

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700391  
 研究課題名 (和文) 動脈硬化形成過程における単球及び血管内皮細胞 PECAM-1 の  
 3次元分子動態解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of three-dimensional molecular dynamics of PECAM-1 on  
 monocytes and vascular endothelial cells in the early  
 atherogenesis.  
 研究代表者  
 橋本 謙 (HASHIMOTO KEN)  
 川崎医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：80341080

## 研究成果の概要：

動脈硬化初期における単球の血管内皮細胞への接着・浸潤機構には不明点が多い。本研究では、単球及び内皮細胞に発現する膜蛋白 PECAM-1 に着目し、その分子動態を直接観察した。単球が内皮細胞間隙を通して浸潤した後、20 分程度にわたって、内皮細胞 PECAM-1 の浸潤スポットへの持続的な集積が認められた。この集積は、単球由来の液性因子や、単球の内皮への接着ではなく、細胞間隙を浸潤することで初めて起こった。このような集積は同一部位での慢性的な単球浸潤を促す可能性があると考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：動脈硬化，血管生物学，循環生理学

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：動脈硬化，血管内皮，単球，PECAM-1，分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の形成初期過程では、脂質の蓄積等により障害を受けた血管内皮細胞に血中の単球が接着、内皮下へ浸潤し、マクロファージに分化することでプラーク形成が進行する。単球の血管内皮への接着・浸潤過程は多くの分子 (ICAM-1, VE-cadherin, PECAM-1, JAMs, CD99 等) が関与する非常に複雑なプロセスであり、「ある細胞が内皮細胞を介して血管内外を行き来する」という意味で、炎症・免疫反応 (主に好中球, リンパ球), がん細胞の転移, 血管新生 (内皮前駆細胞) な

どとある程度の共通項を有しており、そのメカニズムの解明は現在の医学生物学分野での大きなトピックスの一つである。1994 年に、1) ローリング → 2) 強固な接着 → 3) 内皮下への浸潤という順序でプロセスが進行するという「multi-step paradigm」が提唱され、これを基にローリング、接着段階における分子メカニズムはかなりの部分が解明された。しかし、最終段階である浸潤ステップは細胞の 3 次元方向のダイナミクス解析が技術的に難しい為、あまり解析は進んでいない。浸潤ルートについても、従来考えられてきた、

内皮細胞間隙を通るルート (Paracellular route) だけではなく、一部では内皮細胞本体を貫入して浸潤するルート (Transcellular route) も報告されている。

## 2. 研究の目的

前項で述べた背景を踏まえ、本研究では、多くの関連分子の中で、単球及び内皮細胞の両者に発現する膜タンパクである PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) に着目した。従来の報告では、単球の浸潤時には両細胞の PECAM-1 同士が結合し、浸潤が進行することが示唆されているが、その詳細な分子動態や制御機構は不明である。本研究では、分子生物学的手法を用いて PECAM-1 分子の細胞内末端 (C 末端) に緑色蛍光タンパク (GFP; Green Fluorescent Protein) を付加した組換えベクターを構築し、これをヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) に導入・発現させることで、生細胞において単球の接着や浸潤時に起こる PECAM-1 分子の動きや振る舞いを直接観察し、その制御機構について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) PECAM-1-GFP 組み換えベクターの作製  
HUVEC から total RNA を抽出後、逆転写酵素により cDNA を調製し、予め設計したプライマー (PECAM-1 分子の cDNA 配列の開始及び終止コドン両端に制限酵素 (KpnI) 切断サイトを付加したもの) を用いて PECAM-1 cDNA を PCR 法にて増幅した。これを N 末端融合蛍光ベクター (pAcGFP1-N1; Clontech 社) の KpnI サイト (GFP 遺伝子の上流側) にライゲーションし、PECAM-1 の C 末端 (細胞質ドメイン側) に GFP が付加されるベクターを構築した。PECAM-1 遺伝子が正しい方向に挿入された大腸菌コロニーのみを選択後、プラスミドを精製し、DNA シーケンスにより塩基配列を確認した。

