

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09513

研究課題名(和文)ギャップ結合による血管内皮細胞の物性制御とその役割

研究課題名(英文)The role of gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness

研究代表者

岡本 貴行 (Okamoto, Takayuki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：30378286

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)：本研究課題は、炎症時における血管内皮細胞の弾性率(硬さ)の変化について原子間力顕微鏡を用いて解析し、さらに細胞の硬さが持つ病態生理学的役割を明らかにすることを目的として行った。これまで我々は、炎症刺激時に血管内皮細胞が硬化することを見出してきた。本研究では、この細胞硬化の機構に細胞間ギャップ結合が関与することを明らかにし、さらに細胞の硬化が白血球の接着を誘導する可能性を示した。これらの結果から血管内皮細胞の硬さが有する役割の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的には、血管が硬くなると動脈硬化が進展し、心血管イベントが生じやすいことが知られている。本研究では、そのメカニズムの解明に取り組み、病態初期に見られる炎症時において血管内皮細胞そのものが硬化することを示し、その分子機構を解析した。さらに細胞が硬化した結果、白血球が硬化部位に集積する可能性を示し、血管硬化が血管病変の形成を促進する新しいメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate alteration in elastic modulus (stiffness) of vascular endothelial cells during inflammation using atomic force microscope, and to clarify the pathophysiological role of cellular stiffness. We found that vascular endothelial cells increased the stiffness during inflammatory stimulation. Here we have demonstrated that gap junction is involved in the regulation of cellular stiffness. Furthermore, we have shown that cellular stiffening induces leukocyte adhesion. Taken together, our results suggested the pathophysiological role of endothelial cellular stiffness.

研究分野：血管生物学、血栓止血学、細胞接着学、分子薬理学

キーワード：血管内皮細胞 細胞硬化 ギャップ結合 細胞接着斑 細胞骨格 白血球接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心血管疾患、脳血管疾患など血管障害性疾患の背景には、動脈硬化病変や血管壁硬化などの血管弾性の増加(硬化)が存在する。血管硬化は、病的炎症を原因とした細胞外マトリックスの再編成、線維化、石灰化と血管構成細胞の硬化によって生じ、コレステロール非依存的な心血管イベント発生(病的血栓形成)のリスク因子でもある。これまで国内外の多様な研究によって、動脈硬化をはじめとする各種血管病に関連する遺伝子や生理活性物質の同定とその役割が明らかにされつつある。その一方で、血管の物理的性質の変化や役割を明らかにする研究は少ない。特に細胞の硬さ変化と調節機構、細胞の硬さが病態形成に及ぼす影響はほとんど研究されていない。

我々は、これまで血管内皮細胞間のギャップ結合の機能低下が病的な炎症と血液凝固の活性化を生じて血管内皮障害に繋がることを報告し、また、ギャップ結合が血管新生や血管リモデリングを制御していること示してきた。当初の予備研究結果から、ギャップ結合が血管内皮細胞の硬さを調節している可能性を見出した。これらを背景として血管内皮細胞の硬さ変化とその生理的役割を解明しようとする本研究を実施した。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでに炎症時にギャップ結合機能が低下することおよび血管内皮細胞の硬さが増加することを示す結果を得ている。本研究では、ギャップ結合が血管内皮細胞の硬さ制御に関わることを明確化し、血管病変形成にどのように関わるか明らかにする。我々は、炎症時のギャップ結合の低下によって血管内皮細胞が硬化し、この細胞の硬化が白血球の接着と遊走を惹起すると仮説を立てて、本研究ではその検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 炎症時における血管内皮細胞の硬さ変化の解析

血管内皮細胞は、シェアストレス、酸化型低比重リポ蛋白質(Ox-LDL)によって硬化し、細胞の硬さは主に細胞骨格であるアクチン線維の量や収縮力によって決定される。ここでは、まず各種血管由来血管内皮細胞の硬さを原子間力顕微鏡で測定した。次に炎症刺激に応じて血管内皮細胞が硬化するか検討するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、リポ多糖(LPS)、トロンピンで刺激し、経時的に細胞の硬さを原子間力顕微鏡で測定した。次に血管内皮細胞にLifeactとGFPの融合蛋白を発現させ、生細胞でのアクチンを可視化し、細胞表面の硬さ分布とアクチンの局在を解析した。

#### (2) ギャップ結合が血管内皮細胞を硬化する機構の解明

細胞の硬さは細胞骨格に加え、細胞間相互作用によって調節される。血管内皮細胞をギャップ結合阻害剤、またはコネキシン(Cx)32、Cx43に対する特異的阻害抗体で処理して血管内皮細胞の硬さを測定した。同細胞にTNF- $\alpha$ 刺激を加え、炎症時における細胞硬化にギャップ結合が及ぼす影響を解析した。さらに、ギャップ結合阻害剤を処理した細胞について免疫染色を用いてアクチン線維、細胞接着斑の形成を可視化し、炎症時に誘導されるこれらの形成に及ぼす影響を解析した。

#### (3) 血管内皮細胞の硬さが細胞接着に及ぼす影響の解析

白血球には硬い基質に向かって遊走するDurotaxisという性質が備わると考えられており、硬化細胞上で細胞接着と遊走を亢進すると推測される。細胞の硬さ変化が白血球の結合に影響を与えるか確認するため、細胞と同程度の硬さを持つゲルへの白血球の接着を細胞背着アッセイを用いて評価した。次に、ギャップ結合阻害剤で処理して硬化したHUVEC、アクトミオシン阻害剤プレバスタチンで処理して軟化したHUVECへの白血球の接着を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 炎症時における血管内皮細胞の硬さ変化の解析

大動脈、肺微小血管、臍帯静脈など血管種にかかわらず内皮細胞は同等の硬さを有していることを明らかにした。次に、HUVECsはTNF- $\alpha$ 刺激4時間後に硬化し、24時間後には刺激前と同等の硬さに戻ることを見出した(Fig.1)。また、トロンピン刺激、LPS刺激でも同様の結果を示すことを確認し、硬化時には接着斑形成が亢進することを明らかにした。Lifeact-GFP遺伝子を導入してアクチン骨格を可視化したHUVECsを用いて細胞の硬化部位がアクチンの局在に一致することを明らかにした。

#### (2) ギャップ結合が血管内皮細胞を硬化する機構の解明

ギャップ結合阻害剤を処理したHUVECsの硬さについて原子間力顕微鏡を用いて測定し、ギャップ結合を阻害したHUVECsは硬化することを明らかにした。また、TNF-

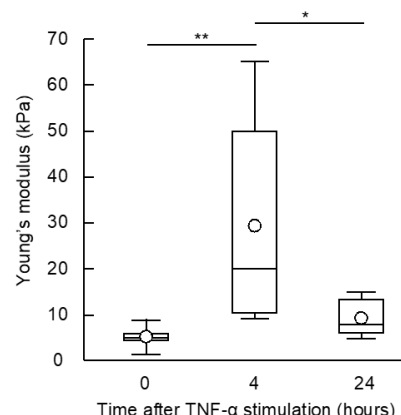


Fig.1 HUVECsはTNF- $\alpha$ 刺激4時間後に一時的に硬化し、24時間後には正常と同等の硬さに戻る。

とギャップ結合阻害剤の共刺激を加えることで、細胞硬化が亢進する傾向を示し、さらに細胞硬化を持続させることを明らかにした (Fig.2)。ギャップ結合阻害剤は単独でも接着班とストレスファイバーの形成を亢進したこと、一方で、細胞骨格再編成阻害剤、アクトミオシン阻害剤が炎症やギャップ結合によって誘導される細胞硬化を抑制したことからギャップ結合による細胞の硬さ制御が細胞骨格再編成に依存的であることを明らかにした。血管内皮細胞に発現するCx32, Cx43 に対する抗体を処理した細胞でも硬化することを確認した。

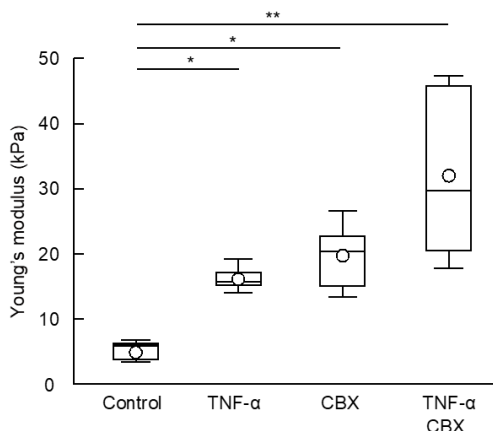


Fig.2 ギャップ結合阻害剤 (カルペノキノロン: CBX) 処理したHUVECsは硬化する。TNF- $\alpha$ とCBXの共刺激時に細胞はより硬化する傾向を示す。

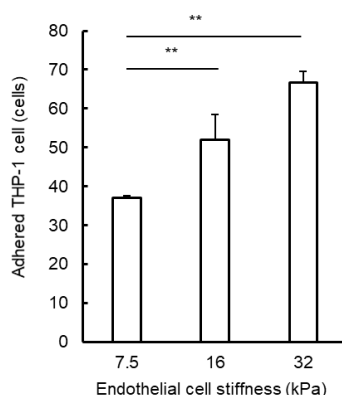


Fig.3 THP-1細胞は血管内皮細胞の硬さ依存的な接着を示す。

### (3) 血管内皮細胞の硬さが細胞接着に及ぼす影響の解析

細胞と同等の硬さを持つゲルを用いて THP-1 細胞の接着能を解析した結果、硬化した細胞と同等の硬さでは細胞接着は、正常と同等に軟らかいゲルと比較して亢進した。次に、ギャップ結合阻害剤を用いて硬化した細胞 (32kPa) とアクトミオシン阻害剤処理で軟化した細胞 (7.2kPa) でも同等の結果が得られ (Fig.3) 血管内皮細胞の硬さ依存的に THP-1 細胞の接着が起こる可能性を見出した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Kawamoto E, Nago N, Okamoto T, Gaowa A, Masui-Ito A, Sakakura Y, Akama Y, Soe ZY, Prajuabjinda O, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, Obeng G, Park EJ, Imai H, Shimaoka M. Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Apr 2;511(2):312-317
2. Okamoto T, Usuda H, Tanaka T, Wada K, Shimaoka M. The Functional Implications of Endothelial Gap Junctions and Cellular Mechanics in Vascular Angiogenesis. *Cancers (Basel)*. 2019 Feb 18;11(2).
3. Shimaoka M, Kawamoto E, Gaowa A, Okamoto T, Park EJ. Connexins and Integrins in Exosomes. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 17;11(1).
4. Okamoto T, Akita N, Terasawa M, Hayashi T, Suzuki K. Rhamnan sulfate extracted from *Monostroma nitidum* attenuates blood coagulation and inflammation of vascular endothelial cells. *J Nat Med*. 2019 Feb 22. Epub ahead of print
5. Okamoto T, Takagi Y, Kawamoto E, Park EJ, Usuda H, Wada K, Shimaoka M. Reduced substrate stiffness promotes M2-like macrophage activation and enhances peroxisome proliferator-activated receptor expression. *Exp Cell Res*. 2018 Jun 15;367(2):264-273.
6. Yoshida K, Akita N, Okamoto T, Asanuma K, Uchida A, Sudo A, Shimaoka M, Suzuki K, Hayashi T. Activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor, protease-activated receptor-1, sphingosine 1-phosphate receptor, and apolipoprotein E receptor 2. *Thromb Res*. 2018 Mar;163:30-40.

7. Okamoto T, Suzuki K.  
The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell-Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation.  
Int J Mol Sci. 2017 Oct 27;18(11). pii: E2254.

8. Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Akita N, Hayashi T, Park EJ, Suzuki K, Shimaoka M.  
Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness.  
2017 Jul 21;7(1):6134.

9. Kawamoto E, Okamoto T, Takagi Y, Honda G, Suzuki K, Imai H, Shimaoka M.  
LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin.  
Biochem Biophys Res Commun. 2016 May 13;473(4):1005-1012.

10. 岡本貴行、鈴木宏治  
凝固制御機序 (徹底ガイド DIC のすべて)  
救急・集中治療. Vol. 30 臨時増刊号. 48-54, 2018

11. 岡本貴行  
インテグリンとトロポモジュリン (特集 トロポモジュリンをめぐる最近の話題).  
Thrombosis medicine 7:176-182. 2017

12. 岡本貴行  
ギャップジャンクションと血管内皮機能  
膜 (MEMBRANE), 41 (2), 61-67, 2016

〔学会発表〕(計 21 件)

国際学会

1. Okamoto, T., Kawamoto, E., Shimaoka, M., Usuda, H., Wada, K.  
Endothelial cell reduces gap junction intercellular communication and increases cellular stiffness upon inflammation  
World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018, Kyoto

2. Tanaka, T., Asano, S., Niibayashi, T., Usuda, H. Okamoto, T. and Wada, K.  
Histological detection of mmcp-4 expressing cells by in situ RT-PCR method.  
World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018, Kyoto

3. Usuda H., Niibayashi T., Tanaka T., Okamoto T. and Wada K.  
Novel method for evaluating leaky gut syndrome induced by NSAIDs/PPI and ischemia with health food-derived reagents.  
World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018, Kyoto

国内シンポジウム

4. 和田孝一郎、臼田春樹、田中徹也、岡本貴行  
iPad を用いた動物実習シミュレーターの活用と今後の薬理学実習  
第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 大阪

5. 岡本貴行、臼田春樹、田中徹也、和田孝一郎  
血栓形成における血管内皮細胞の硬さの役割 (シンポジウム 『多面的研究で迫る血栓症の病態生理』)  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

6. 臼田春樹、新林友美、Kaji Hossain Helal、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、三島義之、石原俊治、和田孝一郎  
Leakygut syndrome の病態解明を目的とした腸粘膜のバリア低下を呈する動物 モデルの作製と新規診断法の確立 (シンポジウム 『新局面を迎える消化管研究の最前線』)  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

国内学会

7. 臼田春樹、松浦良二、郡司位秀、大町健介、佐々木良二、前田憲邦、藤江徹、朝比奈圭、澄川裕之、鐘築剛、三上隆浩、中村元裕、比良田和典、田中雅彦、齋藤誠、田中延仁、青木誠、吉川浩郎、佐原美鈴、新林友美、Kazi Helal Hossain、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎、富永一道、並河徹、渡辺公人

島根県各地域における口腔内高病原性細菌の保菌状況  
第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 大阪

8. 岡本貴行、臼田春樹、田中徹也、和田孝一郎  
ギャップ結合の阻害は血管内皮細胞の硬化を誘導する  
第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 大阪

9. 岡本貴行、臼田春樹、田中徹也、和田孝一郎  
炎症時における血管内皮細胞の硬さ変化と単球接着における細胞の硬さの役割  
第 71 回日本薬理学会西南部会 2018 年 11 月 福岡

10. 田中徹也、浅野哲、新林友美、臼田春樹、岡本貴行、和田孝一郎  
in situ RT-PCR 法を用いた mmcp-4 発現マスト細胞の組織学的検出  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

11. 臼田春樹、新林友美、Kaji Hossain Helal、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎  
腸粘膜バリアの機能低下を評価する新規試薬の開発  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

12. 前田憲邦、郡司位秀、大町健介、松浦良二、佐々木良二、藤江徹、朝比奈圭、澄川裕之、鐘築剛、三上隆浩、中村元裕、比良田和典、田中雅彦、齋藤誠、田中延仁、青木誠、吉川浩郎、佐原美鈴、臼田春樹、新林友美、Kazi Helal Hossain、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎、富永一道、並河徹、渡邊公人  
P.gingivalis の島根県各地域における保菌状況  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

13. 松浦良二、郡司位秀、大町健介、佐々木良二、前田憲邦、藤江徹、朝比奈圭、澄川裕之、鐘築剛、三上隆浩、中村元裕、比良田和典、田中雅彦、齋藤誠、田中延仁、青木誠、吉川浩郎、佐原美鈴、臼田春樹、新林友美、Kazi Helal Hossain、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎、富永一道、並河徹、渡邊 公人  
島根県各地域における口腔内高病原性細菌の保菌状況  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

14. Jahan, I.、Okamoto, T.、Usuda, H.、Tanaka, T. and Wada, K.  
Functional role of nonalcoholic fatty liver disease associated microRNAs in adipocyte differentiation.  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

15. 岡本貴行、臼田春樹、田中徹也、和田孝一郎  
血管内皮細胞の活性化におけるギャップ結合の役割  
第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月、松江

16. 岡本貴行、川本英嗣、臼田春樹、本田剛一、和田孝一郎、鈴木宏治、島岡要  
炎症時の血管内皮細胞の硬化にリコモジュリンが及ぼす影響の解析  
第 40 回日本血栓止血学会学術集会、2018 年 6 月 札幌

17. 鈴木宏治、秋田展幸、岡本貴行、西岡淳二、林辰弥  
海藻アオサ(ヒトエグサ)由来ラムナン硫酸の抗血栓・血管内皮保護・抗腫瘍作用の検討  
第 40 回日本血栓止血学会学術集会、2018 年 6 月 札幌

18. 岡本貴行、川本英嗣、和田孝一郎、鈴木宏治、島岡要  
炎症時における血管内皮細胞の硬化とその役割の解析  
第 25 回日本血管生物医学会学術集会、2017 年 12 月 大阪

19. 岡本貴行、川本英嗣、秋田展幸、林辰弥、臼田春樹、和田孝一郎、鈴木宏治、島岡要  
血管内皮細胞の硬さが単球の接着に及ぼす影響の解析  
第 39 回日本血栓止血学会学術集会、2017 年 6 月 名古屋

20. 秋田展幸、岡本貴行、西岡淳二、鈴木宏治、林辰弥  
MEK 依存性の肝細胞における肝細胞増殖因子によるプロテイン C インヒビターの発現低下は ERK を介さない  
第 39 回日本血栓止血学会学術集会、2017 年 6 月 名古屋

21. 岡本貴行、川本英嗣、秋田展幸、林辰弥、鈴木宏治、島岡要  
マクロファージの分化における細胞外基質の硬さの影響  
第 38 回日本血栓止血学会学術集会、2016 年 6 月 奈良

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 宏治

ローマ字氏名：(Suzuki, Koji)

研究協力者氏名：島岡 要

ローマ字氏名：(Shimaoka, Motomu)

研究協力者氏名：川本 英嗣

ローマ字氏名：(Kawamoto, Eiji)

研究協力者氏名：新林 友美

ローマ字氏名：(Niibayashi, Tomomi)

研究協力者氏名：臼田 春樹

ローマ字氏名：(Usuda, Haruki)

研究協力者氏名：田中 徹也

ローマ字氏名：(Tanaka, Tetsuya)

研究協力者氏名：和田 孝一郎

ローマ字氏名：(Wada, Koichiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。