



Establishment of evaluating the endothelial cell injury by TNF- α in vitro with implicated the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2017-01-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮崎, 恭平 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000159

論文内容要旨

氏名 <small>しめい</small>	菅崎 崇平
学位論文題名	Establishment of evaluating the endothelial cell injury by TNF- α in vitro with implicated the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy.
<p> 【背景】 ウイルス関連急性脳症（以下急性脳症）はウイルス感染後に意識レベル低下やけいれんなどの中枢神経症状を伴って急激に発症する、ウイルス感染症の中でも最も予後不良な合併症である。重症例では、血清中の炎症性サイトカインが高値となり、血管透過性が亢進し、脳浮腫を呈する。しかし、同症における血管内皮細胞障害についての詳細な機序は不明である。本研究では本症の病態解明・治療法開発を目指し、<i>in vitro</i>での炎症性サイトカインによる血管内皮細胞障害評価モデルを作成するため、炎症性サイトカインの一つである TNF-α を用い、血管内皮細胞障害の動的、機能的な評価方法を確立することを目的とした。 </p> <p> 【方法】 本研究は福島県立医科大学倫理委員会の承認を受けて行った。書面で承諾が得られた妊婦の予定帝王切開時に得られた臍帯からヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC：Human Umbilical Vein Endothelial Cell）を単離した。HUVEC を TRANSWELL[®] を用いて単層に培養し、段階希釈した TNF-α（2500, 500, 100 pg/mL, およびコントロール）を添加後一定時間培養した。血管透過性変化の動的評価のために経内皮細胞電気抵抗値（TER：Transendothelial cell Electrical Resistance）を測定した。各 TNF-α 濃度における TER を連続 3 日間測定し、TER の動的な変化を電気生理学的に解析した。また、物質の透過性を機能的に評価するために FITC 標識デキストランを用いた溶質透過性試験を行い経時的な血管透過性変化を測定した。さらに、血管透過性制御に関与するタイトジャンクション蛋白の一つ、claudin-5 の局在変化を蛍光免疫染色により観察した。 </p> <p> 【結果】 TNF-α 添加後、12 時間から 24 時間をピークに TER は一過性に低下し、その後上昇を認めた。TER 低下の程度や回復までに要する時間は TNF-α 濃度依存性であった。また溶質透過性試験でも、TNF-α 濃度依存性に FITC 標識デキストランの透過性が亢進したのちに透過性の回復を認めた。さらに、claudin-5 の蛍光免疫染色では、添加後 12 時間において TNF-α 濃度依存的な claudin-5 の非局在化を認めたのち、その局在の回復を認めた。TER 測定、溶質透過性試験における透過性亢進状態の時間帯に一致したタイトジャンクションの局在変化を認めた。 </p> <p> 【結論】 TER 測定法と溶質透過性試験によって TNF-α 濃度依存的な血管内皮細胞障害作用を動的、機能的に評価する系を確立した。本評価系は TNF-α 濃度および時間経 </p>	

過による血管透過性変化を評価することが可能で、急性脳症における炎症性サイトカイン濃度依存的な重症度と血管透過性亢進状態を反映しており、急性脳症のさらなる病態解明や血管透過性に着目した治療戦略の開発に有用である。

※日本語で記載すること。1200字以内にまとめること。

学位論文審査結果報告書

平成27年12月18日

大学院医学研究科長様

下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果要旨】

氏名 宮崎 恭平

学位論文題名 ウイルス関連急性脳症の病態解明を目指した TNF- α による
血管内皮細胞障害評価系モデルの確立

Establishment of evaluating endothelial cell injury by TNF- α in vitro with
implicated pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy.

本研究はインフルエンザ脳症のようなサイトカインストームが原因となって起こる脳症の発症メカニズムを *in vitro* で調べた研究である。申請者らは血管内皮細胞がサイトカインによって障害され、Blood-Brain barrier が壊されることがその一因と考え、以下の実験を行った。まず、血管内皮の一例として臍帯から分離培養した血管内皮細胞を 3 μ m の pore size の transwell に培養した。この血管内皮がタイトジャンクションを形成後、ここに高濃度の TNF- α を作用させ、ジャンクションが壊れる様子を、1) transwell 上下の電気抵抗と、2) dextran 分子の透過性から評価した。その結果、TNF- α 濃度依存的に細胞の接着が破壊され、monolayer の内皮細胞を超えて物質が拡散されることが示された。さらに細胞を蛍光染色して観察し、TNF- α 処理によってアポトーシスが起きていることや細胞接着因子である claudin-5 の局在が変化していることを観察した。

審査の過程で、1) TNF- α 以外のサイトカインの関与についても調べるべきではないかという指摘、2) 臍帯の血管内皮で中枢神経系の血管内皮の現象を評価できるのかという指摘が出された。これらの点は今後解明されるべき重要なポイントであろう。しかし、*In vitro* でウイルス性脳症の発症原因を解析できるシステムを構築した点は評価に値するものであり、今後の研究の進展が期待される。全ての実験結果は明瞭であり、データの記載も適切である。よって、本研究は学位論文としてふさわしい論文であると判定した。

学位論文審査委員

主査 錫谷 達夫

副査 榎本 崇之

副査 中里 和孝