

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670144

研究課題名(和文) 多次元共培養系構築を通じた細胞外微小環境ダイナミクスの血管再構築への寄与の解明

研究課題名(英文) Study of physiological importance of extracellular microenvironment on neovascularization through a development of multi dimensional co-culture system.

研究代表者

富田 拓郎(沼賀拓郎)(Numaga-Tomita, Takuro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：60705060

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)：心臓・血管は動的な組織である。即ちそれを構成する細胞は、細胞外の動的なダイナミクスに適応し、組織ひいては生体恒常性維持に関与する。しかしながら、心血管細胞の細胞外微小環境の変化への適応機構はわかっていない。本研究は、細胞外環境の硬度に着目し、心血管細胞が如何に細胞外の物理的な変化に適応機構の解明を目的とした。当初、光感応性に硬度変化するハイドロゲルを利用した実験系を計画していたが、その安定的な作製が困難であった。そこで細胞との反応性が低く比較的均質なシリコンラバー上での培養系を確立した。健康な生体組織に近い細胞外硬度において、細胞はそのストレスを低減させる分泌物を放出する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular tissue is physically dynamic. Therefore, most of cardiovascular cells maintain their homeostasis by adopting to physical changes of extracellular environment. However underlying mechanisms remain elusive. In this study, we focused on microenvironmental stiffness surrounding cardiovascular cells and studied how the cells respond and adapt to the changes of extracellular stiffness. At first we had tried to utilize hydrogel which change their elasticity in response to light stimulation. However, the hydrogel was instable and difficult to manipulate. Therefore, we developed the culture system based on PDMS with different stiffness and revealed a possibility that the stiffness close to healthy tissue was critical to supported stress reduction by secretion.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：メカノバイオロジー 心血管細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究の課題は「細胞を取り巻く微小環境の変化が細胞を如何に感作し、細胞応答の効率・特異性に寄与し得るか？」である。これまでの細胞レベルでの研究の大半が、硬い培養ディッシュ上に細胞を播種して行われている。これまでの申請者の研究から、硬い培養ディッシュ上での細胞の挙動および性質は柔軟な生体組織中とは明らかに異なり、それが生体を模倣した *in vitro* モデルの確立を困難にしていると考えられる。生体工学分野においては、化学ポリマーを材料としたハイドロゲルを生体組織再生のうえでの構造基盤とした研究が盛んにおこなわれている。本研究では、ハイドロゲルを利用した血管構成細胞の多次元共培養系モデルの確立を通して、細胞外の微細環境の変化、特にその弾性度変化、により細胞に投射される応力が細胞間コミュニケーションに与える影響をリアルタイムで解析する。

2. 研究の目的

細胞外マトリクスは、安定的な組織の構造的基盤であり、構成するマトリクスタンパク質の種類や量の変化によるダイナミクスを有する。この細胞外微小環境の動的変化は、血管の再構築に必須であることが強く示唆されている。しかしその詳細は未だ明らかにされていない。血管の再構築には、血管を構成する内皮・壁細胞の互惠的相互作用が重要である。申請者らは、最近、壁細胞に発現する非選択的カチオンチャンネル TRPC6 が血管成熟に重要であることを見出した。TRPC6 は細胞に対する機械的応力に感受性があることが示唆されている。本研究は、機械的応力による TRPC6 の活性制御を評価系とした多次元内皮 - 壁細胞共培養系の確立を通して、細胞外微小環境の動的変化と血管構成細胞の互惠的相互作用の

連関を解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞外微小環境のダイナミクスと血管構成細胞の細胞特性の相関の検討。初めに、それぞれ弾性度を変えたポリエチレングリコール (PEG)ハイドロゲルを作成する。本研究においては、リアルタイムでの弾性度の変化による細胞特性の変化を蛍光イメージングにより解析する。そこで利用するのが光依存的に分解される PEG ハイドロゲルである (Kloxin et al.(2010) Nat Protocol 5;1867)。感光性 PEG ハイドロゲルに血管構成細胞あるいは心臓構成細胞を播種あるいは被包し、その増殖能・遊走能および分化能といった細胞特性について弾性度を変化させながら検討する。

(2) 光感応性ハイドロゲルの安定的な作製が困難であったため、硬度を変えたシリコンラバーPDMS を基礎とした2次元培養法に切り替えた。さまざまな細胞外マトリクスの検討から基底膜を構成する細胞外マトリクスのミクスチャーであるマトリゲル (Corning)による薄膜コートを施し心臓構成細胞を播種、細胞内ストレスマーカの解析を行った。

