

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462451

研究課題名(和文) 血管内膜透過性に対するニューロキニン1受容体スプライスバリエーション発現の影響の検討

研究課題名(英文) Involvement of neurokinin 1 receptors and the ligands in albumin permeability across endothelial cell monolayer

研究代表者

東 俊晴 (Azma, Toshiharu)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60284197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：痛み伝達物質サブスタンスP (SP) による血管内膜アルブミン透過性の調節機構を解明するため本研究は計画された。血液凝固因子トロンビンは内膜透過性を増加した。SPは内膜透過性を単独では増加しなかったがトロンビンによる透過性増加を亢進した。血管内凝固は周術期に宿命的な現象だが、その結果として発生するトロンビンによる透過性亢進は抗トロンビン活性をもつ試薬でブロックすることができた。ニューロキニン1受容体NK1R阻害薬もこの透過性亢進を抑制したが、その効果はSPがなくとも発揮された。内皮細胞はヘモキニン遺伝子を発現しており、これとNK1Rを介した情報伝達が内皮細胞機能を自己調整していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify the mechanisms for perioperative modulation of albumin permeability across endothelial cell monolayers. The expression of mRNA for full-length neurokinin-1 receptor NK1R in endothelial cells was confirmed although the level of expression was very low. The level of mRNA for truncated NK1R was much higher and constitutive. A NK1R ligand substance P (SP), failed to modulate the albumin permeability when it was solely applied, while it accelerated the permeability in combination with fresh frozen plasma (FFP). The increase in the albumin permeability by FFP was potently blocked by reagents with anti-thrombin activities (heparin or urinastatin). A NK1R antagonist Spantide reduced the FFP-provoked albumin permeability even in the absence of SP added. Endothelial cells expressed the mRNA for hemokinin (TAC4), indicating that hemokinin/NK1R pathway may be involved in the autocrine regulation for endothelial cell functions.

研究分野：周術期管理医学，麻酔科学，疼痛治療

キーワード：血管内皮細胞 血管透過性 ニューロキニン1受容体 サブスタンスP ヘモキニン バリエーション受容体

1. 研究開始当初の背景

外科的侵襲によって惹起される血管内膜透過性の亢進は、創部周囲組織へ体液を貯留させるため、過剰な周術期輸液やナトリウム負荷の要因となる。術後患者の早期回復を目的として近年提唱されている周術期管理プロトコル (Enhanced Recovery After Surgery Protocol) では過剰な輸液負荷を避けることが推奨されている¹⁾。それゆえ血管内膜透過性を修飾する分子機構を解明し、それに関連するバイオマーカーを発見することが出来れば、体液貯留を起しやすい患者を特定し、周術期輸液管理を最適化するための治療オプションを新たに提示することが可能となるであろう。

血管透過性を亢進する分子機構のひとつとして末梢神経が放出するサブスタンス P が惹起する神経原性炎症・神経原性浮腫が知られている。サブスタンス P の特異的受容体であるニューロキニン 1 受容体 (NK1R) は、脊髄後角に存在して痛み情報を中枢へ伝達するばかりでなく、末梢組織 (血管平滑筋や血管内皮細胞など) にも発現し、サブスタンス P が惹起する血管の拡張や透過性の亢進などに関与する²⁾。NK1R の遺伝情報は 5 つのエクソンにコードされているが、すべてのエクソンから遺伝情報が転写されて発現する完全長 (full-length) mRNA のほかにも、一部の情報が欠落した (truncated) mRNA がスプライスバリエーションとして自然発生することが知られている³⁾。後者の truncated mRNA から翻訳される NK1R は単球などの免疫細胞に構成的に発現している³⁾。この受容体は、神経細胞に発現している完全長受容体と比較して、サブスタンス P 刺激に対する反応閾値が高いことが知られている²⁾。

しかしながら、単球に分化刺激などを加えて活性化させると完全長受容体が新たに発現し、サブスタンス P 刺激に対する促進が起り、より低い濃度で細胞の興奮が発生する⁴⁾。研究代表者らは、全血中に完全長 NK1R の mRNA が検出された個体では、白血球の存在下にサブスタンス P 依存性の血栓形成が促進されることを確認し、この mRNA を血栓発症リスクのバイオマーカーとして提唱した⁵⁾。

研究代表者らは研究開始当初、血液中で検

出された完全長 NK1R の mRNA は血液中の細胞に由来するとの立場を取っていた。しかし、細胞から発生するマイクロパーティクル等の小胞が mRNA を運搬するキャリアとして重要な役割を持つとした知見が蓄積したことにより⁶⁾、血管内皮細胞も全血中で検出される完全長 NK1R の mRNA の発生源であるとした概念を血管内血液凝固や血管透過性亢進といった周術期病態生理を説明するためのスキームに取り入れることとした。すなわち、血管内皮細胞の NK1R スプライスバリエーション発現プロファイルが、血栓形成性や神経原性浮腫の発生に関する個体差を説明しようとの仮説に従って研究計画を再構築することとした。

血管内皮細胞は単球と同様に外因系凝固の惹起物質である組織因子 (tissue factor, TF) を発現することが知られている。マイクロパーティクル等の細胞由来小胞に TF が発現した場合、その小胞周囲で血液凝固が進行し、トロンビンが発生する。トロンビンはさらに血管内皮細胞に作用し、血管透過性を亢進する。

これらのことから、血管内膜透過性を測定するための実験系を構築し、凝固活性を持つ小胞 (procoagulant vesicle, PV) を血管内皮細胞から発生させる刺激を加えた際に、この実験系に同時に加えた介入処置によって起こる変化を観察することで、血管内凝固によって惹起される血管内膜透過性亢進に対する PV 発生や NK1R を介した経路の役割や重要性を検討することとした。

2. 研究の目的

リポ多糖 (LPS) は血管内皮細胞から PV を発生させる既知の物質のひとつである。LPS で血管内皮細胞を刺激した際に PV が発生することを確認し、そのことに対する NK1R 阻害薬の影響を検討する。ヒト新鮮凍結血漿 (FFP) を血管内皮細胞に作用させることで血管内膜透過性が亢進するか、また、その現象に LPS が修飾をくわえるかについて検討する。このような、血管内皮細胞付近で血液凝固が発生した際に惹起される内膜透過性亢進を制御しようとする試薬を特定する。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト単球系セルライン THP-1 ならびにヒト臍帯静脈血管内皮細胞由来セルライン EA.hy926 は DS ファーマバイオメディカル株式会社から購入し、それぞれ推奨された方法に従い培養を継続した。

血管内膜透過性の測定

細胞単層膜の透過性を評価することを目的として製造されているセルカルチャーインサート（メルク社製）のポリエチレンテレフタレート膜上に EA.hy926 を密集状態まで単層培養した。インサートを RPMI1640 培養液で三回洗浄した後、同培養液を満たした 12 穴プレートに装填した。各種試薬の他、イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) で標識されたアルブミンをインサート内に加えた。一定時間が経過した後、プレートの培養液（インサート外）を一部採取し、インサート内側から漏れ出した FITC アルブミンを蛍光プレートリーダーで定量評価した。

PV 発生の定量的測定

24 穴細胞培養用プレートに、血管内膜透過性を評価する方法と同様な条件で EA.hy926 を播種した。倒立顕微鏡で細胞が密集状態まで増殖していることを確認し、プレート内を RPMI1640 で三回洗浄した後、実験を開始した。各種試薬で細胞を刺激し、一定時間が経過した後、規定された量の細胞培養液を試験管に回収した。この試験管に細胞定量用蛍光ビーズを加え、培養液中に含まれる PV をフローサイトメトリーを使用して定量的に解析した。

