

平成 21 年 6 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006-2008

課題番号：18300156

研究課題名（和文） 動脈硬化病変の発症と局在化機構のフィジオーム解析

研究課題名（英文） Physiome analysis on arteriosclerosis appearance and localized mechanism

研究代表者

遠藤 恒介（ENDO KOSUKE）

川崎医科大学 医学部 助教

研究者番号 00350463

研究成果の概要：

（1）動脈硬化初期における単球-内皮細胞相互作用の解析 収縮型の血管平滑筋細胞では、**stress fiber** が非常に発達しており、**IL-1 β** 刺激により細胞は軟化した。これは、動脈硬化病巣において炎症性メディエーターが脱分化を引き起こす可能性を示唆している。

（2）運動と食餌制限の動脈硬化予防効果 運動により動脈硬化のリスクは軽減でき、同時に運動は生体のレドックス機構にダイナミックに影響を与えることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

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：バイオメカニクス 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、脳梗塞等の動脈硬化に起因する疾患は、本邦の死因別死亡の半数を超える現状にあり、さらに急速に進展しつつある高齢化社会においてますます増大する傾向にあるので、その原因解明と診断、治療、予防法の開発は、極めて重大な社会的要請を受ける医学的課題となっている。動脈硬化は長い年月を経て発生する複雑な病変であって、その病態には各臓器に特有の変化があるが、動脈硬化病変発症の初期過程は共通のものと考え

えられる。また、病理学的検討により動脈硬化病変は動脈の湾局部および分岐部に局在化することが認められるが、この動脈硬化病変の局在化も共通のものと考えられる。本研究は、臓器特異的な動脈硬化の病態ではなく、動脈硬化に共通の動脈硬化病変発症の初期過程と動脈硬化病変の局在化機構の一端を解明することを目的とする。

動脈硬化に関する研究は、脂質の代謝、受容体等の分子生物学的検討および種々の分子の病変部における発現等の病理学的検討

等が広範に行われている。しかし、動脈硬化病変発生が一番最初の過程である単球の内皮下への浸潤についてその本質である単球の動きをマイクロメカニクスの視点から解析した研究は極めて少ない。また、血圧、血液成分は全身の動脈いずれにおいても同一であるにも関わらず動脈硬化病変は血管の湾局部、分岐部に局在化することが知られている。その原因として動脈局所で大きく異なる局所血流の関与を示唆する結果が報告されているが、局所血流と動脈硬化病変の発生を結びつける機構についてはほとんど知られていない。

動脈硬化は、分子レベルの異常から細胞レベル、マクロの異常まで階層的、統合的に病変が発生する。生体の階層的、統合的、定量的解析はフィジオームプロジェクトと呼ばれ、ポストゲノムの重要な科学上の動きである。本研究では、ナノモーションから細胞、臓器と階層的、定量的、総合的に動脈硬化病変の発生初期過程と局在化機構の解明をめざす。それを象徴的に示すため、課題名を「動脈硬化病変の発症初期過程と局在化機構のフィジオーム解析」とした。

2. 研究の目的

本研究は、大きく 2 系統の実験から構成される。まず、培養内皮細胞系において「(1) 単球接着が内皮細胞のナノスケールの動きとマイクロメカニクス (粘弾性) に及ぼす影響と、(2) 単球の内皮下への浸潤動態に及ぼす影響」が酸化 LDL によりいかに変化するかを解明する。次に、丸ごとのラットにおいて、「(1) 動脈内皮細胞による一酸化窒素 (NO) およびスーパーオキシド (SO) の産生量ならびに NO と SO 産生酵素の分布、(2) 心臓、腎臓、肝臓、大動脈等の臓器による SO と NO の産生量」が動脈硬化危険因子 (高血圧、高コレステロール血症、非運動) によりいかに影響されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

