

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08729

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡を用いた血管の「硬さ」測定による動脈硬化病変の評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of evaluation method for arteriosclerotic lesions by measuring the "hardness" of blood vessels using an atomic force microscope

研究代表者

松尾 映里 (matsuo, eri)

三重大学・医学部附属病院・技術補佐員

研究者番号：40751665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化症のプラークは、病状の進行により脂肪性・線維化・石灰化等、組織が変化する。本研究では、動脈硬化症のプラークにおいて血管内皮細胞が、細胞外基質の硬さに対する感度をどのように調節し、細胞機能を制御しているのかを解明する。血管内皮細胞を硬さの異なる細胞外基質で培養し、基質の硬さにより細胞機能をどのように制御するか検討した。軟らかい基質は、YAPが不活性化され、Dll4を誘導し、Notchシグナルを活性化し、血管新生関連受容体、凝固因子であるトロンボモジュリン、TFを誘導し、抗炎症サイトカインIL-6の発現を抑制することが示され、血管の硬さが血管内皮細胞の機能を調節する一因となることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、動脈硬化病変における基質の硬さに対する血管内皮細胞機能の制御機構の解明である。動脈硬化症のプラークは、病状の進行により脂肪性から、線維化、石灰化まで組織が変化する硬化していく。本研究では、血管の硬さが血管内皮細胞の機能を調節する一因となることを示した。プラークにおいて、内皮細胞が力学的変化を感知する分子機構の解明することにより、プラーク組織の力学的性質を評価し、抗血栓性および抗炎症性などの内皮細胞機能を制御することができれば、心臓血管領域の発展に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Arteriosclerosis plaques have tissue changes such as fatty, fibrotic, and calcified as the disease progresses. In this study, we elucidate how vascular endothelial cells regulate the sensitivity of extracellular matrix to hardness and regulate cell function in arteriosclerotic plaques. We cultured vascular endothelial cells on extracellular matrix with different hardness, and examined how the hardness of the substrate controls cell function. Soft substrates inactivate YAP, induce Dll4, activate Notch signals, induce angiogenesis-related receptors, the coagulation factors thrombomodulin, TF, and suppress the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-6. It was shown that the hardness of blood vessels contributes to the regulation of the function of vascular endothelial cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：動脈硬化 血管内皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、動脈硬化の発生・進展に伴うプラークの力学的性質(硬さ)の変化は、力学的環境が疾病に及ぼす影響を解明する上で興味を持たれており、動脈硬化病変の局所弾性特性を評価できる方法が研究・開発されている。動脈硬化症のプラークは、病状により脂肪性から、線維化、石灰化まで組織が変化し硬化していくことが知られている。プラークの弾性率は初期の脂質プラークの状態では正常血管より低い、表面に線維化が生じ始めると正常血管組織等同等の硬さに変化し、石灰化が生じると硬くなる(図 2)。酸化ストレスやサイトカインなどの chemical mediator についての研究が進む一方、組織弾性の変化などの力学的シグナルと病態との関係についてはほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、動脈硬化における内皮細胞の機能に及ぼす微小環境の力学的性質(硬さ)の影響を分子生物学的に検討する。内皮細胞刺激因子として VEGF は、内皮細胞の増殖、遊走、透過性、管腔形成など細胞機能を制御することが報告されている。血管内皮細胞を硬さの異なる細胞外基質において培養し、基質の硬さにより細胞機能を制御に影響を与えるか検討する。

3. 研究の方法

細胞培養

HUVEC を硬さが 1, 2, 4, 8, 25kPa のコラーゲンコートしたポリアクリルアミド(PA)ゲルシャーレに播種し、EGM2 培地で、5 時間培養し、FBS、VEGF、bFGF を添加していない EGM2 培地に交換してから、24 時間培養した。さらに、2%FBS を含んだ VEGF、bFGF を添加していない EGM2 培地に交換してから、VEGF を 50ng/mL となるように添加して、24 時間培養した。

ウェスタンブロット分析

PA ゲルで培養した HUVEC から、RIPA バッファーでたんぱく抽出し、還元して、電気泳動して後、ニトロセルロース膜に転写した。5%スキムミルクでブロッキングして、抗ヒト dII4 抗体、抗ヒト notch1 抗体、抗ヒト gapdh 抗体で処理した。HA 二次抗体で処理したのち、ECL で発光させ、検出した。

