

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350544

研究課題名(和文)単球の血管内皮下浸潤における機械刺激感受性分子TRPV2の役割と動脈硬化との関連

研究課題名(英文)The role of mechanosensor molecule TRPV2 during monocyte transmigration across vascular endothelium in atherogenesis.

研究代表者

橋本 謙 (Hashimoto, Ken)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80341080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の発症過程において、血液中の単球の血管内皮への接着及び内皮下への浸潤は非常に重要である。我々はこの浸潤過程における単球と血管内皮の物理的・機械的相互作用に着目し、メカノセンサー分子TRPV2の役割を検討した。ヒト培養内皮細胞を用いたTRPV2ノックダウン、及び過剰発現系、更に各種生化学的検討により、TRPV2は外部からの物理刺激に応答し、Ca²⁺イオンの流入を介してアクチン細胞骨格の制御による仮足形成、及びそれによって生ずる細胞の動きを促すと同時に、細胞周期を正に調節することにより、細胞が動き、分裂するという生存の為に必須の因子であることを明らかにした。

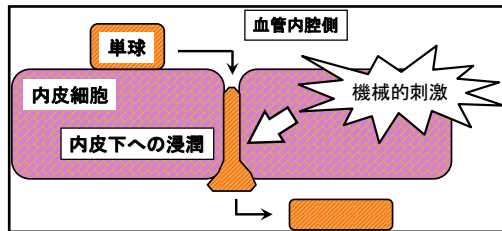
研究成果の概要(英文)：Adhesion and subsequent transmigration of blood monocytes across vascular endothelial cells are critical in early atherogenesis. We focused on the physical and mechanical interaction of monocytes and endothelial cells, and examined the role of TRPV2, Ca²⁺-permeable mechanosensor molecule expressed in endothelial cells. Biochemical analysis including TRPV2 knockdown and overexpression system revealed that TRPV2 is an essential molecule for cell survival by promoting cell migration and proliferation. It promotes cell migration by facilitating pseudopodium formation at the cell membrane through regulating actin cytoskeleton. The role of TRPV2 in the context of monocyte-endothelial interaction during transmigration is the subject of future study.

研究分野：動脈硬化、血管内皮、心臓生理学

キーワード：動脈硬化 血管内皮細胞 単球 浸潤 TRPV2 メカノセンサー

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳卒中等の心血管系疾患は死因別死亡率の過半数を占めているが、これらの主要な病因は**動脈硬化**である。我々は動脈硬化形成初期における key event、即ち、**血中を循環する単球が、傷害を受けた血管内皮細胞に接着し、内皮下組織へ潜り込む(浸潤)際の分子メカニズム**を解明してきた(下図)¹⁻⁸⁾。単球の内皮下浸潤はこれまで、両細胞に多数



存在する接着分子やケモカイン等の“化学的”な観点での理解が主流であった。しかし、内皮細胞間隙という非常に狭い空間を単球がアメーバの様に変形しながら浸潤する際には、**両細胞の接触部ではかなり大きな膜の変形・伸展といった“物理的・機械的(メカニカル)”な刺激が発生しており、刻々と変化するこれらの刺激を両細胞に伝達し、適切な分子再編成等の“化学的”応答に変換する制御系の存在が想定される。このような“機械的”制御系の理解が、これまで蓄積されてきた“化学的”知見と融合すれば、単球の浸潤過程の理解が飛躍的に進むことが期待できる。**

機械刺激感受性分子は近年様々な組織で次々に報告されており、心筋における APJ⁹⁾、神経系における Piezo¹⁰⁾、その他多くの組織における TRP (Transient Receptor Potential) family¹¹⁾等があり、我々も心臓・循環器系に着目して解析を進めてきた。このことは、**動脈硬化に限らず、多くの生体活動において機械刺激の感知・応答機構が重要である**ことを示唆する。本申請では、これらの分子の中で**血管平滑筋細胞¹²⁾や内皮細胞で機械刺激感受性を示す TRPV2 (TRP subfamily V member 2)**に着目した。本分子は高温 (>52°C) によって活性化され、生体にとって重要なメッセンジャーの一つである Ca²⁺を透過する膜貫通型非選択的陽イオンチャネルとして 1999 年にクローニングされ¹³⁾、当初は感覚神経領域で研究が進められた。その後、神経系以外の多くの組織(肺、脾、肝、