3. 1 培養内皮細胞と単球の相互作用

ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) を ECIS (electric cell-substrate impedance sensing system) の電極測定部に培養して単層になって後、IL1 β で前処理した。新鮮血より単核球 (単球とリンパ球) を分離し、CD14 を標的として磁気ビーズ法で単球のみを分離し、刺激された ECIS 測定電極の培養内皮細胞と共培養し、内皮細胞と内皮細胞間の間隙および内皮細胞と基質間の距離を各々連続計測を行った。これを対照条件と酸化 LDL 存在下の両条件下で行い、酸化 LDL の影響を解析した。

HUVEC を培養して単層になって後、IL1

β で前処理する。前述したように単球を分離し、HUVEC と共培養した。原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) により、内皮細胞の弾性を求めた。以上の実験を酸化 LDL の培養液中存在下と非存在下に行って、酸化 LDL の役割を検討した。

また、薄い (50 マイクロメートル程度) コラーゲンを塗布、乾燥させたシャーレに HUVEC を培養して単層になった時点 (血管壁のモデル) で実験を行った。内皮細胞と単球は、波長の異なる蛍光を発する Q dot Tracker で前もって標識しておき、培養内皮細胞を IL1 β で刺激した後、単球を加えて、多光子レーザ走査共焦点顕微鏡により観察した。その際に、酸化 LDL を添加し、単球の内皮下浸潤動態へ及ぼす影響を 3 次元経時的に解析した。

3. 2 運動による動脈硬化予防効果

食餌および水を自由量摂取させながら水泳運動を行った。水泳運動は設備が簡単で安価なため一般的によく用いられる運動方法である。また、ラットは元々泳ぎが得意で、37°C で 48 時間以上泳ぐことができるものもいる。水温 37°C での 1 時間のスイミングはヒトではジョギング程度に相当し、有効な有酸素運動である。

実験は、運動がストレスとならないよう 1 週間の pre-exercise を行った後、8 週齢で開始した。また、寒冷ストレスを取り除く為、37~38.5°C に設定した温水を用いた。Pre-exercise は、水量と運動時間を段階的に増やしていき、最終的に液面 1 m²、水深 37 cm の温水プールで 60 分間泳ぐことができるように設定した。

1 日 60 分、週 5 日の水泳を、0、2、4、6、8 週間の各期間につき 10 匹ずつ、合計 50 匹に負荷した。また感染予防の為、排泄物を網でこまめに取り除き、溺れないように注意深く監視した。終了後はスイムタオルを使用して身体を拭いてからケージに戻し、通常飼育した。実施期間中 1 週おきに体重を測定し、2 週おきに血圧測定・血液採取し、血清中の総コレステロール量、HDL 量、トリグリセライド量、総タンパク量を調べた。実験プロトコルの最後に臓器中の NOx 産生量と superoxide 量、SOD 活性を測定した。

運動負荷終了後のラットを用い、動脈系を圧灌流固定し、DAF-2DA により NO を、dihydroethidium により superoxide をそれぞれ標識した。その後、大動脈-腎動脈分岐部を摘出して、多光子レーザ走査共焦点顕微鏡にて、動脈硬化病変の好発部位である分岐部頭側、中等度好発部位である分岐部尾側、非好発部位である腎動脈末梢部、大動脈を観察した。また、心臓、腎臓、肝臓を摘出・破碎後、超遠心上清をサンプル溶液とした。

NOx量はさらにMetOH処理を施してから酸化窒素分析システム (EICOM)にて測定した。Superoxide量はMPEC(ATTO)を用いた化学発光法にて測定した。SOD活性はSOD Assay Kit - WST (DOJINDO)、タンパク定量はProtein Assay Rapid Kit (wako)を用いてそれぞれ測定した。

4. 研究成果

4. 1 培養内皮細胞と単球の相互作用

動脈硬化病巣では血管平滑筋細胞の形質変換(脱分化;収縮型→合成型)が起こり、プラーク形成に寄与することが知られている。合成型,収縮型の細胞を維持し、それらの物性の違いについて検討した結果、細胞の物理的硬さ(弾性率)の定量評価が可能な原子間力顕微鏡を用いた計測では、合成型の細胞は収縮型に比べて有意に軟らかく、収縮型の細胞にIL-1 β 刺激を加えると合成型の如くに軟らかくなった。収縮型ではalpha smooth muscle actinの発現が豊富でstress fiberが非常に発達しているのに対し、合成型では細胞質全体に弱く発現しており、このことが前述の硬さの違いに影響していると考えられる。IL-1 β 刺激による細胞の軟化は、動脈硬化病巣において炎症性メディエーターが脱分化を引き起こす可能性を示唆している。

また、単球の内皮下浸潤動態の解析では、動脈硬化の主要促進因子である酸化LDLが内皮細胞間隙分子の発現を制御することにより(PECAM-1増加、VE-cadherin減少)、単球の内皮下浸潤の開始を促進することを明らかにした。さらに、内皮細胞を予め最適条件のPECAM-1抗体で処理しておくこと、酸化LDLによる単球の浸潤開始促進作用が有意に抑制され、前述の酸化LDLによるPECAM-1増加が単球浸潤促進の機序であることが確認された。

4. 2 運動による動脈硬化予防効果

局所血管部位の内皮細胞内の酸化ストレス度は血管部位、運動による明白な際は見いだせなかった。

しかし、運動により、体重、血中コレステロールなど、いくつかの動脈硬化リスク項目は減少傾向を示した。運動負荷期間8週のラットにおいて、肝臓のsuperoxide活性が著しく上昇した。これに対し、血中ではNOの増加が認められており、それにより血圧の上昇が抑制されていると考えられる。SODについては、早期の活性上昇は認められたが、慢性的な運動負荷により活性の増加は認められなくなった。以上の結果より、運動により動脈硬化のリスクは軽減でき、同時に運動は生体のレドックス機構にダイナミックに影響を与えることが示唆された。

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 25 件)

N. Kataoka, K. Hashimoto, S. Kudo, R. Yamaguchi, K. Tsujioka and F. Kajiya, "Intracellular Ca²⁺ Responses and Its Propagation in Cultured Endothelial Cells to Mechanical Stimulation by Laser Tweezers", *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol.3 No.2, pp. 116-123, 2008, 査読有

M. R. Williams*, N. Kataoka*, Y. Sakurai, C. M. Powers, S. Eskin and L. V. McIntire (*contributed equally), "Gene Expression Analysis of Endothelial Cells due to Interleukin-1 Beta Stimulation and Neutrophil Transmigration", *Endothelium*, Vol. 15 Issue 1, pp. 73-84, 2008, 査読有

K. Hashimoto, N. Kataoka, K. Nakamura, K. Tsujioka and F. Kajiya, "Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions", *Atherosclerosis*, 194(2):e9-17, 116-123, 2007, 査読有

[学会発表] (計 33 件)

N. Kataoka, "Local Dynamic Recruitment of Endothelial PECAM-1 to Transmigrating Monocytes", The 13th International Conference on Biomedical Engineering, 2008年12月, Singapore

望月 精一, "NO センサによる生体内 NO の計測", 第 46 回日本人工臓器学会, 2008 年 11 月, 東京

氷見 直之, "単球接着による血管内皮細胞膜電流の経時変化~patch clamp 法を用いた測定", 第 40 回化学工学会秋季大会, 2008 年 9 月, 仙台

橋本 謙, "細胞間隙経由の単球の内皮下浸潤における内皮細胞 PECAM-1 の単球近傍への局所集積", 第 47 回日本生体医工学学会大会 2008 年 5 月, 神戸

遠藤 恒介, "循環器系におけるスーパーオ

キサイド計測”, 第47回日本生体医工学会大会, 2008年5月, 神戸

[図書] (計1件)

片岡 則之, 日本機械学会, 「機械工学便覧β 8 生体工学」 2.1.5 細胞生物学的方法, pp. 36-40, 2007, 総ページ数 229

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 恒介 (ENDO KOSUKE)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00350463

(2) 研究分担者

橋本 謙 (HASHIMOTO KEN)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80341080

氷見 直之 (HIMI NAOYUKI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70412161

(3) 連携研究者

望月 精一 (MOCHIZUKI SEIICHI)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号: 60259596

片岡 則之 (KATAOKA NORIYUKI)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教

授

研究者番号: 20250681