

平成21年 5月 12日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790229

研究課題名（和文）血管内皮細胞におけるコネクシン32の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of gap junction protein connexin32  
in endothelial cells

研究代表者 岡本 貴行 (Takayuki Okamoto)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30378286

## 研究成果の概要：

血管内皮細胞の機能障害は慢性的な炎症や血液凝固の活性化を生じ、炎症性の血管病変の形成から動脈硬化の発症を誘発すると考えられている。本研究では細胞間の結合と情報伝達を行うギャップ結合を構成する蛋白質である Connexin(Cx)32 が内皮細胞の機能に及ぼす影響を解析した。その結果、内皮細胞での Cx32 の発現量は炎症時に減少すること、また Cx32 の減少が内皮細胞での炎症と血液凝固を亢進する可能性を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：血管生物学、血栓止血病態学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：血管内皮細胞、ギャップ結合、コネクシン、炎症、血液凝固、血管内皮障害、炎症性血管病変、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化に加え、食生活の欧米化、運動不足、ストレスなどを原因とする生活習慣病の蔓延に伴い、心筋梗塞や脳梗塞、静脈血栓症などの血管障害性疾患が増加している。こうした疾患では梗塞部位の周辺臓器に障害を生じ、長期の治療と介護を必要とする。そのため、患者の Quality of Life (QOL) の改善、家族の身体的・経済的負担の軽減の点からも、適切な診断法や治療法の開発が早急に解決すべき医学的、社会的課題となっている。

る。

血管障害性疾患の基盤には血管内皮の慢性的な炎症と血液凝固能の亢進から生じる炎症性血管病変が存在する。現在、この炎症性血管病変の適切な診断法や治療法は無く、血管内皮を障害から保護し、修復・再生させる分子機構の解明とその治療応用が重要であると考えられる。それらの開発には、正常な血管内皮が持つ抗血栓機構と、その破綻の分子機構の解明が不可欠である。

血管の発生分化を始め、腫瘍における血管

新生のメカニズムさらには血管リモデリングや動脈硬化発症の分子機構が徐々に明らかになり、こうした現象に関わる遺伝子が同定されつつある。最近、血管内皮細胞間のギャップ結合が、心血管イベント(不整脈、動脈硬化、心筋梗塞など)の発生に関わることが報告された。ギャップ結合は隣接する細胞質間を連結し、小分子の物質輸送を行うチャンネルである。この結合はConnexin(Cx)蛋白質で構成されており、血管内皮ではCx37、Cx40、Cx43の発現が報告されている。遺伝子多型解析や疾患モデル動物解析の結果、これら遺伝子の変異や機能不全は心血管イベントおよび高血圧、糖尿病の発症を促進することが示唆されている。しかし、炎症や血液凝固などの血管内皮機能の調節におけるこれらCx遺伝子の役割と、遺伝子が疾患の発症過程にどのように関わるかは明らかではない。

これまでに私が内皮細胞に発現することを同定したCx32はシュワン細胞や肝細胞で発現しており、その機能不全は、末梢神経障害や自然発生肝癌の発症を増加することが知られている。しかし、Cx32の血管での機能や炎症性血管障害の発症との関わりは明らかでない。こうした背景から、本研究ではCx32を介するギャップ結合が正常な血管内皮細胞の機能維持と血管内皮障害の形成に及ぼす影響を解明した。

