

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：12501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22650101
 研究課題名（和文）単糖の新規薬理作用の分子細胞力学的解析

研究課題名（英文）Molecular cell biomechanical analysis of novel pharmacological activity of monosaccharide

研究代表者
 松本 明郎（MATSUMOTO AKIO）
 千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：60437308

研究成果の概要（和文）：単糖がマウス由来血管内皮細胞に対して血管新生様反応である網状変形を生じさせることを見出した。単糖は、細胞表面の接着タンパク質の糖鎖構造を改変することにより、細胞周囲との接着能を変化させることが明らかになった。本研究では、生化学的解析を医学側が担当し、接着タンパク質の機能解析などを工学的に行なうことにより、効率的に成果を生み出すことに繋がった。新たな分子細胞力学分野への第一歩となったとも考えられる。

研究成果の概要（英文）：This research project gave a new insight into the action of monosaccharide as it causes mesh-formation on cultured mouse vascular endothelial cells, a part of angiogenic response in mono layered cells. The point of action is glycan on cell surface proteins; a treatment of cells with monosaccharide causes modification of glycans on cell surface adhesive proteins, resulting in the alteration on adhesive forces of the cell. This project has an advantage on research team as they can share the favorite field for detailed analysis; molecular biological analyses by the team of Chiba Univ. and functional analyses by using engineering techniques by the team of Nagoya Inst. Tech. Therefore, this project becomes a first step for conducting “Molecular Cell Biomechanics” research in combination with the scientists from different fields to fulfill higher demand in scientific project.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：総合領域

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：生物・生体工学，形態変化，酸化ストレス，バイオメカニクス，分子生物学，一酸化窒素，血管内皮細胞，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ある種の単糖（グルコー

ス誘導体）がタンパク質の産生・成熟過程を生化学的に改変し、均質な単層シート状に成

長しているマウス由来血管内皮細胞に網状構造を形成させる作用を有することを新規に見出した。これまで、単糖と生体との関わりは、甘味成分として、または糖代謝によるエネルギー産生の原材料としての認識されてきた。この研究代表者らの発見から、単糖が薬理学的作用を有する可能性が明らかとなり、単糖が細胞の力学応答性や自発遊走能、細胞間や基板に対する接着性の変化を惹起する可能性を有することが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究課題では、この細胞形態の変化に関与している単糖応答分子の探索を進め、形態変化がおきる分子機構を明らかにするとともに、それらの責任分子の寄与度を数値化するための工学的測定手法を開発することを目的の一つとした。さらに、工学と生物学の協力により本研究を推進させることにより、形態変化の分子機構を解析する分子細胞力学 (Molecular Cell Biomechanics) の基盤を形成することも期待している。

3. 研究の方法

細胞の形態変化・形態維持という複数の因子が関わる機構を効率的に解析するために、分子生物学的手法と工学的手法を併用する。この目的を達成するために、生物学という接点を持った医学と工学研究者が、互いの長所を生かして共同研究を行なう体制を構築した。

細胞形態の変化に関するモデルは、マウス由来血管内皮培養細胞 (F2) を用い、単糖処理により生じる形態変化を、各種薬剤処理による変化と比較することにより解析を進めることとした。

分子細胞生物学的には、主に生化学的手法を用い、DNA チップを用いた遺伝子発現パターンの網羅的解析、特異抗体を用いたウェス

タンブロット法による各種タンパク質発現量と発現タンパク質の性状変化の解析、糖鎖修飾に関しては特異的レクチンを用いたウェスタンブロット法を適用した。

工学的には、形態変化に関する基本データの取得を目的として、タイムラプス観察による細胞遊走能、極性、網状形成度の計測を行なった。細胞間の接合強度を測定するため、細胞用引張試験機を用いた。

