

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659112

研究課題名(和文) 血管内皮細胞由来EMPの生物活性の解析および産生血管内皮細胞の解明

研究課題名(英文) Endothelial microparticles modulate cellular status of pericytes

研究代表者

山本 誠士(Yamamoto, Seiji)

富山大学・医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10456361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)： 脳血管内皮細胞を用い、炎症惹起物質を作用させることによってin vitroで効率の良いendothelial microparticles (EMP)の産生方法の確立を行うとともに、EMP含有物質の同定を目的として研究を行った。本研究の結果、炎症血管内皮細胞から、効率よくEMPが産生されることが明らかとなった。また、EMPにはmiRNAが含まれていた。ペリサイトに対してEMPを作用させたところ、有意にVEGF-Bの発現が上昇していた。EMPは、ペリサイトに作用し細胞の状態を変化させる活性を有することが示された。また、その活性本体はEMPに含有されるmiRNAであることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)： We studied endothelial microparticles (EMPs) produced from inflamed endothelial cells in vitro. EMPs incorporation study was performed, and mRNA and protein expression levels were analyzed using pericytes by the action of the EMPs. Here we show that EMPs contained inflammatory specific miRNA. EMPs incorporated pericytes were altered their transcription and protein expression levels. We have shown that target cells of EMPs are pericytes, suggesting EMPs and miRNA included in the EMPs are new therapeutic target of the various inflammatory diseases.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学、薬理学一般

キーワード： EMP Endothelial cells Pericytes

1. 研究開始当初の背景

我々が構築したマウス全身炎症モデル(敗血症/全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)モデル)では、肺、心臓、腎臓を含む主要臓器不全および血管内皮細胞傷害を合併し、生命予後が非常に悪いうえに有効な治療法が少ない中で、細胞炎症シグナリングカスケードで主要な役割を果たす分子であるNFκB、FADD に対する siRNA 等を用いた遺伝子治療が有効であることを明らかにしてきた。しかしながら、炎症を遷延化させる機構すべてが明らかになったわけではなく、炎症性サイトカイン以外に炎症遷延化と耐糖能に影響を与える新規炎症カスケード作用物質が存在する可能性あるのではないかと考えられた。新規炎症カスケード作用物質を検討している過程で、上記炎症性疾患モデルにおいて endothelial microparticles (EMP)の血中含量が増加することを発見した。

2. 研究の目的

我々は、マウス全身炎症モデルで、細胞炎症シグナリングカスケードで主要な役割を果たす分子である NFκB、FADD に対する siRNA 等を用いた遺伝子治療が有効であることを明らかにしてきた。しかしながら、炎症を遷延化させる機構すべてが明らかになったわけではなく、炎症遷延化に影響を与える新規炎症カスケード作用物質が存在する可能性を考えた。Endothelial microparticles (EMP)は、炎症性疾患に伴い血中に増加することが報告されている血管内皮細胞由来の小胞である。本研究では、炎症惹起モデルにおける EMP 含有 miRNA の組成変化の詳細な解析とともに、ターゲット細胞への作用を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、血管内皮細胞培養系において炎症惹起物質を作用させ endothelial microparticles (EMP)の最も効率の良い産生系の開発と測定方法を確立するとともに。血管内皮細胞培養系炎症惹起モデルにおける EMP 含有 miRNA の組成変化の詳細な解析とともに、炎症惹起によって激的に発現増加する miRNA のターゲット mRNA を明らかにし、さらにはターゲット細胞への作用を解明することを目的として研究を行った。

4. 研究成果

本研究結果、in vitro で炎症惹起させた血管内皮細胞由来の endothelial microparticles (EMP)には、多数の炎症関連 miRNA が包含されており、炎症の強度に正の相関を示すものが見出された。それら miRNA のターゲット解析の結果と EMP の出芽様式を詳細に解析した結果から、ペリサイト/血管平滑筋細胞が標的細胞である可能性が考えられた。

EMP に包含されており、血管内皮細胞の炎症強度に相関する miRNA のひとつに焦点を当てて解析した。異なる 3 アルゴリズムで in silico 解析を行った結果、その miRNA のターゲット mRNA は Yy1 のみであった。この miRNA は、ヒトを含めて哺乳類において、種を超えて保存性が高いことも in silico 解析から明らかとなった。さらに、ヒト由来 mRNA に対する in silico 解析から、この miRNA のターゲット mRNA は YY1 であることが強く示唆された。

Yy1 をノックダウンした細胞では、VEGF family の発現増加が観察されるとの報告がある。そこで、血管内皮細胞に炎症性物質を作用させた後、培養液から EMP を分画し、ヒト由来脳血管ペリサイトに作用させた。2日後、脳血管ペリサイトから mRNA を抽出し、VEGF ファミリーに属する Vegfa, Vegfb, Vegfc, Plgf の発現を real-time PCR で確認した。その結果、EMP 非作用群と比較して EMP 作用群で有意に Vegfb の発現が亢進していた。そこで、VEGF-B タンパク質の発現を western blotting で確認したところ、EMP 非作用群と比較して EMP 作用群で有意に VEGF-B タンパク質の発現が上昇していた(図)。このようなことから、炎症性 EMP はペリサイト/血管平滑筋細胞に対し作用し、YY1 の発現を調整し、VEGF-B の発現を増加させる働きを有する可能性が示唆された。

