化した。その後時間経過と共に染色性、形態変化の回復を認めた。TER 測定試験、透過性試験で血管透過性が亢進している時期に一致した claudin-5 の局在変化が認められた

図 3



総括

TER 測定試験、溶質透過性試験、蛍光免疫染色によって、HUVEC に対する TNFα の影響を電氣的、機能的、病理組織学的に評価できる評価系を確立することができた。本手法を用いることにより、血管内皮細胞障害による血管透過性亢進状態の程度を *in vitro* で再現していると考えられ、血管内皮細胞障害に起因する急性脳症の病態解明や治療法の開発に有用な手段となりうる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 宮崎恭平、渡部真裕、橋本浩一、佐藤晶論、川崎幸彦、細矢光亮、急性脳症のモデルとしての TNF による血管内皮細胞障害作用の電氣的機能的評価法の確立 第 4 5 回日本小児感染症学会総会・学術集会、2013 年 10 月 26-27 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
2. 宮崎恭平、渡部真裕、橋本浩一、佐藤晶論、川崎幸彦、細矢光亮、急性脳症モデルとしての TNF による血管内皮細胞障害作用の動的評価法の確立、第 1 1 7 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)
3. 宮崎恭平、渡部真裕、橋本浩一、佐藤晶論、川崎幸彦、細矢光亮、急性脳症モデルとしての TNF による血管内皮細胞障害作用の動的評価法の確立、第 4 6 回日本小児感染症学会総会・学術集会、2014 年 10 月 25-26 日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)
4. Miyazaki Kyohei, Watanabe Masahiro, Hashimoto Koichi, Sato Masatoki, Kawasaki Yukihiko, Hosoya Mitsuaki, Evaluation of the vascular endothelial cell

injury induced by TNF- *in vitro*. The
11th Asian Society for Pediatric Research
(ASPR2015), 2015年4月16-18日, 大
阪国際会議場(大阪府、大阪市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

細矢 光亮 (HOSOSYA MITSUAKI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80192318

(2)研究分担者

川崎 幸彦 (KAWASAKI YUKIHIKO)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00305369

(3)連携研究者

橋本 浩一 (HASHIMOTO KOICHI)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：5032234

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)