

機関番号：35303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700476

研究課題名（和文）動脈硬化形成過程における単球浸潤部位への内皮細胞 PECAM-1 局所輸送機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of trafficking mechanism of endothelial PECAM-1 to the spot of monocyte transmigration in 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（和文）：動脈硬化形成過程における単球の血管内皮下への蓄積機構には不明な点が多い。培養内皮細胞へのヒト単球の 2 段階添加実験を行ったところ、1 度目に比べて 2 度目の添加で単球浸潤率が有意に上昇していた。また、単球添加により、内皮細胞間隙の PECAM-1 が有意に増加、VE-cadherin が有意に減少していた。以上より、単球の浸潤によって起こる内皮細胞間隙分子の変化（PECAM-1 増加、VE-cadherin 減少）が次の単球の浸潤を促進し、このことが動脈硬化における長期的な単球の蓄積につながっている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In atherogenesis, it is unclear whether and how one monocyte transmigration event affects endothelium to facilitate subsequent ones. When human monocytes were added twice to endothelial cells *in vitro*, significant augmentation of transmigration was observed at the second addition. Endothelial surface expressions of two major junctional molecules, PECAM-1 and VE-cadherin, increased and decreased respectively, in response to monocyte addition. These findings show that monocyte trans-endothelial migration alters endothelial junctional organization to more monocyte-permeable state (increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin), resulting in the augmented transmigratory activity at a later stage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：動脈硬化、循環生理学、白血球

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、血管内皮細胞、単球、浸潤、PECAM-1、VE-cadherin

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や心不全等の心血管系疾患や脳卒中は死因別死亡率の過半数を占めている

が、これらの根本原因は動脈硬化であると考えられている。動脈硬化は、かつては脂質代謝異常が主要因と考えられていたが、現在で

は、様々な細胞・因子が複雑に絡み合う慢性炎症性疾患であるとの認識が一般的である。その初期過程において、血中を循環する炎症細胞である単球が、酸化 LDL 等により傷害を受けた血管内皮細胞へ接着・内皮下組織へ浸潤し、マクロファージに分化・蓄積する過程は、病巣形成における重要な Key event であり、細胞・分子レベルでのメカニズム解明をめぐって世界中で激しい研究競争が行われている。

単球を含む白血球の血管外遊走は 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進行すると考えられ、ローリング・接着段階における分子メカニズムはかなり解明されている。一方、浸潤過程は細胞の 3 次元 (深さ) 方向のダイナミクス解析が技術的に難しい為、未解明部分が多い。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 (Para-cellular) だけでなく、細胞本体を貫入するルート (Trans-cellular) も報告されている。Para-cellular ルートでは、単球浸潤時に内皮細胞 PECAM-1 が浸潤部位に集積し、両細胞表面の PECAM-1 同士の間により浸潤が進行し、さらに、浸潤部位への PECAM-1 集積には細胞骨格である微小管 (tubulin) とモーター蛋白 kinesin が関与することが示唆された。しかし、実際の PECAM-1 の輸送動態 (集積の程度、時間経過等)、及び kinesin や微小管との相互作用について直接的な証明はされておらず、また、集積を誘発する因子やシグナル系も不明である。

2. 研究の目的

一方、動脈硬化は長い年月をかけて進行する慢性的な炎症疾患であり、単一の浸潤イベントのみが単独で存在するわけではない。実際、単一の浸潤イベントがその後の単球の浸潤活性や内皮細胞の機能に及ぼす影響については不明な点が多い。本研究では、培養細胞を用いた実験系により、単球の浸潤が内皮細胞、特に細胞間隙の分子群に及ぼす影響について解析し、それら分子群の変化が次の単球の浸潤活性に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 単球の 2 段階添加による浸潤活性評価

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) をガラスベースディッシュ上でコンフルエントまで培養し、炎症性サイトカインである interleukin-1-beta (IL-1 β) で刺激を加えることにより単球の接着を促進した。ヒト末梢血より分離した単球 (CD14⁺) を顕微鏡ステージ上で 30-40 分の間隔で 2 回に渡り添加し、タイムラプス観察を行った。それぞれの観察期間 (stage 1, 2) では 30 秒ごとに位相差画