(3) 細胞外硬度変化に感作した細胞内シグナル伝達機構の解明。細胞外硬度変化の細胞内化学シグナル変換経路として、チロシンリン酸化シグナル伝達が考えられる。そこで TRPC チャンネルによるチロシンリン酸化経路を介したシグナル伝達の調節機構をニワトリ由来免疫B細胞株を用いて解析した。

4. 研究成果

細胞外基質 (PDMS) の硬度の違いによる心筋細胞の形態自体には大きな変化が見られなかった。しかしながらより柔らかい PDMS 上では心筋の自動能による収縮活動はより顕

著になった。また長期間の培養において、心筋細胞は柔らかい基質上ではきれいに接着が維持されたが、硬い基質上においては、剥がれて死ぬ細胞の数が顕著に上昇し、細胞に対するストレスが高い事が観察された。

細胞播種後 48 時間後において、硬い基質上の細胞はわずかに剥がれ始めている。この時点で細胞培養上清を回収し、それを別に培養した心線維芽細胞に添加して心筋細胞由来の分泌物が線維芽細胞に与える影響を解析した。

実験開始時の予測では、硬度の大きい基質上の細胞が、ストレス誘発性因子を放出し、線維芽細胞を活性化するのではないかと考えていた。しかしながら興味深いことに、硬い基質上に培養した細胞は、線維芽細胞の元来発現するストレスマーカーに影響を与えなかった。一方で柔らかい基質上に播種した細胞の培養上清は、線維芽細胞のストレスマーカーの発現を減弱させた。

多くの慢性的な疾患において、組織の線維化（組織の硬化）は病態レベルの重篤化と強い相関を持つ。組織の硬化が起こるメカニズムは未だほとんど明らかにされていないが、組織の硬化それ自体が増悪化への寄与が近年注目されている。本研究において、当初の予測では組織の硬化自体が組織中の細胞にストレスを与え、それが近隣の細胞に伝播していくのではないかと考えていた。しかしながら、本研究結果としては、正常な硬度の組織においては、細胞がむしろストレスを緩和させるような因子を放出し、組織の恒常性を維持しようとしていることが示唆された。今後、このストレス緩和因子の同定や、基質硬度によるその制御機構を明らかにすることで、組織の線維化を伴う疾患に対する新たな治療戦略の種にしていきたい。

細胞による細胞外の微小環境の感知・適応は長期的なプロセスであり遺伝子発現制

御が伴う。物理的応力のトランスデューサとして予測する TRPC チャンネルが如何に、細胞外からの刺激を化学反応に変え得るかを調査した。心線維芽細胞を硬度のことなる培養皿中に培養するとその硬度の差により MAPK の活性化に変化が見られることを見出した。そこで TRPC チャンネルと MAPK の活性化をつなげるシグナル経路およびその後の遺伝子発現変化を調節する因子の探索を行った。余計な細胞外からの機械刺激を避ける為、非接着系の細胞であるニワトリ由来の免疫 B 細胞株を使用した。B 細胞にはチロシンリン酸化シグナル経路の詳細がほぼ完全に明らかになっており、その知見を応用しやすいという利点もあった。TRPC6 の発現がニワトリ B 細胞では観察できなかったため、最近縁ホモログである TRPC3 を標的とした。TRPC3 は B 細胞受容体刺激後に活性化される phospholipase C γ 2 (PLC γ 2)により産生される diacylglycerol(DAG) により活性化された。TRPC3 を介した Ca $^{2+}$ 流入は PLC γ 2 の形質膜への移行を誘導し、受容体非依存的に活性化させることが示唆された。この PLC γ 2 の持続的な活性化は、さらなる DAG の産生と細胞内 Ca $^{2+}$ 濃度上昇を仲介することが予測された。そこで Ca $^{2+}$ と DAG を活性化に必要とする classical protein kinase C (PKC) の活性化への関与を解析した。B 細胞においては PKC β が classical PKC のドミナントなアイソフォームであったことから、その形質膜への移行を評価した結果、TRPC3 は PKC β の形質膜への局在に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この PKC β の持続的な活性化は、その下流において extracellular-signal regulated kinase (ERK)の持続的な活性化に重要であった。そこで次に PKC β と ERK をつなぐシグナル経路の探索を行った。PKC β はその直下

流の標的として protein kinase D をリン酸化した。これまでに B 細胞受容体刺激後の ERK の活性化には低分子量 G タンパク質である Ras が重要な分子として知られていた。しかしながら、B 細胞受容体刺激後の Ras の活性化は一過的であることが知られており、ERK の活性化との時間的な矛盾が指摘されていた。本研究においても、TRPC3 の欠損は B 細胞受容体刺激後の Ras の活性化には影響を与えなかった。そこでその他のシグナル分子として、神経芽細胞における ERK の持続的な活性化に必要とされていた低分子量 G タンパク質 Rap1 に注目した。その結果、B 細胞受容体刺激後に Rap1 は持続的な活性化を示し、特に持続的な活性化には TRPC3 が必須であることを明らかにした。Rap1 の活性化を仲介する Guanine nucleotide exchange Factor (GEF) の探索から、C3G と呼ばれる因子が B 細胞受容体刺激後にカルシウムおよび TRPC3 依存的に Rap1 と相互作用することを明らかにした。Rap1 はその下流において、Raf kinase のひとつである B-Raf の活性化を誘導し、B-Raf の活性化は ERK のリン酸化酵素である MEK1 の活性化を介して ERK の活性化を導くことを明らかにした。また ERK の活性化は early responsive gene family の転写因子である Egr-1 が主要な標的となることを明らかにした。以上の結果から、TRPC チャンネル群は、その活性化により PLC および PKC と機能的且つ物理的に共役し、Egr-1 の活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。特に、これまでカルシウムチャンネルはカルシウムを細胞内に取入れるプライマリーな働きのみ注目されてきたが、実は、他のシグナル分子を形質膜直下に集約し、拡散性の二次メッセンジャーを効率的にシグナル分子に受け渡すためのプラットフォームとして機能することをはっきり

と明らかにした。また、このシグナル分子の集約は安定的なものではなく、時間経過と共に変化し、その相互作用分子のレパートリーも時々刻々と変化するダイナミックなものであった。受容体自体が過度な活性化を避けるために細胞内部にエンドサイトーシスにより移行する際に、形質膜で機能する分子の持続的な活性化を保証するために、カルシウムチャンネルがシグナルプラットフォームとして機能する可能性が示唆された。

TRPC チャンネルは、これまでに細胞の機械刺激応答に関与する可能性が多く報告されている。即ち TRPC チャンネルは機械刺激を受容して、PLC に連関した受容体非存在下に置いてもシグナルの起点となりうる可能性が示唆される。現在、血管平滑筋に発現する TRPC6 チャンネルの解析から、TRPC6 チャンネルの抑制は組織虚血に誘導される血管形成を亢進することを見出している。この血管形成の亢進は新生血管が内皮細胞により形成されたのちに、血管平滑筋に被覆されるステップが重要であることを明らかにした。TRPC6 の欠損は血管平滑筋におけるストレスファイバーの形成を亢進したことから、血管平滑筋によるキャピラリーの安定化には血管平滑筋の張力の速やかな回復が重要であることを明らかにした。血管に対する機械的伸展刺激がある閾値を超えると、細胞は分裂することにより個々の細胞にかかる張力を分散させようとする。その際に血管平滑筋は増殖型の表現型となる。増殖型の血管平滑筋は、炎症性メディエータの放出をしやすく、血管組織としては速やかに収縮型の表現型に戻ることが炎症からの組織保護に必要となる。TRPC6 は増殖型平滑筋であるための必須因子であることが推測され、その欠損が速やかな収縮型への移行を亢進することが示唆された。また TRPC6 の阻害剤が、高脂

血症による血管内皮細胞障害が抑制することを明らかにし、TRPC6 チャンネルは血管組織が成熟していく過程で機械的刺激を受容し、血管を増やす方向に働くと考えられそれが血管内皮細胞に対しても負の影響を与えていると考えられた。この結果は粥状動脈硬化症における血管の肥厚・硬化につながると考えられ、機械的ストレスから血管組織を保護するために TRPC6 チャンネルを阻害することは新たな創薬標的となると期待される。未だ、血管平滑筋が細胞外の微細環境変化をどのように受容し、細胞応答を導くかは今後の研究の進展が必要となる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems JM, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, Nishida M (2016) Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. *Science signaling* 9: ra7 査読あり
DOI: 10.1126/scisignal.aac9187

Numaga-Tomita T, Nishida M, Putney JW, Jr., Mori Y (2016) TRPC3 amplifies B-cell receptor-induced ERK signalling via protein kinase D-dependent Rap1 activation. *The Biochemical journal* 473: 201-210 査読あり
DOI: 10.1042/BJ20150596

〔学会発表〕(計 2 件)

富田(沼賀)拓郎 B細胞受容体刺激に惹起されるERK活性化におけるTRPC3を介したシグナル伝達機構の解明 第93回日本生理学会大会 2016年3月22日 札幌コンベンションセ

ンター(北海道、札幌市)

富田(沼賀)拓郎 Effect of TRPC6 deficiency on motor function disorder after hindlimb ischemia. 日本薬理学会大会 2015年3月20日 名古屋国際会議場 愛知県、名古屋市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富田 拓郎(沼賀 拓郎)(Numaga-Tomita Takuro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号: 60705060