

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18500348
 研究課題名 (和文) 肺動脈内皮細胞伸展刺激によって生じる遺伝子発現変化の網羅的時系列解析
 研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of the time series of gene expressions caused by mechanical stretch of human pulmonary arterial endothelial cells
 研究代表者
 野城 真理 (NOSHIRO MAKOTO)
 北里大学・医療衛生学部・教授
 研究者番号：80014231

研究成果の概要：機械的伸展によって、肺動脈内皮細胞では加えた歪と等しい歪が、肺胞上皮細胞では加えた歪より小さい歪が生じる。繰り返し機械的伸展によって、肺動脈内皮細胞から産生される IL-6 および IL-8 が伸展時間とともに増加する。繰り返し機械的伸展によって生じる遺伝子発現変化は、適応閾値によってより正確に検出できる。繰り返し機械的伸展によって、機械刺激受容体やカルシウム信号伝達などに関連する遺伝子や SELE, PPP1CB などの発現が変化した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	690,000	4,290,000

研究分野：生体医工学、バイオインフォマティクス

科研費の分科・細目：人間医工学 [医用生体工学・生体材料学]

キーワード：人工呼吸関連肺損傷、伸展刺激、肺動脈内皮細胞、網羅的遺伝子発現解析、時系列

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸自体が肺損傷を誘発することが知られるようになり、さらに、人工呼吸によって肺の細胞からサイトカインが産生され、全身の炎症反応を惹起し、多臓器不全（人工呼吸誘発多臓器不全）に至ることがあると考えられている。人工呼吸誘発多臓器不全は臨床的に重要であると同時に、生体機能代行装置と生体との関係において臨床工学上の新たな課題を提起した。すなわち、人工心肺装置や血液浄化装置などの生命維持管理装置

が生体の反応を誘発し、人工呼吸誘発多臓器不全と本質的に同一の現象を生じる可能性がある。したがって、人工呼吸誘発肺損傷のメカニズムを分子生物学のレベルにまでさかのぼって解明することは、臨床工学的に見て重要な意義がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、網羅的遺伝子発現解析システム (Affymetrix 社製 GeneChip) を用いて、サイトカイン産生の主要原因の一つと予想

される肺動脈内皮細胞の伸展が遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにし、機械的刺激から炎症性サイトカインの遺伝子発現に至るメカニズムを示す第一次近似モデルを構築することである。これによって、人工呼吸誘発多臓器不全の基本的メカニズムを分子生物学的レベルで解明する第一歩を踏み出せる。

3. 研究の方法

(1) 細胞の歪

培養細胞伸展装置 (FX-4000T Flexcell Tension Plus System) を用いてシリコン膜を 20% 伸展させ、シリコン膜に接着している正常ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) およびヒト肺腺癌上皮細胞 (A549) の歪を、伸展前後の顕微鏡画像から計測した。

(2) サイトカイン産生

培養細胞伸展装置を用いて、周期 15 回/min、伸展：弛緩比 1：2 の方形波状の繰り返し伸展を HPAEC に加え、伸展開始後 12 時間以内に数回、培養液上清中に含まれる IL-6 や IL-8 などのサイトカインの量を ELISA 法によって計測した。

(3) 網羅的遺伝子発現解析

(2) と同様にして伸展および採取した HPAEC から RNA を抽出して、Affymetrix 社製 GeneChip を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

(4) 遺伝子発現データ解析

① トップダウン解析

機械刺激受容体とされるインテグリンに関連する遺伝子を含むパスウェイを KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, 生命システム情報統合データベース) のパスウェイデータベースから特定し、該当パスウェイ内に存在する遺伝子に対してマイクロアレイ発現データの解析を行った。

また内皮細胞にずり応力が作用したときにカルシウム濃度が変化することから、特に calcium signaling pathway 内の特定の経路に着目し、マイクロアレイ発現データの解析を行った。

② ボトムアップ解析

我々が提案する適応閾値を利用し、マイクロアレイ発現データから生物学的に意味のある発現変化を示した遺伝子を抽出し、遺伝子の機能やその遺伝子が含まれるパスウェイについて検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞の歪