像を取得し、30-40 分間観察した。得られた画像を基に単球の浸潤率を stage 1, 2 で個別に解析した。

(2) 単球添加による内皮細胞間隙分子の発現解析

IL-1 β で刺激した内皮細胞に単球を添加し、インキュベータ内で最大 50 分間反応させた後、両細胞を回収し、ブロッキング処理後、蛍光色素を付加した 3 種の抗体

(VE-cadherin-FITC, PECAM-1-PE, CD14-PE-Cy7) でサンプルを標識した。フローサイトメーター (FACS-Calibur) を用いて内皮細胞表面の PECAM-1 及び VE-cadherin の発現を解析した。単球と内皮細胞は各々のセレクションマーカー分子 (単球: CD14, 内皮細胞: VE-cadherin) の発現プロファイルにより識別した。

(3) PECAM-1-GFP 発現システムの構築

膜貫通型分子 PECAM-1 (分子量: 約 130kDa) の細胞内ドメイン末端 (C 末端) に Aequorea coerulea-derived GFP (AcGFP1) を連結した組み換えベクター (PECAM-1-GFP) を作製し、これを nucleofection 法により HUVEC 内に導入した。遺伝子を導入した HUVEC において、PECAM-1-GFP の発現をウエスタンブロットにより確認し、その細胞内局在を免疫蛍光法により確認した。

(4) 単球浸潤時の PECAM-1 分子イメージング

上記 (3) で作成した PECAM-1-GFP 発現細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡との組み合わせで単球浸潤時の PECAM-1 の分子動態を解析した。単球は赤色の蛍光色素 (Cell Tracker Orange CMRA) で予め染色し、顕微鏡ステージ上で内皮細胞に添加した。得られた蛍光画像を基に、単球浸潤部位局所における内皮細胞 PECAM-1 の分子動態を定量化した。

4. 研究成果

我々の実験系では単球の浸潤は殆どが para-cellular ルートを介するものであり、従来の報告どおり、trans-cellular イベントの発生率は相対的に低値であった。

単球の 2 段階添加実験では、2 回目の添加 (stage 2) における浸潤率が 1 回目の添加時 (stage 1) に比べて有意に増加していた (図 1、約 1.5 倍)。このことから、単球の浸潤が内皮細胞間隙分子に何らかの影響を与え、その結果、stage 2 での浸潤活性が増大したものと考えられた。そこで、フローサイトメーターを用いて主な細胞間隙分子である PECAM-1 と VE-cadherin の細胞表面における発現変化を解析したところ、単球添加により前者が有意に増加、後者は有意に減少して

いた (図 2)。PECAM-1 は単球側にも発現している同分子との homophilic 結合を介して浸潤を促進し、VE-cadherin は細胞間隙のバリアとして機能することで浸潤を抑制すると考えられているので、今回観察された変化は、更なる単球の浸潤を促進する方向の変化である。

以上のような分子変化の詳細をさらに解明する為、PECAM-1-GFP 発現系を用いて単球浸潤時の PECAM-1 分子動態を検討した。PECAM-1-GFP ベクターを導入した内皮細胞では、PECAM-1-GFP の発現が確認され、内因性 PECAM-1 と同様に細胞間隙に正しく局在していた。分子イメージング実験と定量的画像解析の結果、単球の浸潤が完了した後、内皮細胞 PECAM-1 が浸潤部位局所に徐々に集積することが明らかとなった (図 3)。このことから、para-cellular の単球浸潤が起こった細胞間隙局所では、浸潤完了後に内皮細胞 PECAM-1 が浸潤部位に集積することにより、同一部位での次の単球の浸潤が促進されることが想定された。実際、ライブ観察による詳細な解析の結果、ある一つの浸潤イベントが起こった部位の周囲に設定した一定範囲内において、その後に浸潤した単球のうち 50% (10 out of 20 cells) が最初の単球が浸潤したのと同じ又は類似の部位から浸潤していた。