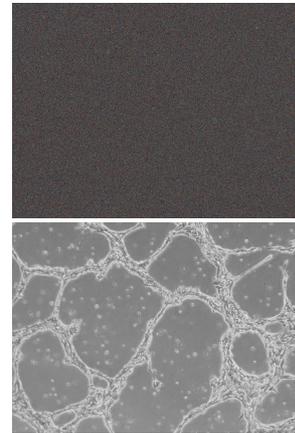
4. 研究成果

(1) 網状変化の生理的意義

単糖を細胞培養液に加え、通常条件にて F2 細胞を培養すると、24-48 時間かけて網状形態が次第に形成される (右図下)。

培養血管内皮細胞における網状形成は、生体内における血管新生に伴う反応である

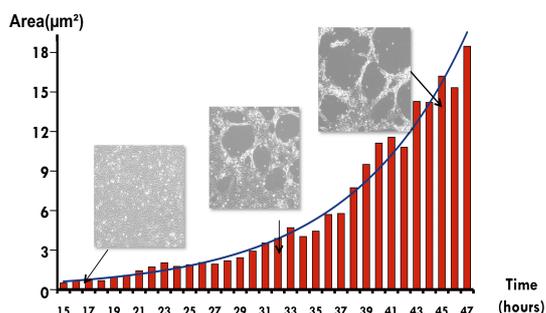
ことが知られている。そこで、一般的に血管新生に伴う網状形成であることを確認する方法として用いられているマトリゲル上で F2 細胞を培養した場合の形態と比較したところ、極めて類似した形態を示し、この単糖添加により生じる血管内皮細胞の網状変化は血管形成を示唆するものであることが示唆された。



(2) 網状形成の経時的形成過程の解析

F2 細胞を単糖処理したことにより生じる網状形成が 1-2 日間の培養で形成される過程について検討をおこなった。培養条件下で F2 細胞の形態変化を顕微鏡下にて連続的にタイムラプス観察を行なった。この連続撮影画像において、培養皿の底面が露出した面積

を測定することにより、網状形成度を定量的に評価する手法を開発した。この手法により、網状形成度は、指数関数的に増大していくことが明らかにされた。本測定法は、近似曲線との相関性 ($r^2 = 0.98$) も高いため、血管内皮細胞における血管新生様反応の程度を評価するためにも用いることができると考えられた。すなわち、血管新生能を有する薬物間での薬効評価などにも応用が可能になるものと考えられる。



(3) 単糖処理により生じる網状形成の機序に関する検討

通常の培養では網状の形態形成を引き起こさない血管内皮細胞が、単糖処理により網状形成を徐々に引き起こすことが明らかとなり、血管新生反応と関連した反応であることも示唆された。それでは、単糖が細胞に対してどのような影響を及ぼした結果、この網状形成が生じることになったのであろうか。前述の腔面積の測定からもわかるように、経時的に網構造は拡大し、相互に融合していく。それでは、最初の微小な腔は、どのようにして形成されていくのであろうか。通常、隣接した細胞は互いに接着し間隙を有さない。しかし、この接着が部分的に破壊されると細胞間隙が形成され、それが次第に拡大していくことにより、腔の形成と拡大が認められるようになる。それでは、接着の破壊はどのようにしておきるのであろうか。タイムラプス画像を用いて、個々の細胞の移動度について検討

をおこなった。一定時間内における細胞の遊走距離を指標として単糖処理の効果を検討したところ、単糖処理は細胞の遊走能には影響を与えてはいないことが明らかとなった。これより、単糖処理による間隙形成機序は、細胞個々の遊走能が不均一になり、速く移動する細胞と遅い細胞との間で細胞間接着を維持することが物理的な距離の拡大により不可能となり、間隙が形成されるのではないと考えられる。それでは、どのようにして細胞間隙は形成されていくのであろうか。

この問題を解明するために、まず単糖処理により発現変化する遺伝子群を見出し、その遺伝子群から推定されるシグナル経路を見出すことを目的として、DNA チップ解析を行なった。血管内皮細胞を単糖処理することにより有意に発現変化する遺伝子は複数見出されたが、IPA システム (Ingenuity Systems) を利用して、特定のシグナル経路が見出されるか検討したが、血管新生様反応に関連するシグナル経路は見出されなかった。

そこで、次に細胞と周囲との接着に関して検討をおこなうことにした。細胞と基盤 (培養皿底面)、細胞と細胞について検討をおこなうこととした。細胞と基盤間の接着を減弱させることを目的として、ガラス製の培養ディッシュを用い、細胞と基盤間の接着力を減弱させたところ、単糖処理を行なった時と同様の形態変化 (網状形成) を得ることができた。すなわち、単糖処理により細胞と基盤間の接着力が減弱し、その結果として網状形成が促進されたものと考えられる。細胞-基盤間の接着には、Vinculin などの接着タンパク質が関与していることが知られているため、単糖処理による Vinculin タンパク質の発現変化について特異抗体を用いてウェスタンブロットング法にて検討した。単糖処理をおこなっても、Vinculin 量に変化は認められ

ず、発現量の増減ではなく接着能に関する質的な変化が関わっていることが示唆された。

次に、細胞間の接着について検討をおこなった。血管内皮細胞特異的な細胞間接着に関与するタンパク質として VE-Cadherin, PECAM1 に着目し、単糖処理前後でのタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法にて検討した。前出の Vinculin と同様に単糖処理前後で発現量に変化は認められなかったが、単糖処理後において分子量の減少が認められた。分子量変化は、何らかの原因によるタンパク質の切断によるものとも考えられたが、翻訳後修飾の変化によるものの可能性もある。そこで、N結合型糖鎖の除去を目的として PNGase によりそれぞれのサンプルを処理したところ、単糖処理とは無関係にほぼ同一になった。これより、単糖処理に伴うタンパク質分子量の変化は、ペプチドの切断によるものではなく、糖鎖除去等によるものであらうと考えられた。すなわち、単糖処理により、細胞間接着タンパク質の糖鎖構造が変化したことが示唆された。

接着タンパク質における糖鎖の役割は、接着の制御に関わると言われている。そのため、細胞間の接着強度が糖鎖除去により変化しているかどうかについて、細胞用引張試験機をもちいて計測を行なった。この結果、糖鎖除去により細胞間接着力は増大しており、より離れにくくなっていることが示された。

これらの結果を総合すると、血管内皮細胞を単糖処理することにより、内皮細胞表面の接着タンパク質の糖鎖構造が変化し、その結果として細胞間接着力がより強固となり柔軟性を欠くこととなった。しかし、内皮細胞の遊走能は単糖処理によっても変化しないため、細胞間接着における柔軟性が減少し、破断しやすくなったと考えられる。一方、同方向へ移動する細胞間では破断はおきず、よ

り強固な接着が維持され、結果的に細胞間がより収縮した様になり、細胞塊を形成していたと考えられた。

以上の成果より、単糖の作用は接着タンパク質の糖鎖構造を変化させることにあり、血管内皮細胞における表現系は、血管新生様反応であることが示された。本研究成果は、これまで知られていなかった単糖にも細胞機能に変化を生じさせるほどの薬理作用が存在していることを示すことになった。さらに、血管内皮細胞の網状変化（血管新生様反応）に糖鎖構造の変化が関与することを示すことともなり、当初予定していた以上の成果を得ることが出来たと考えられる。これらの成果を2年間で得ることができた一因に、医学と工学の連携に基づいた分子細胞力学的な解析手法を導入することができたことがあげられるであらう。

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6件)

- ① Matsumoto A, Gow AJ. Membrane transfer of S-nitrosothiols. Nitric Oxide(査読有), 25(2), 2011, 102-107.
DOI:10.1016/j.niox.2011.02.006
- ② Korekane H, Korekane A, Yamaguchi Y, Kato M, Miyamoto Y, Matsumoto A, Hasegawa T, Suzuki K, Taniguchi N, Ookawara T. N-Glycosylation profiling of recombinant mouse extracellular superoxide dismutase produced in Chinese hamster ovary cells. Glycoconj J. (査読有), 28(3-4), 2011, 183-196.
DOI: 10.1007/s10719-011-9333-6

[学会発表] (計11件)

- ① 高橋結宗, 松本明郎, 長山和亮, 松本健郎 NO 由来ストレスによる血管内皮細胞の力学応答の解明に関する基礎研究, 日本機械学会東海学生会 第43回学生会卒業研究発表講演会, 2012年3月14日, 名古屋工業大学

② 大脇靖史, 長山和亮, 松本明郎, 松本健郎 血管内皮細胞の糖鎖除去による網目構造形成機構の解明に関する研究, 日本機械学会 2011 年度年次大会, 2011 年 9 月 12-15 日, 東京工業大学

③ Matsumoto A., Membrane Transfer of S-nitrosothiols, The 6th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects -Development of Novel Therapy to Specific Disease in organ-, 2011 年 4 月 1 日, 京都大学

④ 大脇 靖史, 長山和亮, 松本明郎, 松本健郎 血管内皮細胞の流れ負荷に伴う変形の量子ドットを用いた局所計測の試み, 第 23 回バイオエンジニアリング講演会, 2011 年 1 月 9 日, 熊本大学

⑤ Matsumoto A. Intracellular S-nitrosothiol (SNO) formation by extracellular NO sources, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010 年 6 月 16 日, 京都国際会館

⑥ Matsumoto A. Functional modifications of glycans on vascular endothelial cells by mono-saccharides. International Society for Heart Research 2010, 2010 年 5 月 16 日, 京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 明郎 (MATSUMOTO AKIO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 60437308

(2) 研究分担者

松本 健郎 (MATSUMOTO TAKEO)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 30209639

(3) 連携研究者

長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 10359763

(4) 研究協力者

大脇 靖史 (OWAKI YASUSHI)
名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・大学院生

藤原 亜規子 (FUJIWARA AKIKO)
千葉大学・医学(系)研究科・学生