

平成 21 年 4 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 - 2008
 課題番号：19590816
 研究課題名 (和文) 心筋梗塞発症関連遺伝子リンホトキシン による細胞接着制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of cell adhesion mediated by myocardial infarction related gene lymphotoxin alpha
 研究代表者 坂田 泰彦 (SAKATA YASUHIKO)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号 90379206

研究成果の概要:心筋梗塞発症関連遺伝子リンホトキシン (LTA)による細胞接着の機序を検討した。LTA は接着因子の発現を増強することにより、動脈硬化の初期段階である単球・血管内皮細胞の接着に寄与していた。LTA による接着因子の発現と細胞接着の増強は、TNF I 型受容体、PI3K-Akt / NFkB 経路 の活性化を介していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：リンホトキシン・細胞接着・血管内皮細胞・単球細胞・動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は悪性新生物と並び本邦における最も主要な死因の一つである。その背景に存在する動脈硬化症ならびに冠動脈疾患は多様な因子を基盤として発症する一連の疾患群であり、疫学研究により糖尿病・高血圧・高脂血症・喫煙などが古典的冠危険因子として確立されている。近年、遺伝子解析の進歩に伴い心筋梗塞においても遺伝的リスクの同定が試みられている。我々は大阪大学を中心とした多施設共同研究である大阪冠症候群研究会 (OACIS: Osaka Acute Coronary Insufficiency Study) の遺伝子バンクを用いて症例対照研究を行い、冠動脈疾患関連遺伝子を探索した。その結果、Tumor Necrosis

Factor (TNF) スーパーファミリーの一員であるリンホトキシン (LTA)が心筋梗塞発症関連遺伝子であることを見出した(Ozaki et al., Nat Genet 2004)。また、前述の OACIS のデータベースを用いて急性心筋梗塞症例の予後解析を行い、LTA 遺伝子 252GG 多型が古典的冠危険因子や梗塞の重症度とは独立した心筋梗塞後の予後予測因子であることを報告した(Mizuno et al., Atherosclerosis 2006)。臨床例におけるこれらの検討より、動脈硬化性疾患の代表ともいえる心筋梗塞の病態に LTA が深く関与していることが明らかとなった。しかしながらこれまで、LTA の動脈硬化における役割はほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

今回、我々は動脈硬化における LTA の役割を解明するため、LTA による細胞接着の制御機構の解明を目的として研究を立案した。LTA と同じ TNF スーパーファミリーの一員である TNF は自己免疫疾患・敗血症などの全身性炎症性疾患と関連するとされ、単球遊走、リンパ球活性化を誘導し、血管壁における一連の局所炎症反応とでも言うべき動脈硬化においても主要な役割を果たす。すなわち TNF は炎症の初期段階において E-セレクトリン、VCAM など内皮細胞表面の接着因子や MCP-1 などを誘導するが、この作用は TNF 受容体である TNFR への TNF の結合後の PI3K-Akt 経路、IKK 経路、あるいは small G 蛋白である Rho キナーゼ経路を介した NF- κ B 活性化を介して発揮される。LTA は TNF と同様の構造を有し、受容体(TNFR)も共通であることから、LTA のシグナル伝達系には TNF とある程度共通の部分があることは想像に難くない。そのためまずは NF- κ B 経路を中心に LTA 下流のシグナル伝達を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LTAが細胞接着因子発言に及ぼす影響の検討

まずヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC)、ヒト冠動脈血管平滑筋細胞(HCASC)、ヒトTHP1単球細胞をLTAの存在下(100ng/ml: ED50=0.02~0.05ng/ml)、非存在下に37℃で2時間培養を行った後にRNAを抽出し、Affymetrix社製Focus array Gene Chip(約8000項目)を用いてLTAシグナルの下流に位置する遺伝子のスクリーニングを行なった。また定量的PCR法、ウエスタンブロット法によりHUVEC、HCAECにおける細胞接着因子の発現を検討した。

(2) LTAが単球細胞と血管内皮細胞の接着に及ぼす影響の検討

また実際の細胞接着に及ぼすLTAの影響を検討するため、LTA存在下に2時間培養した血管内皮細胞(HUVEC)にTHP1単球細胞を加えて検討した。具体的にはHUVECにLTA刺激を与え、カルセインに

て標識した単球THP1細胞を30分間共培養し、未接着の単球を洗浄除去した後に、HUVECに接着したTHP1細胞の量を定量した。

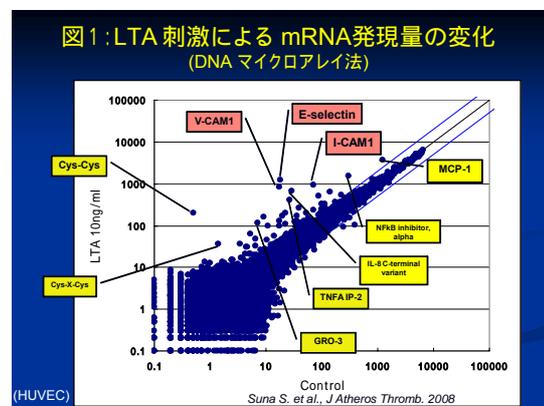
(3) LTAによる細胞接着増強作用の機序の検討

まず、small interfering RNA、siRNA を用いて、TNF受容体 または をノックダウンして、LTA刺激による細胞接着因子の誘導、および細胞接着に及ぼす影響を検討した。次にNF κ Bの関与につきELISA法により検討した。またNF κ Bの上流の因子を検討するために、MAPキナーゼ経路を中心に検討した。

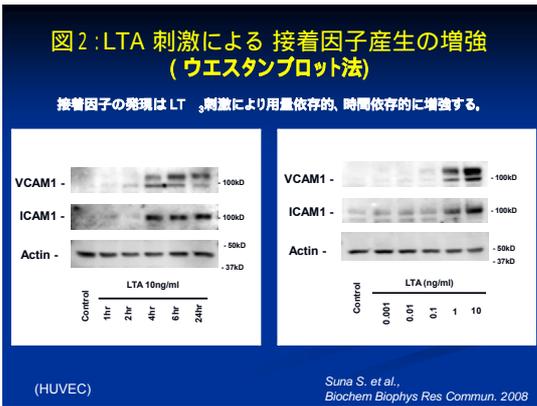
4. 研究成果

(1) LTAが細胞接着因子発言に及ぼす影響の検討

DNA マイクロアレイ法の結果、HUVEC、HCAEC において E-セレクトリン、VCAM、ICAM などの細胞接着に関わる遺伝子群の発現が強く特異的に誘導されることが明らかとなった(図1)。



また定量的 PCR 法、ウエスタンブロット法により HUVEC、HCAEC において、LTA は濃度依存的に E-セレクトリン、VCAM など接着因子の発現を誘導した。(図2)。



以上より LTA は血管内皮において細胞接着因子の発現を増強することが明らかとなった。

(2) LTAが単球細胞と血管内皮細胞の接着に及ぼす影響の検討

LTA 存在下に培養した血管内皮細胞に THP1 単球細胞を加えて検討した結果、THP1 単球細胞細胞の HUVEC および HCAEC への接着は LTA の濃度依存的に増加した(図3)。すなわち LTA は血管内皮細胞における接着因子の発現を誘導し、またそれにより動脈硬化の初期段階である単球と血管内皮細胞の接着を増強することにより動脈硬化の初期段階を制御しているものと考えられる。

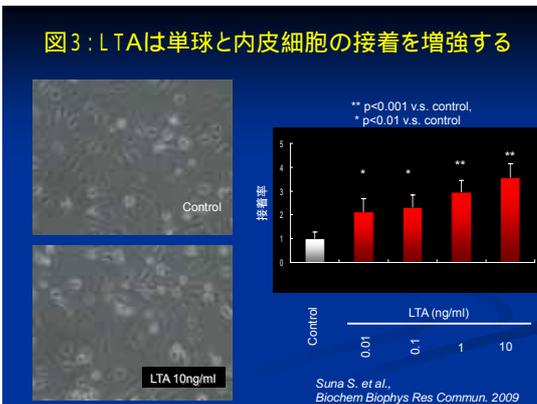
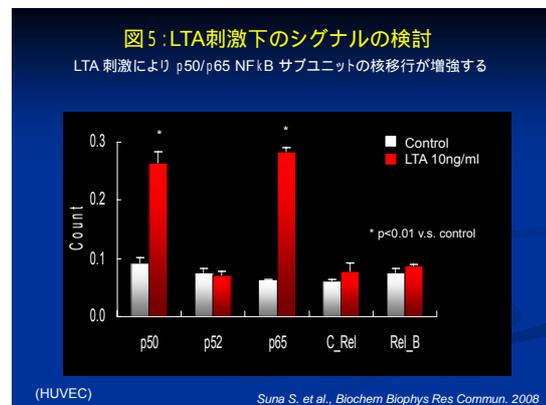
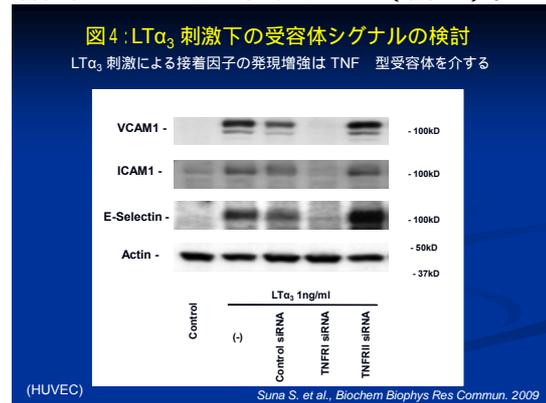


図3:左、紡錘形の細胞が HUVEC、球形の細胞が THP1 細胞。LTA 刺激により HUVEC に接着した THP1 細胞数が増加している。右、接着細胞数は用量依存的に増加した。

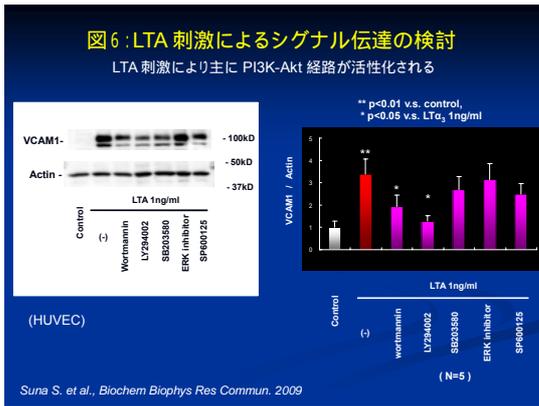
(3) LTAによる細胞接着増強作用の機序の検討

HUVECにおいてLTA刺激による VCAM1等

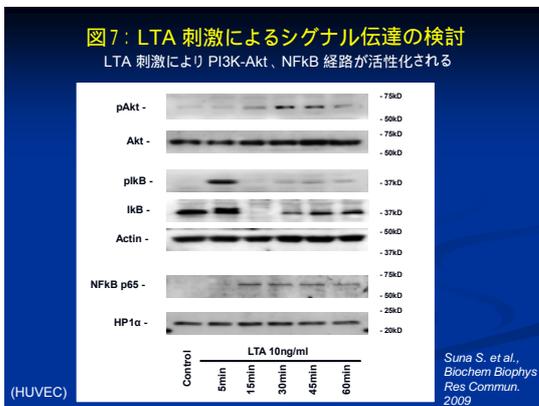
の接着因子の発現をウエスタンブロット法により検討したところ、control siRNA, TNF受容体II siRNAではVCAM1の発現は抑制されない一方、siRNA を用いたTNF受容体1のノックダウンによりその発現増加は抑制された(図4)。また、細胞接着も、TNF受容体1をノックダウンすることにより減弱した。またLTAにより活性化されるNF κ B のサブユニットをELISA法により検討したところ、p50 と p65サブユニットが著明に活性化された。すなわちLTAは NF κ B古典的経路を活性化することが示唆された(図5)。



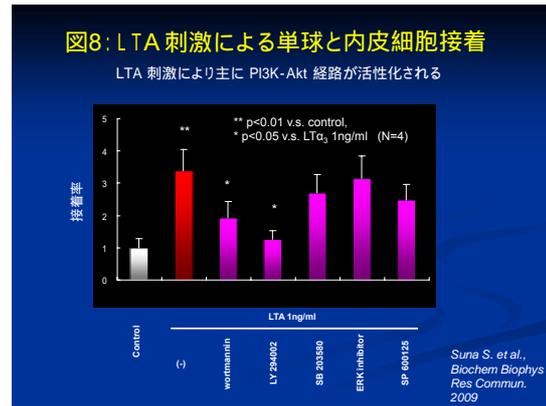
次にNF κ Bの上流の因子をMAPキナーゼ等の種々の阻害薬を用いて検討した。PI3kinaseの阻害薬であるWortmannin, LY294002 によりLTA刺激による接着因子 VCAM1の発現増加は有意に抑制されたが、その他のp38 MAPK, ERK, JNKの阻害薬では有意な抑制を認めなかった(図6)。



またさらに、接着因子発現を抑制した PI3kinase 阻害薬による NFκB 活性化に与える影響を検討したところ LTA 刺激による NFκB p65 サブユニットの活性化・核内移行が Wortmannin, LY294002 により抑制された。すなわち、LTA 刺激による細胞接着因子の誘導には主として PI3K-Akt 経路を介した NFκB 活性化の関与することが示唆された。また、LTA 刺激により、Akt のリン酸化、IκB のリン酸化と degradation、および NFκB の活性化が順を追って生じることから、LTA による NFκB 古典的経路の活性化に PI3K 経路が関与することが示された (図 7)。



さらに、細胞接着に関して、種々の阻害薬を用いて接着への影響を検討したところ、やはり、細胞接着は PI3K 阻害薬である Wortmannin, LY294002 で最も有意に抑制され、他の阻害薬では有意な抑制を認めなかった (図 8)。



(4) 結果の総括

LTA による細胞接着の機序を検討した。LTA は接着因子の発現を増強することにより、動脈硬化の初期段階である単球・血管内皮細胞の接着に寄与することが示唆された。LTA による接着因子の発現と細胞接着の増強は、TNF I 型受容体、PI3K-Akt / NFκB 経路の活性化を介していた。すなわちかかる機序により LTA は動脈硬化の初期段階である単球と血管内皮の接着に関与すると考えられた。

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) SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. Ozaki K, Sato H, Inoue K, Tsunoda T, Sakata Y, Mizuno H, Lin TH, Miyamoto Y, Aoki A, Onouchi Y, Sheu SH, Ikegawa S, Odashiro K, Nobuyoshi M, Juo SH, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. *Nat Genet.* 2009;41(3):329-33. Epub 2009 Feb 8. 査読有

2) Triglyceride deposit cardiomyovascular pathology. Hirano K, Ikeda Y, Zaima N, Sakata Y, Matsumiya G. *N Engl J Med.* 2008 Nov 27;359(22):2396-8. 査読有

3) Impact of Diabetes Mellitus on Rehospitalization for Heart Failure Among Survivors of Acute Myocardial Infarction

in the Percutaneous Coronary Intervention Era. Nakatani D, Sakata Y, Mizuno H, Shimizu M, Suna S, Usami M, Ito H, Yasumura Y, Hirayama A, Takeda H, Hori M, Sato H; the Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group. Circ J. 2009 Mar 25;73(4):662-666. Epub 2009 Feb 19. 査読有

4) Lymphotoxin-alpha3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR1/NF-kappaB signaling. Suna S, Sakata Y, Shimizu M, Nakatani D, Usami M, Matsumoto S, Mizuno H, Ozaki K, Takashima S, Takeda H, Tanaka T, Hori M, Sato H. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Feb 6;379(2):374-8. Epub 2008 Dec 25. 査読有

5)Up-regulation of cell adhesion molecule genes in human endothelial cells stimulated by lymphotoxin alpha: DNA microarray analysis. Suna S, Sakata Y, Sato H, Mizuno H, Nakatani D, Shimizu M, Usami M, Takashima S, Takeda H, Hori M. J Atheroscler Thromb. 2008 Jun;15(3):160-5. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1) Lymphotoxin Alpha3 Has a Pivotal Role In Atherosclerosis By Inducing Monocyte-Endothelial Interaction Mediated By Tumor Necrosis Factor Receptor 1 /Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathway. 第58回米国心臓病学会議 (ACC) . Mar 29-31, 2009. Orange county convention center, Orlando, USA

2) 坂田泰彦、佐藤洋 . Biomarkers, Single Nucleotide Polymorphisms and Cardiovascular Risk After Acute Myocardial Infarction: Observations from the Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS). 第73回日本循環器学会学術集会 シンポジウム 1 .平成21年 3 月20日 .大阪国際会議場 .

3) 砂真一郎、坂田泰彦、佐藤洋ほか . リンホトキシン (LTA) は血管内皮細胞と単球との接着を増強し、これはNFkB活性化による接着因子の増強を介している. 第28回 近畿

循環器疾患治療研究会 . 平成20年9月20日 . ホテルグランヴィア大阪

4) 砂真一郎、坂田泰彦、佐藤洋ほか Lymphotoxin-alpha Regulates Monocyte Adhesion to Endothelial Cells by Up-regulation of Cell Adhesion Molecules via PI3K-Akt-NFkB Pathway in Human Endothelial Cells . 第72回日本循環器学会総会・学術集会 . 平成20年3月28-30日 . 福岡国際会議場 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂田 泰彦 (SAKATA YASUHIKO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 90379206

(2)研究分担者

佐藤 洋 (SATO HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号 10294092

水野 裕八 (MIZUNO HIROYA)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号 60437423

(3)連携研究者