

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10769

研究課題名(和文) ずり応力によるiPS細胞由来血管内皮細胞の形態変化に伴う細胞機能・応答機構の解明

研究課題名(英文) Cell function and response mechanism associated with morphological changes of iPS cell-derived vascular endothelial cells due to shear stress

研究代表者

栗田 二郎 (JIRO, KURITA)

日本医科大学・医学部・病院講師

研究者番号：20421183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養ウシ大動脈内皮細胞に層流性または乱流性のずり応力による機械的刺激を与え、細胞増殖や分化に關与するMARK経路や免疫炎症反応の中心的役割を果たすNF- κ B経路、またHippo経路におけるユビキチンプロテアソームシステム(UPS)の關与を調べた。その結果、乱流のみがNF- κ Bを活性化させ、さらにそれはリン酸化されたI κ Bに変化を与えず、トータル量としてのI κ Bのみが減少した。つまり、乱流だけがI κ Bの分解を誘発させ、NF- κ Bを活性化させることと、そのI κ Bの分解はUPSを介するものであると判明した。また一方で、層流はUPSを逃れてNF- κ Bの不活性化に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では乱流がI κ Bの分解を誘発し、NF- κ Bを活性化させること。また、そのI κ Bの分解はユビキチンプロテアソームシステム(UPS)によるものであると判明した。一方で、層流はUPSを介した分解を逃れて、NF- κ Bの不活性化に寄与していることも示した。今回、異なる血流パターンがNF- κ B経路に異なる影響を及ぼす実験結果を得た。しかし、これは血流が引き起こすごく一部の細胞応答反応を見ているにすぎない。今後もこのような血流が及ぼす動脈硬化機序の基礎的解明を継続し、外科手術における吻合部狭窄を予防する手段として、乱流を回避させる血行再建方法の開発や工夫についての基礎的知見の積み重ねを継続したい。

研究成果の概要(英文)： Shear stress is known to cause activation of NF- κ B. However the precise details of these phenomenon under different flow patterns are not well understood. So we studied the effect of disturbed flow versus pulsatile uniform flow as physiological types of blood flow on NF- κ B pathway. Our hypothesis are that respective flows have different effects on the degradation of I κ B and the degradation induced by the ubiquitin-proteasome system(UPS). In this study, we have shown that exposure to disturbed flow induced the degradation of I κ B via UPS. Although the absolute level of phosphorylated I κ B is unchanged, we see a relative increase in the phosphorylated rate of I κ B. As a result, there is net activation of I κ B. On the other hand, exposure to uniform flow somehow prevents I κ B from the degradation in UPS pathway. Further studies are to be done to elucidate this novel mechanism of the degradation.

研究分野：流体力学分野

キーワード：ずり応力 シェアストレス iPS細胞 MARK経路 ユビキチン プロテアソーム NF-

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多能性幹細胞由来心筋シートに代表されるような再生医療の発展が期待されている。特に患者自身の細胞から作成可能な iPS 細胞から血管内皮細胞、壁細胞、心筋細胞への分化誘導の報告が相次ぎ、将来的に成熟血管への再生機構をさらに解明することによって、自己由来細胞の動静脈グラフトを用いた autotransplantation の実現も不可能ではない。

一方、生体内の血管内腔を一層に覆う内皮細胞は、血流に起因する力学的刺激であるシェアストレス (shear stress = ずり応力) を絶えず受けている。内皮細胞には血流の変化をシェアストレスの変化として感知し、情報を細胞内に伝達し、形態や機能に伴う細胞応答を起こす能力が備わっていることが報告されている。循環器系疾患の原因となる動脈硬化症や動脈瘤等の血管病変では、血管の形状や走行に起因した血流の変化、つまり力学的刺激の変化が血管内皮細胞に影響を与え、細胞の形態変化に伴って機能が変化するメカノトランスダクションにより血管が変性し、病変が発症、進展すると考えられている。また、こうしたシェアストレスに対する内皮細胞の応答は、発生時の脈管形成や恒常性の維持、血管新生あるいは血管のリモデリングや粥状動脈硬化といった血流依存性に起こる現象に重要な役割を果たすと考えられている。

これら総合的なティッシュエンジニアリングの観点から、我々はメカニカルストレスが iPS 細胞由来の血管内皮細胞に対して作用し、恒常性の維持や健全な細胞増殖に寄与すると仮説を立てた。また、それが iPS 細胞由来血管内皮細胞の安定した組織化をもたらすと証明できれば、本研究は成熟血管を形成する上で有用な知見を提示することができるであろう。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血流に起因するシェアストレス(ずり応力)に対する iPS 細胞由来の血管内皮細胞の形態変化に伴う細胞機能・応答機構を解明することである。

3. 研究の方法

培養ウシ大動脈内皮細胞を拍動性の有無を追加した層流性または乱流性のずり応力を与え、細胞増殖や分化に関与する MARK 経路や免疫炎症反応の中心的役割を果たす NF- κ B 経路、また Hippo 経路におけるユビキチンプロテアソームシステム(UPS)の関与に関する研究を行った。

NF- κ B は動脈硬化を惹起する炎症を制御する細胞内セルシグナル伝達経路である。NF- κ B は阻害タンパクである I κ B によって細胞質内で不活性化しているが、ある刺激によって、I κ B のリン酸化が急速に進むと、NF- κ B は遊離し、核内に translocate して、転写活性が亢進する。また、リン酸化された I κ B はユビキチンプロテアソーム分解経路に進み処理されると考えられている。

具体的なアプローチは以下の通りである。

- iPS 細胞由来血管内皮細胞のシェアストレスフローモデルを確立する。
- 機械的刺激が NF- κ B の活性化を惹起することは知られているが、異なる血流パターンが及ぼす影響に関しては不明である。これらの血流パターンの違いが、ユビキチンプロテアソームに影響を与え、I κ B の分解に影響を及ぼしている可能性を検証する。

【検体作成】各内皮細胞をファイブロネクチンコーティングのスライドガラスに播種し、10%ウシ胎児血清(FBS)付加専用培地内で 100%コンフルエントまでインキュベータ内にて培養を行う。

実験 16 時間前に 1% FBS 付加専用培地にインキュベートし、静置状態をコントロールとする。

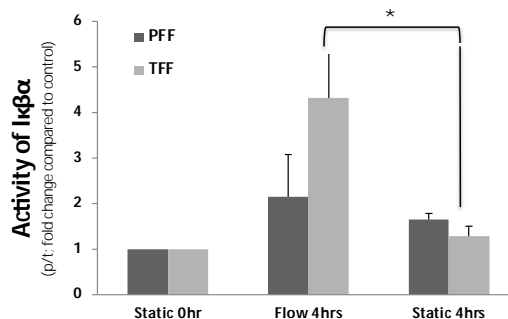
【シユアストレス回路】特製の parallel plate flow chambers システムを用いて、各細胞を定常層流(SF)、そしてより生理的な 一方向性拍動流(PFF)、二方向性拍動流(乱流)(TFF)の3種類のシユアストレス(14dyne/cm², 60cycles/分)に0,2,4時間曝す。

【検体評価】プロテアソーム系の関与を調べるために、プロテアソームインヒビター(MG132)を付加の有無について比較した。シユアストレス24時間負荷の実験終了後、細胞を採取し、内皮細胞のマーカー(VEGFR-2, VEGFR-1, VE-カドヘリン, PECAM-1), 平滑筋細胞マーカーSM -アクチン, 血球系のマーカーCD3, 上皮系細胞のマーカーケラチン等についてウエスタンプロットによる定量解析や mRNA の発現解析でタンパク発現の経時的变化を評価した。また、蛍光染色を行い、画像解析ソフト「J image」を用いて、経時的な血管内皮細胞の長軸方向への進展度、細胞角度および面積変化を形態学的に解析し、細胞応答との関係性を検討した。

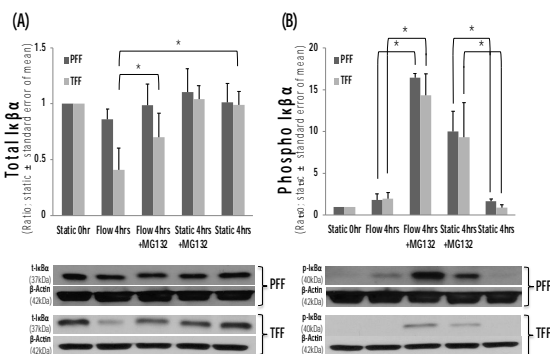
4. 研究成果(抜粋)

TFF は static な状態に比べて有意に IκBα が活性化されていた(上段図)。一方で SF、PFF に関しては有意差を認めなかった。これにより 乱流のみ NF-κB を活性化させることが分かった。さらにリン酸化された IκBα

に関しては SF や PFF の層流だけでなく、TFFの乱流でも変化はなかったが、トータル量としては TFFの乱流は有意に IκBα が減少していた(中段図)。さらに、この乱流による IκBα の減少が、UPS によるものかどうかを調べるために、プロテアソームインヒビターである MG132 を用いて比較したところ、MG132 は乱流下のみ



において引き起こされた total-IκBα の減少を阻害しており、一方で層流では有意差はなかつた。



つまり、UPS が乱流によって惹起された IκBα の分解に関与していることが分かった。

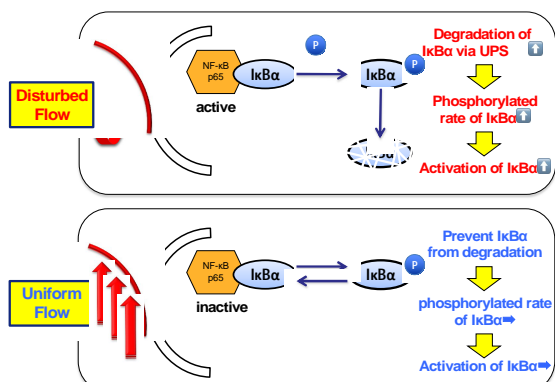
つまり、UPS が TFF によって惹起された IκBα の分解に関与していることが示された。

この研究において、乱流が IκBα の分解を誘発し NF-κB を活性化させること、また、その IκBα の分解は UPS によるものであると判

明した。一方で層流は UPS を逃れて、NF-κB の不活性化に寄与していることが示唆された。つまり、比較的生理的な層流が、UPS によって制御された NF-κB 経路を介して血管内皮細胞の恒常性に関与している可能性がある。

<参考文献>

1. G. Chitragari et al. Regulation of Yes-Associated Protein by Laminar Flow. *Ann Vasc Surg* 2018;52:183-191



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

諸データを最終的にまとめ、報告予定である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	新田 隆 (Nitta Takashi) (40256954)	日本医科大学・大学院医学研究科・研究生 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------