## 2. 研究の目的

私はこれまでに独自に開発したファージディスプレイ法を用いて血管内皮細胞の機能を制御する新規分子を探索し、ギャップ結合を形成するコネクシン(Connexin: Cx)32が血管内皮細胞に発現することを発見した。ヒトには約20種類のCx分子の存在が知られており、血管内皮細胞に発現するCx37、Cx40、Cx43は、心筋梗塞や動脈硬化の発症に関わることが示唆されている。しかし、ギャップ結合を介する細胞間相互作用が、血管内皮の機能維持とその病態形成に及ぼす影響はほとんど明らかでない。Cx32を介したギャップ結合が血管内皮の機能と炎症と血液凝固の病的活性化による病態形成に及ぼす影響を解明することは、血管内皮障害が関与する病態の分子機構の解明と、その診断法・治療法の開発に重要である。そのため、本研究では各種血管内皮細胞でのCx32の発現について調べ、炎症や血液凝固亢進時の血管内皮細胞におけるCx32の発現量の変化を明らかにする。次にCx32強制発現細胞やRNA干渉を利用してCx32ノックダウン細胞を作製し、血管内皮機能(炎症と血液凝固、血管透過性)に与える影響を解析する。また、*in vivo*においても、Cx32欠損マウスを用いて炎症や血液凝固活性化時における反応性(サイトカイン分泌、

血液凝固)の違いや動脈硬化症モデルマウスの動脈硬化病変部位におけるCx32の発現変動を検討する。さらには、ギャップ結合を介して隣接する細胞に生じる物質変化、細胞内シグナル伝達の解析を行い、Cx32による血管内皮の機能調節や血管障害性疾患発症の分子メカニズムの解明を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種血管内皮細胞でのCx32の発現

ヒト大動脈血管内皮細胞(HAECs)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)などの動脈系、静脈系由来の血管内皮細胞を培養し、それぞれの細胞からmRNAと蛋白質を回収した。Cx32 mRNAの発現をRT-PCR法で、蛋白質はウェスタンブロット法で検出した。また、培養細胞内におけるCx32の局在を免疫蛍光染色にて調べ、動脈系、静脈系由来の血管内皮細胞間での違いを検討した。

### (2) 炎症、血液凝固亢進時における血管内皮でのCx32発現量及び機能変化

HAECs、HUVECsなど血管内皮細胞にTumornecrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Lipopolysaccharide (LPS)、Interleukin-1 $\beta$ 、トロンビンによる炎症性刺激、血液凝固活性化刺激を与え、細胞が発現するCx32の遺伝子量を定量的PCR法で調べ、蛋白質量はウェスタンブロット法で調べた。

### (3) Cx32が血管内皮機能(サイトカイン分泌、血液凝固活性化)に与える影響

Cx32発現遺伝子を導入して作製した強制発現内皮細胞やギャップ結合阻害剤処理した培養内皮細胞に各種刺激を加え、培養上清中に分泌されるサイトカインは免疫酵素測定法で測定し、組織因子の発現は基質分解活性を指標に測定して血管内皮機能にCx32によるギャップ結合が与える影響を解析した。また、それぞれのmRNAの発現は定量的PCR法で調べた。

### (4) Cx32の血管透過性に与える影響

血管の透過性調節は、ギャップ結合阻害剤を処理したHUVECsをインターセルの上層に培養し、蛍光色素で標識したデキストラン硫酸の透過率を指標に測定し、ギャップ結合と血管透過性の関連を解析した。

### (5) 血栓症、動脈硬化症疾患モデルマウスの解析

Cx32欠損マウスを用いてLPS誘発エンドトキセミアモデルや血栓症モデルを作製し、各種血中サイトカイン濃度や血栓形成、血管病変の病理切片(血管形態観察、浸潤している細胞数)などについて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種血管内皮細胞での Cx32 の発現

HAECs、HUVECs、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAECs)、微小血管内皮細胞 (HMVECs) で Cx32 mRNA (図 1A) と蛋白質 (図 1B) が発現していることを明らかにした。これらの細胞における Cx32 蛋白質の局在を明らかにした。

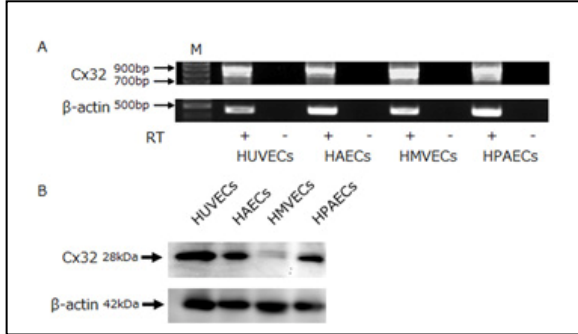


図 1 内皮細胞における Cx32 の発現

##### (2) 炎症、血液凝固亢進時における血管内皮での Cx32 発現量及び機能変化

HUVECs に TNF- $\alpha$ 、LPS、Interleukin (IL)-1 $\beta$  による刺激を与え、TNF- $\alpha$  刺激によって Cx32 の mRNA と蛋白質の発現量が減少することを明らかにした (図 2)。他の刺激によって Cx32 の発現量は顕著な変化を認めなかった。

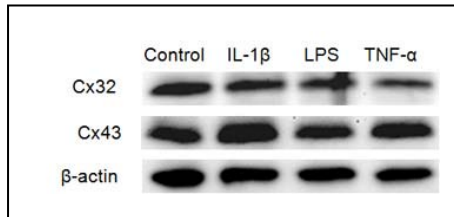


図 2 炎症、血液凝固亢進時における血管内皮での Cx32 発現量

##### (3) Cx32 が血管内皮機能 (サイトカイン分泌、血液凝固活性化) に与える影響

Cx32 発現遺伝子を導入して作製した強制発現 HUVECs は TNF- $\alpha$  で誘導される IL-6、ヒト単球走化活性因子 (MCP-1) の発現がコントロール遺伝子導入 HUVECs と比較して抑制された (図 3A)。ギャップ結合阻害剤処理した HUVECs では未処理の HUVECs と比較して TNF- $\alpha$  で誘導される IL-6、MCP-1 の発現が亢進し (図 3B)、また組織因子の発現も亢進していることを明らかにした。

##### (4) Cx32 の血管透過性に与える影響

ギャップ結合阻害剤を処理した HUVECs では未処理の HUVECs と比較して血管透過性が亢進している傾向を示した。

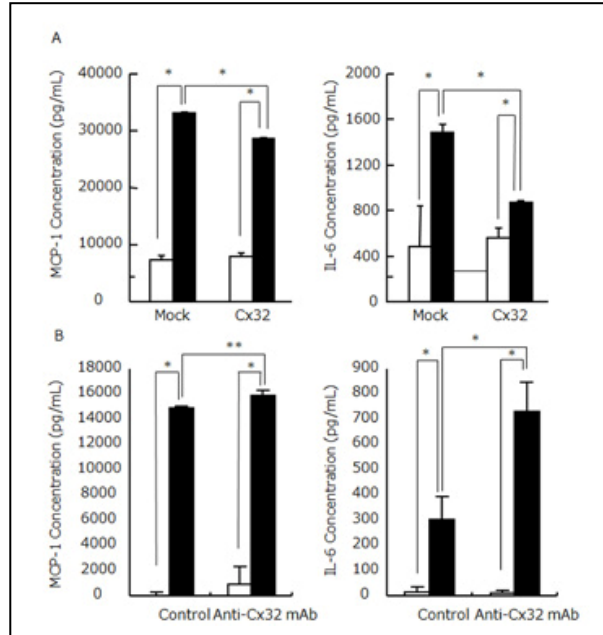


図 3 Cx32 がサイトカイン分泌に与える影響

##### (5) 血栓症、動脈硬化症疾患モデルマウスの解析

Cx32 欠損マウスでは LPS 誘発エンドトキセミアモデルで上昇する血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、インターフェロン  $\gamma$  濃度が、野生型マウスと比較して上昇していた。

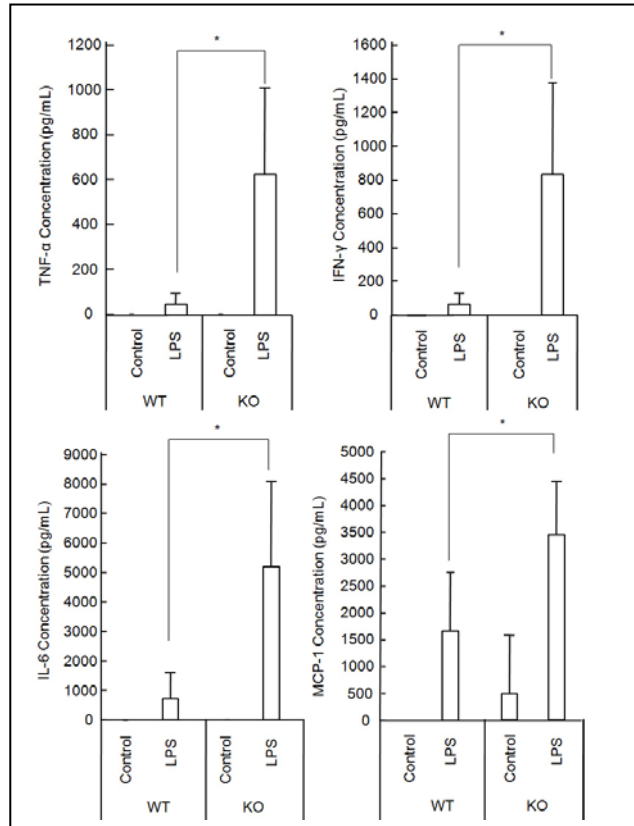


図 4 Cx32 欠損マウスでの LPS 誘発サイトカインの分泌

本研究で得られた成果は内皮細胞で Cx32 が発現することを初めて示したものである。また、この Cx32 の発現低下や機能障害が内皮細胞の炎症や血液凝固を亢進すること、Cx32 欠損マウスでは LPS 誘導される炎症が亢進することを明らかにした。ギャップ結合が血管内皮細胞での炎症や血液凝固を制御していることを示す報告はなく、国内外を問わず学術的価値に優れていると考えられる。今後は、血管内皮細胞に発現する Cx 遺伝子 (Cx32、Cx37、Cx40、Cx43) が、炎症と血液凝固の亢進状態から病態形成に至る様々な過程に及ぼす影響の解析、血管平滑筋細胞や各種白血球が発現する Cx 遺伝子と病態の関連を包括的に解明する予定である (図 5)。

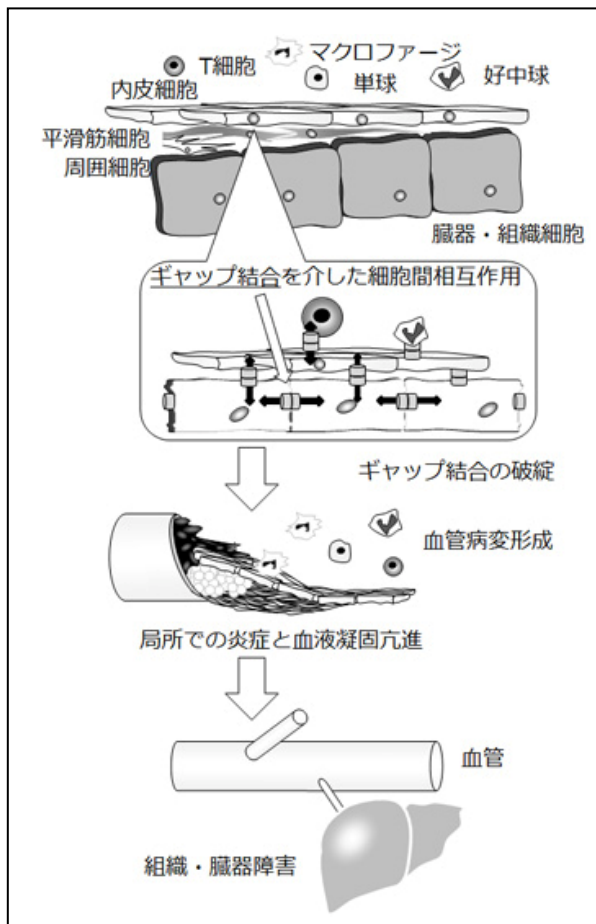


図 5 ギャップ結合と血管障害性疾患

将来的に本研究は、血管の発生や分化、血管内皮の炎症、血液凝固、血管新生、動脈硬化、血管リモデリングをはじめとする血管内皮機能の維持と破綻の分子機構の理解と関連する疾患の診断法や治療法の開発に有益な情報を提供してくれるものと期待される。

## 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 6 件)

1. Okamoto T, Akiyama M, Takeda M, Gabazza EC, Hayashi T, Suzuki K. Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 May 1;382(2):264-8. 査読有

2. Kishiwada M, Hayashi T, Yuasa H, Fujii K, Nishioka J, Akita N, Tanaka H, Ido M, Okamoto T, Gabazza EC, Isaji S, Suzuki K. Regulatory mechanisms of C4b-binding protein (C4BP) alpha and beta expression in rat hepatocytes by lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Thromb Haemost*. 2008 Nov;6(11):1858-67. 査読有

3. Nomura T, Kawamura M, Shibata H, Abe Y, Ohkawa A, Mukai Y, Sugita T, Imai S, Nagano K, Okamoto T, Tsutsumi Y, Kamada H, Nakagawa S, Tsunoda S. Creation of a novel cell penetrating peptide, using a random 18mer peptides library. *Die Pharmazie*. 2007 Aug;62(8):569-73. 査読有

4. 岡本貴行、鈴木宏治 血小板と血液凝固のクロストーク *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 2009 35(3):90-93 査読無

5. 岡本貴行、宋振虎、鈴木宏治 静脈血栓症の発症機序 *International Review of Thrombosis* 2008 3(Suppl.) 106-110 査読無

6. 鈴木宏治、岡本貴行、宋振虎 止血因子と PARs *Annual Review 血液* 2008 238-250 査読無

[学会発表] (計 7 件)

1. 岡本貴行、市川翔子、長岡伸征、林辰弥、鈴木宏治 培養ヒト血管内皮細胞及びマウス血管内皮は Cx32 を発現する 第 7 回コネクシン研究会 2008 年 12 月 19 日 京都市

2. 岡本貴行、林辰弥、鈴木宏治 障害血管内皮細胞での組織因子発現における細胞間ギャップ結合の役割 第 81 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 10 日 神戸市

3. 岡本貴行、林辰弥、鈴木宏治 血管内皮細胞の機能制御における内皮細胞間ギャップ

プ結合の役割 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 2008 年 11 月 22 日 大阪市

4. 岡本貴行、秋山真理、ガバザエステバン、林辰弥、鈴木宏治 血管内皮細胞間ギャップ結合による組織因子の発現制御に関する研究 第 80 回日本生化学会大会 2007 年 12 月 13 日 横浜市

5. 岡本貴行、秋山真理、ガバザエステバン、林辰弥、鈴木宏治 血管内皮機能に及ぼす細胞間ギャップ結合の影響 第 15 回日本血管生物医学会学術大会 2007 年 11 月 29 日 福岡市

6. 岡本貴行、ガバザエステバン、林辰弥、鈴木宏治 ギャップ結合が組織因子発現に及ぼす影響の解析 第 30 回 日本血栓止血学会学術集会 2007 年 11 月 17 日 志摩市

7. Takayuki Okamoto, Mari Akiyama, Mariko Takeda, Esteban C. Gabazza, Tatsuya Hayashi and Koji Suzuki Connexin32 regulate inflammatory process on endothelial cells through modulation of cytokine expression. International Gap junction Conference 2007 年 8 月 6 日 コペンハーゲン

〔図書〕(計 3 件)

1. 岡本貴行、鈴木宏治 日本医事新報社、血漿蛋白質の種類と機能 よくわかる病態生理 5 血液疾患 107-109 2007 年

2. 岡本貴行、鈴木宏治 日本医事新報社、血栓傾向 よくわかる病態生理 5 血液疾患 110-114 2007 年

3. 岡本貴行、鈴木宏治 金芳堂 遺伝子改変疾患モデル動物の紹介と購入先 血栓症・動脈硬化モデル動物作製法 291-304 2007 年

〔その他〕

研究室ホームページ情報

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/molpath/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 貴行 (Takayuki Okamoto)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30378286

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者