

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670096

研究課題名(和文) 内皮細胞由来の内弾性板形成促進因子の探索

研究課題名(英文) Search for a promoting factor of internal elastic lamina formation derived from endothelial cells

研究代表者

南沢 享 (Minamisawa, Susumu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40257332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：内弾性板は動脈血管において、内皮細胞と平滑筋細胞層との間に位置し、血管弾力性を保つとともに種々の物質の拡散を防ぐバリアとして機能する。内弾性板の破綻は動脈瘤や動脈硬化の発症に深く関わり、動脈機能を維持する上で極めて重要な細胞外構造である。しかし、内弾性板が、内皮細胞と平滑筋細胞層との間に形成される原理は殆ど解明されていない。本研究では「動脈内皮細胞から誘導される因子が平滑筋細胞に作用して、内弾性板が形成される」という仮説をたて内弾性板形成に重要な因子を探索することを研究目的とした。そのために重層化した平滑筋層に内皮細胞を上乗せするモデルを作成し、弾性線維形成促進因子の探索を継続している。

研究成果の概要(英文)：The internal elastic lamina in the artery is located between the endothelium and the layers of smooth muscle cells. The internal elastic lamina maintains elasticity of the vessel and functions as a barrier to protect diffusion of various materials. Disrupt of the internal elastic lamina causes atherosclerosis and aneurysm of the artery. However, the mechanism of the internal elastic lamina formation has not been fully understood. In this study we hypothesized that a factor derived from the vascular endothelium promotes formation of the internal elastic lamina by interacting with smooth muscle cells. Using a hierarchical cell manipulation technique, we fabricated vascular smooth muscle cells into three-dimensional cellular multilayers and then a single layer of endothelial cells were covered into them. We further searched for a factor that promotes elastic fiber formation.

研究分野：循環生理学

キーワード：血管 内弾性板 内皮細胞 動脈硬化 動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

内弾性板という動脈血管における特殊な細胞外構造物が、内皮細胞と平滑筋細胞層との間に形成される分子機序について、これまで殆ど研究されていない。本課題に関する研究の遅れは、内弾性板形成を評価するための良い実験系がなかったことなどに起因するが、内弾性板の生理・病態学的意義を鑑みると憂慮すべきことである。しかし、弾性線維形成自体の分子機序に関しては、徐々に理解が進んでおり、エラスチン、ミクロフィブリルなど弾性線維構成タンパク質が弾性能を有する線維を形成するには、エラスチン架橋形成のためのリシルオキダーゼ酵素や fibulin ファミリーなどのオーガナイザータンパク質が重要であることが明らかになってきている。さらに最近、血管内皮細胞から分泌される fibulin-2 を fibulin-5 とともに欠損させたダブルノックアウトマウスにおいて、内弾性板形成異常を来すことが明らかになった (Chapman et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010)。また、我々は胎生期血管である動脈管の弾性線維形成不良がプロスタグランジン E_2 (PGE_2) とその受容体 EP4 を介する刺激によって引き起こされることを発見し、弾性線維形成を制御する新たなシグナル経路を突き止めた (Yokoyama et al. *Circulation* 2013)。さらに我々は動脈管内皮細胞は同じ血流や圧力など機械的刺激に曝されながら、隣接する大動脈とは異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした (Liu et al. *PLoSOne* 2013)。これまで一旦不溶化した内弾性板構造は容易に変化しないと考えられていたが、動脈硬化など血管内外からの刺激によって、ダイナミックに構造が変化することが分ってきた。以上の我々の先行研究を含む国内外の研究成果から「動脈内皮細胞が内弾性板形成に重要である」との着想に到った。

2. 研究の目的

内弾性板は動脈血管において、内皮細胞と平滑筋細胞層との間に位置し、血管弾力性を保つとともに種々の物質の拡散を防ぐバリアとして機能する。内弾性板の破綻は動脈瘤や動脈硬化の発症に深く関わり、動脈機能を維持する上で極めて重要な細胞外構造である。動脈平滑筋層内に存在する弾性線維に比して厚く、緻密な膜状構造を有す

る内弾性板が、内皮細胞と平滑筋細胞層との間に形成される原理は殆ど解明されていない。本研究で、我々は「動脈内皮細胞から誘導される因子が平滑筋細胞に作用して、内弾性板が形成される」という仮説をたて、動脈内皮細胞選択的分離方法や細胞積層化による三次元組織構築法などの新技術、内弾性板の過形成を来すモデル動物を利用して、内弾性板形成に重要な因子を探索することを研究目的とした。

3. 研究の方法

動脈平滑筋細胞は弾性線維の構成タンパク質であるエラスチン、ミクロフィブリルを分泌し、細胞外に弾性線維を形成する。不溶性の細胞外基質である弾性線維の形成や破綻に関する研究は、良い *in vitro* 実験系がなかったことなどが要因となって遅れていた。しかし、我々の連携研究者中邨博士は長期平滑筋培養によって、弾性線維を定量的に評価する方法を開発し、我々も同様の実験方法を確立させた (Yokoyama et al. *Circulation* 2013)。また、連携研究者・松崎博士らによって開発された細胞接着因子のナノコーティング薄膜による細胞積層化技術を用いることによって、ラット平滑筋細胞から大動脈を模倣した 5～7 層の血管組織片を作成し、その内部に形成される弾性線維を評価する実験系を確立した。そこで内皮細胞と平滑筋細胞の物理的な接触が内弾性板形成に影響するか否かを、胞積層法を用いて検討した。

4. 研究成果

細胞接着因子のナノコーティング薄膜による細胞積層化技術を用いることによって、ラット平滑筋細胞から大動脈を模倣した 5～7 層の血管組織片を作成し、その内部に形成される弾性線維を評価する実験系を確立した。これらの新技術を基盤として、平滑筋細胞層に内皮細胞を上乗せしたモデルを作成し、内皮細胞の存在が弾性線維形成を促進する可能性が示唆され、その分子機序の解明を進めている。

動脈の構造と機能を保つ上で極めて重要な内弾性板の破綻は血管病や老化と密接に関係するため、内弾性板形成の分子機序解明を目指す本研究は、血管分化・組織形成に関する基礎生物学のみならず、医学的・社会的に

も極めて意義深いと考えられた。

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 3件)

Ishiwata R, Yokoyama U, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Akashi M, Ishikawa Y. Three-dimensional multilayers of smooth muscle cells as a new experimental model for vascular elastic fiber formation studies atherosclerosis. *Atherosclerosis* 233(2): 590-600. 2014.

Kobirumaki-Shimozawa F, Inoue T, Shintani SA, Oyama K, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *J Physiol Sci*. 64(4):221-32, 2014.

Jiao Q, Sanbe A, Zhang X, Liu JP, Minamisawa S. α B-Crystallin R120G variant causes cardiac arrhythmias and alterations in the expression of Ca²⁺ handling proteins and ER stress in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41(8):589-99, 2014.

[学会発表](計 4件)

Minamisawa S, Akaike T, Kajimura I, Omori E. Endogenous prostaglandin E2 signaling plays a role in remodeling of extracellular matrix in the chicken ductus arteriosus. Pharmacology & Physiology International Science Congress 2014. Kuala Lumpur, Malaysia, August 22, 2014. (poster presentation)

Kajimura I, Akaike T, Yokoyama U, Ishikawa Y, Minamisawa S. Nuclear factor kappa B inhibition promotes closure of the rat ductus arteriosus. Experimental Biology 2014. San Diego, 2014. 4. 26-30. (poster presentation)

安田昌太郎, 相原伸平, 石山敦士, 小野弓絵, 梶村いちげ, 南沢享. 小動物心磁図による肺動脈性高血圧症検出法の提案. 第 29 回日本

生体磁気学会. 大阪大学吹田キャンパス コンベンションセンター, 大阪. 2014.5.29-30.

Hirasaki Y, Minamisawa S, Okabe M. The elasmobranch heart does not twist: a speckle-tracking echocardiography study. The American Physiological Society intersociety meeting: Comparative approaches to grand challenges in physiology, San Diego, 10 月. (poster presentation)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://sminamis.m38.coreserver.jp/Jikei_Cell_Physiology/Welcom.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

南沢享(MINAMISAWA Susumu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40257332

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者

中邨 智之 (NAKAMURA Tomoyuki)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20362527

青木 浩樹 (AOKI Hiroki)

久留米大学・付置研究所・教授

研究者番号：60322244

松崎 典弥 (MATSUSAKI Michiya)

大阪大学・工学(系)研究科・助教

研究者番号：00419467