腸、血管、心臓、骨格筋、マクロファージ等)での発現、また、高温以外の様々な刺激(リゾリン脂質¹⁴⁾、PI-3K シグナル¹⁵⁾、増殖因子 IGF¹⁶⁾、走化性因子 fMLP¹⁷⁾、機械刺激¹²⁾による活性化が報告され、**本分子の生理的役割は複雑・多岐に渡り、組織ごとにも異なる可能性**が示唆された。近年、前立腺ガン細胞¹⁸⁾、マクロファージ¹⁷⁾、発生段階の神経軸索¹⁹⁾において **TRPV2 の阻害が“細胞の動き”を抑制する**方向に働くことが報告された。本研究では、動脈硬化における血管内皮細胞と単球の相互作用に着目し、TRPV2 の役割を物理的・機械的観点から検討する。

2. 研究の目的

TRPV2 を介した Ca²⁺流入量は一般的な電位依存型 Ca²⁺チャネルに比べるとごく少量であることから、我々は以下のような仮説を着想した。即ち、細胞は、**自身の動きや他の細胞との接触 → 微細な膜伸展・変形 → TRPV2 の立体構造変化・活性化 → 少量の Ca²⁺流入 → 細胞内シグナル → 適切な応答(分子再配置・変形・遊走等)**という機械刺激応答機構を常に稼働させることで自身の恒常性を維持している、換言すれば、**TRPV2 は“細胞が仮足を形成して動く”という生存に必須の応答に必要な分子**ではないかとの仮説である。本研究では、この仮説を検証する為のモデルとして我々がこれまで取り組んできた動脈硬化に着目し、単球の内皮細胞への接着・浸潤過程における両細胞接触面での機械刺激感知・応答機構を明らかにする。また、**TRPV2 の機能異常が単球浸潤や動脈硬化進行に及ぼす影響**を明らかにし、将来的には**動脈硬化の予防・治療**に貢献したい。

3. 研究の方法

(1) TRPV2 ノックダウン系の構築

ヒト臍帯静脈培養血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、siRNA による TRPV2 ノックダウン系を構築した。ノックダウン効率は mRNA レベル(定量 PCR)及び蛋白レベル(ウェスタンブロット)にて検証した。

(2) 細胞の動き、形態の評価

HUVEC を用いたタイムラプス観察及び画像解析ソフト Image J により、個々の細胞をトレースし、その遊走速度 (µm/min) 及び形態を定量化した。形態については、**circularity (真円度) = 4π × (面積) / (周長の 2**

乗)を用いた。この値が1.0に近づくほど真円に近くなり、0.0に近づくほど伸張した多角形状の形態であることを示す。

(3) wound healing assay

HUVECの細胞層の一部を物理的に剥ぎ取り、その後の修復過程をタイムラプス観察することで、周囲の細胞の遊走度や傷 (scratch) の修復能力を評価した。

(4) Ca²⁺キレート実験

TRPV2はCa²⁺を透過するチャネルとして働くことが報告されている為、EGTAにより細胞外Ca²⁺をキレートした際の表現型を解析することで、TRPV2の機能発現におけるCa²⁺透過の必要性を検証した。

(5) 免疫染色

TRPV2機能に関連する各種分子 (リン酸化 Arp2, talin, vinculin) について免疫蛍光染色を行い、細胞内の局在を可視化・解析した。

(6) ウェスタンブロット

TRPV2機能に関連する各種分子 (Arp2, リン酸化 Arp2, ERM, リン酸化 ERM) についてウェスタンブロットを行い、その発現量を解析した。

(7) 細胞増殖アッセイ

MTTアッセイにより細胞増殖の程度を評価した。

(8) TRPV2過剰発現系の構築

ヒト全長TRPV2 cDNAを基にGFP融合ベクター (TRPV2-GFP) を構築し、HUVECにおける過剰発現系を構築した。

4. 研究成果

(1) TRPV2ノックダウン系の構築

siRNAの濃度、導入時期等の条件検討により、mRNAレベルで16%まで、蛋白レベルで34%までTRPV2をノックダウンすることに成功した。また、蛍光タグ付きsiRNAを用いた実験により、siRNAの導入率が93%に達していることを確認した。

(2) 細胞の動き、形態、wound healing

TRPV2のノックダウンにより、内皮細胞の動きが有意に阻害され (図1)、細胞形態が円形に近くなっていたことから、細胞が動く際に必要な仮足の形成能が阻害されていることが示唆された。wound healing assayでも同様にTRPV2ノックダウン細胞では傷の修復能が低下していた。一方、傷 (scratch) の周囲にあり、活発に遊走している細胞ではTRPV2の発現が上昇していた (図2)。以上より、TRPV2は細胞が仮足を形成して動くというプロセスに必要な分子であることが示唆された。また、Ca²⁺キレート条件下でも同様に細胞の動きは阻害され、形態が円形に近くなったことから、TRPV2を介して流入するCa²⁺が仮足形成や細胞の動きに重要であると考えられた。更に、TRPV2-GFPを用いたタイムラプスイメージングでは、実際の生きた細胞においてTRPV2の仮足形成部への集積が認められ、上記のデータを裏付ける結果となった。

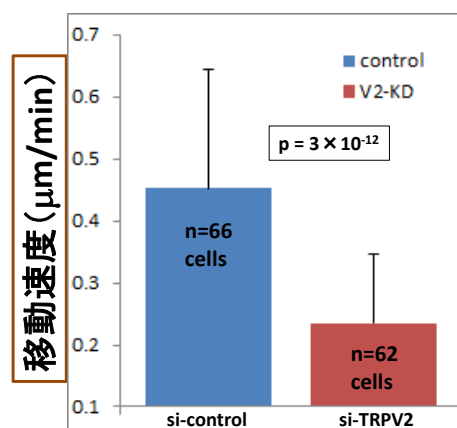


図1 細胞の遊走速度

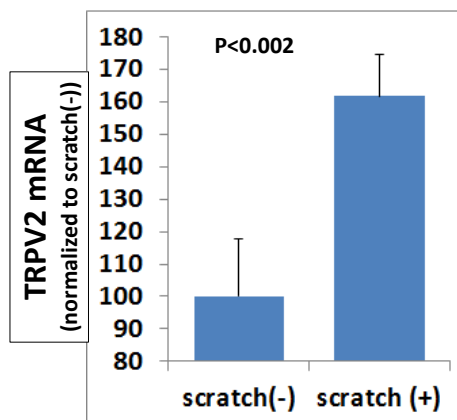


図2 傷 (scratch) 周囲の細胞におけるTRPV2発現

(3) 細胞内分子機構の検討

TRPV2及び流入したCa²⁺が作用する細胞内シグナル系として、(1)細胞骨格系、(2)基質との焦点接着系、及び(3)細胞周期・増殖系に着目した。(1)については、TRPV2ノックダウンにより、仮足形成時のアクチン細胞骨格の核形成に必要なリン酸化Arp2 (pArp2)の仮足形成部 (細胞膜) への移行が阻害されており (図3)、また、細胞骨格と細胞膜を接続するERMタンパクのリン酸化レベルの減少を認めたことから、これらが仮足形成阻害の分子機構の一つと考えられた。(2)については、TRPV2ノックダウンにより、焦点接着部位の制御因子であるtalin, vinculinがより強く染色されており (図4)、基質との接着強化による遊走阻害という機序が考えられた。(3)については、TRPV2ノックダウンにより、細胞増殖が阻害されており、細胞の動きとの関連は不明であるが、TRPV2が何らかの機序で細胞周期を正に調節する可能性が示唆された。