### (2) PECAM-1-GFP ベクターの内皮細胞への導入

高効率の遺伝子導入が可能な Nucleofection 法 (Amaxa 社) を用いて、上記 (1) で準備した PECAM-1-GFP ベクターを HUVEC に遺伝子導入した。最適な導入条件については予備実験を行い決定した。導入した遺伝子産物及びそれらを発現した細胞の機能確認として、① PECAM-1-GFP の細胞内局在の確認 (蛍光抗体法)、② PECAM-1-GFP の分子量確認 (ウエスタンブロット法)、③ PECAM-1-GFP の細胞内シグナル伝達機能の確認 (Pervanadate 処理による SHP-2 集積のチェック; 蛍光抗体法)、④ 細胞の形態や増殖能の変化、⑤ PECAM-1-GFP 導入細胞での IL-1 $\beta$  に対する細胞活性化の確

認 (ICAM-1 の発現; ウエスタンブロット法) を行い、PECAM-1-GFP を発現した内皮細胞が通常の細胞と同様の機能を維持していることを確認した。

### (3) 単球浸潤時の生細胞における内皮細胞 PECAM-1 の分子イメージング

上記 (1)、(2) の PECAM-1-GFP ベクターを導入した HUVEC を直径 35mm のガラスベース ディッシュ (fibronectin コート済み) に播種後、2~3 日間培養してコロニー状に増幅させた。実験前日には、動脈硬化病巣での炎症状態を再現する為、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  (5ng/mL) にて刺激した。ヒト単球は実験前日に健康なボランティアから採取した血液から magnetic cell-sorting (MACS) system (Miltenyi Biotec 社) により分離・精製した。実験当日は、小型 CO<sub>2</sub> インキュベータ設置済みの倒立顕微鏡下に単球 (約 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells) を HUVEC に加え、3-5 分後毎に共焦点レーザー顕微鏡により連続的に 3 次元断層観察を行った。得られた画像を基に、単球の動き (接着、遊走、浸潤等) や浸潤ルートと内皮細胞 PECAM-1 動態との関連を詳細に解析した。一部の試験では、特異的抗体を用いて単球の接着のみ、及び浸潤のみを阻害した条件下で同様の試験を行い、単球の接着・浸潤の各ステップと PECAM-1 動態との関連を独立に検討した。

(4) フローサイトメーターを用いた単球浸潤時の内皮細胞 PECAM-1 の膜集積の定量解析  
単球と内皮細胞を一定時間 (~50 分) 反応させた後、両細胞の特異マーカー (単球: CD14, 内皮細胞: VE-cadherin) と標的分子 (PECAM-1) を異なる蛍光色素付抗体で 3 重染色し、フローサイトメーターで解析することにより、両細胞集団を認識させ、細胞膜表面の PECAM-1 の発現を個別に定量解析した。

## 4. 研究成果

(1) PECAM-1-GFP 組み換えベクターの作製  
前述の方法にて PECAM-1-GFP ベクターを構築し、塩基配列は DNA シーケンスにより確認した。

### (2) PECAM-1-GFP ベクターの内皮細胞への導入

予備検討した最適導入条件の基で PECAM-1-GFP ベクターを HUVEC に導入し、導入した遺伝子産物及びそれらを発現した細胞の機能確認を行った。

① 発現した PECAM-1-GFP は内因性 PECAM-1 と同様に細胞間隙に局在しており、タンパク合成から膜への輸送が正常に行われていることが確認された。

② 発現した PECAM-1-GFP は想定された分子量

(160kDa) の位置にバンドが認められた。

③ Pervanadate 処理により SHP-2 (Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase-2) が細胞間隙に集積し、PECAM-1 の細胞内ドメインに結合するという既知の現象が、PECAM-1-GFP 導入細胞においても認められたことから、PECAM-1 分子の細胞内端に GFP を付加した状態でも、PECAM-1 分子の細胞内ドメインを介したシグナル伝達機能が正常に維持されていることが確認された。

④ PECAM-1-GFP 導入細胞の増殖能や細胞の形態は非導入細胞と比べて大きな変化は見られなかった。

⑤ PECAM-1-GFP 導入細胞に IL-1 $\beta$  刺激を加えると、非導入細胞と同様に ICAM-1 の発現誘導が認められ、単球-内皮細胞実験系に供するのに問題ないことが確認された。