PV の凝固活性の定性的確認⁷⁾

PV が含まれる試験管に FFP と FITC 標識フィブリノーゲンをそれぞれ終濃度 0.5 vol% となるように加え、一定時間反応させた。FITC 標識フィブリノーゲンは既報の方法に従い作成した⁸⁾。PV に FITC に由来する蛍光が検出され、その蛍光強度が抗凝固薬であるヘパリンの添加により抑制された場合、PV が実際に凝固活性を持つと考えることが出来る。

フローサイトメトリー

細胞培養上清を回収した試験管内に含まれる 1×10^4 個の微粒子をフローサイトメーター (Becton Dickinson (BD) 社製, FACS Canto

II flow cytometer) を用いて解析した。必要に応じて蛍光標識された特異的抗体を試料に加えたが、溶液中の試料と定量用ビーズの容量が常に一定となるように留意した。BD FACS DIVA software で測定データの一次解析を行った後、Kaluza flow cytometry analysis software (ver. 1.2, Beckman Coulter, Brea, CA) を利用して詳細な解析を加えた。

統計学的解析

統計学的有意差を検定するために分散分析を行った。群間の比較が必要な場合は Bonferroni の補正を加えた t 検定を施行した ($P < 0.05$)。

4. 研究成果

血管内皮細胞 (EA.hy926) を 24 穴細胞培養用プレートに密集状態となるまで単層培養した。実験開始直前にプレート内の培養皿を新しい培養液 (RPMI1640) で三回洗浄した。培養液には必要に応じて NK1R 阻害薬 Spantide ($\sim 1 \mu\text{M}$) と LPS (100 ng/ml) を加えた。刺激開始から一定時間経過したところで培養上清を採取し、TF 活性を持つ PV の発生量をフローサイトメトリーで測定した。また同じ条件で培養し、同じ時間経過で刺激物質を負荷した血管内皮細胞から total RNA を抽出し、本研究に関連する遺伝子の mRNA 発現量を評価した。

3 時間の LPS 刺激は内皮細胞培養上清中の TF 陽性 PV を有意に増加した。Spantide (10 nM - 1 μM) はその増加を有意に抑制した。血管内皮細胞は SP の前駆物質タンパク質の遺伝子 (TAC1) を発現していなかったが、別の NK1R リガンドであるヘモキニンの遺伝子 (TAC4) を構成的に発現していた。

単球系細胞 THP-1 から total RNA を抽出し、NK1R 関連遺伝子の発現について検討した。EA.hy926 は、われわれが血栓発症リスクのバイオマーカー⁵⁾として提唱している full-length NK1R の mRNA を極めてわずかではあるが構成的に発現していた。一方、THP-1 はこの mRNA を構成的に発現していなかった。しかし LPS で 2 時間以上 THP-1 を刺激すると full-length NK1R の mRNA の発現が検出された。

血管内皮細胞をセルカルチャーインサート内腔側底面のポリエチレンテレフタレー

ト膜上に密集した単層状態となるまで培養した。同インサートを培養液で三回洗浄し、新しい培養液で満たした 12 穴細胞培養プレートにセットした。細胞に刺激物質を負荷する場合はインサート内腔側に添加した。血管内膜透過性を評価する場合は、内腔側に FITC 標識アルブミン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた。その蛍光標識されたアルブミンの管腔外側への漏出を経時的に測定し、血管内膜透過性の指標とした。

薬物による負荷を行っていない内皮細胞単層膜において、FITC 標識アルブミンの管腔外側溶液への蓄積は、測定開始後 3 時間以上に渡って直線的に増加したことから、今回作成した実験系において、血管内皮単層膜透過性機能は測定開始後、少なくとも 3 時間は保たれると考えられた。