定量的 PCR

PA ゲルで培養した HUVEC から、tRNA を精製し、逆転写した。RT-qPCR は、THUNDERBIRD Probe qPCR kit (Toyobo)によって StepOnePlus real-time PCR system で行った。発現量の算定には、GAPDH を基準として、Ct 法を用いました。プライマーとプローブには TaqMan 発現アッセイを用いました。ID は、下記に示しました。gapdh Hs99999905_m1, dII4 Hs00184092_m1, notch1 Hs01062014_m1, hey1 Hs01114113_m1, hes1 Hs00172878_m1, vegfr1 Hs01052961_m1, vegfr2 Hs00911700_m1, vegfr3 Hs01047677_m1.

形態観察および縦横比の測定

PA ゲルで培養した HUVEC は、10%ホルマリン緩衝液で室温 15 分間処理した後、PBS で 3 回洗浄した後、オールインワン顕微鏡で撮影した。細胞の縦横比の測定には ImageJ を用いた。

SiRNA 分析

SiRNA 分析には、HUVEC を 6×10^4 cells/dish となるように播種し、EGM2 培地で、24 時間培養し、コンフルエントが 30-50%になるようにした。FBS、VEGF、bFGF を添加していない EGM2 培地に交換してから、LipofectamineRNAiMAX(Invitrogen)と DLL4 の siRNA (Silencer Select, Thermo, assay ID: s534448, 最終濃度 20nM)の混合液を添加し、5時間培養した。次に、2%FBS を含んだ VEGF、bFGF を添加していない EGM2 培地に交換してから、VEGF を 50ng/mL となるように添加して、18 時間培養した。

免疫染色

HUVEC を PA ゲル上で培養し、ホルムアルデヒドで固定したのち、抗 YAP-XP 抗体を反応させたのち、蛍光抗 IgG 抗体で反応させて、ヘキストで核染色させ、YAP の検出を行った。

4. 研究の成果

1) 基質が柔らかいほど、細胞が縦長に伸長し、管腔形成が誘導されると考えられた(図 1)。

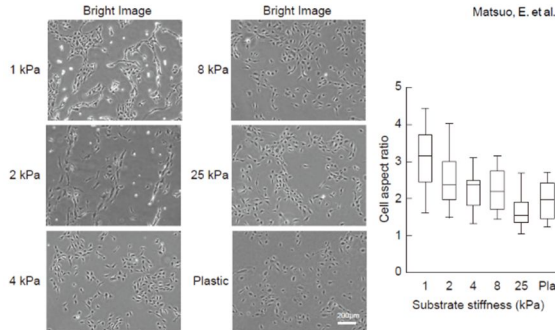


図 1 基質の硬さと管腔形成

2) 柔らかい基質の細胞では、DII4 発現が誘導され、VEGF 刺激により、さらに高くなり(図 2a)、Notch1 は、基質による発現量の変化はあまり無かったが、NICD の発現量も高くなった(図 2b, c)。柔らかい基質の細胞では、細胞の縦長比が大きくなり、DII4 発現が誘導され、VEGF 刺激により、さらに高くなり、Notchシグナルとして伝達され、下流の遺伝子 HEY1 の転写が活性化されることが確認できた(図 2d)。