### (3) 単球浸潤時の生細胞における内皮細胞 PECAM-1 の分子イメージング

細胞間隙を通る浸潤 (Paracellular route) では、浸潤する単球を取り囲むように内皮細胞 PECAM-1 が再配置する様子が 3 次元的にもはっきりと認められ、両細胞の PECAM-1 同士が結合していることが示唆された。また、浸潤完了後には、浸潤した単球が他の場所へ遊走した後においても、内皮細胞 PECAM-1 が持続的に浸潤スポットに集積してくる現象が観察された (図 1, arrowheads)。浸潤スポット局所の蛍光輝度の変化を定量的に解析した結果、浸潤完了後 ~20 分程度にわたって、PECAM-1-GFP 輝度が 1.2~1.4 倍程度まで増加していた (図 2)。一方、細胞本体を通る浸潤 (Transcellular route) ではこのような再配置や集積は認められなかった (図 2)。特異抗体を用いて単球の接着や浸潤のみを阻害した条件下では、上記の PECAM-1 集積が消失したことから、PECAM-1 集積は、単球由来の液性因子や、単球の内皮への接着ではなく、細胞間隙を浸潤して PECAM-1 同士が結合することで初めて起こることが示唆された。

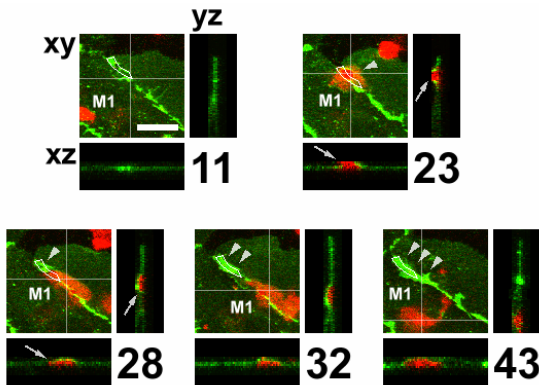


図 1 単球浸潤後の内皮細胞 PECAM-1 の浸潤スポットへの持続的集積 (赤: 単球[M1], 緑: 内

皮細胞 PECAM-1-GFP, 数字: 単球添加後の時間 (分), Scale Bar = 20  $\mu$ m)

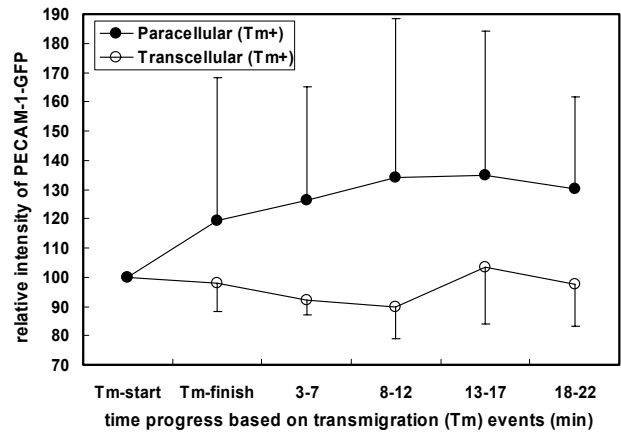


図 2 浸潤スポット局所における内皮細胞 PECAM-1-GFP の輝度変化 (Tm: Transmigration = 浸潤)

(4) フローサイトメーターを用いた単球浸潤時の内皮細胞 PECAM-1 の膜集積の定量解析  
フローサイトメーターを用いた解析においても、前述の輝度解析と同様に、単球添加によって内皮細胞表面の PECAM-1 発現が 1.2~1.3 倍に増加しており、前述の PECAM-1 集積が確認された。

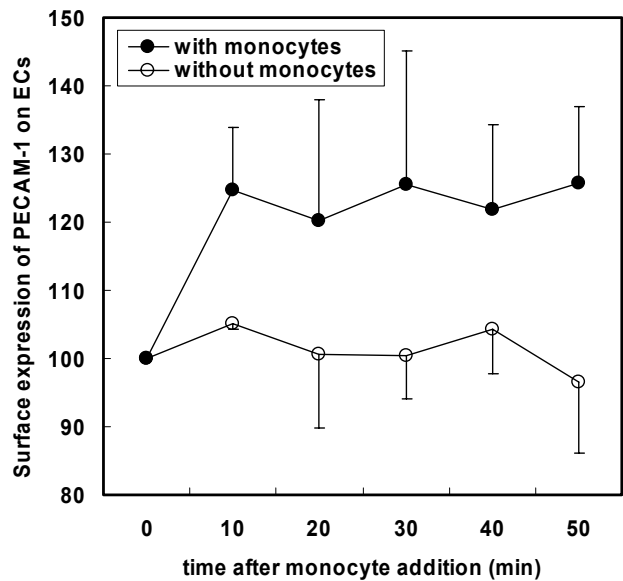


図 3 フローサイトメーターを用いた単球浸潤時の内皮細胞 PECAM-1 の膜集積の定量解析

### <まとめと今後の展望>

内皮細胞間隙を通る単球の浸潤 (Paracellular route) では、浸潤する単球と内皮細胞上の PECAM-1 分子同士が結合することにより何らかのシグナル系が惹起され、内皮細胞では浸潤スポットへの PECAM-1 輸送系が促進されたものと考えられる。このこと

は、同一スポットでの慢性的な単球浸潤を促し、結果として動脈硬化病巣形成を促進するものと考えられる。従って、将来的に何らかの方法で PECAM-1 の膜への輸送系を抑制することができれば、PECAM-1 自体の抑制を行わず、従って副作用の少ない動脈硬化の治療に結びつく可能性がある。現在、PECAM-1 輸送系の実態と、その制御因子について検討を行っている。

#### 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 8 件)

- 1) Nakamura K, Shimizu J, Kataoka N, Hashimoto K, Ikeda T, Fujio H, Ohta-Ogo K, Ogawa A, Miura A, Mohri S, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Date H, Matsubara H, Mochizuki S, Hashimoto K, Kajiya F, Ohe T. Altered Nano/Micro-Order Elasticity of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Cardiol.* in press. 査読有
- 2) Kume T, Kawamoto T, Okura H, Neishi Y, Hashimoto K, Hayashida A, Watanabe N, Kanda Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K. Evaluation of Coronary Endothelial Function by Catheter-Type NO Sensor in High-Fat-Diet-Induced Obese Dogs. *Circ J.* 2009 Mar;73(3):562-567. 査読有
- 3) Shinji Deguchi, Hiroyuki Fukamachi, Ken Hashimoto, Kazushi Iio, Katsuhiko Tsujioka. Measurement and finite element modeling of the force balance in the vertical section of adhering vascular endothelial cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2, 173-185, 2009 査読有
- 4) Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Murshid SA, Hashimoto K, Kataoka N, Tsujioka K, Kajiya F, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. *Bone.* 43(1):19-24, 2008 査読有
- 5) N. Kataoka, K. Hashimoto, S. Kudo, R. Yamaguchi, K. Tsujioka and F. Kajiya. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Responses in Cultured Endothelial Cells to Mechanical Stimulation by Laser Tweezers. *Journal*

*of Biomechanical Science and Engineering*, 3(2), 116-123, 2008 査読有

- 6) Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Emi Nakamura, Katsuhiko Tsujioka, Fumihiko Kajiya, Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis.* 194 (2), e9-e17, 2007 査読有
  - 7) Hashimoto K, Kataoka N, Kajiya F. [Confocal microscopy], *Nippon Rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 65(2):279-86, 2007. (Japanese). 査読無
  - 8) S Deguchi, M Yano, K Hashimoto, H Fukamachi, S Washio, K Tsujioka, Assessment of the mechanical properties of the nucleus inside a spherical endothelial cell based on microtensile testing. *Journal of Mechanics of Materials and Structures*, 2(6), 1087-1102, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- 1) Kazufumi Nakamura, Wakako Sumita, Ken Hashimoto, Daiji Miura, Nobuhiro Nishii, Satoshi Nagase, Hiroshi Morita, Yoshiki Hata, Kengo Kusano, Tohru Ohe. Increased Cardiomyocyte Elasticity in the Transverse Direction in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic  $\beta$ -Adrenergic Stimulation. 第 73 回日本循環器学会, 2009 年 3 月 20-22 日, 大阪
  - 2) N. Kataoka, K. Hashimoto, E. Nakamura, K. Hagihara, K. Tsujioka, F Kajiya. Local Dynamic Recruitment of Endothelial PECAM-1 to Transmigrating Monocytes. The 13th International Conference on Biomedical Engineering, 2008 年 12 月 3-6 日, Singapore
  - 3) 氷見直之, 濱口愛里, 橋本 謙, 古我知成, 辻岡克彦. 単球 (THP-1) の接着による内皮細胞の電気生理学的変化. 第 47 回日本生体医工学会大会, 2008 年 5 月 8-10 日, 神戸
  - 4) 橋本 謙, 片岡則之, 中村恵美, 萩原喜美子, 辻岡克彦, 梶谷文彦. 細胞間隙經由の単球の内皮下浸潤における内皮細胞 PECAM-1 の単球近傍への局所集積. 第 47 回日本生体医工学会大会, 2008 年 5 月 8-10 日, 神戸

5) Wakako Sumita, Kazufumi Nakamura, Daiji Miura, Ken Hashimoto, Satoshi Nagase, Takefumi Oka, Juichiro Shimizu, Kengo Kusano, Miyako Takaki, Tohru Ohe, Increased Cardiomyocyte Stiffness of the Transverse Direction in the Rat Heart with Hypertrophy Induced by Chronic  $\beta$ -Adrenergic Stimulation. 第72回日本循環器学会, 2008年3月28-30日, 福岡

6) Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Emi Nakamura, Kimiko Hagihara, Katsuhiko Tsujioka, and Fumihiko Kajiya. Local dynamic recruitment of endothelial PECAM-1 to transmigrating monocytes during paracellular diapedesis. 第85回日本生理学会大会, 2008年3月25-27日, 東京

7) 橋本 謙, 片岡則之, 辻岡克彦, 梶谷文彦, Effect of oxidized LDL on monocyte dynamics during transendothelial migration through regulations of PECAM-1 and VE-cadherin on endothelial junctions. 第33回日本微小循環学会年次総会, 2008年2月21-22日, 東京

8) 橋本 謙, 片岡則之, 中村恵美, 辻岡克彦, 梶谷文彦, 細胞間隙を通過して内皮下へ浸潤する単球近傍への内皮細胞 PECAM-1 の局所集積. 第20回バイオエンジニアリング講演会, 2008年1月25-26日, 東京

9) N Kataoka, K Hashimoto, M. R. Williams, S. G. Eskin, K. Tsujioka, L. V. McIntire, and F. Kajiya. Effects of IL-1 $\beta$  and oxLDL on micromechanics of endothelium related with monocyte transmigration. Biomedical Engineering Society 2007 Annual Fall Meeting. 2007年9月, Los Angeles, USA.

10) Yasuyo Sugawara, Hiroshi Kamioka, Ryoko Ando, Yoshihito Ishihara, Sakhr A Murshid, Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Katsuhiko Tsujioka, Fumihiko Kajiya, Takashi Yamashiro, Teruko Takano-Yamamoto. The elastic modulus of osteoblasts and osteocytes. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting, 2007年9月16-19日, Honolulu, Hawaii, USA

11) 橋本 謙, 片岡則之, 中村恵美, 辻岡克彦, 梶谷文彦, 単球の血管内皮下浸潤における PECAM-1 動態の生細胞観察系の構築. 第46回日本生体医工学会大会, 2007年4月

25-27日, 仙台

12) 片岡則之, 橋本 謙, 辻岡克彦, 梶谷文彦, IL-1 $\beta$ と酸化 LDL が血管内皮細胞に及ぼす効果 — ナノ・マイクロメカニクスの観点から —. 第46回日本生体医工学会大会, 2007年4月25-27日, 仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 謙 (HASHIMOTO KEN)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80341080

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: