

論文の内容の要旨

論文題目 エンドトキシンによる血管内皮細胞障害に関する研究

指導教員 瀬戸泰之教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

塩入利一

【背景と目的】

各種治療薬や集中治療の進歩などにもかかわらず、特に重症患者では敗血症による死亡率は依然として高率である。感染症を原因とした全身性炎症反応症候群である sepsis から severe sepsis や septic shock および多臓器不全に至る病態として、血管内皮細胞の障害が深く関与しているといわれている。

血管内皮細胞は、血管運動能の調節・血管透過性の調節・血液流動性の保持など、臓器のホメオスタシスを維持するために重要な機能を有しているが、sepsis においてはさまざまな機序により生理機能の破綻を生じる。血管内皮細胞の障害に伴う血管透過性の亢進は、呼吸機能不全の原因となる急性呼吸窮迫症候群を初めとする、全身性血管逸脱症候群を引き起こす。また血管内皮細胞障害より発症する播種性血管内凝固症候群は、重要臓器の機能不全を惹起する。Sepsis の主要な原因菌であるグラム陰性菌の菌体成分はエンドトキシン (lipopolysaccharide : LPS) として知られているが、細胞表面においては TLR4/CD14/MD-2 という LPS 受容体蛋白質により認識されることが明らかにされた。これらのうち CD14 や MD-2 は細胞膜表面に存在する membrane type (mCD14, mMD-2) と、血液中に存在する可溶性の soluble type (sCD14, sMD-2) が存在することも明らかとなったが、血管内皮細胞におけるこれら蛋白質の発現状態や可溶性成分の機能は十分には解明されていない。また LPS が直接的に血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することによって内皮細胞障害に関与しているとの報告の一方で、FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins) などの内因性アポトーシス阻害物質

を抑制しない限りアポトーシスは誘導されないとも報告されており、アポトーシスの関与については明らかではない。

本研究では、血管内皮細胞におけるLPS受容体蛋白質の発現状況とこれらの可溶性成分の役割を解析するとともに、LPSによる血管内皮細胞障害とアポトーシスの関与について検討を行った。

【方法】

1) 細胞 : 血管内皮細胞は初代培養細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Venous Endothelial Cells : HUVEC)を用いた。

2) 細胞の刺激 : 血清非添加培地にLPS-binding protein (LBP)およびsCD14またはsMD-2を添加し、内因性アポトーシス阻害物質を抑制するため、cycloheximide (CHX)の存在または非存在下にLPS (*Escheria coli* O111:B4)で刺激を行った。

3)判定 : HUVECより全RNAを抽出し、real time RT-PCR法を用いLPS受容体蛋白質のmRNAの発現状況を検討した。代謝活性のある細胞中のNADH活性を反映するMTS法にて細胞のviabilityを評価した (Cell Viability Assay)。また細胞外のLDH活性を指標に細胞のcytotoxicityを評価した (Cell Cytotoxicity Assay)。アポトーシスは、実行性のcaspaseであるcaspase-3および-7の活性を、細胞内と培養上清中 (細胞外)にて、発光基質を用いて測定した (Caspase-3/7 activity Assay)。また、Western blot法にて培養上清中の活性型caspase-3およびLDH蛋白質を検出した。

【結果】

1) HUVECにおけるLPS受容体蛋白質のmRNA発現 : MD-2およびTLR4のmRNA発現は認められたが、CD14のmRNA発現はほとんど認めなかった。

2) Cell Viability Assay : CHX存在下ではsCD14共存下にLPS依存性のviabilityの低下がみられたが、sMD-2の影響はみられなかった。CHX非存在下ではsCD14およびsMD-2の有無にかかわらずLPS依存性のviabilityの変化はみられなかった。

3) Cell Cytotoxicity Assay : CHXの有無にかかわらず、sCD14共存下にLPS依存性のcytotoxicityの上昇を認めたが、sMD-2の影響はみられなかった (図)。

4) Caspase-3/7 Activity Assay : 細胞内ではCHXの有無にかかわらず、sCD14およびsMD-2の共存・非共存下ともに、LPS依存性のcaspase-3/7活性の上昇は認めなかった。細胞外ではCHXの有無にかかわらず、sCD14共存下にLPS依存性のcaspase-3/7活性の上昇を認めたが、sMD-2の影響はみられなかった (図)。

5) 培養上清中のcaspaseおよびLDH蛋白質 : CHXの有無にかかわらず、sCD14共存下に、LPS依存性の活性型caspase-3およびLDH蛋白質の増加を認めた。

【考察】

本研究では、ヒトにおける反応をより反映していると考えられるヒト初代培養細胞であるHUVECを、内因性アポトーシス阻害物質を抑制するためCHXの存在・非存在下にLPSで刺激を行い、MTS法によるviability、細胞外のLDH活性を指標としたcytotoxicity、さらにはア