内皮細胞単層膜の内腔側に LPS (100 ng/ml) と SP (1 μM)、Spantide (1 μM) を添加した (すべて終濃度で表示)。これらの試薬で血管内皮細胞を 3 時間負荷しても、血管内膜透過性は影響を受けなかった。またこれらの試薬を負荷した状況下に、新鮮凍結血漿 (FFP) を内腔側に終濃度 0.5 vol% となるように添加した。FFP 添加後 15 分で SP を負荷した内皮細胞単層膜の透過性が有意に亢進した。測定開始後 15 分の SP による透過性亢進の後を追うように SP 負荷を行っていない単層膜の透過性も亢進しはじめ、30 分後の内膜透過性に両者間の有意差は認められなかった。Spantide を負荷した単層膜はこれら二つの群と比較して内膜透過性が有意に低かった。このことから FFP 添加 (すなわち凝固因子添加) による内膜透過性亢進に対する NK1R 阻害薬の抑制作用は、環境中に外因性の SP を添加しなくても認められることが確認された。

しかしながら Spantide は FFP による透過性亢進を完全にブロックするまでの効果を示さなかった。一方血管内皮細胞を血液凝固反応の結果発生するトロンビンの阻害薬であるヘパリン (10 unit/ml) や複数の血液凝固因子に対して阻害作用を持つセリンプロテアーゼ阻害薬であるウリナスタチン (100 unit/ml) で前負荷した後に FFP を添加すると、FFP による内膜透過性の亢進は強力にブロックされた。

これらの結果をまとめると、(1) LPS による血管内皮細胞刺激は比較的短時間 (3 時間以内) のうちに TF 活性を有する PV を有意に発生させたが、LPS 単独刺激は内膜透過性に影響を与えなかった。(2) NK1R 阻害薬は LPS による PV 発生を抑制した。この現象は環境に SP を加えなくても認められた。一方、血管内皮細胞は NK1R リガンドのひとつであるヘモキニンの遺伝子 (Tac4) を構成的に発現していたことから、ヘモキニンと NK1R による自己調節機能 (autocrine regulation) が血管内皮細胞の PV 発生機能に影響を与えていることが示唆された。(3) 血管内皮細胞単層膜に FFP を負荷すると、内膜透過性は亢進したが、SP はこの透過性亢進を加速した。(4) LPS 単独負荷による透過性亢進は認められなかった。さらに LPS が FFP 負荷による内膜透過性増加作用をさらに促進する効果は認められなかった。

今回の実験で、LPS による 3 時間程度の血管内皮細胞刺激は、同細胞から TF を多量に発現した PV の発生を増加することが確認されている。研究代表者は、この TF 発現 PV が血管内凝固の核となり、そこから発生するトロンビンが血管内皮細胞を刺激して血管透過性を亢進するといったスキームを想定して研究を開始した。トロンビンの発生源である FFP で血管内皮細胞を刺激すると内膜透過性は有意に亢進し、複数のトロンビン阻害薬 (ヘパリンやウリナスタチン) が FFP 惹起性の透過性亢進を抑制したことから、周期には宿命的に発生する血管内凝固すなわちトロンビン産生が血管内膜透過性を亢進することについては、今回、実験的に証明することができた。しかし PV 発生増加を通して実験環境内でトロンビンの発生を増加すると考えられる LPS が内膜透過性を亢進していない。

血液凝固はセリンプロテアーゼによる限定的蛋白分解が連鎖的に進行しポリマー化したフィブリンが発生する反応であるが、ホスファチジルセリンなどのリン脂質の存在下にその反応速度は爆発的に増加するとされている⁹⁾。PV はアポトーシス発生と類似した状況で発生するため、PV 表面は TF のみならずホスファチジルセリンが発現している。すなわち PV 存在下に発生する血管内凝固は血管内で均等に起こり始めるのではなく、PV

を核としたミクロな環境で発生し始める^{6,7)}。LPS 刺激により TF を発現した PV が内皮細胞から切り出されていく現象は、血管内凝固を促進するといった生体にとって負の側面を持つが、PV 切り出しにより内皮細胞から離れた場所でトロンビンの発生を惹起することにより、血管内トロンビン発生に伴う血管内膜透過性の亢進を抑止するといった生体保護的な側面も併せ持つ可能性が示唆された。

以下に研究成果をまとめてみる。血管内皮細胞はわずかではあるが full-length NK1R の mRNA を発現しており、刺激に応じて TF 活性を有する PV を発生させる。この PV が実際に凝固活性を持つことはフローサイトメトリーで確認されているため、全血中に同 mRNA が検出されることは、内皮細胞由来の PV の発生を反映している可能性が示唆された。神経原性浮腫の原因として知られている SP は、少なくとも今回の実験系では単独で血管内膜透過性を亢進するほどの強い刺激物質ではないことが示された。SP は血管内凝固の結果発生するトロンビンと共同して透過性を亢進することが示された。今回の実験系に置いて、NK1R 阻害薬は驚くべきことに外因系 SP の添加に関係なく PV 発生や内膜透過性を抑制することが示された。今回の研究により、血管内皮細胞が NK1R リガンドのひとつであるヘモキニンの遺伝子を構成的に発現していることが示されたことから、両者を介した情報伝達経路が内皮細胞の活性を自己調整 (autocrine regulation) している可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- 1) Eskicioglu C, Forbes SS, Aarts MA, et al. Enhanced recovery after surgery (ERAS) programs for patients having colorectal surgery: a meta-analysis of randomized trials. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 2321 – 9.
- 2) 東 俊晴, 伊藤大真, 杉本由紀. ニューロキニン受容体と血栓形成. *Anesthesia* 21 Century 2010; 12: 2317 – 2324.
- 3) Tuluc F, Lai JP, Kilpatrick LE, et al. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends in immunology* 2009; 30: 271 – 6.
- 4) Lai J-P, Ho WZ, Kilpatrick LE, et al. Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during

monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7771 – 6.

- 5) Azma T, Sugimoto Y, Kinoshita H, et al. Detection of the fulllength transcript variant for neurokinin-1 receptor in human whole blood associated with enhanced reinforcement of clot by substance-P. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 33: 329 – 37.
- 6) Azma T, Tuluc F, Ito T, et al. Mechanisms of action of anesthetics for the modulation of perioperative thrombosis: evidence for immune mechanisms from basic and clinical studies. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 5779 – 93.
- 7) Ito T, Azma T, Ogawa S, et al. Flow cytometric analysis for shedding of procoagulant particles provoked by calcium influx through the cell membrane in human monocytic cells. *Exp Clin Cardiol* 2014;20:1862-85.
- 8) Goschnick MW, Lau L-M, Wee JL, et al. Impaired “outside-in” integrin α IIb β 3 signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood* 2006; 108: 1911 – 8.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Azma T, Tuluc F, Ito T, Aoyama-Mani C, Kawahito S, Kinoshita H. Mechanisms of action of anesthetics for the modulation of perioperative thrombosis: evidence for immune mechanisms from basic and clinical studies. *Curr Pharm Des* 2014;20:5779-93. 査読有

Ito T, Azma T, Ogawa S, Kinoshita H, Kawahito S, Matsumoto N. Flow cytometric analysis for shedding of procoagulant particles provoked by calcium influx through the cell membrane in human monocytic cells. *Exp Clin Cardiol* 2014;20:1862-85. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

Azma T, Nishioka A, Ito T, Nagasaka H, Matsumoto N. Effects of prolonged pulsed radio frequency current on cytotoxicity, microvesicle shedding, and mRNA expression for proopiomelanocortin (POMC) in human monocytic cells. 16th World Congress on Pain, September 26 – 30, 2016, Yokohama

Azma T, Nishioka A, Nagasaka H, Matsumoto N. Effects of continuous radio frequency current at 50°C on microvesicle shedding and cellular viability in human monocytic cells.

35th Annual Congress for the European Society of Regional Anaesthesia & Pain Therapy, September 7 – 10, 2016, Maastricht, Netherlands.