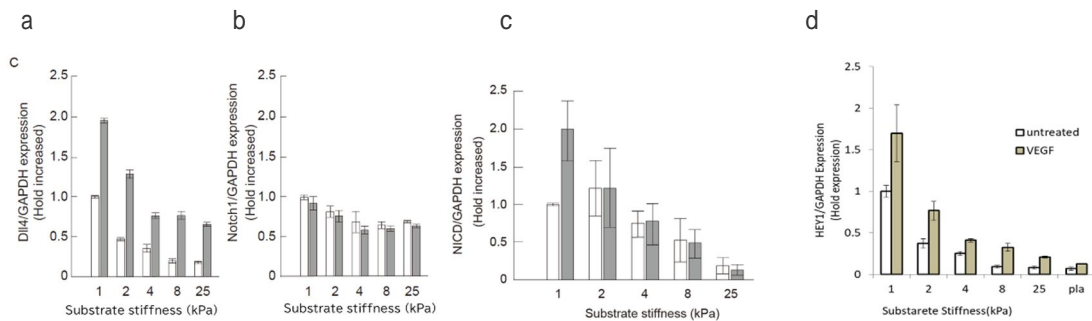


図 2 基質の硬さによる DII4(a)、Notch1(b)の RNA 発現、DII4-Notch1 シグナル(c)および下流遺伝子(d)に対する影響

3) 基質が硬くなるほど、YAP の核移行は誘導され(図 3)、HUVEC において基質が硬くなるほど、YAP の転写活性遺伝子 CTGF および CYR61 の発現が亢進する(図 4)。HUVEC は、柔らかい基質では、YAP/TAZ は活性化されず、細胞質に局在し、硬い基質では、YAP は活性化され、核に移行し、標的遺伝子ある CTGF, CYR61 の発現が誘導されることが、確認できた。DII4 の硬さに依存した発現には、YAP の活性が重要な役割をしている(図 5)。

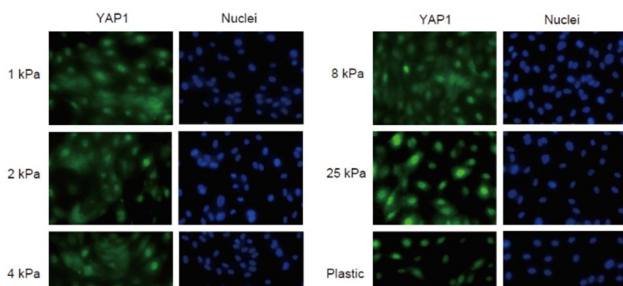


図 3 基質の硬さによる YAP の核移行に与える影響

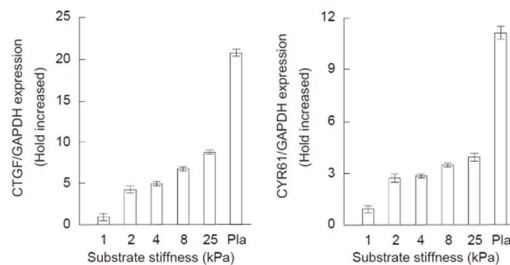


図 4 基質の硬さによる YAP の活性化に対する影響

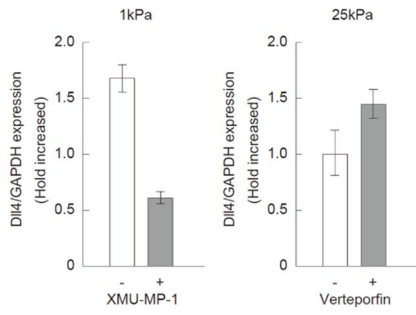


図5 DII4の硬さ依存発現におけるYAPの役割

4) VEGFR は、基質が軟らかいほど、発現量が亢進し、VEGFR1, 3 は、VEGF により発現が亢進している(図 6)。VEGFR は、VEGF の添加無添加に関わらず、DII4 の発現が抑えられることで、発現量が減少している(図 7)。トロンボモジュリン、Tissue factor は、VEGF 添加により、柔らかい基質ほど、発現量が亢進し、DII4 の発現抑制により発現量が抑制された。IL-6 は、基質の硬さ依存的に発現量が増加し、DII4 の発現抑制により発現量が増加している(図 8)。d 以上の結果から、軟らかい基質、VEGF は VEGFR の発現が誘導、トロンボモジュリン、Tissue factor の発現を誘導し、VEGFR の IL-6 の発現を抑制することが、示された。

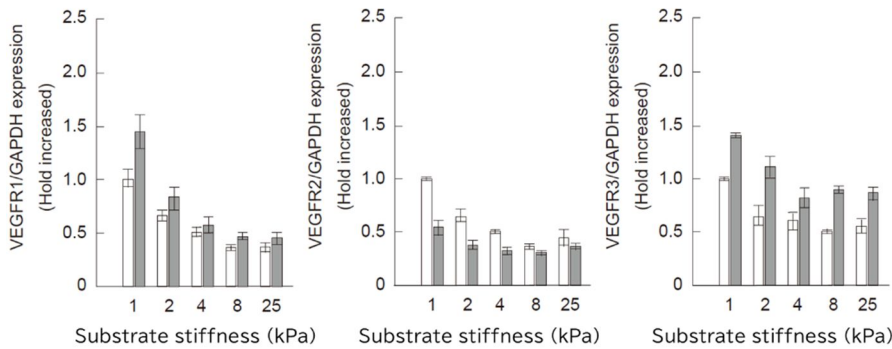


図6 基質の硬さによる VEGFR の発現に対する影響

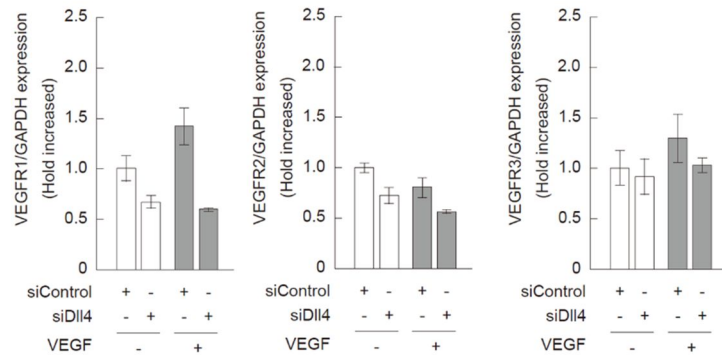


図7 DII4 発現抑制による VEGFRs 発現に対する影響

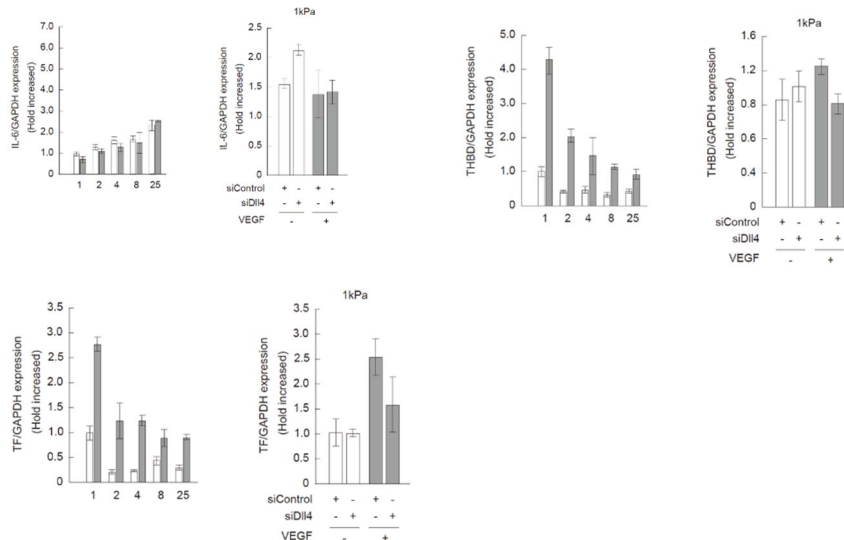


図8 IL-6, THBD 及び TF の発現に対する基質の硬さおよび DII4 発現抑制による影

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島本 亮、松尾 映理、金田 真吏、伊藤 温志、高尾 仁二
2. 発表標題 肺虚血再灌流障害における内皮細胞機能に及ぼす微小環境の力学的性質の影響に関する研究
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行、松尾 映里、伊藤 温志、川本 英嗣、臼田 春樹、田中 徹也、島岡 要、和田 孝一郎、高尾 仁二、島本 亮
2. 発表標題 細胞外環境の硬さによる血管内皮細胞の機能変化の解析
3. 学会等名 第42回（2020年度）血栓止血学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 貴行、松尾映里、伊藤温志、川本英嗣、臼田春樹、和田孝一郎、島岡要、高尾仁二、島 本亮
2. 発表標題 細胞接着基質の硬さがVEGF誘導性の血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第43回（2021年度）血栓止血学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	島本 亮 (shimamoto ryo) (90324524)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岡本 貴行 (okamoto takayuki) (30378286)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	

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