

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790178

研究課題名（和文）機械受容応答を介する血管内皮透過性調節機構の解明：m-カルパインの機能解析

研究課題名（英文）Mechanisms underlying endothelial barrier functions through mechanotransductions: regulatory role of m-calpain

研究代表者

宮崎 拓郎 (Miyazaki Takuro)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：80398693

研究成果の概要（和文）：

目的—内皮細胞は血管の内腔に存在するため、血流に起因する機械的な刺激（シェアストレス）を直接受容する。これに伴い、血管内皮はバリア機能の変調などの細胞応答（いわゆる機械受容応答）を呈することが報告されている。しかしながら、機械受容応答のキーとなる分子は未だ明らかになっていない。本研究では機械受容応答調節因子の候補としてCa²⁺感受性の細胞内プロテアーゼであるカルパインに着目し、その役割について明らかにすることを目的とした。

結果および考察—マウス大動脈内膜におけるm-カルパインのmRNAおよびタンパク質発現を確認したところ、いずれも血流が乱流状態となる大動脈弓の下部において顕著であった。マウスにカルパイン阻害薬またはm-カルパイン siRNAを投与すると、大動脈弓でRhoキナーゼ阻害薬感受性の血管透過性亢進が認められ、亢進部位では内皮細胞間ギャップの肥大化、ストレスファイバーの過剰形成、リン酸化LIMキナーゼ2の発現増加ならびにRhoA活性の亢進が認められた。HUVECsに乱流状態でシェアストレスを負荷したところ、RhoA活性の亢進およびリン酸化LIMキナーゼ2の発現増加が認められたが、これらの応答はm-カルパインをノックダウンすることによりさらに増強された。

なお、脳血管炎に対するm-カルパインの関与を検証する目的で、マウス光化学刺激誘発中大脳動脈血栓モデルの作製にも着手した。このモデルを用いて既存の血栓溶解薬である組織型プラスミノゲンアクチベータの作用を確認できたことからモデル作製に成功したと考える。

結論—m-カルパインはシェアストレス存在下の内皮細胞形態制御に重要な役割を担うことが明らかとなった。同時に、m-カルパインは大動脈弓下部などの動脈硬化好発部位においてRhoA活性の亢進に拮抗することで、血管内皮バリア機能を保護していることが明らかとなった。本研究の結果は、血流による血管透過性制御にm-カルパインが関与することを初めて証明した点で重要であり、この分子が動脈硬化症の発症や脳梗塞時の血管炎に対してどのような影響を及ぼすか、病態との関わりを今後検証していきたいと考える。

研究成果の概要（英文）：

Aims: It has been reported that laminar shear flow (LF) improves barrier functions in vascular endothelial cells (ECs); while disturbed flow (DF) impairs the barrier. Our previous study showed that LF stimulus led to the activation of cysteine protease, m-calpain, in ECs, which can influence RhoA activity. We hypothesized that m-calpain participates in the shear pattern-dependent EC barrier maintenance through RhoA signaling.

Methods and results: m-calpain expression levels in the intima in the inferior aspect of mouse aortic arch where DF dominates were higher than those in adjacent regions. Elevation in transendothelial albumin permeability, which was induced by administration of calpain inhibitor (ALLM), was prominent in the inferior arch; moreover, this elevation was abolished by Rho kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632). Similarly, short interfering RNA (siRNA)-induced silencing of m-calpain resulted in increasing RhoA activity and hyper-permeability in the aortic arch, which was accompanied by ROCK inhibitor-sensitive phosphorylation of downstream effector LIM kinase2 (LIMK2), stress fiber accumulation in endothelium and enhanced interendothelial gaps. Exposure of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to LF diminished RhoA activity; in contrast, DF facilitated the activity. siRNA-induced m-calpain silencing further accelerated the DF-induced RhoA over-activation, phosphorylation of LIMK2 and cytoskeletal rearrangement, resulting in barrier dysfunction in the cells.