Azma T, Ogawa S, Ito T, Matsumoto N. Involvement of calcium overloading but not opening of permeability transition pore in the mitochondrial depolarization in human monocytic cells exposed to bupivacaine. 34th Annual Congress for the European Society of Regional Anaesthesia & Pain Therapy, September 2 – 5, 2015, Ljubljana, Slovenia.

Azma T, Ogawa S, Ito T, Matsumoto N. Involvement of reactive oxygen species in the shedding of procoagulant particles from monocytes exposed to bupivacaine: cause or bare results? 33th Annual Congress for the European Society of Regional Anaesthesia & Pain Therapy, September 3 – 6, 2014, Seville, Spain.

東 俊晴, 西岡慧, 長坂浩, 松本延幸. ヒト血管内皮細胞の凝固活性小胞放出と単層膜透過性に対するリポ多糖とニューロキニン1受容体阻害薬の影響. 日本心臓血管麻酔学会第21回学術大会. 2016年9月16日～18日, 横浜.

東 俊晴, 西岡 慧, 伊藤大真, 松本延幸. ヒト単球系細胞のproopiomelanocortin (POMC)遺伝子発現に対するパルス高周波の時間依存性効果. 日本ペインクリニック学会第50回大会. 2016年7月7日～9日, 横浜.

東 俊晴, 小川さおり, 西岡 慧, 竹内菊子, 長坂 浩, 松本延幸. セリンプロテアーゼ阻害薬と比較したニューロキニン1受容体阻害薬によるトリプシン惹起血管内膜透過性亢進に対する抑制効果. 日本麻酔科学会第63回学術集会. 2016年5月26日～28日, 福岡.

東 俊晴, 小川 さおり, 西岡 慧, 長坂 浩, 松本 延幸. LPSによるヒト血管内皮細胞の凝固活性マイクロパーティクル放出に対するニューロキニン1受容体阻害薬の影響. 日本心臓血管麻酔学会第20回学術大会. 2015年10月9日～11日, 福岡.

東 俊晴, 伊藤 大真, 小川 さおり, 木下 浩之, 松本 延幸. 低速灌流下の管腔内血栓成長に対する単球の影響を検討するための静脈血栓モデルの作成. 第36回日本循環制御医学会総会. 2015年6月5日～6日, 名古屋.

東 俊晴, 伊藤大真, 小川さおり, 長坂浩, 松本延幸. 組織因子陽性マイクロパーティクルの血管内発生源細胞の遺伝子発現プロフィー

ルに対するLPSの影響. 日本麻酔科学会 第62回学術集会. 2015年05月28日～30日, 神戸

東 俊晴. シンポジウム3・術中大量出血に対する管理法の進歩: 周術期輸血戦略の意思決定アルゴリズム. 第61回日本輸血・細胞治療学会総会, 2013年5月16日～18日, 横浜.

東 俊晴. 痛み, しびれの正体と付き合い方. 埼玉医科大学市民公開講座. 2015年1月17日, 川越.

[図書] (計3件)

日本麻酔科学会 (共同執筆 東俊晴含む). III 静脈麻酔薬 ケタミン塩酸塩. 日本麻酔科学会 麻酔薬および麻酔関連薬使用ガイドライン 第3版第4訂 P86-89, 2016. http://www.anesth.or.jp/guide/pdf/publication4-3_20160325.pdf

東 俊晴. 循環ベーシック: 循環領域の輸液・輸血管理. 日本麻酔科学会第60回学術集会. リフレッシャーコースレクチャー. P1-6, 2013. <https://member.anesth.or.jp/sm/60/session/R525.html>

[その他]

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Toshiharu_Azma

http://independent.academia.edu/Toshiharu_Azma

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 俊晴 (AZMA, Toshiharu)

国立研究開発法人・国立国際医療研究センター国府台病院・手術関連診療部門・部門長
埼玉医科大学医学部麻酔科学・客員准教授
研究者番号: 60284197