




所属長	所属科長	事務(局/部)長
		

令和4年 4月 1日

理事長 殿

学 長 殿

令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

標記の件に関しまして、別紙のとおり報告いたします。

また、本研究報告の内容は、近畿大学学術情報リポジトリ (KURepo) に公開する旨、承諾いたします。

1. カテゴリー	<input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 開発・提案 / カテゴリーNo 30
2. 企画題目	COVID-19 血栓症解析のための生細胞イメージング法の開発

研究代表者

所 属 : 理工学部 生命科学科

職・氏名 准教授 ・ 早坂 晴子



令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

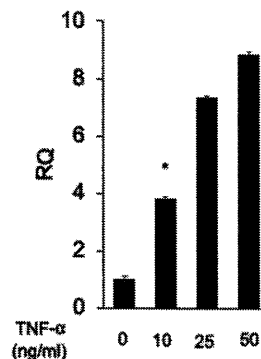
企画題目	COVID-19 血栓症解析のための生細胞イメージング法の開発
研究者所属・氏名	研究代表者：理工学部・早坂 晴子 共同研究者：農学部・岡村 大治

1. 研究、開発・提案 目的及び内容

COVID-19の血栓症は、既知の血栓性疾患と臨床上的特性が完全に一致しないため COVID-19 特有の要因が示唆されるが、SARS-CoV-2 感染にともなう組織微小環境変化や血栓症増悪因子は不明である。本研究提案では、細胞死誘導をリアルタイムで検出する実験法の確立を試みた。血管内皮細胞障害と同調して生じるシグナルを発光シグナルとして可視化することができれば、培養細胞を用いた血管微小環境要因の解析が可能となる。

2. 研究、開発・提案 経過及び成果

本提案では、肺炎で生じる低酸素状態、免疫系活性化で生じる炎症性サイトカインなどが血管内皮細胞を傷害するプロセスを、生細胞レベルで解析可能とする実験方法の確立をめざした。このためにまず、生細胞発光シグナルのリアルタイム測定精度の確認から開始した。私は、生物発光シグナルにより、細胞傷害性細胞で誘導される癌細胞の細胞死を検出するシステムの検討をおこなった。マウスメラノーマである B16F10 細胞を移植したマウス脾臓から脾細胞を分離したのち、マイトマイシン C (MMC) 処理により増殖を停止させた B16F10 細胞と 3 日間共培養することで、活性化誘導脾細胞得た。この細胞をホタルルシフェラーゼ（生物発光を生じさせる酵素）の遺伝子を一過的導入した B16F10 細胞に添加し、活性化脾細胞による細胞死の誘導を試みた。すなわち、活性化脾細胞が B16F10 細胞に細胞死を誘導すると、生物発光のレベルが低下すると推測された。上記の実験系を用いて、長時間発光測定装置 Kronos による発光値測定を行った結果、脾臓細胞添加から約 20 時間経過後に発光値の低下が検出され、癌を移植していないマウス由来の脾細胞を用いたコントロールと比較すると、B16F10 細胞移植マウス由来の活性化脾細胞により発光レベルが顕著に低下した。また、血管内皮細胞を用いた生物発光シグナル検出をおこなうのに先立ち、炎症性サイトカインが内皮細胞にどのような遺伝子発現の変化を与えるのかを調べた。これまでの研究では、炎症性サイトカイン TNF- α で血管内皮細胞を刺激すると、接着分子である ICAM-1 発現の上昇が報告されている（図）。また、同様の変化がマウスリンパ管内皮細胞 (SVEC-4) でも生じることを確認している。そこで、炎症性サイトカイン TNF- α 添加時の内皮細胞で生じる全遺伝子変化を次世代シーケンシング (RNA-Seq) により解析した。SVEC4-10 細胞 1×10^6 個をプレートに播種し、24 時間培養した後、TNF- α 25 ng/ml で刺激し、24 時間後の total RNA を RNA-Seq 解析した。その結果、TNF- α 刺激後に発現上昇する遺伝子は全体の 0.5%であり、134 遺伝子あることがわかった。この中には発現レベルが 10 倍以上上昇する複数のケモカイン遺伝子や自然免疫応答に関与するペプチド



TNF- α 刺激時 ICAM-1 遺伝子発現解析

グリカン認識タンパク質が含まれており、炎症性サイトカインシグナルにより内皮細胞で発現が変化する遺伝子群の同定につながった。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・提案 計画

本研究から、発光レポーターのホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いて、経時的に細胞シグナルを可視化することが可能になった。また本研究から炎症性サイトカインで誘導される複数の遺伝子が同定された。血管内皮細胞傷害において、炎症シグナルに関与する遺伝子を同定することは重要である。今後、これらの遺伝子の制御下にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、刺激に対して応答するかどうかを解析することで、炎症刺激による遺伝子の経時的変化を検出することができる。炎症刺激時に加え、肺炎で生じる低酸素の影響を解析すれば、凝固促進、血栓形成における血管微小環境の影響を知ることができる。今後は、本提案で構築した実験法を用いて、血管内皮細胞障害と同調して生じる組織微小環境要因を探求する予定である。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)

5. 研究、開発・提案 課題の成果発表等

- Real-time monitoring of B16 melanoma cell viability by the firefly luciferase-based bioluminescence
Nishizawa H, Kurowarabe K., Hayashi R., *Hayasaka H. 理工学総合研究所 研究報告 Science and Technology, 32, 2021 (*Corresponding Author)
- Stepwise conversion methods between ground states pluripotency from naïve to primed.
Okamura D*, Chikushi M, Chigi Y, Shiogai N, Jafar S, Wu J. (*Corresponding Author)
Biochem Biophys Res Commun. 574:70-77, 2021 Aug 8
- The amount range of membrane cholesterol required for robust cell adhesion and proliferation in serum-free condition.
Takii S, Wu J, Okamura D*. (*Corresponding Author)
PLOS ONE. in press