Conclusion: Our findings revealed a relatively high m-calpain expression levels in the inferior arch. The m-calpain activity antagonizes DF-induced over-activation of RhoA/ROCK/LIMK2 signaling and subsequent cytoskeletal rearrangement in ECs, which exerts EC barrier improvement.

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	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞運動・形態形成・細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

血管内腔に存在する血管内皮細胞は血流に起因する機械刺激（シェアストレス）を感知して、血管調節因子の遊離や細胞リモデリング（細胞骨格・接着斑の適応応答）に代表される様々な細胞応答を呈することが知られている。近年申請者らは培養血管内皮細胞にシェアストレスを負荷すると接着分子の α_v インテグリンを介して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、 Ca^{2+} 感受性プロテアーゼであるm-カルパインが活性化されることを報告してきた。siRNAを用いてm-カルパインを選択的にノックダウンするとシェアストレスを負荷した際の細胞リモデリングが認められなくなることから、m-カルパインは少なくとも内皮細胞の動的・力学的応答（細胞ダイナミクス）に関与しているものと考えられる。細胞ダイナミクスが内皮細胞のバリア機能に多大な影響を及ぼすことから推測すると、m-カルパインが内皮細胞における物質透過性の

調節に重要な役割を担う可能性が示唆されるが、血管組織におけるm-カルパインの機能について生体レベルで検討した報告は存在しない。本研究により生体内における血管内皮細胞の透過性制御機構の一端が明らかとなり、血管組織の恒常性維持ならびに動脈硬化病変発生のメカニズム解明の一助になると考えられる。

2. 研究の目的

血管内皮細胞は血管の内腔に存在し、血流に起因する圧力、伸展力およびシェアストレスを直接受容する特殊な力学的環境に置かれているが、特にシェアストレスの強度に応じて様々な細胞応答を行うことが報告されている。また、血管内皮細胞は血管内腔を一層に覆い、血漿成分が血管外に漏出することを防ぐバリアの役割を担っているが、構造上血流が乱流となる血管の分岐部や湾曲部で

は血管内皮細胞のバリア機能が低下することが知られている。その結果血漿タンパク質や脂質が血管壁に蓄積し、このような部位では動脈硬化巣が好発することが報告されている。また、人為的に血管の構造を変化させた場合、シェアストレスが低くなる部位および乱流状態になる部位に動脈硬化巣が好発することが報告されており、血管内皮細胞のシェアストレス応答は血管組織の恒常性維持に重要な役割を担うものと考えられる。

シェアストレス応答の分子メカニズムについては不明な点が多いが、近年の研究進展の結果、Ca²⁺依存的経路が重要な役割を担うものと考えられている。しかしながら、その際キーとなる分子は未だ明らかになっていない。そこで本研究では機械受容応答調節因子の候補としてCa²⁺感受性の細胞内システインプロテアーゼであるカルパインに着目した。カルパインは血管内皮細胞を含む多くの組織に偏在することが知られており、そのCa²⁺感受性からμ-およびm-アイソザイムに大別される。カルパインは細胞内においてシグナル伝達分子や細胞接着に関わる分子を切断することで細胞機能を制御することから、その動態および機能について盛んに研究がなされてきた。血管内皮細胞のシェアストレス応答においてもカルパインがCa²⁺依存的に細胞力学を制御することが推測されるが、シェアストレス応答におけるカルパインの役割については未だ解明されていない。そこで、本研究ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた *in vitro* の実験系およびマウスを用いた *in vivo* の実験系を用いて、生理的条件下の血管内皮細胞の機械受容応答におけるカルパインの役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

① 培養細胞を用いた検討

HUVECsに対して層流状態のシェアストレスを負荷する場合、自作の平行平板型流れ負荷チャンバーを用いて行った。カラーゲンコートしたガラス底の流路細胞をあらかじめ培養しておき、シリ

ジポンプを用いて一定の流量で流路に Krebs-HEPES 緩衝液または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を灌流した。いずれの場合もチャンバーは37°C に保温した状態で実験を行った。

細胞に乱流刺激を負荷する場合は、平行平板チャンバー内に段差を配置することにより生体内の乱流状態 (剥離流および再循環流) を *in vitro* で模倣した。HUVECsに対してsiRNAを投与する場合、それぞれμ-またはm-カルパインに対する Stealth small interference RNA (Invitrogen) または non-silencing control RNA (medium GC; Invitrogen) を lipofection 試薬 siPORT NeoFX Transfection Agent (Ambion) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後の細胞を実験に用いた。

② マウスにおける検討

マウスに溶媒として dimethylsulfoxide (DMSO) または薬物 (ALLM : 0.1~1 mg/kg、Y-27632 : 0.1 mg/kg、LPS : 1 mg/kg) を尾静脈より投与した。投与から1時間後、あらかじめ過剰のウシ血清アルブミン (BSA) で標識したエバンスブルー色素 (EBD) を尾静脈から投与した (1.4 mg/body)。EBD/BSA溶液を投与して1時間後に左心室から Krebs-HEPES 緩衝液を全身的に灌流することで血管内の不要な色素を排除し、パラホルムアルデヒド溶液を全身的に灌流することでマウスを固定した。固定したマウスから大動脈弓・胸部大動脈を摘出し、これを切開し、EBDの en-face 分布を撮影した。色素の漏出量を定量する場合、組織に水酸化カリウム (1M) 溶液を加えて溶解し、溶出した色素を抽出液で抽出しマイクロプレートリーダーを用いて595 nmにおける吸光度を測定した。また、細胞-細胞間接着を可視化する目的で、硝酸銀染色を行った。その際、マウス左心室より Krebs-HEPES 緩衝液を灌流することで脱血を行い、その後 0.25% 硝酸銀を添加した Krebs-HEPES 緩衝液を同様に灌流することで染色を行い、さらに4%パラホルムアルデヒドを灌流することで灌流固定を行った。染色した大動脈を摘出し、内

膜について微分干渉顕微鏡像を取得した。

マウスに対してsiRNAを投与する場合、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、それぞれm-カルパインに対するStealth small interference RNA (Invitrogen) または non-silencing control RNA (medium GC; Invitrogen) をTransIT-QR Hydrodynamic delivery solution (Mirus Bio) に溶解して尾静脈より投与することでハイドロダイナミックトランスフェクションした。オリゴの投与量はいずれも3 µg/bodyとし、投与開始から7秒以内にすべての試薬を投与した。トランスフェクションから48時間後の動物を実験に用いた。

4. 研究成果

① 大動脈組織におけるカルパインの発現分布について

マウス大動脈・大動脈弓内膜の μ -および m-カルパイン mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により確認したところ、血流が乱流状態となり、動脈硬化粥腫が好発する大動脈弓の下部において、いずれのアイソザイムについても強い発現が認められた。また、m-カルパインタンパク発現を免疫組織化学染色法により確認したところ、mRNA 発現と同様に大動脈弓の下部において強い m-カルパインの局在が認められた (Fig. 1)。

② シェアストレスのパターンが血管内皮細胞におけるカルパイン発現に対して及ぼす影響について (in vitro における検証実験)

生体内における発現パターンから、シェアストレスが層流または乱流状態で作用した

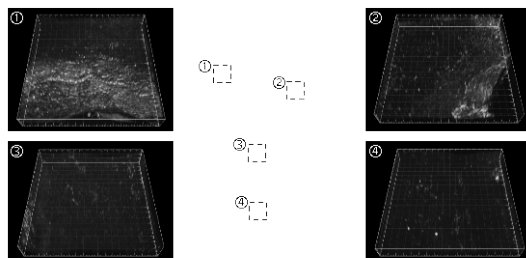


Fig.1 マウス大動脈弓および胸部大動脈におけるカルパインの発現

マウス大動脈弓および胸部大動脈内膜におけるm-カルパインタンパク発現。蛍光免疫組織化学染色法により一連の光学断層像を取得し、これを3D画像に再構築した。実験は4回繰り返し、典型例を示した。

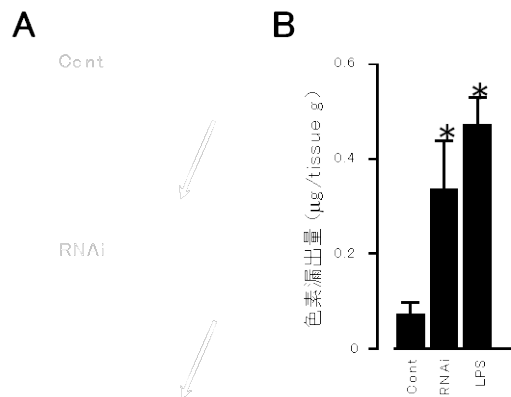


Fig.2 大動脈弓下部においてm-カルパインのノックダウンによって引き起こされる血管透過性亢進

マウスにハイドロダイナミック法によりコントロールRNA (3 µg/body) または siRNA (3 µg/body) を transfection した。また、マウスにLPS (1 mg/kg) を投与した。(A) コントロールまたはm-カルパインノックダウンマウスから抽出した大動脈弓下部内膜におけるm-カルパインのタンパク質分布。(B) 大動脈弓においてm-カルパインノックダウンにより引き起こされる血管透過性亢進。トランスフェクションから2日後にマウスの尾静脈よりEBD (1.4 mg/body) を投与した。色素の漏出量は組織の湿重量で標準化した値を示した (n=4, *P<0.05 vs コントロール)。

場合、内皮細胞のカルパイン発現に対して異なる影響をおよぼす可能性が考えられたので、平行平板型シェアストレス負荷装置の流路に段差 (障害物) を配置することで HUVECs に乱流刺激 (剥離流および再循環流) を負荷し、層流条件下の発現変化と比較した。Western blot 法によりカルパイン発現について評価したところ、層流および乱流刺激開始から1時間後の時点で μ -および m-カルパインアイソザイムに明確な発現変化は認められなかった。層流刺激を24時間負荷した場合は、 μ -カルパインについては明確な発現変化は認められなかったが、m-カルパインで発現の低下が認められた。一方、乱流刺激の負荷では刺激開始から24時間の時点ではいずれのアイソザイムについても発現変化は認められなかった。

③ 乱流条件下の血管内皮細胞におけるバリア機能に対してm-カルパインがおよぼす影響について

マウス胸部大動脈・大動脈弓における血管透過性に対するカルパインの役割について EBD/BSA アッセイにより検証を行った。カルパイン阻害薬 ALLM をマウスの静脈内に投与したところ、1 mg/kg 以上の投与量において大動脈弓下部で EBD の漏出が認められた。この色素漏出は特に血管の内膜側で認められ、

Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 を同時に投与することで有意に抑制された。一方、LPS を用いて全身的に炎症を引き起こした場合、胸部大動脈・大動脈弓の広い範囲で透過性の亢進が認められ、局在したパターンは認められなかった。

次に、siRNA を用いて m-カルパインをノックダウンした場合、大動脈の血管透過性にどのような影響をおよぼすか検討を行った。大動脈弓におけるカルパインの発現を Western blot 法により確認したところ、m-カルパイン siRNA をマウスの静脈内に投与することにより特異的な m-カルパインタンパク質発現認められた。免疫組織化学染色法により同一部位の血管内皮細胞における m-カルパインの発現を確認したところ、コントロールマウスの大動脈弓下部に認められる m-カルパインの局在が m-カルパイン siRNA の投与により消失した (Fig. 2)。コントロールおよび siRNA マウスにおいて EBD/BSA アッセイにより血管透過性を評価したところ、siRNA マウスの大動脈弓でコントロールマウスと比較して著しい EBD の漏出が認められた。

硝酸銀染色によりコントロールおよびノックダウンマウスの血管内皮細胞の細胞間接着を評価した。コントロールマウスの大動脈弓下部において内皮細胞間には小サイズかつ低密度のギャップが認められた。マウスに m-カルパイン siRNA を静脈内投与したところ内皮細胞間ギャップの肥大化・密度増加が認められた。一方、胸部大動脈では siRNA を投与しても細胞間ギャップはほとんど検出されなかった。

大動脈弓組織において RhoA の活性を評価した。プルダウンアッセイにより大動脈弓全体の RhoA 活性を測定したところ、コントロール群と比較して m-カルパイン siRNA 投与群でわずかな RhoA 活性亢進が認められた。さらに、m-カルパイン siRNA の投与により大動脈弓内膜において Rho キナーゼのエフェクターである LIM キナーゼ 2 のリン酸化亢進が認められたが、これは Y-27632 を同時に投与することで抑制された。さらに、免疫組織化学染色法により f-アクチンを染色したところ、m-カルパイン siRNA 投与群の大動脈弓に存在する血管内皮細胞でストレスファイバーの過剰形成および細胞辺縁型アクチンの消失が認められたが、この細胞骨格の変化は Y-27632 を同時に投与することで抑制さ

れた (Fig. 3)。

④ 血管内皮細胞における RhoA 活性に対して m-カルパインがおよぼす影響について (in vitro における検証実験)

HUVECs に乱流刺激 (剥離流および再循環流) を負荷し、層流条件下の細胞応答と比較した。層流刺激を負荷した HUVECs では刺激開始から 3 分で RhoA 活性の低下が認められ、この活性低下は少なくとも 60 分間は持続することが明らかとなった。一方、乱流刺激の負荷では刺激開始から 3 分で RhoA 活性の増強が認められ、この活性増強は少なくとも 60 分間は持続することが明らかとなった。細胞に m-カルパイン siRNA をトランスフェクションすると層流刺激による RhoA 活性低下が抑制され、乱流刺激による RhoA 活性化がさらに増強された。同様に抗リン酸化抗体を用いた Western blot で LIM キナーゼ 2 のリン酸化状態を確認したところ、乱流刺激を負荷することにより HUVECs において LIM キナーゼ 2 リン酸化の増強が認められ、細胞に m-カルパイン siRNA をトランスフェクションするとリン酸化レベルはさらに上昇した。

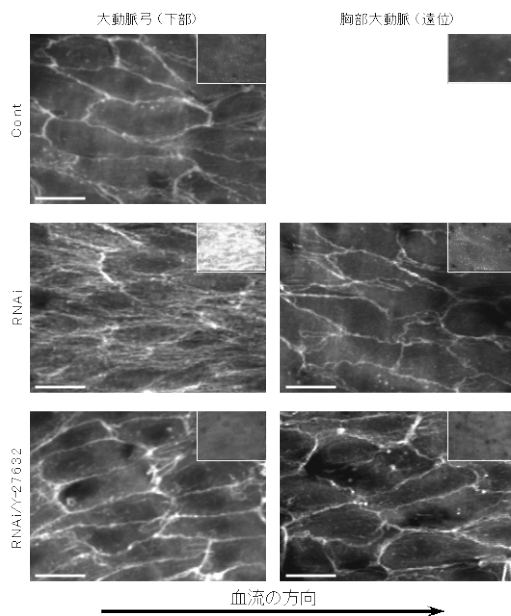


Fig. 3 m-カルパインのノックダウンにより引き起こされる血管内皮細胞骨格再構築

コントロールマウス (Cont)、m-カルパインノックダウンマウス (RNAi) または siRNA/Y-27632 (0.1 mg/kg) 投与マウス (RNAi/Y-27632) より抽出した大動脈弓下部および遠位胸部大動脈の血管内皮細胞におけるアクチン細胞骨格の分布、組織抽出から 1 時間前に FITC-BSA (1.0 mg/body) を尾静脈より投与した。挿入画は同時に投与した FITC-BSA の分布を示す。実験は 4 回繰り返し、典型例を示した。スケールバーは 20 μ m を示す。

⑤ マウス中大脳動脈血栓モデル

マウス光化学刺激誘発中大脳動脈血栓モデルの作製に着手した。このモデルを用いて組織型プラスミノゲンアクチベータ (10 mg/kg) の血栓溶解作用を確認できた。

⑥ 考察

本実験において、EBD/BSA アッセイによりコントロールマウスの大動脈弓下部でわずかな BSA 漏出を検出した。カルパインの薬理的阻害薬の投与により BSA 漏出は大動脈弓下部において局所的に促進され、siRNA による m-カルパインのノックダウンによっても大動脈弓下部における BSA の漏出と血管内皮細胞の細胞間ギャップの形成が促進された。興味深いことに、本研究において m-カルパインは特に大動脈弓下部に強い発現が認められ、この局在は BSA 漏出部位と一致することが明らかとなった。*In vitro*における検討で、血管内皮細胞に長時間乱流状態でシェアストレスを負荷しても m-カルパイン発現は変化しなかったが、層流状態でシェアストレスを負荷すると m-カルパイン発現が減少したことから、血流が乱流となる大動脈弓下部における m-カルパインの局在はシェアストレスのパターンに依存したものである可能性が高い。したがって、大動脈弓下部における血管内皮バリアの完全性は、シェアストレスのパターンに依存した m-カルパインの活性によって保護されている可能性が示唆される。

本研究の *in vitro* 実験において、乱流状態のシェアストレスは RhoA 活性を促進し、層流状態のシェアストレスは RhoA 活性を低下させるという現象が認められ、すなわち RhoA の活性がシェアストレスのパターンに依存することが明らかとなった。さらに、m-カルパインのノックダウンにより層流刺激によって引き起こされる RhoA 活性低下が抑制され、乱流刺激によって引き起こされる RhoA 活性亢進がさらに増強された。したがって、m-カルパインはシェアストレスのパターンに関わらず潜在的に RhoA 活性に拮抗しているものと考えられる。なお、m-カルパイン siRNA をマウスに静脈内投与すると、血流が乱流となる大動脈弓下部の血管内皮細胞においてのみ LIM キナーゼ 2 のリン酸化が認められたことから、m-カルパインによる RhoA 活性の亢進抑制機構は生体内の血管組織で

も機能しているものと考えられる。

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 3 件)

- ① Miyazaki T, Honda K, Ohata H, m-calpain antagonizes RhoA overactivation and endothelial barrier dysfunction under disturbed shear conditions, Cardiovascular Research, 査読有、85 (3)、2010、530-541
- ② Miyazaki T, Kimura Y, Ohata H, Hashimoto T, Shibata K, Hasumi K, Honda K, Distinct effects of tissue-type plasminogen activator and SMTP-7 on cerebrovascular inflammation following thrombolytic reperfusion, Stroke, 査読有、42 (4)、2011、1097-1104
- ③ Shibata K, Miyazaki T, Ohata H, Honda K, Shear stress-dependent effects of lysophosphatidic acid on agonist-induced vasomotor responses in rat mesenteric artery, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 査読有 in press

[学会発表] (計 4 件)

- ① 宮崎拓郎、大幡久之、本田一男、マウス大動脈弓における m-カルパイン発現が血管内皮バリア機能に及ぼす影響、第 119 回日本薬理学会関東部会、2008
- ② 宮崎拓郎、大幡久之、本田一男、マウス光化学刺激中大脳動脈血栓モデルにおいて組織型プラスミノゲンアクチベータによる血栓溶解時に認められる脳血管炎、第 83 回日本薬理学会年会、2009
- ③ 木下実季、山本翔子、宮崎拓郎、大幡久之、本田一男、マウス中大脳動脈血栓モデルにおける改変型組織プラスミノゲン活性化薬により誘発される血栓溶解作用と虚血・再灌流障害の評価、日本薬学会 第 130 年会、2009
- ④ Miyazaki T, Ohata H, Hasumi K, Honda K, DISTINCT EFFECTS OF TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR AND CPD-7 ON CEREBROVASCULAR INFLAMMATION DURING THROMBOLYSIS, 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 拓郎

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：80398693