



Detection of inflammatory circulating endothelial cells using human umbilical vein endothelial cells detached from culture dishes by tumor necrosis factor-alpha as control cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-03-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 朽久保, 順平 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/2924">http://hdl.handle.net/10271/2924</a>

博士(医学) 朽久保 順平

## 論文題目

Detection of inflammatory circulating endothelial cells using human umbilical vein endothelial cells detached from culture dishes by tumor necrosis factor-alpha as control cells

(腫瘍壊死因子アルファによって培養皿から遊離したヒト臍帯静脈内皮細胞をコントロール細胞に用いた炎症性循環内皮細胞の検出)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

全身性炎症反応症候群に起因する播種性血管内凝固症候群は集中治療患者において重篤な病態であり、血管内皮傷害の進行が密接に関わっている。播種性血管内凝固症候群を早期に正確に診断することは臓器機能障害の進行を防ぐために重要である。

循環内皮細胞は血管壁から血液中に遊離した血管内皮細胞であり、血管内皮傷害で増加し、播種性血管内凝固症候群の診断に重要な役割を担う可能性がある。しかし、循環内皮細胞の検出法はいまだ標準化されていない。

この研究の目的は重篤な病態における循環内皮細胞の検出法を確立することである。そのためには循環内皮細胞に対する適切な陽性コントロール細胞が不可欠である。そこで我々は全身性炎症反応症候群において血管内皮傷害に寄与する主要な炎症性サイトカインの 1 つである腫瘍壊死因子アルファに着目し、その曝露によって培養皿から遊離したヒト臍帯静脈内皮細胞をコントロール細胞として用いた。

### [方法]

この研究プロトコールは名古屋大学医学部附属病院の治験審査委員会で承認され、名古屋大学医学部附属病院で実施された。参加者は文書により説明され同意した。

約 50%の密度まで培養されたヒト臍帯静脈内皮細胞を腫瘍壊死因子アルファ濃度が 100 ng/mL の培地で 37°C で培養し、24 時間後に遊離したヒト臍帯静脈内皮細胞を回収して、これを腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞として用いた。

循環内皮細胞を検出するための適切なマーカーを探すため、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞、腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞、全血血液細胞の細胞表面分子を CD146、CD105、CD31、CD309、CD34、CD45、CD133 に対する抗体およびハリエニシダ由来レクチン 1 を用いてフローサイトメーターで解析した。

循環内皮細胞を検出するための方法であるフローサイトメトリー法と免疫ビーズ法を比較するため、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 100 個または腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞 100 個を健常人から採取した血液に添加し、それぞれの方

法で添加した内皮細胞の検出率を測定した。またヒト血液中の循環内皮細胞を検出できるかを確認するため、健常人および集中治療患者の血液中の循環内皮細胞数をフローサイトメトリー法で測定した。

#### [結果]

CD146、CD105、CD31、ハリエニシダ由来レクチン 1 は正常ヒト臍帯静脈内皮細胞で強陽性であった。この 4 つのマーカーのうち、CD146 と CD105 は血液細胞でほとんど陰性であったが、CD31 とハリエニシダ由来レクチン 1 は血液細胞の一部でも陽性であった。腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞は正常ヒト臍帯静脈内皮細胞と比べて CD146 と CD105 の抗原量が低下していた。以上より、フローサイトメトリー法における循環内皮細胞の定義を CD146 陽性、CD105 陽性、CD45 陰性、CD133 陰性、ヘキスト核染色陽性を満たす細胞とし、ゲーティングを腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞が正確に検出される範囲に設定した。

血液に添加した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞の平均検出率はフローサイトメトリー法で 75%、免疫ビーズ法で 82%であった。これに対し、腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞の平均検出率はフローサイトメトリー法で 64%、免疫ビーズ法で 27%と、有意に ( $p<0.05$ ) フローサイトメトリー法が良好であった。

健常者 20 人と集中治療患者 16 人で検出された循環内皮細胞の平均はそれぞれ 2.8 個/mL、4.3 個/mL であった。集中治療患者のうち、播種性血管内凝固症候群を伴う全身性炎症反応症候群を発症していた 1 人では、集中治療室入室時に循環内皮細胞が 49 個/mL と上昇しており、治療介入による病態の改善に伴い循環内皮細胞は減少した。

#### [考察]

循環内皮細胞のマーカーとして CD146、CD105、CD34、CD31、ハリエニシダ由来レクチン 1 が広く用いられているが、我々の結果からは CD146 と CD105 が内皮細胞に対して感度と特異度に最も優れたマーカーと考えられた。

血液に添加した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞の検出率はフローサイトメトリー法と免疫ビーズ法で差がないにもかかわらず、腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞の検出率は免疫ビーズ法で低下していた。これは腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞の CD146 の抗原量が正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に比べて低下していることが原因と考えられた。このことから、重篤な炎症病態によって血管壁から遊離した内皮細胞である循環内皮細胞の検出には、腫瘍壊死因子-ヒト臍帯静脈内皮細胞の検出と同様に、免疫ビーズ法よりもフローサイトメトリー法が適していると考えられた。

#### [結論]

CD146 と CD105 は循環血管内皮細胞を同定するためのマーカーとして適している。重篤な炎症病態における循環血管内皮細胞の検出法として、フローサイトメトリー法は免疫ビーズ法より優れている。