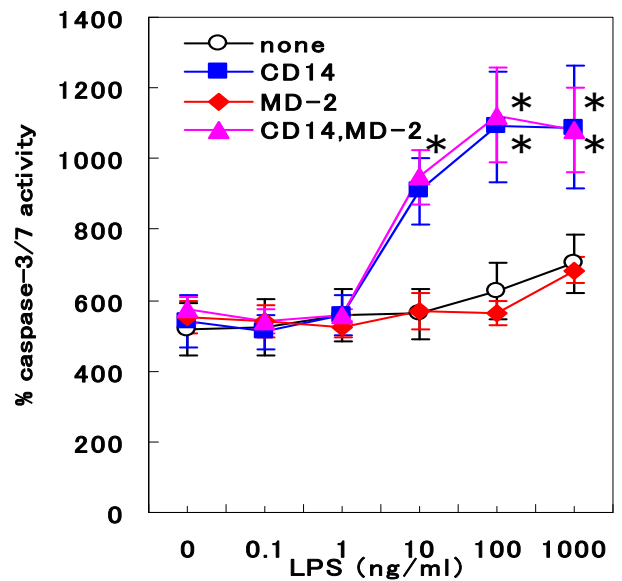
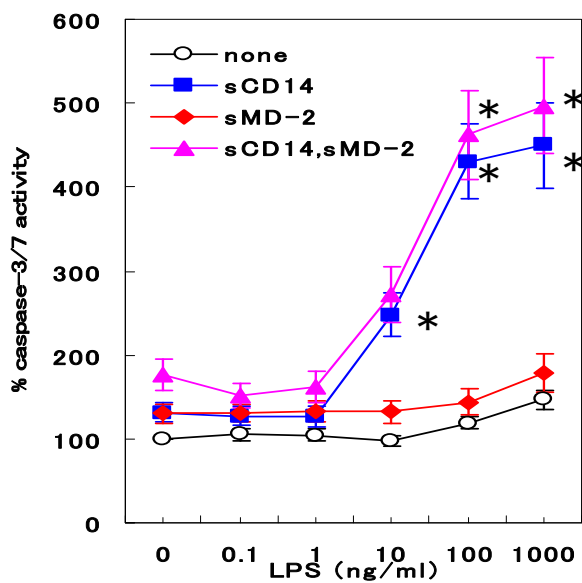
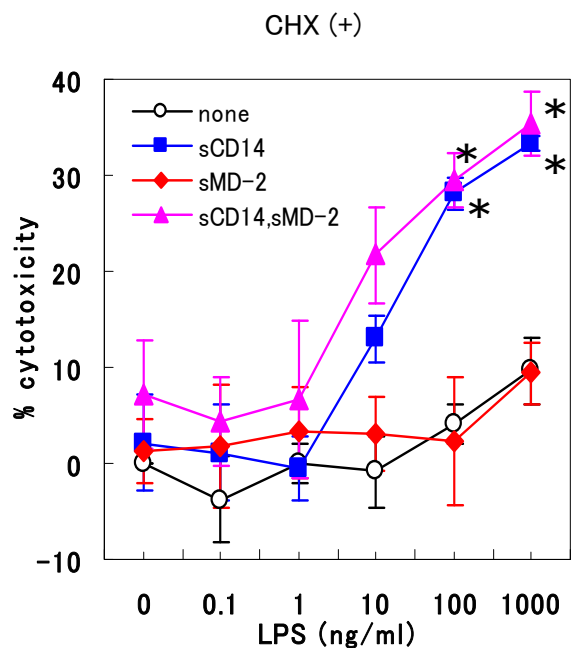
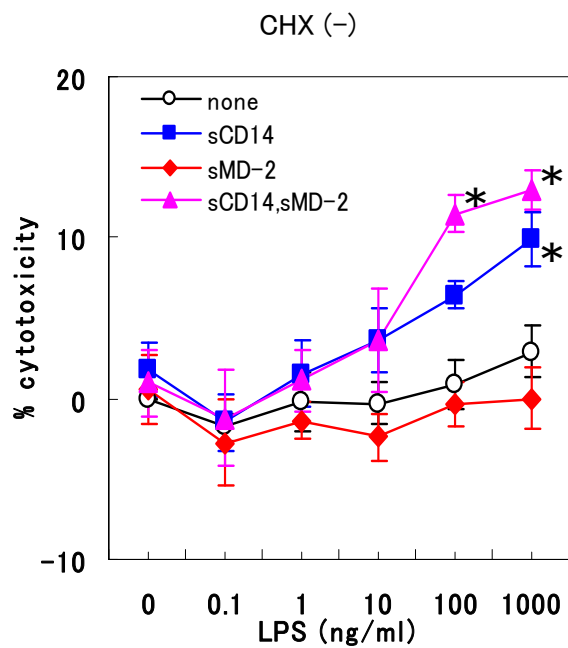
ポトーシスの生化学的指標である caspase-3/7 の活性化を細胞内外で測定することによって、LPS による血管内皮細胞障害およびアポトーシス誘導を評価した。

Cell Viability Assay では、CHX 存在下では、sCD14 依存性に LPS 刺激による viability の低下がみられたが、CHX 非存在下では、LPS 刺激による viability の低下はみられなかった。CHX 非存在下では、HUVEC の自然増殖の影響などにより、viability が修飾されている可能性が考えられ、細胞外の LDH 活性を指標とした Cell Cytotoxicity Assay を施行した。Cell Cytotoxicity Assay では、CHX の有無にかかわらず、sCD14 依存的に LPS 刺激による cytotoxicity の上昇がみられた。HUVEC では、sCD14 共存下に、LPS 依存性に細胞障害が惹起されていると考えられ、この細胞障害がアポトーシスに起因するものかどうか、caspase-3/7 活性を測定し検討した。細胞内の caspase-3/7 活性は、LPS 依存性の上昇はみられなかった。細胞外の caspase-3/7 活性は、CHX の有無にかかわらず、sCD14 依存的に LPS 刺激による活性の上昇がみられた。この細胞外の caspase-3/7 活性は、caspase-3/7 の特異的な阻害剤である Z-DEVD-FMK と共に測定すると完全に抑制されたこと、また Western Blot 法にて、活性型の caspase-3 蛋白質の増加も検出されたことから、この活性は少なくとも caspase-3 に起因するものであると考えられた。

本研究では、細胞外の活性に着目することにより、LPS 刺激による caspase-3/7 活性の上昇が認められた。これまでの研究では、細胞内の caspase-3/7 活性のみに着目され、細胞外の活性は検討されていなかったことが、LPS 刺激による caspase-3/7 活性の上昇が捉えられなかった一因であると考えられた。さらに本研究では、CHX 非存在下においても LPS により caspase-3/7 活性が上昇することが見出された。HUVEC では、CHX などによって内因性アポトーシス阻害物質である FLIP の影響を抑制しないと LPS によるアポトーシスは誘導されないとの報告がみられるが、CHX 存在下での反応は実際の生体における反応を反映していないことも指摘されている。本研究では、HUVEC では CHX によってアポトーシス阻害物質である FLIP を抑制しなくても、LPS 刺激により caspase-3/7 の活性化が起きることを明らかにした。

また HUVEC では、sCD14 存在下でないと LPS による viability の低下・cytotoxicity の上昇および caspase-3/7 の活性化は観察されなかったが、sMD-2 の存在はこれらには影響を与えなかった。血管内皮細胞では TLR4 と MD-2 は発現しているが CD14 は発現していないとの報告がみられ、本研究においても real time RT-PCR 法による検討では同様の結果であった。したがって、HUVEC では sCD14 は欠如している mCD14 を補完する機能を有していることが示唆された。一方 sMD-2 に関しては mMD-2 が発現していることから、このような LPS 認識を促進する作用は有していないと考えられた。

以上のように、血管内皮細胞である HUVEC は、CHX を併用しない内因性アポトーシス抑制物質 FLIP の影響下においても、sCD14 依存的に LPS 刺激によりアポトーシスが誘導されることを見出した。したがって、sCD14 の制御などによって、血管内皮細胞のアポトーシスおよび細胞障害の抑制することが、重症敗血症や敗血症性ショックの新たな治療戦略として有用である可能性が示唆された。



HUVEC における LPS 刺激による cytotoxicity および細胞外 caspase-3/7 活性

FBS 非添加培養液に LBP (100 ng/ml)を加え、sCD14 (1 μ g/ml)および sMD-2 (1 μ g/ml)の共存・非共存下、HUVEC を CHX 非存在下 (左)および存在下 (20 μ g/ml; 右)に図に示す濃度の LPS で刺激を行い、24 時間後に、cytotoxicity (上段)および細胞外 caspase-3/7 活性 (下段)を測定した。Cytotoxicity は、sCD14 および sMD-2 非添加時の LPS 非刺激における最大の cytotoxicity を 100%として表している。Caspase-3/7 活性は、sCD14, sMD-2 非添加および CHX 非存在下における LPS 非刺激時の活性を 100 %として表している。データは平均値±標準誤差を示す。

(*: $P < 0.05$; 対応する LPS 非刺激時の値との比較, Dunnett's multiple comparison test)