また、予備検討において、PECAM-1 の細胞内ドメインに結合するシグナル分子である SHP-2 を siRNA によりノックダウンすると PECAM-1 集積が抑制されたことから、単球浸潤により誘発される PECAM-1 の集積が SHP-2 を介した機序で起こることが示唆された。

以上をまとめると、単球の内皮下への浸潤により、内皮細胞間隙の分子組成の変化 (PECAM-1 集積, VE-cadherin 減少) が誘発され、このことが次のステージにおける単球の更なる浸潤を促進していると考えられた。このようなポジティブフィードバック機構の詳細な分子メカニズムを明らかにし、効率よく制御することができれば、過剰な単球の浸潤・蓄積を防止し、動脈硬化の治療・予防に大きく貢献できることが期待される。

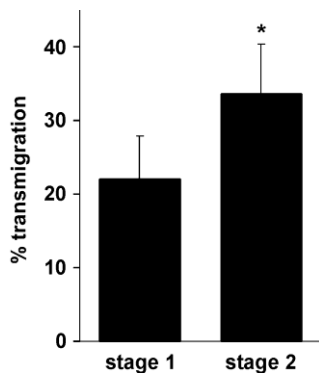


図 1 単球の 2 段階添加実験 (縦軸: 浸潤率)

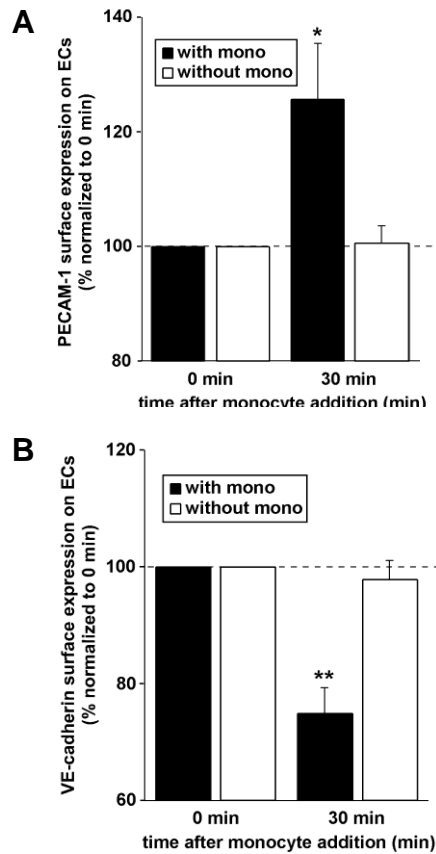


図 2 単球添加時の PECAM-1 (A)、及び VE-cadherin (B) の発現変化

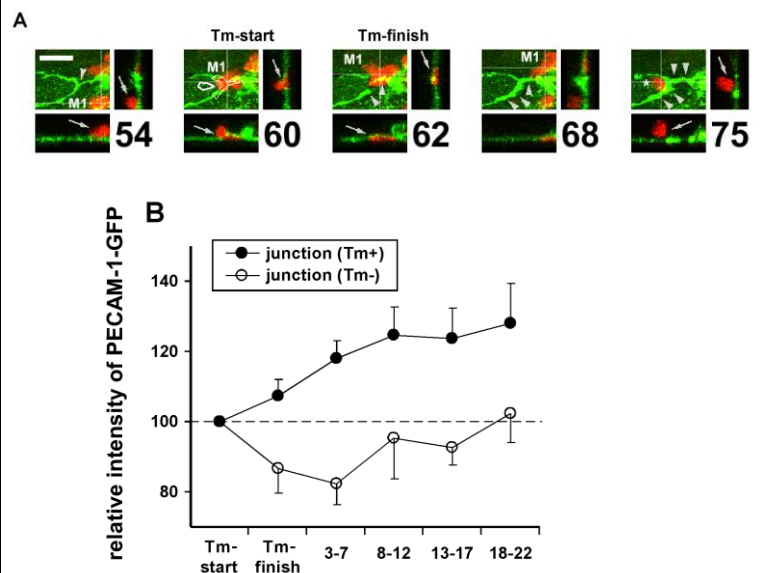


図 3 (A) 単球 (赤) 浸潤時の内皮細胞 PECAM-1-GFP (緑) の分子イメージング。数字は単球添加後の時間 (分)。Tm: 浸潤。(B) 浸潤 (Tm) 部位局所での PECAM-1 の輝度変化。横軸: 浸潤イベントを基準にした時間経過 (分)。縦軸: PECAM-1-GFP 蛍光輝度。浸潤が起こっていない部位 (Tm-) では蛍光増大は認められない。