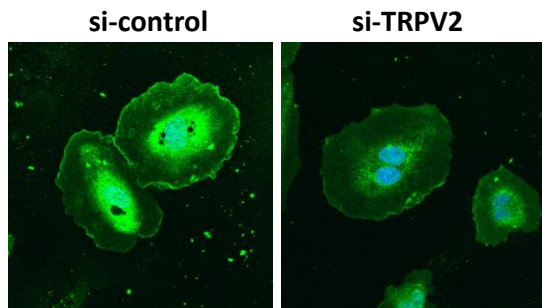


図3 リン酸化 Arp2 (緑) の膜への移行

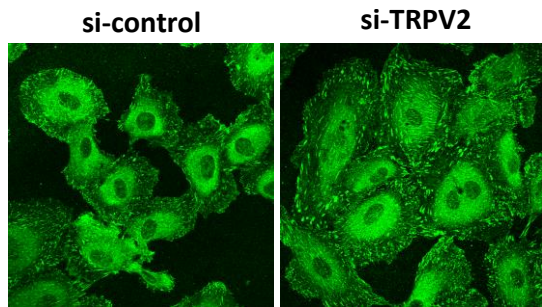


図4 talin (緑) の焦点接着斑への集積

(4) まとめ

以上より、TRPV2 は外部からの物理刺激に
応答し、Ca²⁺の流入を介してアクチン細胞骨格
の制御による仮足形成 (Arp2, ERM)、及びそ
れによって生ずる細胞の動きを促すと同時
に、細胞周期を正に調節することにより、細
胞が動き、分裂するという生存の為に必須の
因子であると考えられた。今後は、動脈硬化
 発症における TRPV2 の関与を明らかにする
 為、単球との相互作用、浸潤における TRPV2
 の役割について、培養系及び TRPV2 ノック
 アウトマウスを用いた個体レベルにて解析
 を進める予定である。

<引用文献>

- 1) Hashimoto et al. *J Physiol Sci*, 2012.
- 2) Hashimoto et al, *Int J Cardiol*, 2011;149(3).
- 3) Hashimoto et al, *Int J Cardiol*, 2011;149(2).
- 4) Hashimoto et al. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2010. 5) Hashimoto et al. *Atherosclerosis*, 2007. 6) Hashimoto et al. *Atherosclerosis*, 2004. 7) Kataoka et al. *PNAS USA*, 2002. 8) Iwaki et al. *J Biol Chem*, 1997. 9) Scimia et al, *Nature*, 2012. 10) Coste et al, *Science*, 2010. 11) Inoue et al, *Pharmacol Ther*. 2009. 12) Muraki K et al, *Circ Res*. 2003. 13) Caterina et al, *Nature*. 1999. 14) Monet et al, *Biochim Biophys Acta*. 2009. 15) Penna et al. *Cell Calcium*. 2006. 16) Kanzaki et al, *Nat Cell Biol*. 1999. 17) Nagasawa et al, *J Cell Physiol*. 2007. 18) Monet et al, *Cancer Res*. 2010. 19) Shibasaki K et al, *J Neurosci*. 2010.

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 8 件)

