

機関番号: 1 1 4 0 1

研究種目: 基盤研究 (C)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20592115

研究課題名(和文) 急性肺障害における血管内皮細胞内 HSP70 の抗炎症作用に関する研究

研究課題名(英文) The role of vascular endothelial HSP70 on acute lung injury

研究代表者

齋藤 元 (SAITO HAJIME)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 20323149

研究成果の概要(和文): 急性肺障害の病態解明のため、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) および heat shock protein (HSP) 抗炎症作用に関し培養細胞を用い検討した。好中球血管外遊走の際、細胞内 F-actin は増加するが、その後の細胞内HSP70増加に伴い F-actin が減少していく抗炎症効果が確認できた。また VASPリン酸化を促進する hydroxyethyl starch (HES) 処置はHSP70抑制剤である quercetin 前処置で抑制された。以上より、HSP 抗炎症作用機序はVASPリン酸化経路の上流に位置することが解明された。

研究成果の概要(英文): The transendothelial migration of neutrophils is a critical step in acute inflammation. In the present study, to estimate the role of heat shock protein (HSP), a transwell chamber migration assay system incorporating endothelial monolayer was used to examine the numbers of migrating neutrophils. The expression of endothelial vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), a protein responsible for controlling the geometry of actin-filament, was also estimated at selected times during the neutrophil migration, in vitro. The results showed that pretreating endothelial cells with hydroxyethyl starch (HES) significantly diminished neutrophil migration, quercetin (HSP70 inhibitor) inhibited the effect of HES on neutrophil transendothelial migration, and VASP phosphorylation normally associated with the inhibition of neutrophil transendothelial migration. These data suggest that endothelial VASP regulate transendothelial neutrophil migration by modulating the cytoskeletal events that associated with upstream HSP70 signal transduction mechanisms.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・救急医学

キーワード: heat shock protein, 急性肺障害, 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

敗血症などに続発する acute respiratory distress syndrome (ARDS) を中心とした急性肺障害 (acute lung injury: ALI) は依然救命率

の低い疾患であり、その機序解明と治療法開発は急務である。近年これらの病因はサイトカインなど炎症性物質の全身波及による急性炎症がその本体である事が明らかになっ

てきた。一方急性炎症における好中球の炎症部位への浸潤には、血管内皮細胞への rolling、adhesion、transmigration といった過程が存在するが、このうち炎症反応の critical step といえる好中球血管外遊走(transmigration) に関しては従来から主に好中球機能を中心に検討されてきた。しかし血管内皮細胞内 signal の second messenger である calcium ion をキレートすると好中球血管外遊走が抑制されることが報告され[Huang AJ, et al. J. Cell. Biol. 120:1371-80, 1993]、以後好中球血管外遊走に先立つ血管内皮細胞の細胞間橋開放については血管内皮細胞情報伝達を介した能動的機能および細胞骨格変化が注目されている。

我々は in vitro の系を使って従来より好中球の血管外遊走時の血管内皮細胞機能を検討しており、好中球が血管外遊走する際に血管内皮細胞の細胞骨格を構成する myosin light chain (MLC) がリン酸化され、このリン酸化を行う myosin light chain kinase (MLCK) の抑制剤で血管内皮細胞を前処置すると好中球の血管外遊走が抑制される事を報告した[Saito H, et al. J. Immunol. 161:1533-40, 1998]。また Rho kinase inhibitor で血管内皮細胞を前処置すると好中球血管外遊走が抑制される事を認め、血管内皮細胞内 MLC リン酸化に引き続き起こる好中球血管外遊走に関して Calcium-calmodulin MLCK dependent pathway の他に Rho pathway も key pathway であるという結果を得、報告した[Saito H, et al. J Leukoc Biol. 72:829-36, 2002]。

ところでこれら急性炎症に伴う好中球血管外遊走モデルでは、我々の得た結果および多くの論文からも好中球血管外遊走は炎症反応後 30 分をピークとして以後漸減する傾向が報告されている。これには何らかの negative regulator として homeostasis を保つ生体反応が関与しているものと思われるが、このメカニズムについては未だ解明されていない。近年、血管内皮細胞の barrier function に関して Protein kinase A (PKA) の downstream signal である vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) に関し negative regulator としての報告がされ[Laurence DW, et al. Am J Physiol Cell Physiol 282:C1235-C45, 2002]、VASP が actin filament に関与し tight junction protein である Zonula occludens (ZO-1) と分布を共有することより、血管内皮細胞の actin-based barrier function つまり血管内皮細胞透過性抑制に関連している可能性が示唆されている。一方、その作用機序は不明なものの homeostasis を保つシャペロン効果として heat shock protein (HSP) 70 には炎症時血管透過性亢進の抑制作用があることが報告され[Suganuma T, et al. J Pharmacol Exp Ther

303:656-63, 2002]、さらに最近 glutamine には HSP70 誘導とそれに続く細胞内 cAMP 増加により肺障害保護作用があることが報告され[Singleton KD, et al. Crit Care Med. 33:1206-13, 2005]、HSP における血管内皮細胞透過性亢進の抑制作用における signal transduction の解明が注目されてきている。

2. 研究の目的

以上の背景と我々の研究結果より、主に炎症反応後に亢進していた血管内皮細胞透過性が漸減していく negative regulator としての抗炎症作用メカニズムの解明を行うべく、key mediator として HSP 70 と VASP リン酸化に着目し以下の仮説を立てた。つまり“好中球が血管外遊走を行う際、血管内皮細胞内情報伝達系が活性化される。そしてその結果 MLCK dependent pathway および MLCK independent pathway (Rho kinase pathway) が活性化され、細胞内情報伝達機構に引き続き生じる血管内皮細胞内細胞骨格変化 (actin-myosin interaction) により血管内皮細胞の収縮が起き、好中球の血管外遊走を制御している (F-actin stress fiber 増量、および細胞辺縁から細胞質全体への分布)。その炎症反応に伴い血管内皮細胞内 heat shock factor 1 (HSF-1) がリン酸化し、HSP70 が誘導、それによる cAMP の上昇と引き続く cAMP-dependent PKA pathway 活性化により VASP リン酸化が好中球血管外遊走より遅延して増強し、bind している profilin や Cdc42 を介して actin redistribution (baseline である F-actin の細胞周辺分布) を誘導、actin 関連 tight junction protein である ZO-1 に作用し細胞間橋の tension を低下させ、血管透過性を低下させる (細胞間橋が閉じる)。結果として一旦ピークに向かった好中球血管外遊走が漸減していく”という仮説を立て、それを証明するため本研究を計画した。本研究により HSP70 および VASP リン酸化が炎症時の好中球血管外遊走の negative regulator としてそのメカニズムが明らかとなれば、HSP70 誘導 および VASP リン酸化を促進することにより、炎症により亢進した血管内皮細胞透過性を抑制する抗炎症作用を発揮すると考えられ、将来的に ALI の治療にも寄与する事が可能になるとと思われる。本研究は現象のみ広く知られている HSP70 抗炎症作用を血管内皮細胞内 VASP リン酸化に関する基礎的研究から明らかとし、さらには ALI 治療薬開発に結びつくメカニズム解明に発展することを目標としている。

3. 研究の方法

HSP70 誘導と VASP リン酸化における血管内皮細胞透過性のメカニズム解明を目的とし、好中球血管外遊走時における血管内

皮細胞細胞骨格変化を中心とした細胞内シグナルに関して検討した。

好中球分離

健康ヒト末梢静脈血より採取した血液は 6% dextran, および Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) による濃度勾配遠心法により好中球を分離し、PMN buffer (PBS with 5mM glucose, pH 7.4) を用い 10^7 PMN/ml とした。

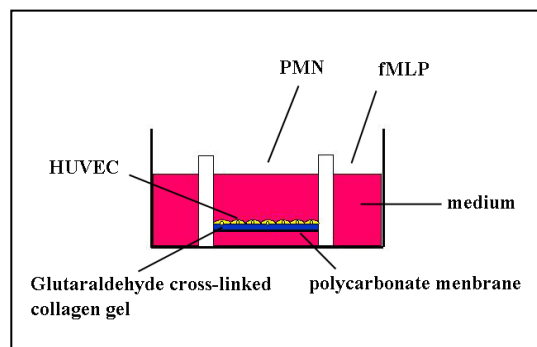
Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) 培養

HUVEC (Dainippon Pharmaceutical Company, Osaka, Japan) は type I collagen (Sigma) で coating された 25cm^2 plastic culture flasks を用い、培養液は M199 (Life Technologies, Grand Island, NY) に終濃度 10% FCS, 100U/ml penicillin G, 100mg/ml streptomycin, 2mg/ml amphotericin B となるよう加え、 37°C , 5% CO_2 , 95% air で培養した。Confluent となった HUVEC は 0.05% trypsin/5mM EDTA (Life Technologies) ではがし 12mm もしくは 30mm transwell culture chamber へ培養する。チャンバーを上下2層に分ける polycarbonate membrane (0.4 μm pore size, Costar, Bedford, MA) は 1% gelatin (/PBS) で 37°C , 30 分間 incubate の後、0.5% glutaraldehyde (/PBS) で 25 分間固定され、PBS で 3 回洗浄、0.1M glycine で incubate、さらに PBS で 3 回洗浄後、M199 培養液中で 1 週間まで保存可能である。collagen matrix gel 上の HUVEC は、通常 1 週間ほどで confluent となり実験に用いることが可能となる。

血管外遊走モデル

HUVEC を培養した前述の上下2層に分かれたチャンバーの上室に分離ヒト好中球 (10^7 PMN/ml) を添加し (PMN-to-EC ratio 10:1)、下室に走化性因子として fMLP (10^{-6}M) を投与して好中球血管外遊走を起こす (transmigration assay, Figure 1)。反応終了後、チャンバーは PBS で 3 回洗浄し接着もしくは migration していない細胞を洗い流し、2.5% glutaraldehyde (/PBS, pH 7.3) で 16 時間固定、gelatin を注意深く採取しパラフィンへ封埋、4mm の cross section を作成し各種染色を行う。血管内皮細胞の下層にある好中球 (migration), および上層 (adhesion) を乱数表によるランダム 5 視野でカウントし評価した。また具体的に inhibitor としては quercetin (HSP 70 inhibitor: 1-100uM, Extrasynthese)、また治療薬からの展望より hydroxyethyl starch (HES: 10mg/ml) を前処置し VASP リン酸化や細胞間橋透過性に関し検討した。

Figure 1. Transmigration assay



HUVEC の F-actin 分布および定量

血管外遊走モデルにおける HUVEC の F-actin 分布は Rhodamine-Phalloidin 染色で検討した。まず血管外遊走モデルの終了した膜をチャンバーから取り出し、PBS で洗浄後、2% formaldehyde (pH6.5) で 60 分固定、また染色は rhodamine-phalloidin (10 U/ml)/0.1% Triton X-100/1% BSA にて 120 分間遮光で行った。その後 PBS で洗浄、90% glycerol/10% PBS, 0.1 M n-propylgallate で封入、カバーガラスで閉じ、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 410, Zeiss, Germany) で観察した。また、F-actin 定量は Fluorescence plate reader で行った。

HUVEC 分離および Western blotting

好中球 transmigration assays 終了後、HUVEC は PBS で 3 回洗浄され、0.25% trypsin/5 mM EDTA で 10 秒間・3 回、また冷 HBSS で 3 回リンスとする。採取された HUVEC と好中球は Histopaque density gradients (Sigma) で分離する。まず 15 ml polypropylene centrifuge tube に Histopaque-1119 3ml、そして Histopaque-1077 3ml を重層する。その後 6 ml のサンプルを重層し遠心 (700g, 30 分、 4°C) すると HUVEC は Histopaque-1077 の上層、好中球は Histopaque-1077 と Histopaque-1119 の境界に分離され、HUVEC を回収、5ml HBSS で洗浄する (遠心 200g, 10 分、purity: 95% 以上)。HUVEC は 400 μl lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.9, 250 mM NaCl, 100 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 75 mM NaF, 0.5% sodium deoxycolate, 1% NP-40, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0.2 μM phenylmethionylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin) で氷上 30 分 incubate し SDS-page に移行、PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) に転写、10% skim milk/TBS/0.2% Tween 20 で 1 時間ブロッキング、VASP リン酸化に関しては 5 $\mu\text{g/ml}$ polyclonal rabbit anti-phospho-vasodilator-stimulated phosphoprotein-157 (Phospho-VASP Ser 157, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) で incubate、0.2% Tween 20-TBS で洗浄後、HRP conjugated

goat anti-rabbit pAb (DAKO) で1時間 incubate、0.2% Tween 20-TBS で洗浄後、ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用い検出した。

統計

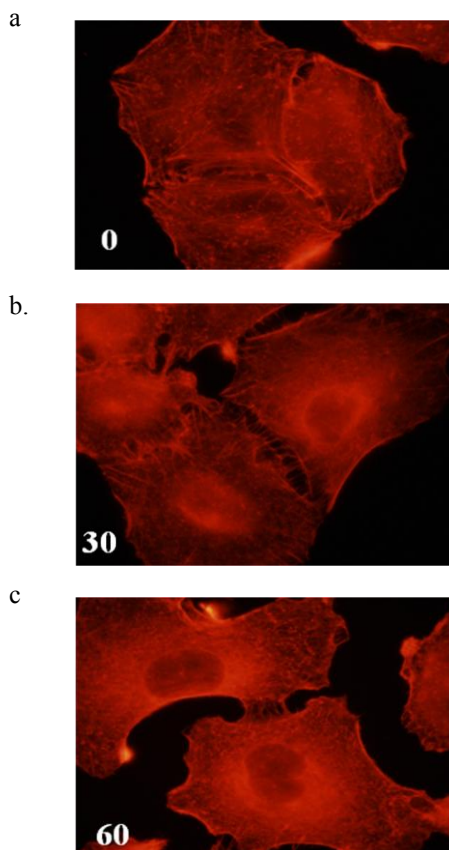
値は means ± SD で表し、統計は Scheffe's multiple comparison tests を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

4. 研究成果

HUVEC の F-actin 分布および定量

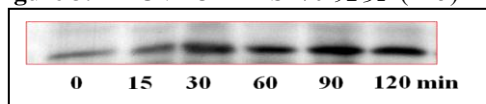
HUVEC 血管外遊走モデル下において Rhodamine-Phalloidin 染色での F-actin 分布を検討した。0分 (Figure 2a)、30分 (Figure 2b)、60分 (Figure 2c) と経時的に一旦細胞質に増加した stress fiber が時間とともに減少してくるのが観察される。

Figure 2. HUVEC の F-actin 染色 (n=5)



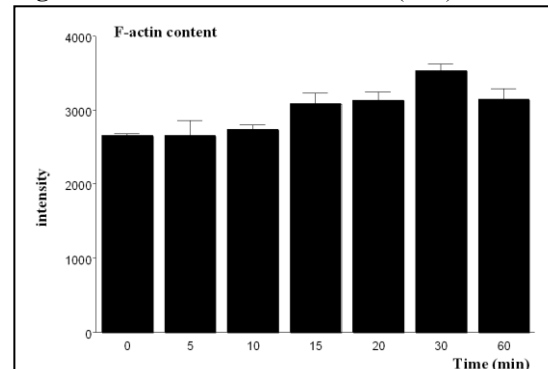
一方、同じ系での HSP70 の発現を western blotting で評価した (Figure 3)。HSP70 が経時的に、特に 30 分後から著明に増強していることが分かる。

Figure 3. HUVEC の HSP70 発現 (n=5)



さらに Fluorescence plate reader による F-actin 定量を行ったところ、F-actin 量が 30 分といったその peak からその後徐々に低下してきている傾向が確認された (Figure 4)。これは HSP70 が増加してくると逆相関している。

Figure 4. HUVEC の F-actin 量 (n=5)



これらの結果は、炎症反応により F-actin が増加し、いったん亢進した血管内皮細胞透過性が HSP70 誘導に伴い抑制に向かう可能性を示唆している。

血管外遊走モデル

好中球血管外遊走モデルを用いて検討した。Control 群では 30 分間の migration assay で遊走した好中球カウントは 80.2 ± 15.1 (/5HPF) であり HES 前処置では 42.9 ± 13.2 (/5HPF) と有意差をもって好中球血管外遊走を抑制した (Table 1)。またこの効果は HSP70 inhibitor である quercetin 前処置により 70.9 ± 14.7 (/5HPF) と抑制効果が抑えられた結果となった。このことより VASP リン酸化を促進する HES は血管透過性抑制の効果を有し、また一方でその upstream signal transduction に HSP70 が関与している可能性が示唆された。

Table 1. 各実験グループでの好中球数カウント (n=5).

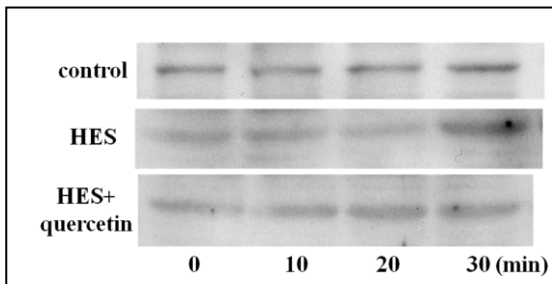
Groups	Neutrophil counts (/5hpf)
control	80.2 ± 15.1
HES	42.9 ± 13.2 *
HES with quercetin	70.9 ± 14.7

*, $p < 0.05$ vs control.

VASP リン酸化

Western blotting により VASP リン酸化を評価した。Control 群では 30 分間の migration assay で VASP のリン酸化に変化は見られなかった (Figure 5)。一方 HES 前処置では 30 分後に VASP リン酸化増強を認め、HSP70 inhibitor である quercetin 前処置より抑制された。これらの結果も合わせると、HES により VASP リン酸化が生じ、その結果好中球血管外遊走が抑制され、その signal transduction に HSP70 が関与しており、HSP 抗炎症作用は VASP リン酸化の上流に位置すると考えられた。

Figure 5. HUVEC の VASP リン酸化 (n=5)

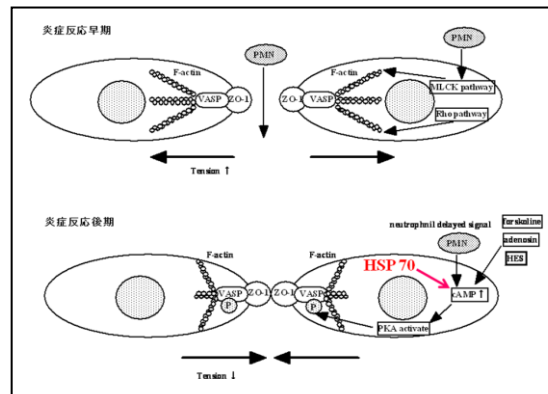


* Discussion

本研究により、好中球血管外遊走において血管内皮細胞内 F-actin は増加するが、その後の細胞内 HSP70 増加に伴い F-actin が減少していく抗炎症作用が確認できた。また HES は VASP リン酸化を介し好中球血管外遊走の抑制作用を有するが、HSP 抗炎症作用機序は VASP リン酸化経路の上流に位置することが解明された。さらなる missing link は解明されていないが、本研究結果に基づき従来からの我々の研究報告を総合すると下記の仮説が推論できる。“好中球が血管外遊走を行う際、血管内皮細胞内情報伝達系が活性化され、MLCK dependent pathway および MLCK independent pathway (Rho kinase pathway) が活性化される。そして細胞内情報伝達機構に引き続き生じる血管内皮細胞内細胞骨格変化 (actin-myosin interaction) により血管内皮細胞の収縮が起き、好中球の血管外遊走を制御している (F-actin stress fiber 増量、および細胞辺縁から細胞質全体への分布)。その炎症反応に伴う血管内皮細胞内 cAMP の上昇により引き起こされる cAMP-dependent PKA pathway 活性化により VASP リン酸化が好中球血管外遊走より遅延して増強し、bind している profilin や Cdc42 を介して actin redistribution (baseline である F-actin の細胞周辺分布) を誘導、actin 関連 tight junction protein である ZO-1 などに作用し細胞間橋の tension を低下させ、血管透過性を低下させる (細胞間橋が閉じる)。結果として一旦ピークに向かった好

中球血管外遊走が漸減していく。経験的に知られている HSP70 の抗炎症作用はこの VASP リン酸化の上流の signal transduction に関わっている” (Figure 6)。本研究により VASP リン酸化が炎症時の好中球血管外遊走の negative regulator としてそのメカニズムの 1 つが明らかとなり、HES が VASP リン酸化を促進し血管内皮細胞透過性低下による抗炎症作用を發揮する一方で、HSP 抗炎症作用がこの上流に位置することが判明、将来的に ARDS をはじめとする ALI など重度な肺傷害の治療にも寄与する可能性が示唆された。

Figure 6. 推測される signal transduction



国内外では主に当科で好中球血管外遊走における血管内皮細胞の新しい情報伝達経路の解明を目的として研究を進めている。現在まで Calcium-calmoduline MLCK dependent pathway と Rho pathway が key pathway である事が我々の研究から明らかとなり、Physiological review (impact factor 37.7) にもその signal transduction が血管内皮細胞機能の review に引用され評価されている [Burns AR, et al. *Physiol Rev* 83:309-36, 2002] [Mehta D, et al. *Physiol Rev* 86:279-367, 2006]。今回の HSP70 および VASP に関する研究はさらに内皮細胞収縮の negative regulator としての抗炎症作用メカニズム解明に踏み込んだ、本分野においては最先端に位置する研究と考えられる。HSP70 の血管透過性抑制と血管内皮細胞内 VASP の作用機序がさらに明らかとなれば、これを応用し急性肺傷害時に HSP70 誘導や VASP リン酸化を促進することで抗炎症作用を發揮することが可能になる。そしてこの反応は肺への好中球集積抑制やそれに引き続く好中球の活性酸素産生抑制により、ARDS の本態である肺血管内皮細胞障害を抑制すると推察される。現在まで急性炎症における HSP70 の抗炎症作用機序を、VASP を介した細胞内情報伝達機構に引き続き生じる actin base の細胞骨格再構成の negative regulation から検討する報告は国内外を問わず認められない。

本研究成果は現象のみ知られている
HSP70 抗炎症作用機序を血管内皮細胞内
VASP リン酸化に関する基礎的研究から明
らかとし、さらには ALI 治療薬開発に寄与
する可能性があると思われる。

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 0 件)

[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 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 元 (SAITO HAJIME)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号 : 20323149

(2)研究分担者

南谷 佳弘 (MINAMIYA YOSIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 30239321

小川 純一 (OGAWA JUN-ICHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 20112774