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 5 件)

① Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Hagihara K, Hatano M, Okamoto T, Kanouchi H, Minatogawa Y, Mohri S, Tsujioka K, Kajiya F. Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent transmigratory activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions. *Int J Cardiol.* 2010 in press 査読有

② Ken HASHIMOTO, Noriyuki KATAOKA, Emi NAKAMURA, Takeaki OKAMOTO, Hiroaki KANOUCHI, Yohsuke MINATOGAWA, Satoshi MOHRI, Katsuhiko TSUJIOKA and Fumihiko KAJIYA, An Experimental Model for Studying Molecular Behavior of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 during Mechanical Interactions between Monocytes and Vascular Endothelial Cells, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 5(4):281-290, 2010. 査読有

③ 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.* 140(1):102-107, 2010. 査読有

④ 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):562-7. 査読有

⑤ 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

[学会発表] (計 14 件)

① 橋本 謙, 片岡則之, 辻岡克彦, 梶谷文彦, 毛利 聡. 単球の内皮下浸潤により誘発される内皮細胞間隙分子の変化が次の単球浸潤を促進する. 第 62 回日本生理学会中国四国地方会 (2010.11.20-21, 出雲) 抄録集 p13

② Core 5. Myocardium: Function and Failure
Session Title: Ventricular Function, Mechanics and Genes

Abstract 13933: Increased Cardiomyocyte Stiffness in the Transverse Direction and Incomplete Relaxation in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic β -adrenergic Stimulation

Kazufumi Nakamura, Wakako S Yoshikawa, Daiji Miura, Juichiro Shimizu, Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Hiroko Toyota, Hiroshi Okuyama, Norihisa Toh, Hiroshi Morita, Kengo F Kusano, Tatsuhito Matsuo, Miyako Takaki, Naoto Yagi, Hiroshi Ito. American Heart Association's Scientific Sessions 2010 (Nov 13-17, 2010. Chicago, USA)

③ 橋本 謙, 片岡則之, 毛利 聡, 辻岡克彦, 梶谷文彦. 単球の内皮下浸潤によって誘発される次の単球浸潤の促進. (第 25 回生体・生理工学シンポジウム, The 25th Symposium on Biological and Physiological Engineering, 2010.9.23-25 (岡山), オーガナイズドセッション「生体機能計測の新展開」, 論文集, pp. 469-470

④ 橋本 謙, 片岡則之, 毛利 聡, 辻岡克彦, 梶谷文彦. 動脈硬化における単球及び血管内皮細胞のダイナミクス—培養細胞を用いたバイオイメーjing— (In vitro bioimaging of monocyte trans-endothelial migration in early atherogenesis), *バイオイメーjing*, Vol. 19 (2) [第 19 回日本バイオイメーjing学会学術集会要旨集] p84-85, 2010.9.9-11 (横浜, シンポジウム)

⑤ Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Emi Nakamura, Kimiko Hagihara, Takeaki Okamoto, Hiroaki Kanouchi, Yohsuke Minatogawa, Satoshi Mohri, Katsuhiko Tsujioka, and Fumihiko Kajiya. Monocyte trans-endothelial migration induces PECAM-1 accumulation and VE-cadherin reduction at the surface of vascular endothelial cells. (6th World Congress on Biomechanics, Singapore Suntec Convention Centre, 1 - 6 August 2010,

abstract p148)