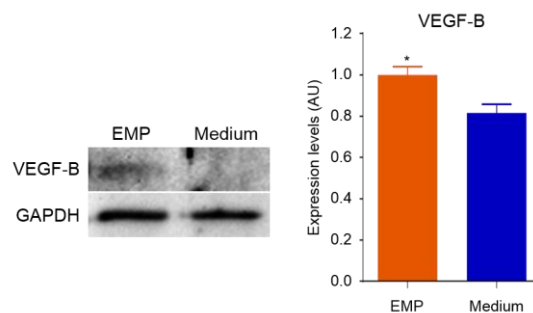


図. VEGF-B 蛋白質の発現を western blotting で確認した。

これらの結果から、炎症状態における EMP の動態は病態生理学的観点から今後注目されるべき事象であり、EMP をターゲットとした治療や診断の開発が、種々の炎症性疾患に対して有用であることが強く示唆される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shen J, Ishii Y, Xu G, Dang TC, Hamashima T, Matsushima T, Yamamoto S, Hattori Y, Takatsuru Y, Nabekura J, Sasahara M: PDGFR- β as a positive regulator of tissue repair in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 32, 353-367, 2012, 査読有.
- ② Ikutani M, Yanagibashi T, Ogasawara M, Tsuneyama K, Yamamoto S, Hattori Y, Kouro T, Itakura A, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K: Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *J Immunol* 188, 703-713, 2012, 査読有.
- ③ Aoki Y, Hatakeyama N, Yamamoto S, Kinoshita H, Matsuda N, Hattori Y, Yamazaki M: Role of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs. *Br J Pharmacol* 166, 390-400, 2012, 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 東英梨月, 山本誠土, 村松昌, 濱島丈, 石井陽子, 新飯田俊平, 笹原正清: マウス創傷治癒モデルにおける血管新生および恒常性に関する multifunctional macrophage の機能解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, P2-0553, 2013 年 12 月 4 日.
- ② 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 濱島丈, 石井陽子, 新飯田俊平, 笹原正清: 血管内皮細胞が産生する Endothelial microparticles の病態生物学的解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, P1-0928, 2013 年 12 月 3 日.
- ③ 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 濱島丈, 石井陽子, 新飯田俊平, 笹原正清: 血管内皮炎症によって産生される EMP の機能解析. 第 21 回日本血管生物医学会, 大阪, PB1-22, 2013 年 9 月 26 日.
- ④ 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 濱島丈, 石井陽子, 新飯田俊平, 笹原正清: 血管内皮細胞の炎症病態に関連する miRNA の解析. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2-G4-5, 2013 年 6

月 7 日.

- ⑤ 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 柳橋努, 生谷尚士, 長井良憲, 高津聖志, 堂本光子, 松田直之, 新飯田俊平, 服部裕一: Endothelial microparticles (EMPs)由来 miRNA の機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2P-0355, 2012 年 12 月 12 日.
- ⑥ 東英梨月, 山本誠土, 村松昌, 新飯田俊平, 服部裕一: 骨髄由来 multifunctional macrophage のマウス創傷治癒モデルにおける機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 1P-0479, 2012 年 12 月 11 日.
- ⑦ Yamamoto S, Azuma E, Muramatsu M, Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Dohmoto M, Matsuda N, Niida S, Hattori Y: Functional analysis of miRNA contained in the endothelial microparticles (EMPs). The 20th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, Tokushima, O-37, December 7th, 2012.
- ⑧ Yamamoto S, Sasahara M: Technological developments and analyses of in vitro neuro-vascular wiring systems. Neuro-Vascular Wiring International Symposium 2012, Nara, Japan: 31, November 12, 2012.
- ⑨ 新飯田俊平, 山本誠土, 村松昌, 東英梨月, 本山昇, 滝川修: 血中 miRNA と Endothelial Microparticles. 第 4 回 RNAi 研究会, 広島, 2012 年 9 月 1 日.
- ⑩ Yamamoto S, Azuma E, Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Dohmoto M, Muramatsu M, Matsuda N, Niida S, Hattori Y: Inflammatory endothelial microparticles (EMPs) contribute to cellular interaction as a bioactive carrier. The 17th International Vascular Biology Meeting, Wiesbaden, Germany: PII-34, June 3, 2012.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pathol2/index.html>

<http://utomir.lib.u-toyama.ac.jp/dspace/handle/10110/11902>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 誠士(YAMAMOTO, Seiji)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
助教
研究者番号:10456361

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: