

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19454

研究課題名(和文)時間軸・空間軸融合による血管炎症収束の制御機構解明―「炎症性」血小板の新概念構築

研究課題名(英文)The regulatory mechanism of vascular inflammation convergence by temporal and spatial axes

研究代表者

山口 宗一 (Yamakuchi, Munekazu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20325814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化は、軽微な慢性炎症による血管内皮細胞障害が長期化することで発症・悪化する。つまり、血管の炎症をコントロールすることで、動脈硬化の悪化を防ぐことが期待される。この一連の炎症反応には、血管内皮細胞に加えて、多くの造血細胞が協調して関与している。本研究では、血小板と血管内皮細胞の役割に着目し、主に培養細胞を用いた実験により、炎症の増悪・収束のシグナルを検討した。特に、動脈硬化発症のバイオマーカーとなりうる血管内皮増殖因子の新しい測定系を開発し、時計遺伝子が炎症に関与していることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、血小板は止血反応以外の機能として、癌の進行や免疫反応に重要な役割を果たしていることが注目されている。我々は、血小板の炎症に対する様々な作用の制御系に、時計遺伝子が関与している可能性を示した。これは、生活リズムの乱れが炎症の適切な制御を乱すことを示しており、今後さらなる研究が期待される。また、血管内皮増殖因子には複数のアイソフォームが存在し、それらは血管炎症における作用が異なることが予想される。本研究では、これらのアイソフォームを測定する方法を開発した。この成果は、動脈硬化の検査方法の開発につながり、新たな制御機構の解明に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis develops and worsens by the prolonged vascular endothelial cell damage under low-grade chronic inflammation. In other words, control of vascular inflammation is expected to prevent aggravation of atherosclerosis. In addition to vascular endothelial cells, many hematopoietic cells are involved in this series of inflammatory responses in a coordinated manner. In this study, we focused on the role of platelets and vascular endothelial cells and investigated the signals of exacerbation and convergence of inflammation by the experiments using cultured cells. In particular, we developed a new measurement system for isoforms of vascular endothelial growth factor, which are biomarkers for the development of atherosclerosis, and demonstrated the involvement of the clock gene in inflammation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血小板

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化進展は、慢性的な軽微な炎症による血管内皮細胞障害の結果であり、遷延化する炎症は血管機能低下と器質的変化をもたらす。これまで、血管の炎症に関わる分子として血管内皮細胞の分泌蛋白 von Willebrand 因子や P-selectin、細胞内シグナル関連分子として p53 や各種 microRNA などの研究に携わってきたが、その中で血小板との細胞間連関が重要であるという考えに至った^{1, 2, 3}。炎症に関与する白血球の役割や分子機序は研究が進んでいるが、現在のところ、血小板の役割は明確になっていない。元来、血小板は止血反応に重要な因子であるが、近年がんの進展や免疫反応に関与することが報告され、血小板の新たな機能が示唆されている⁴。この様な背景から、血小板が血管炎症の進展に及ぼす役割を検討する本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

血小板が血管炎症の開始から収束に至る一連の流れをどのように制御するかを解き明かす。本研究では血小板と血管の相互作用について、時間的、空間的な動態を検討するため、VEGF-A と BMAL1 の 2 つの分子を中心に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) VEGF-A のアイソフォーム測定

VEGF-A には多くのアイソフォーム (スプライシングバリエーション) が存在することが知られている。特に VEGF-A121、VEGF-A165 は主要なアイソフォームであり、両者は同一のレセプターを持つが細胞内シグナルの違いについては、未だ不明な点が多い。また、VEGF-A121 は、VEGF-A165 が持つヘパリン結合ドメインが欠落しているために、両者の細胞外での動態は異なることが報告されているが、詳細は不明である。そこで、この両者を明確に測り分けるためのツールとして ELISA システムを構築した。

(2) 健常人の VEGF-A121、VEGF-A165 測定

血中の VEGF-A は白血球や血小板から分泌されたものが多いと考えられている。健常人の血液から血清、血漿を分離した。また Platelet Rich Plasma (PRP) から血小板を単離した。血小板内の VEGF-A121、VEGF-A165 の比率と、血小板から放出されるそれらの比率を ELISA で検討した。

(3) 血小板シグナルの検討

血小板は外界の刺激により活性化し凝集反応が惹起される。活性化血小板は 顆粒中のサイトカインや様々な生理活性分子が分泌され周辺の細胞へシグナルを送る。この生理活性分子の一つに VEGF-A がある。血小板の活性化シグナルについて巨核球系培養細胞 Meg01 を使用して検討した。

(4) 巨核球と血管内皮細胞における BMAL1 の役割の検討

BMAL1 は時計遺伝子の一つであるが、炎症に関与するという報告が散見される。血管炎症の場として血管内皮細胞と血小板は協調した働きを持つことが予想される。本研究では Meg01 細胞と血管内皮細胞 HUVEC を用いて、BMAL1 による細胞内シグナルや形質変化の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) VEGF-A のアイソフォーム測定用 ELISA の開発

VEGF-A のスプライシングバリエーション VEGF-A121、VEGF-A165 のモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体を使用して、VEGF-A121 と VEGF-A165 を特異的に測り分けられる ELISA システムを独自に構築した。この ELISA の性能を確認するために、HEK293 細胞に VEGF-A121 または VEGF-A165 の発現プラスミドを導入して培養 (図 1A) し、それらの培養液中に分泌される VEGF-A121、VEGF-A165、total VEGF-A を、構築した ELISA と市販の VEGF-A キットを用いて測定した。VEGF-A121 または VEGF-A165 の発現プラスミドを導入した細胞培養液中の VEGF-A121、VEGF-A165 のいずれも VEGF-A キットで検出できた (図 1B) が、構築した VEGF-A121 または VEGF-A165 の ELISA はそれぞれのアイソフォームを選択的に検出できる (図 1C、1D) ことが示された。

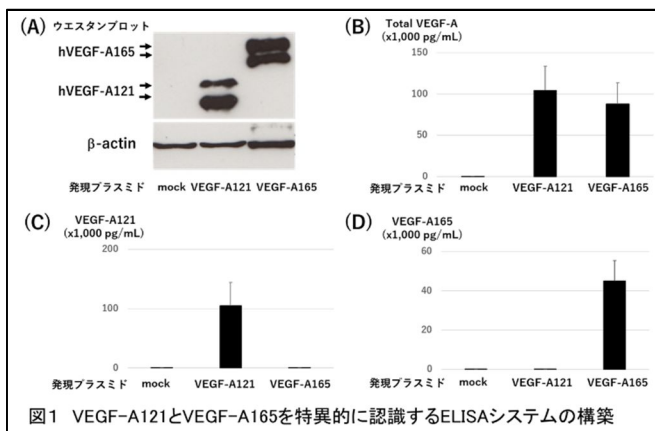


図1 VEGF-A121とVEGF-A165を特異的に認識するELISAシステムの構築

(2) 血清、血漿、血小板中の VEGF-121 と VEGF-165 の検討

血清中が血漿中よりも VEGF-A121 と VEGF-A165 の測定値は共に高値を示した。血清、血漿いずれも VEGF-A121 の方が VEGF-A165 と比較して高値を示した (図 2A)。これに対して血小板中では、VEGF-A121 よりも VEGF-A165 が高値であった (図 2B)。血小板中は VEGF-A165 が豊富に含まれており、血清中の VEGF-A の多くは採血後に凝集した血小板からの放出されたものと考えられているので、血清中で VEGF-A121 が高値となることが疑問であった。この矛盾を解決するため、活性化した血小板から放出される VEGF-A121 と VEGF-A165 の割合を検討した。トロンピン、カルシウムの刺激により血小板から VEGF-A を放出させると、その放出量は VEGF-A165 よりも VEGF-A121 の方が多く、これが血清中で VEGF-A121 が高値である一つの理由と考えられた。以上の結果は PLOS ONE に掲載された⁵。

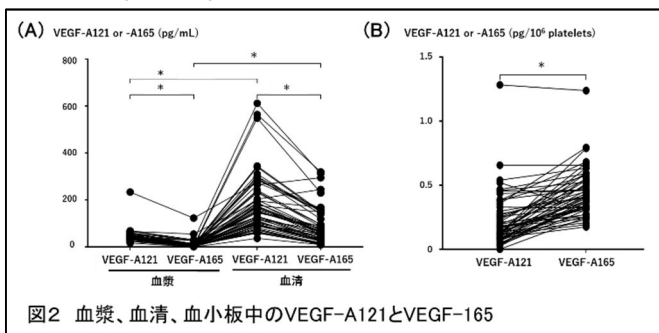


図2 血漿、血清、血小板中の VEGF-A121 と VEGF-A165

(3) Ca1DAG-GEF1 を中心とした血小板シグナル

血小板の活性化は止血反応の進行に重要であるが、炎症反応への関与を想起した。血小板のプロスタグランジンや一酸化窒素 (NO) などの産生は、血管内皮細胞や白血球に作用して炎症の増強、抑制効果をもたらす。血小板は活性化すると内包する顆粒内の生理活性分子を放出するが、血小板凝集シグナルを制御する Ca1DAG-GEF1 が分泌にどれほど関与するかは不明である。血小板シグナルに関与する分子が発現すると思われる巨核球系培養細胞 Meg01 を使用して研究を遂行した。Meg01 には血小板活性化シグナルの中心分子である Ca1DAG-GEF1 (rasgrp2 遺伝子) が比較的豊富に発現している (図 3A)。Meg01 細胞において、この Ca1DAG-GEF1 を介した Rap1 活性化を確認することができた (図 3B)。我々は Ca1DAG-GEF1 にミスセンス変異を持つ家系についても研究しており、この変異により Rap1 の活性化、血小板の活性化が減弱することを見出しており (投稿準備中)、今後は VEGF-A の放出がこのシグナル系と関連するかについて引き続き検討していく。

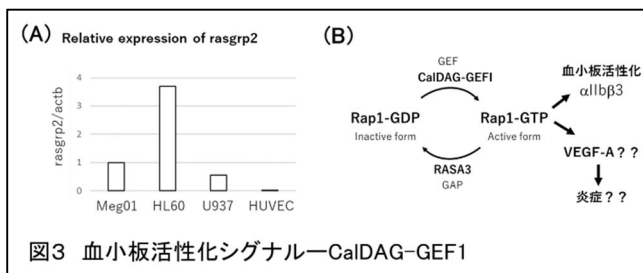


図3 血小板活性化シグナル—Ca1DAG-GEF1

(4) 巨核球と血管内皮細胞における BMAL1 の役割

時計遺伝子の BMAL1 が血小板や血管内皮の関与する炎症への制御について検討した。Meg01 細胞には BMAL1 が発現しており、BMAL1 siRNA をリポフェクタミンで導入して BMAL1 のノックダウンが可能であることを確認した (図 4A)。血小板関連の様々な分子について検討をしたが、現時点で一定の提示可能なデータは得られていない。しかしながら、VEGF-A 発現は BMAL1 の影響を受けることが示唆された (データ未提示)。培養細胞 HUVEC において Meg01 と同様に BMAL1 をノックダウンした。HUVEC を TNF-alpha で刺激すると、炎症性接着因子である VCAM1 が発現する。BMAL1 をノックダウンすると、ウェスタンブロットで VCAM1 の発現が減弱した (図 4B)。これらの結果は、BMAL1 が血小板においても血管内皮細胞においても、炎症関連シグナルを制御する可能性を示している。

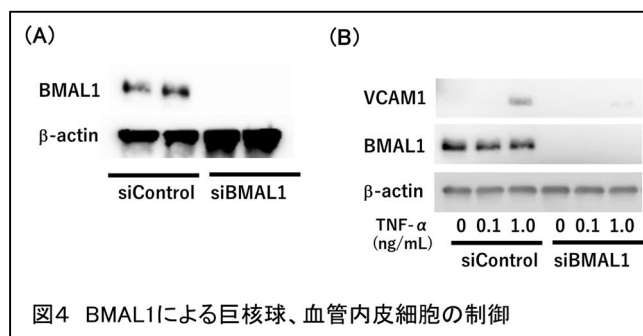


図4 BMAL1による巨核球、血管内皮細胞の制御

(5) 考察・今後の展望

本萌芽研究で次の 2 つについて成果を得ることができた。血管内皮細胞増殖因子 VEGF-A の炎症への関与を検討する新たなツールとして、VEGF-A アイソフォーム (VEGF-A121 と VEGF-A165) を測り分けられる ELISA を独自に開発完成できた。血管の炎症を、血小板 血管内皮細胞において環境変化による影響を BMAL1 分子に注目して解析し、関連性を示唆する結果を得た。VEGF-A121 及び VEGF-A165 の ELISA を用いて、血小板と血清中のこれら VEGF-A アイソフォーム存在比の差異を確認したので、今後は、炎症との関連を始め様々な疾患におけるバイオマーカー的な役割などの検討を行っていきたい。BMAL1 は生体の環境により変動する分子の一つであり、今回得られた結果は、BMAL1 の血管の炎症への影響を血小板と血管内皮細胞においてそれぞれ確認できた。構築した ELISA を使用し VEGF-A アイソフォームを介した制御機構について更に検討していく予定である。

(6) まとめ

今回の萌芽研究は、動脈硬化など血管炎症を基盤とする病態に、BMAL1などの時間の制御因子の関連、VEGF-Aなど血管新生分子のシグナルのクロストーク等の可能性を示唆しており、今後の動脈硬化進展の治療効果や予後判定の臨床検査、新たな抗血小板薬・分子標的薬の開発に革新的な進歩が期待される。

<引用文献>

(1)Panta S, Yamakuchi M, Shimizu T, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Kojo T, Hashiguchi T. Low grade inflammation inhibits VEGF induced HUVECs migration in p53 dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Feb 5;483(2):803-809.

(2)Aryal B, Yamakuchi M, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Gejima K, Takenouchi K, Komokata T, Hashiguchi T, Imoto Y. Bivalent property of intra-platelet VWF in liver regeneration and HCC recurrence: A prospective multicenter study. *Cancer Biomark*. 2019;26(1):51-61.

(3)Yamakuchi M, Hashiguchi T. Endothelial Cell Aging: How miRNAs Contribute? *J Clin Med*. 2018 Jul 10;7(7):170.

(4)Aryal B, Yamakuchi M, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Gejima K, Komokata T, Hashiguchi T, Imoto Y. Deciphering Platelet Kinetics in Diagnostic and Prognostic Evaluation of Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jun 27;2018:9142672.

(5)Yamakuchi M, Okawa M, Takenouchi K, Bibek A, Yamada S, Inoue K, Higurashi K, Tabaru A, Tanoue K, Oyama Y, Higashi S, Fujisaki C, Kanda H, Terasaki H, Sakamoto T, Soga Y, Hashiguchi T. VEGF-A165 is the predominant VEGF-A isoform in platelets, while VEGF-A121 is abundant in serum and plasma from healthy individuals. *PLoS One*. 2023 Apr 7;18(4):e0284131.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kasamo Yuki, Kikuchi Kiyoshi, Yamakuchi Munekazu, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Kambe Yuki, Ito Takashi, Kawahara Ko-ichi, Arita Kazunori, Yoshimoto Koji, Maruyama Ikuro	4. 巻 22
2. 論文標題 1,5-Anhydro-D-fructose Protects against Rotenone-Induced Neuronal Damage In Vitro through Mitochondrial Biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9941 ~ 9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maenosono Ryuichi, Mizukami Naoko, Ichiki Hitoshi, Oketani Naoya, Namino Fuminori, Masamoto Izumi, Yuasa Toshinori, Yamakuchi Munekazu, Ohishi Mitsuru, Hashiguchi Teruto	4. 巻 48
2. 論文標題 Total atrial conduction time as a possible predictor of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation for paroxysmal atrial fibrillation: relationship between electrical atrial remodeling and structural atrial remodeling time courses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 295 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-021-01090-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukaihara Kosuke, Yamakuchi Munekazu, Kanda Hideaki, Shigehisa Yoshiya, Arata Kenichi, Matsumoto Kazuhisa, Takenouchi Kazunori, Oyama Yoko, Koriyama Toyoyasu, Hashiguchi Teruto, Imoto Yutaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Evaluation of VEGF-A in platelet and microRNA-126 in serum after coronary artery bypass grafting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 1635 ~ 1645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-021-01855-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamakuchi Munekazu, Okawa Masashi, Takenouchi Kazunori, Bibek Aryal, Yamada Shingo, Inoue Keiichi, Higurashi Kazuhiko, Tabaru Akito, Tanoue Kiyonori, Oyama Yoko, Higashi Sadayuki, Fujisaki Chieko, Kanda Hideaki, Terasaki Hiroto, Sakamoto Taiji, Soga Yoshiharu, Hashiguchi Teruto	4. 巻 18
2. 論文標題 VEGF-A165 is the predominant VEGF-A isoform in platelets, while VEGF-A121 is abundant in serum and plasma from healthy individuals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0284131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0284131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 宗一, 向原 公介, 上田 英昭, 大川 政士, 松本 和久, 竹之内 和則, 大山 陽子, 東 貞行, 藤崎 知園子, 井本 浩, 橋口 照人
2. 発表標題 血中microRNA-126と血小板VEGF-Aの相互関連性についての検討
3. 学会等名 日本医療検査医学会第54回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大川 政士, 山口 宗一, 竹之内 和則, 東 貞行, 井上 恵一, 山田 晋吾, 橋口 照人
2. 発表標題 血清、血漿、血小板におけるVEGF-A 121、165アイソフォームの比較定量
3. 学会等名 第22回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 宗一, 上田 英昭, 向原 公介, 松本 和久, 大川 政士, 竹之内 和則, 大山 陽子, 東 貞行, 藤崎 知園子, 井本 浩, 橋口 照人
2. 発表標題 血管平滑筋細胞石灰化のmiRNA依存性制御機構の検討
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 征郎 (Maruyama Ikuro) (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大山 陽子 (Oyama Yoko) (20583470)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教 (17701)	
研究分担者	東 貞行 (Higashi Sadayuki) (20866701)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	
研究分担者	竹之内 和則 (Takenouchi Kazunori) (30646758)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	橋口 照人 (Hashiguchi Teruto) (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関