HPAEC では、細胞が疎な状態およびコンフルエントな状態いずれにおいても、シリコン

膜の歪と細胞の歪は一致した。

A549 では、細胞が疎な状態およびコンフルエントな状態いずれにおいても、細胞の歪はシリコン膜の歪みより少なかった。

(2) サイトカイン産生

IL-6 (図 1) および IL-8 (図 2) の産生量は、伸展を加えることによって、伸展を加えない場合よりも増加した。伸展時間とともに変化量は増加した。

IL-6 産生量の時間変化

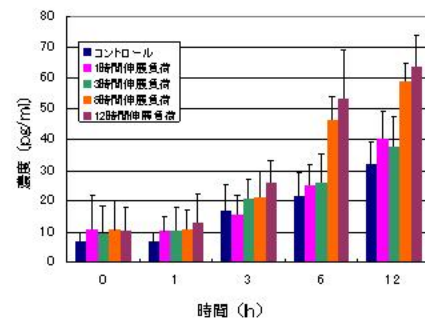


図 1 IL-6 産生量の時間的変化

IL-8 産生量の時間変化

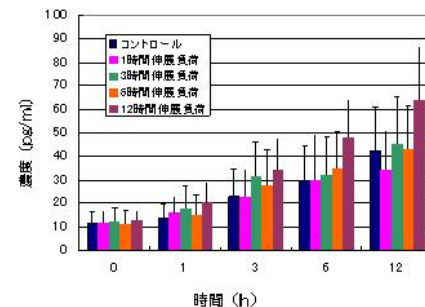


図 2 IL-8 産生量の時間的変化

(3), (4) 網羅的遺伝子発現解析およびそのデータ解析

① トップダウン解析

A. インテグリン関連遺伝子を含む pathway の発現解析

細胞の機械刺激受容体 (メカノセンサー) として働く遺伝子としてインテグリンが知られている。また機械刺激により NF- κ B の発現が増加するという報告がある。そこで、インテグリンのファミリー遺伝子の情報を

NCBI (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health) のデータベースから検索した。その結果 45 個の遺伝子情報を得た。

次にこれらの遺伝子が KEGG データベース中のどのパスウェイ上に存在するかを検討した結果、KEGG データベース内に情報があつた遺伝子は 28 個で、これらの遺伝子は以下に示すパスウェイ中に存在した。

- a) regulation of actin cytoskeleton
- b) focal adhesion
- c) ECM-receptor interaction
- d) cell adhesion molecules (CAMs)
- e) hematopoietic cell lineage
- f) small cell lung cancer
- g) leukocyte transendothelial migration
- h) cell communication

上記のパスウェイの中で、対象組織が肺であり、インテグリンからの経路が比較的単純でかつ、経路の末端に NF- κ B を含むパスウェイとして small cell lung cancer がある。そこでこのパスウェイに着目して発現解析を行った。

インテグリンから NF- κ B までの経路には 42 個の遺伝子が存在し、そのうち 33 個の遺伝子が本研究で使用したマイクロアレイ上に存在している。各遺伝子を KEGG のパスウェイ表示上の区分である、ECM、ITG、FAK、PIK、PKB、IKK、IKBA、NFKB に分類した。このグループ内の遺伝子の平均発現量を計測時刻 (0h, 1h, 6h, 7h, 12h) ごとに算出し、平均発現量の時系列変化を比較した。その結果、パスウェイの起点である ECM グループの発現量変化と NFKB グループの発現量変化が良く一致していることが示された。

次に NF- κ B を含むパスウェイを KEGG データベースにおいて検索した結果、11 個のパスウェイが見つかった。それらの中で経路の比較的末端部分に NF- κ B が存在するものとして

- a) apoptosis
- b) toll-like receptor signaling pathway
- c) adipocytokine signaling pathway

の三つがあつた。これらのパスウェイ内を比較すると、PI3K \rightarrow AKT \rightarrow IKK \rightarrow I κ B α \rightarrow NF- κ B のグループ経路はそれぞれのパスウェイで共通しており、比較的重要な経路であると思われた。

そこで次に PI3K \rightarrow AKT \rightarrow IKK \rightarrow I κ B α \rightarrow NF- κ B の経路で発現量がどのように変化するかを検討した。インテグリンの解析と同様にして上記の経路に含まれる遺伝子情報を NCBI データベースから検索した結果、18 個の遺伝子情報を得た。この遺伝子について上述の small cell lung cancer の場合と同様にして各グループで発現量を平均化し、その時系列変化を調べた。その結果伸展開始後および伸

展率が変化した後の 1h, 7h において発現量が増加する遺伝子が 7 個得られ、PI3K から始まり NF- κ B への経路は、機械伸展刺激と関連して発現量が増加している可能性が示された。

B. calcium signaling pathway の発現解析
内皮細胞にずり応力が作用すると細胞内カルシウム濃度が上昇する反応が起こることから calcium signaling pathway に注目した。calcium signaling pathway の内部で、最終的に他のパスウェイに到達する経路として、ROC \rightarrow PLC \rightarrow IP3R \rightarrow Ca $^{2+}$ \rightarrow CALM \rightarrow IP3 3K の経路を中心に発現解析を行った。解析対象となる遺伝子は 49 個であり、機械伸展開始後および伸展率が変化する 1h, 7h で発現の増減が確認された遺伝子は 23 個であつた。この結果より calcium signaling pathway 中の遺伝子の発現量変化は機械伸展刺激とかなりよく一致していることが確認された。

②ボトムアップ解析

適応閾値を越える遺伝子の抽出とその解析

A. 適応閾値

実験環境の違いや、外部刺激などにより発現量に意味のある変化を示した遺伝子を検出するために、固定された閾値(例えば、2 倍以上もしくは 2 分の 1 以下の発現量変化)を利用する方法が広く利用されている。しかし、発現量は遺伝子によって大きく異なり、高い発現量を示す遺伝子に適した閾値が、低い発現量を示す遺伝子に対しても適切な閾値であるかどうかは必ずしも確かではない。我々は幅広い範囲の発現量において、生物学的に意味のある発現量変化を示した遺伝子を精度良く検出するために、発現量に応じた適応閾値を用いた解析方法を提案している。本研究では機械伸展刺激時に意味のある発現変化を示した遺伝子を検出するために適応閾値を利用した。

B. 適応閾値の計算方法

適応閾値を計算するためには、同一条件下で計測された 2 枚のマイクロアレイ発現データが必要となる。まずマイクロアレイ上のそれぞれの遺伝子において、1 枚目の発現量に対する 2 枚目の発現量の比を計算する。次いでこの発現比を 1 枚目の発現量に対してプロットする(図 3)。ただし、1 枚目の発現量はその常用対数値を計算し、さらにそれらの中央値を用いて正規化したものを用いる。

図に示されるように、各遺伝子の発現量に対応して、発現量の比は大きく変化している。発現量が相対的に低い領域では、発現量の比は比較的高い範囲に分布し、発現量が相対的に高い領域では、発現量の比は比較的低い範

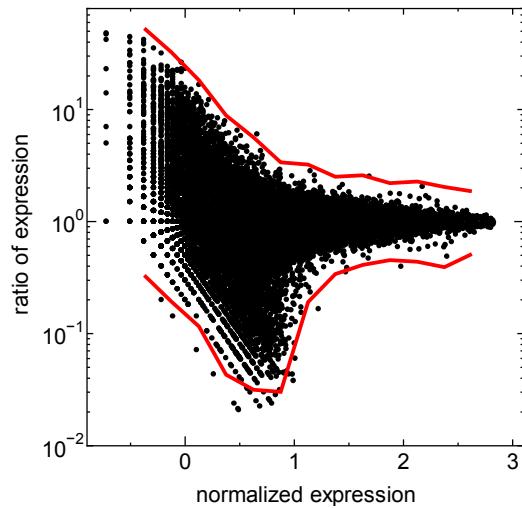
囲に分布している。そこで発現量の比が存在し得る範囲を決定するために、まず発現データをいくつかの区分に分割する。分割された区分において、複数のサブセットデータを作成し、そのサブセットデータにおける発現比の最大値および最小値を求める。得られた最大値および最小値の平均値の信頼区間を算出し、この信頼区間を利用して、その区分における上限閾値および下限閾値を算出し、これを適応閾値とする。

C. 計算手順

以下に適応閾値算出の具体的な計算手順を示す。計算された適応閾値は、異なった計測条件から得られた発現量を比較するために使用される。もし発現量の比が下限閾値より小さい場合は、発現量に意味のある減少が生じたと考える。同様に発現比が上限閾値より大きい場合も発現量に意味のある増加が生じたと考える。

- 1) 同一条件下で計測された2枚のマイクロアレイデータの1枚目と2枚目の発現量の比を各遺伝子について計算する。
- 2) 1枚目のマイクロアレイデータの発現量の常用対数値を計算し、それらの中央値を用いて発現量を正規化する。
- 3) 正規化された発現量を n 分割する ($n=20$)。
- 4) i 番目の区間内に存在する遺伝子数 $N(i)$ を求める。 $N(i)$ が 100 以下の場合、この区間を計算対象から除外する。
- 5) 区間 i において、 $N(i)$ の半分の数 of 遺伝子をランダムに選択する。
- 6) 区間 i における発現比の最大値および最小値を求める。
- 7) 手順 5), および 6) を $N(i)/2$ 回繰り返す。
- 8) 手順 7) で得られた区間 i における発現比の最大値の平均値の 99.99% 信頼区間を算出し、信頼区間の上限値を 1.5 倍としたものを、区間 i における上限閾値とする。
- 9) 手順 8) と同様にして、区間 i における発現比の最小値の平均値の 99.99% 信頼区間を算出し、信頼区間の下限値を 1.5 分の 1 としたものを、区間 i における下限閾値とする。
- 10) 手順 4) から 9) をすべての区間について繰り返す。

機械伸展刺激を加えていない状態 (0h) で、2枚のマイクロアレイを用いて発現量を計測し、上記の計算手順を経て適応閾値を算出した結果を以下に示す。図中の赤実線が算出された適応閾値である。



適応閾値の計算例

D. 適応閾値を用いた発現解析

発現データは

- 1) 伸展刺激開始直前 (0h)
- 2) 伸展率 20% 1 時間後 (1h)
- 3) 伸展率 20% 6 時間後 (6h)
- 4) 伸展率 30% 1 時間後 (7h)
- 5) 伸展率 30% 6 時間後 (12h)

の 5 種類であり、前後するデータで発現量の比を算出し (0h/1h, 1h/6h, 6h/7h, 7h/12h), この比の値が適応閾値を越える変化を示した遺伝子を検出した。表の UP は適応閾値の上限値を越えた遺伝子, DOWN は適応閾値の下限を越えた遺伝子を示す。

1) 0h/1h

UP	ADM, STK3, KCNC4, HIVEP3
DOWN	PLN, PROM1, EPHA3, ZMYM5, ZNF137, PLSCR2, DRD3, HIST1H4G

2) 1h/6h

UP	CALR, TFPI2, HNRPH1, ZFP36L1, CD55, NCKAP1, SPAG9, CCL2, STC2, LYPD1, CDH2, VCAM1, HSPA2, KHDRBS3, APAF1, BCL10, HDAC9, PMCH, DKK2, SELE, IKZF5, PAX1, MEFV
DOWN	LUM, ID1, KLF2, ID2, MYBL2, JUNB, NFKBIA, BHLHB2, FAF1, GADD45B, KLF4, ATF3, APOC1, HES1, TSPAN5, KLF7, HEY1, SMAD7, ZBTB16, SYCP2, SLC4A10, PCDHGB6, TCEB3B

3) 6h/7h

UP	EID1, APOC1, ABCC3, SNPH, EPN1, ABCB9, IL3RA, NEUROD4
DOWN	NCKAP1, PCNP, PPP1CB, BRWD2, TANK, C9orf127, CXCL2, RAP1GAP, PTPRZ1, REG1B, KIF23, DACT1, PITX2, MAGEA4, SELE, KERA, FGF6, C5orf4

4) 7h/12h

UP	KPNB1, PDIA4, SUB1, AGT, RAD23B, XPO1, ENC1, PCNP, PPP1CB, FOS, CPSF6, BRWD2, ZNF638, TMED2, NKX2-1, GCNT3, CHAT, PROP1, C5orf4
DOWN	EID1, APOC1, VCAM1, DGCR8, CPNE7, NXF2, A4GNT, PPEF2

これらの遺伝子で複数の時間で増減を示した遺伝子は以下の9つである。

- 1) NCKAP1 (UP→DOWN)
- 2) VCAM1 (UP→DOWN)
- 3) SELE (UP→DOWN)
- 4) APOC1 (DOWN→UP→DOWN)
- 5) EID1 (UP→DOWN)
- 6) PCNP (DOWN→UP)
- 7) PPP1CB (DOWN→UP)
- 8) BRWD2 (DOWN→UP)
- 9) C5orf4 (DOWN→UP)

KEGG データベース中にこれらの遺伝子が存在するパスウェイが存在するかどうかを調べた結果、

- 1) cell adhesion molecules (VCAM1, SELE を含む)
- 2) regulation of action cytoskeleton (PPP1CB を含む)
- 3) focal adhesion (PPP1CB を含む)
- 4) long-term potentiation (PPP1CB を含む)
- 5) insulin signaling pathway (PPP1CB を含む)

の5つのパスウェイが KEGG データベース中に存在した。

パスウェイ情報が存在した遺伝子のうち、VCAM1 は shear stress 反応遺伝子として以前から報告されている遺伝子である。

SELE (selectin E) は今回の適応閾値解析によって検出された遺伝子である。selectin とは白血球と血管内皮細胞の接着に関与する細胞表面の分子であり、selectin E はサイトカイン刺激による転写活性化の結果血管内皮細胞上に発現する。selectin の細胞接着活性はカルシウム依存性のレクチン活性による糖鎖リガンドの認識に基づいている。

PPP1CB はタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 の触媒サブユニットのひとつで、細胞分割、グリコーゲン代謝、筋肉伸縮性、タンパク質合

成などの細胞プロセス制御に関わることが知られている。また PPP1CB は上述のように4つのパスウェイに関連している。特に細胞骨格や、細胞接着に関連するパスウェイに含まれていることから機械伸展刺激による細胞骨格のリモデリングやインテグリンのような機械刺激受容体とも関連があると考えられる。

(5) まとめ

本研究では、トップダウンアプローチ、ボトムアップアプローチの両方から発現解析を行った。

トップダウンアプローチでは KEGG データベースのパスウェイ情報を利用した結果、肺動脈内皮細胞においても、機械刺激受容体やカルシウム信号伝達などに関連する遺伝子の発現量変化と機械伸展刺激の間に関連があることが示された。

またボトムアップアプローチにおいては、我々が提案する適応閾値により生物学的に意味のある発現変化をした遺伝子を効率良く絞り込むことに成功した。また得られた遺伝子を KEGG データベースを利用して解析した結果、従来から報告されている VCAM1 遺伝子以外に新たに SELE, PPP1CB などが検出された。これらの遺伝子機能は内皮細胞の接着やサイトカイン刺激との関連があるとされ、機械伸展刺激により発現が変化する可能性が高いものであることが示された。

以上から我々が提案する適応閾値による発現解析方法は効果的であることが示され。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1) H. Inaoka, Y. Fukuoka, A. Ueno, I.S. Kohane: A new implementation of the reverse engineering algorithm to elucidate gene functional dependencies, IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems (査読有), 127, 1712-1718, 2007.

2) H Inaoka, Y Fukuoka, I S Kohane, Evidence of spatially-bound gene regulation in Mus Musculus : Decreased gene expression proximal to microRNA genomic location, Proc Natl Acad Sci USA (査読有), 104, 12, 5020-5025, 2007.

3) Nakano M, Denda N, Matsumoto M, Kawamura M, Kawakubo Y, Hatanaka K, Hiramoto Y, Sato Y, Noshiro M and Harada Y: Interaction between cyclooxygenase (COX)-1- and COX-2-products modulates COX-2 expression

in the late phase of acute inflammation. Eur. J. Pharmacol. (査読有), 559: 210-218, 2007.

4) Kokubo K, Igawa S, Fukuda A, Shinbo T, Hirose M, Masuda N, Kobayashi H : The roll of nitric oxide in reducing deformability of Lewis lung tumor cell stimulated by inflammatory cytokines, Nitric Oxide (査読有), 19, 312-319, 2008.

5) K Kokubo, S Soeda, T Shinbo, M Hirose, N Fuku, Y Nishigaki, M Tanaka, H Kobayashi, Macrophages that survive hyperoxia exposure have higher superoxide dismutase activities in their mitochondria, Adv Exp Med Biol (査読有) (in press).

[学会発表] (計9件)

1) H Inaoka, Y Fukuoka, Adaptive threshold for detecting significant fold changes in microarray data, The 17th International Conference on Genome Informatics (Yokohama, Japan), Dec, 2006.

2) 福岡豊, 稲岡秀検, 野城真理, 遺伝子発現に基づく細胞機能評価の試み, 第21回生体・生理工学シンポジウム (鹿児島), 11月, 2006.

3) 稲岡秀検, 福岡豊, 野城真理 : 適応閾値を用いた発現解析, システム・情報部門学術講演会 2007 講演論文集, 41-42, 2007 (東京).

4) 小林こず恵, 岸亜由美, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 小林弘祐, 野城真理 : 機械伸展による細胞の伸展率, システム情報部門学術講演会 2007 講演論文集, 177-178, 2007 (東京).

5) K. Kobayashi, A. Kisi, M. Tanaka, H. Inaoka, S. Nebuya, Y. Fukuoka, H. Kobayashi, M. Noshiro: Strain on the normal human pulmonary artery endothelial cells stretched mechanically, Proc. Internat. Symp. Biol. Physiol. Enging., 311-312, 2008 (Harbin, China).

6) 小林こず恵, 岸亜由美, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 福岡豊, 小林弘祐, 野城真理 : シリコン膜の機械的伸展による細胞の伸展率, 第47回日本生体医工学会大会, 2008, 神戸.

7) 稲岡秀検, 福岡豊, 野城真理 : 適応閾値による遺伝子発現解析, 第23回生体・生理工学シンポジウム論文集, 157-159, 2008 (名古屋).

8) 小林こず恵, 岸亜由美, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 小林弘祐, 野城真理 : 肺動脈内皮細胞の機械的伸展による形状変化の測定, 第23回生体・生理工学シンポジウム論文集, 345-346, 2008 (名古屋).

9) Y Fukuoka, H Inaoka, M Noshiro: Adaptive threshold to detect biologically

meaningful changes in microarray data, Proc. 30th Ann Int IEEE EMBS Conf, pp. 5708-5711, 2008 (Vancouver, Canada).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野城 真理 (NOSHIRO MAKOTO)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 80014231

(2) 研究分担者

小林 弘祐 (KOBAYASHI HIROSUKE)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 70153632
原田 芳照 (HARADA YOSHITERU)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 20050677
福岡 豊 (FUKUOKA YUTAKA)
東京医科歯科大学大学院・
疾患生命科学研究部・准教授
研究者番号: 30242217
(2006, 2007年度)

(3) 連携研究者

福岡 豊 (FUKUOKA YUTAKA)
東京医科歯科大学大学院・
疾患生命科学研究部・准教授
研究者番号: 30242217
(2008年度)