

機関番号：35309

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500402

研究課題名 (和文) 浸潤過程にある白血球中の構造タンパク・情報伝達分子挙動の実時間挙動解析

研究課題名 (英文) Real time and in situ observation of actin structure in migrating leukocyte

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、動脈硬化発生メカニズムの解明を念頭に、白血球遊走時の細胞骨格ならびに情報伝達分子の可視化を試みた。まずは、株化細胞を用いた実験系の構築を行った。細胞としては THP-1、遊走因子として 1mM の fMLP を用いて遊走を制御する実験系を構築した。アクチンの観察については、新規アクチン結合 Lifeact と snap-tag の融合ベクターを作成し、生細胞でのアクチン観察手法を確立した。また、白血球浸潤には、PECAM-1 が重要な役割を果たし、情報伝達の上流には SHP-2 が支配的であることを確認した。

研究成果の概要 (英文)：

It is well known that one of the critical events in early atherosclerosis is the recruitment of blood monocytes to proatherogenic vascular regions and subsequent transmigration across vascular endothelial cells. It is still unknown how monocytes infiltrate into between and underneath EC monolayer. To elucidate this phenomenon, direct observation of cytoskeletal structure and/or signaling molecules in migrating monocytes under the controlled culture condition is necessary. In this study, we have established the observation system of migration of monocytic cell line induced by chemoattractant from micropipette. We have estimated the migration of HL-60 and THP-1 seeded on gelatin or fibronectin, to fMLP or MCP-1. In our experiments, THP-1 cells seeded on fibronectin actively migrated to the tip of micropipette. fMLP was more effective than MCP-1. In addition, we have found that PECAM-1 in EC is one of the key molecules that controls the leukocytes trans-endothelial migration and SHP-2 exists in the upstream of signaling transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：白血球、内皮細胞、情報伝達、ナノバイオロジー・ナノメディスン

1. 研究開始当初の背景

白血球の内皮細胞への接着、内皮下への浸潤は、炎症を起こした血管部位で生ずる生体防御機構の1つであり、そのプロセスは良く研究されている。複雑な局所血流等の物理的刺戟、あるいはサイトカイン等の化学的刺戟によって内皮細胞が活性化され、VCAM、ICAM、Selectin等の接着タンパク、MCP-1、IL-8等のケモカインの増加が起こり、主にSelectinを介して血流中の白血球が内皮細胞上を緩く接着しながらローリングを起こす(Ross R., N Engl J Med. 1999)。その後、VCAM、ICAMを介して内皮細胞に強固に接着し、一過性に内皮細胞間隙に存在するVE-Cadherinが消失し(Shaw S.K. et al., J. Immunol. 2001)、非常に狭い内皮細胞間隙を通して浸潤していく(K. Hashimoto, N. Kataoka, et al., Atherosclerosis, 2004,)。血管部位によっては、内皮細胞本体を貫通しながら浸潤する白血球も観察されている(Feng D., J Exp Med 1998)。この浸潤の過程で、白血球は非常にダイナミックな挙動を示すため、細胞の遊走という観点から、ストレスファイバーの形成に焦点をあてた研究もなされ、RhoAが単球の浸潤プロセスにおいて重要な役割を担っていることも指摘されている(Honing H., et al., Leukoc Biol. 2004)。しかしながら、白血球が、”いかにして狭い内皮細胞間隙を通過するのか”、“いかにして内皮細胞本体を貫通していくのか”、さらには、“内皮間隙と内皮本体という、浸潤経路の違いは何か”という、疑問には解答が得られていない。

これまで申請者らは、単球の接着によって内皮細胞のアクチン、焦点接着斑の再構築が生じて内皮細胞の変形能低下、すなわち障壁機能の低下を招くこと(Kataoka, et al., Pro. Natl. Aca. Sci. USA, 2002)、また、単球の内皮下浸潤プロセスを3次元実時間で観察する試みも行ってきた(K. Hashimoto, N. Kataoka, et al., Atherosclerosis, 2004)。さらには、酸化LDLや炎症性サイトカインの単球浸潤に及ぼすメカニズムの解明にも取り組んでいる(K. Hashimoto, N. Kataoka, et al., Atherosclerosis, 2007)。しかしながらこれまでの研究では、実際の細胞挙動とタンパク挙動の関連性、時間的に連続した情報が欠如しており、より詳細な病変発生メカニズムの解明、新たな治療・診断法の開発に繋げていくには、これら、細胞機能に関連したタンパク機能・挙動の実時間観察が重要であるとの考えに至った。

いっぽう、動脈硬化発生時には酸化LDLが内皮下に蓄積することが単球の接着・浸潤を誘発することから、我々は以前、酸化LDLの単球浸潤に及ぼす影響を検討した(K. Hashimoto, N. Kataoka, et al., Atherosclerosis, 2007)。その結果、酸化LDLは内皮細胞のPECAM-1の発現増加とVE-Cadherinの発現低下を生じさせて単球浸潤を誘発することが分かった。そこでPECAM-1が単球浸潤における重要な接着分子であると考え、発現増加の意義を詳細に検討した。

2. 研究の目的

本研究では、遊走・浸潤過程にある白血球のアクチンフィラメントに着目し

- 1) 3次元実時間でアクチン挙動を観察するシステムを構築し、
- 2) 同時に、接着タンパクの働き、情報伝達に関わる分子の解析も試み、白血球の浸潤メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本来、単球や好中球は単独では増殖せず、また、1日ないし2日程度しか培養することもできないため、経時的な観察は困難である。いっぽう、遊走する生細胞中の細胞骨格などを観察するにはGFPなどの蛍光タンパクの遺伝子導入を行うことが有効である。そのため、遊走中の白血球の細胞骨格の観察には、株化細胞を用いた実験系の確立が必要である。そこで本研究では、まず、株化白血球細胞にマイクロピペットでケモカインを投与し、制御された環境下で遊走を促す実験システムの確立を目指した。本研究では、アクチンのヒト白血病患者由来の単球系株化細胞THP-1(Japanese of Research Bioresources)と、ヒト前骨髄球性白血病株化細胞HL-60(Japanese of Research Bioresources)を用いた。

培養液として、RPMI-1640にペニシリン(1000単位/ml)、ストレプトマイシン(10 μ g/ml)、ウシ胎児血清(10%)を添加して用いた。

THP-1、HL60ともに継代培養した後、直径35mmの培養ディッシュをゼラチン(0.1%)あるいはフィブロネクチン(培養面積1cm²あたり2 μ g)でコートした。

株化白血球の遊走を促すケモカインとして、fMLP(formyl Methionyl Leucyl Phenylalanine)またはMCP-1を用いた。

倒立位相差顕微鏡（オリンパス IX70）ステージ上のインキュベーター内に培養ディッシュを設置した。ここに、先端径 $4\ \mu\text{m}$ のマイクロピペットをマイクロインジェクターに接続し、3次元油圧マニピレーターにて先端位置をマイクロメーターオーダーで制御できるようにした。細胞の挙動は、画像処理ソフトウェア IP-Lab を用いて顕微鏡に接続したカラーCCDカメラを通して5秒に1枚の割合で1時間（計720枚）撮影し、コンピュータに画像を取り込んだのち、画像ソフト（Image J）を用いて解析を行なった。

ヒト末梢血を採取し、Histopaque（比重：1.077g/mL、Sigma）を用いて単核球（単球、リンパ球）を分離した。分離した単核球分画に単球の特異的表面抗原であるCD14に対する抗体を付着させたマイクロビーズを加えて単球のみを標識し、強磁場に設置された分離カラムを用いて単球のみを分離した。（MACS system, Miltenyi Biotec）。92%以上の細胞がCD14陽性であることを、フローサイトメーター（FACS Calibur, Becton Dickinson）を用いて確認した。

HUVECを $4\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチンでコーティングした、直径35mmガラスボトムディッシュ（中心のカバーガラス直径12mm、日本製）上に播種し、コンフルエントまで培養し、炎症性サイトカインである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約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。画像の取得には、20倍の対物レンズを備えた倒立型顕微鏡（IX70 Olympus）、CCDカメラ、および画像解析ソフトウェア（Lumina Vision）を用いた。浸潤する単球のほとんどが、30~40分以内に浸潤を完了してしまうため、観察は30~40分間行うこととした。

Image J（画像解析ソフト）を使用して、それぞれのstageにおける浸潤率（% transmigration）を評価した。まず、取得した位相差画像からImage Jにより時系列のスタック画像を作成し、所定領域におけるすべての単球の挙動を個々に追跡した。浸潤したかどうかについては、位相差画像上で浸潤した単球は平たくかつ暗く、浸潤しなかった単球は丸くかつ明るく見えるという原理に基づいて識別した。また、どちらのstageでも、対象視野内の滞在時間が10分未満のものや単球以外と思われるもの、凝集塊、視野外か

ら侵入したものは評価の対象から除外した。

IL-1 β で刺激した内皮細胞に単球を添加し、インキュベーター内で最大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。混合細胞サンプル中の単球と内皮細胞は、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。

4. 研究成果

fMLP（1mM）に対するTHP-1とHL-60の遊走能の比較を行った。HL-60はTHP-1と比較するとゼラチンをコートしたディッシュ、フィブロネクチンをコートしたディッシュともにあまり接着せず、かつ、fMLPを充填したマイクロピペットへの遊走は、THP-1の方が顕著であった。

次に、THP-1を用いて培養ディッシュをコートした細胞外マトリックスの影響を検討した。フィブロネクチン、ゼラチン、2種類のコートをしたディッシュ上でTHP-1を培養し、fMLPを充填したマイクロピペットに対する遊走能を比較したところ、動く細胞数はフィブロネクチンでは全体の8.7%、ゼラチンでは24.7%という結果だったが、ピペット先端に向かっていく細胞だけを比較したところ、フィブロネクチンの方は5.8%、ゼラチンの方が2.0%という結果であった。また、MCP-1とfMLPに対するTHP-1の遊走能を比較したところ、fMLPのほうが遊走距離も長く、活発に遊走が起こっていた。マイクロピペットに充填するfMLPの濃度1mM（437.6 \cdot g/ml）、100 μM 、10 μM で比較したところ、100 μM 以下ではほとんど遊走は観察されず、1mM程度の濃度が必要なことが分かった。

以上の結果をもとに、フィブロネクチンをコートしたディッシュにTHP-1を播種して4~5日後、1mMのfMLPを充填した内径 $4\ \mu\text{m}$ のマイクロピペットを用いて遊走を促したところ、Fig. 2に示すようにマイクロピペットの移動に伴ってTHP-1も遊走する実験系を確立した。

アクチン観察については、17個のアミノ酸のみからなるアクチン結合ペプチド、Lifeactの有効性を確認し、さらにLifeactとタンパク質タグであるSnap-tagの融合プラスミドベクターを合成に成功した。現在、これをTHP-1に導入して生きた状態で、かつ遊走中のアクチンダイナミクスについて観察を試みている。

HUVECに30分の間隔において単球を二段階添加 (stage1, 2) し、生きたサンプルにおける全ての単球を追跡する事により、各 satge 個別に浸潤率を算出した結果、浸潤の程度は stage2 ではっきりと 1.5 倍に増加していた。

単球の添加に対する内皮細胞表面にの PECAM-1 と VE-cadherin の発現量を FACS を用いて計測した。単球と内皮細胞はそれぞれの細胞特異的な表面分子マーカーである CD14 と VE-cadherin により、混合した細胞の中でもどれであるか確認する事ができる。単球を内皮細胞上で最大 50 分間培養した結果、内皮細胞表面では PECAM-1 が有意に増加していた。一方、VE-cadherin は有意に減少していた。単球添加を行わなければ、これら各分子の変化は見られなかった。(p=0.59 for PECAM-1, p=0.41 for VE-cadherin.)

一つの浸潤イベントの周囲にある範囲を設定し、(直径約 70µm) その範囲内で、遅れて浸潤した単球のうち 50%が、先に浸潤した単球と同一部位或は類似部位を介して浸潤した事を発見した。

さらに我々は、PECAM-1 の細胞内ドメインに存在するホスファターゼである SHP-1 に着目し、siRNA 導入でその発現を抑えて PECAM-1 の動態観察をしたところ、単球の内皮間隙への凝集が見られなかった。よって、単球の接着から PECAM-1 の増加、さらなる単球浸潤の増加には、情報伝達因子として SHP-1 が大きく関与してい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 3 件)

① K. Hashimoto, N. Kataoka, E. Nakamura, K. Hagihara, M. Hatano, T. Okamoto, H. Kanouchi, Y. Minatogawa, S. Mohri, K. Tsujioka, and F. Kajiya, Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent transmigratory activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions, International Journal of Cardiology, vol. 149 No. 2, pp.232-239, 2011 (査読有り)

② K. Hashimoto, N. Kataoka, E. Nakamura, T. Okamoto, H. Kanouchi, Y. Minatogawa, K. Tsujioka, S. Mohri and F. Kajiya, Experimental Models for Studying Molecular Dynamics of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 and Tubulin during Mechanical Interactions between Monocytes Vascular Endothelial Cells, Journal of Biomechanical Science and Engineering, vol. 5, No. 4, pp.281-290, 2010 (査読有

り)

③ K. Sarai, K. Shikata, Y. Shikata, K. Omori, N. Watanabe, M. Sasaki, S. Nishishita, J. Wada, N. Goda, N. Kataoka and H. Makino, Endothelial Barrier Protective Effect of FTY720 under the Hyperglycemic Condition: Involvement of Focal Adhesion Kinase, Small GTPases and Adherens Junction Proteins, American Journal of Physiology - Cell Physiology, Vol. 297 No. 4, pp. C945-54, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

① 片岡則之、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、2010年9月25日、岡山大学

② Noriyuki Kataoka, Monocyte trans-endothelial migration induces PECAM-1 accumulation and VE-cadherin reduction at the surface of vascular endothelial cells, 6th World Congress on Biomechanics, 2010年8月5日, Singapore Suntec Convention Centre

③ 片岡則之, Experimental Model for Studying Molecular Behavior in Endothelial Cells during Interaction with Monocytes, 第49回日本生体医工学会、2010年6月26日、大阪交流国際センター

④ 橋本謙、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、2010年1月9日、岡山理科大学

⑤ Noriyuki Kataoka, Role of dynamic recruitment of Endothelial PECAM-1 to Transmigrating Monocytes, 第47回日本生物物理学会年会、2009年11月1日、アステイ徳島

⑥ Noriyuki Kataoka, Local Dynamic Recruitment of Endothelial PECAM-1 to Transmigrating Monocytes, The 13th International Conference on Biomedical Engineering, 2008年12月5日、Singapore Suntec Convention Centre

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

立花 博之 (TACHIBANA HIROYUKI)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師
研究者番号：00241216

(3) 研究分担者

梶谷 文彦 (KAJIYA FUMIHIKO)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授
研究者番号：70029114

(4) 研究分担者

平松 修 (HIRAMATSU OSAMU)
川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授
研究者番号：50208849

(5) 連携研究者

橋本 謙 (HASHIMOTO KEN)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：80341080

(6) 連携研究者

辻岡 克彦 (TSUJIOKA KATSUHIKO)
川崎医科大学・医学部・元教授
研究者番号：30163801