- (1) Sasae Y., 他 6 名 (Hashimoto K:2 番目, Ujihara Y:3 番目, Mohri S:7 番目). Left ventricular mechanics and myocardial calcium dynamics in short-term and long-term hyperthyroid mice. *Kawasaki Medical Journal*, 41(2), 2015, in press 【論文・査読有】
- (2) Wei F, 他 16 名 (Ujihara Y:5 番目, Mohri S:14 番目) . Cdk5rap1-Mediated 2-Methylthio Modification of Mitochondrial tRNAs Governs Protein Translation and Contributes to Myopathy in Mice and Humans, *Cell Metab*, 2015; 21(3):428-442. 【論文・査読有】 doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.019.
- (3) Ujihara Y, 他 5 名. Computational studies on strain transmission from a collagen gel construct to a cell and its internal cytoskeletal filaments, *Comput Biol Med*, 2015;56:20-29. 【論文・査読有】 doi: 10.1016/j.compbio.2014.10.015.
- (4) Katanosaka Y, 他 10 名 (Ujihara Y:3 番目, Mohri S:10 番目) . TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice, *Nat Commun*, 2014;5:3932. 【論文・査読有】 doi: 10.1038/ncomms4932
- (5) Igarashi J, 他 17 名 (Ujihara Y:8 番目, Mohri S:10 番目) . Involvement of S1P1 receptor pathway in angiogenic effects of a novel adenosine-like nucleic acid analog COA-C1 in cultured human vascular endothelial cells, *Pharmacology & Pharmaceutical Medicine*, 2014;2(5):e00068. 【論文・査読有】 doi: 10.1002/prp2.68.
- (6) Sumita-Yoshikawa W, 他 16 名 (Hashimoto K:5 番目). Increased Passive Stiffness of Cardiomyocytes in the Transverse Direction and Residual Actin and Myosin Cross-Bridge Formation in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic β -Adrenergic Stimulation. *Circ J*. 2013 Feb 25;77(3):741-8. 【論文・査読有】 <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0779>
- (7) Hashimoto K, 他 8 名 (Mohri S:7 番目) . Live-cell visualization of the trans-cellular mode of monocyte transmigration across the vascular endothelium, and its relationship with endothelial PECAM-1. *J Physiol Sci*. 2012;62(1):63-9. 【論文・査読有】 doi:

- 10.1007/s12576-011-0181-8.
(8) Himi N, 他 5 名 (Hashimoto K:3 番目). Calcium influx through the TRPV1 channel of endothelial cells (ECs) correlates with a stronger adhesion between monocytes and ECs. *Adv Med Sci.* 2012;57(2):224-9. 【論文・査読有】doi: 10.2478/v10039-012-0044-4.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 氏原 嘉洋、成体マウス心臓の機能維持における TRPV2 の役割、第 54 回日本生体医工学会 2015.5.7-9, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- (2) 橋本 謙、周産期における心筋タイチンのアイソフォーム転換機構の解析、第 54 回日本生体医工学会 2015.5.7-9, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- (3) 橋本 謙、出生時の肺呼吸開始による酸素分圧上昇が心筋細胞の分裂停止に果たす役割の検討、第 66 回日本生理学会中国四国地方会、2014.11.1-2、情報通信交流館 e-とびあ・かがわ (香川県高松市)
- (4) 橋本 謙、心筋細胞の分裂制御機構の解明に向けた予備的検討、第 53 回日本生体医工学会 2014.6.24-26, 仙台国際会議場 (宮城県仙台市)
- (5) 片岡則之、動脈硬化発生における細胞・分子のナノ/マイクロメカニクス, ワークショップ「高度物理刺激と生体応答」, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 2013.9.8-11, 岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- (6) N. Kataoka. Realtime Observation of Actindynamics in Living and Migrating Monocytic Cells with Lifeact-GFP Fusion Protein. Proceedings of 2012 BMES Annual Fall Meeting, 2012 BMES Annual Fall Meeting, Atlanta(USA), 2012.10.24-27
- (7) 橋本 謙、動脈硬化初期の単球-血管内皮間相互作用におけるメカノセンサー (TRPV2) の役割、第 64 回日本生理学会中国四国地方会、2012.10.27-28, 高知市文化プラザ「かるぼーと」 (高知県高知市)

[その他]

ホームページ等

川崎医科大学・生理学 1 教室

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=202>

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・講師

研究者番号：80341080

(2) 研究分担者

毛利 聡 (Mohri Satoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00294413

氏原 嘉洋 (Ujihara Yoshihiro)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80610021