⑥片岡則之, 橋本 謙, 毛利 聡, 梶谷文彦. Experimental Model for Studying Molecular Behavior in Endothelial Cells during Interaction with Monocytes. 第49回日本生体医工学会大会 (2010.6.25-27, 大阪, シンポジウム「細胞バイオメカニクス of 新しい展開」, プログラム・抄録集 p. 219、CD-ROM S-10-4

⑦Kazufumi Nakamura, Daiji Miura, Ken Hashimoto, Hiroko Toyota, Hiroshi Okuyama, Juichiro Shimizu, Wakako Sumida, Satoshi Nagase, Kuniyoshi Kohno, Hiroshi Morita, Kengo Kusano, Naoto Yagi, Hiroshi Ito, Increased Cardiomyocyte Stiffness in Transverse Direction in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic β -adrenergic Stimulation. Circulation Journal 74 Suppl. I, p263-264, 2010 (第74回日本循環器学会, 2010.3.5-7, 京都)

⑧中村一文, 三浦大志, 片岡則之, 橋本謙, 草野研吾, 伊藤浩. 肺動脈平滑筋細胞と心筋細胞における nano/micro オーダーの弾性的変化・原子間力顕微鏡による検討. 第22回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 p374, 2010.1.9-10 (岡山)

⑨橋本 謙, 片岡則之, 毛利 聡, 梶谷文彦. 細胞間隙を介する単球の浸潤により誘発される内皮細胞 PECAM-1 の浸潤部位への持続的集積. 第22回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 p216, 2010.1.9-10 (岡山)

⑩ Kazufumi Nakamura, Daiji Miura, Wakako S Yoshikawa, Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Juichiro Shiizu, Nobuhiro Nishii, Satoshi Nagase, Hiroshi Morita, Yoshiki Hata, Kengo F Kusano, and Hiroshi Ito. Increased Cardiomyocyte Elasticity in the Transverse Direction in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic β -Adrenergic Stimulation. Circulation, 2009; 120: S1147. American Heart Association's Scientific Sessions 2009 (Nov 14-18, 2009. Orlando, Florida, USA)

⑪ Noriyuki Kataoka, Ken Hashimoto, Satoshi Mohri, Fumihiko Kajiya. Role of dynamic recruitment of Endothelial PECAM-1 to Transmigrating Monocytes. (浸潤する単球への内皮細胞 PECAM-1 の局所集積). 生物物理, Vol49, Suppl.1, S-57,

2009 (第47回日本生物物理学会, 2009.10.30-11.1, 徳島)

⑫ Naoyuki Himi, Airi Hamaguchi, Ken Hashimoto, Tomoshige Koga, Katsuhiko Tsujioka. ENDOTHELIAL TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID CHANNEL 1 AND SMALL CONDUCTANCE POTASSIUM CHANNEL STRENGTHENED ADHESION OF MONOCYTE. J. Physiol. Sci. 59 (Suppl. 1), p500, 2009 (36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), 第86回日本生理学会大会, 2009.7.27-8.1, 京都)

⑬ Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Emi Nakamura, Kimiko Hagihara, Takeaki Okamoto, Hiroaki Kanouchi, Yohsuke Minatogawa, Satoshi Mohri, Katsuhiko Tsujioka, Fumihiko Kajiya. MONOCYTE INVASION INDUCES REDISTRIBUTION AND SUBSEQUENT ACCUMULATION OF ENDOTHELIAL PECAM-1 DURING PARA-, BUT NOT TRANS-CELLULAR MIGRATION. J. Physiol. Sci. 59 (Suppl. 1), p324, 2009 (36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), 第86回日本生理学会大会, 2009.7.27-8.1, 京都)

⑭橋本 謙, 片岡則之, 中村恵美, 萩原喜美子, 毛利 聡, 辻岡克彦, 梶谷文彦. 細胞間隙を通る単球の浸潤により誘発される内皮細胞 PECAM-1 の再配置及び浸潤後の持続的集積. 生体医工学 Vol.47, Suppl.1, p331, 2009. (第48回日本生体医工学会大会, 2009.4.23~25, 東京, CD-ROM)

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: