

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790700

研究課題名（和文）

血液凝固制御因子とギャップ結合による血管内皮細胞の機能維持機構の解明

研究課題名（英文）

Regulation of endothelial cell functions by anticoagulant factors and gap junction.

研究代表者

岡本 貴行（Okamoto Takayuki）

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（和文）：動脈硬化巣や病的血栓の形成など血管病の一因として、血管内皮機能障害が考えられる。本研究では血管内皮を障害から保護し、その機能を維持する機構を明らかにすることを目的とする。血管内皮保護作用を有する血液凝固制御因子の活性化プロテイン C (APC) とトロンボモジュリン (TM)、細胞間コミュニケーションを行うギャップ結合 (GJ) に着目した。まず APC、TM が内皮細胞間 GJ を亢進することを明らかにした。次いで、GJ を構成するコネクシン (Cx)32 分子の阻害は外因系凝固を開始する組織因子 (TF) の発現を促進し、Cx32 強制発現細胞は血管新生を促進することなど GJ が血管内皮機能を修飾することを示した。また、内皮細胞は単球や好中球と GJ を介して各細胞の活性化を調節していることを示し、血管機能の維持に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and thromboembolism, are caused by endothelial dysfunctions associated with pathogenic activation of blood coagulation and inflammation. Our goal is to understand the mechanisms for protection and maintenance of endothelial functions. I first investigated the effects of activated protein C and thrombomodulin on endothelial gap junction. My results demonstrated that these factors enhance gap junction intercellular communication. Next, I indicated that inhibition of gap junction protein connexin32 increases tissue factor expression and that overexpression connexin32 enhances tube formation of endothelial cells. In addition, endothelial cells modulate monocyte/neutrophil activation via gap junction mediated cell-cell interaction. These results suggested activated protein C and thrombomodulin regulate gap junction cell-cell interaction in order to maintain endothelial functions and homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管内皮細胞、活性化プロテイン C、トロンボモジュリン、ギャップ結合、コネクシン、炎症、血液凝固、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

正常な血管内皮は抗血栓性・抗炎症性状態であるが、傷害時には抗血栓性・抗炎症性が低下し、損傷部の拡大阻止と修復を目的として炎症と血液凝固亢進因子を発現する。高齢者や生活習慣病患者では炎症と血液凝固が慢性的に活性化しやすく、血管内皮障害を誘発する。これら障害は血管病変とともに動脈硬化巣や病的血栓を形成すると考えられている。こうした血管内皮障害を原因とする疾患の克服には、血管病変を修復・再生し、障害から血管内皮を保護することにより、如何に血管内皮機能を回復し、血管内皮の恒常性を維持するかが重要である。

血液凝固制御因子の APC、TM は抗血栓性作用に加え、抗腫瘍作用や感染障害臓器の修復作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用などの細胞保護作用を持つ。こうした血管内皮保護作用から APC と TM は敗血症や播種性血管内凝固症候群に対する医薬品として利用され、現在、他の血栓性疾患、炎症性疾患への APC、TM の適用拡大や細胞保護作用の分子機構を明らかにしようとする研究が注目されている。

一方、国外を中心として血管内皮に発現する GJ 蛋白質の Cx 37、Cx40、Cx43 の異常や機能不全は、高血圧、不整脈、心筋梗塞や動脈硬化などの血管障害性疾患の発症を促進することが報告されている。しかし、細胞間コミュニケーションを行い、その恒常性を維持する GJ の異常を原因として、これら疾患の発症の基盤である炎症と血液凝固の活性化や血管内皮障害が引き起こされる分子機構は明らかでない。

これら背景に加えて、私はこれまでに内皮細胞に Cx32 が発現し、炎症反応を調節していること、また APC が骨芽細胞の増殖を亢進することなどを示してきた。こうした研究成果を踏まえ、血液凝固制御因子と GJ による内皮細胞の機能維持機構を解明する本研究を実施した。

## 2. 研究の目的

APC、TM の血管内皮保護作用の発見は、血液凝固制御因子が止血血栓、炎症、生体防御、細胞死、組織再生などを調節することを示している。また、血管内皮の Cx 分子の異常が高血圧、不整脈、心筋梗塞や動脈硬化の発症を促進すること、我々が明らかにした Cx32 が内皮細胞の炎症と血液凝固を調節していることは、血管内皮の障害発症と恒常性維持の機構に血液凝固制御因子と GJ が重要な役割を有している可能性を示している。

本研究では、APC、TM が内皮細胞間 GJ の機能維持に及ぼす影響、及び Cx32 の発現調節による内皮細胞の機能制御機構を解

析することを目的としている。そのために① APC、TM が内皮細胞に発現する Cx 分子の発現と GJ 機能に及ぼす影響を解析した。次に② Cx32 発現量、機能を人為的に操作した内皮細胞での血管内皮機能(血液凝固因子・炎症性因子の発現、細胞増殖、白血球浸潤、血管透過性)の変化を解析した。さらには③内皮細胞と単球・好中球など白血球の相互作用における GJ の影響を解析した。

本研究を介して動脈硬化巣や病的血栓の発症の原因である炎症と血液凝固の活性化や血管内皮障害を引き起こす新たな分子機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### ・ GJ の機能評価と発現量変化の測定

GJ 機能は、低分子蛍光色素(カルセイン)で染色したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)と非染色細胞を共培養し、色素が移行した細胞数を蛍光顕微鏡下で観察して評価した。

HUVECs に APC、TM を加え、内皮細胞が発現する Cx32、Cx37、Cx43 遺伝子の発現量変化は定量的 PCR 法にて行った。

### ・ 組織因子の発現量測定

GJ 阻害剤、抗 Cx32 抗体などの存在下と非存在下において、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )刺激で活性化した HUVECs を未処理 HUVECs と共培養し、TF を測定した。TF 活性は第 VIIa 因子と第 X 因子の共存下に HUVECs 上で生成される第 Xa 因子の活性を指標に評価し、TF mRNA の発現は定量的 PCR 法で測定した。

### ・ 血管新生評価法

内皮細胞株 EA.hy926 細胞に Cx32 遺伝子を安定発現させた細胞を作製した。血管内皮細胞増殖因子を含有したマトリゲル上にこの Cx32 遺伝子強制発現 EA.hy926 細胞を 6 時間培養して Tube formation を誘導し、その形態変化を顕微鏡下で観察して比較した。

### ・ 血管透過性評価法

ボイデンチャンバー上で Cx32 遺伝子強制発現 EA.hy926 細胞を培養した。上層に血管内皮細胞増殖因子、蛍光標識したデキストランを加え、細胞の単層を超えて下層に移行したデキストランの蛍光量を測定し血管透過性を評価した。

### ・ 内皮細胞と白血球の共培養

TNF- $\alpha$  で刺激した HUVECs と単球または好中球を共培養し、上清中に存在するインターロイキン 6(IL-6)、単球走化活性因子(MCP-1)を ELISA 法で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) APC、TM が内皮細胞間 GJ に及ぼす影響の解析

APC または TM を処理した HUVECs ではカルセインで染色された細胞 (矢印) から非染色細胞へと色素の移行が亢進していた (図 1)。APC と TM が HUVECs の GJ 機能を亢進することを示した。

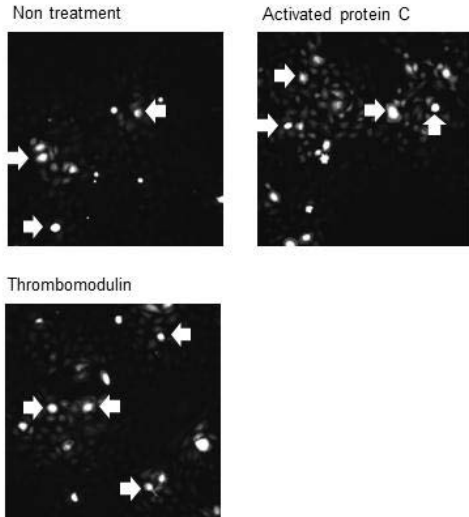


図 1 APC, TM は内皮細胞間 GJ を亢進する。

また、APC 処理時における Cx32、Cx37、Cx43 遺伝子の mRNA の発現量の変化を Real time PCR で測定した結果、APC 100nM 処理時において Cx32、Cx43 mRNA の発現が有意 (\*\* $p < 0.05$ ) に増加していることが明らかになった (図 2)。

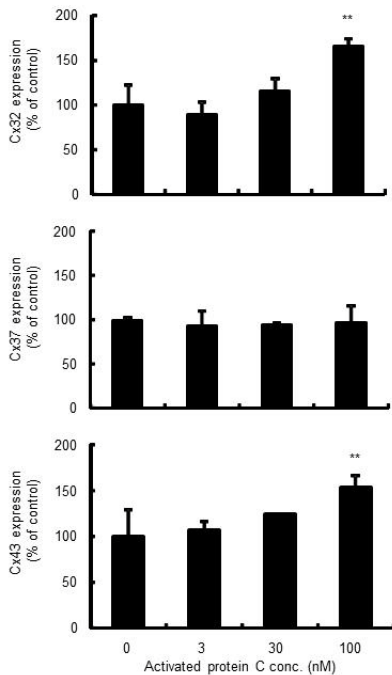


図 2 APC は Cx32、Cx43mRNA 発現を増加する。

##### (2) 血管内皮細胞の組織因子発現に Cx32、Cx43 分子が及ぼす影響の解析

次に Cx32、Cx43 が血管内皮細胞機能に及ぼす影響を TF の発現を指標に評価した。抗 Cx32 抗体、抗 Cx43 抗体処理により各 Cx 分子の機能を阻害した HUVECs に TNF- $\alpha$  刺激を加え、誘導される TF の活性と mRNA の発現量を比較した。抗 Cx32 抗体処理した細胞は、コントロール抗体及び抗 Cx43 抗体と比較して TF の活性と mRNA の発現量は有意 (\*; $p < 0.01$ ) に上昇した (図 3)。

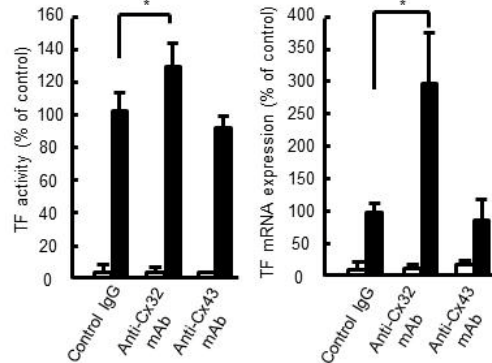


図 3 内皮細胞の Cx32 阻害時には TNF- $\alpha$  誘導性 TF の発現が亢進する。

##### (3) Cx32 が血管新生に及ぼす影響の解析

Cx32 強制発現細胞を用いて血管内皮細胞の特徴的な機能である血管新生に及ぼす影響を in vitro tube formation を指標に評価した。その結果、Cx32 遺伝子発現 EA.hy926 細胞は、コントロール遺伝子発現細胞と比較して、Tube formation が促進していた (図 4)。

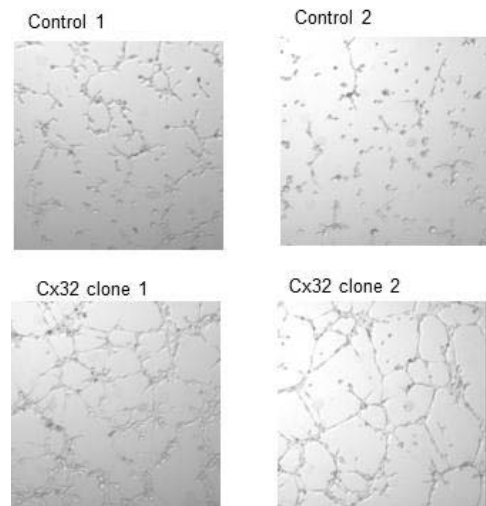


図 4 Cx32 強制発現細胞は血管新生 (Tube formation) を亢進する。

##### (4) Cx32 が血管透過性に及ぼす影響

上記細胞を用いて、血管透過性に及ぼす影響を、ポイデンチャンバー上にコンフルエン

トに培養した細胞層を透過した蛍光標識デキストランを測定して評価した。その結果、Cx32 強制発現細胞では血管透過性が有意に (\*;p<0.01)抑制されていた(図 5)。

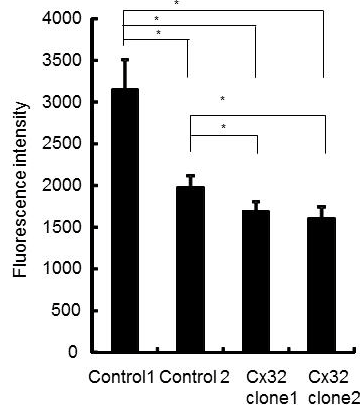


図 5 Cx32 強制発現細胞は血管透過性が抑制されている。

(5)血管内皮細胞との接着による白血球の活性化に GJ が及ぼす影響

HUVECs を TNF- $\alpha$  刺激を加えて活性化した後、ヒト正常単球、またはヒト正常好中球と共培養し、上清中の IL-6 と MCP-1 の濃度を測定した。それぞれ単独で培養した時と比較して共培養 (HUVECs+, Monocytes/Neutrophil+)時では、両因子が分泌されることを明らかにした(図 6 \*;p<0.01)。また、GJ 阻害時にはこれらが抑制する可能性を示唆するデータも得ている。

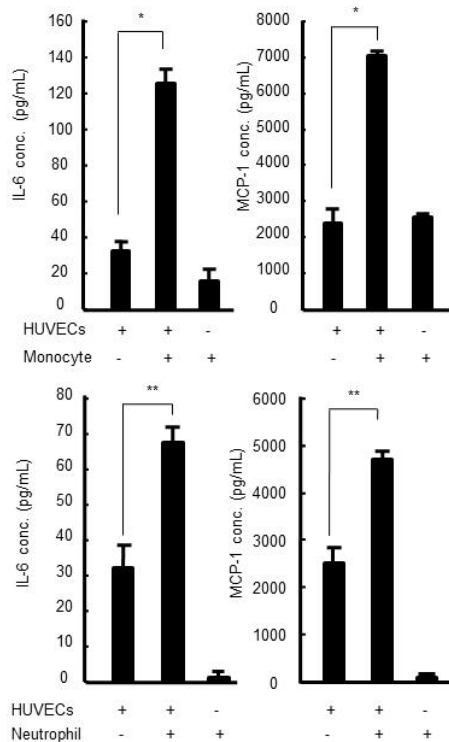


図 6 共培養によりサイトカインが分泌される。

これらの結果は、APC や TM が血管内皮細胞間の GJ を調節し、血管内皮細胞の機能を制御していることを示している。

##### 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 7 件)

- Okamoto, T., Tanigami, H., Suzuki, K., Shimaoka, M., Thrombomodulin, a bi-functional modulator of inflammation and coagulation in sepsis (review). Critical Care Research and Practice, 2011 (査読有)
- Okamoto, T., Akiyama, M., Takeda, M., Akita, N., Yoshida, K., Hayashi, T., Suzuki, K., Connexin32 protects against vascular inflammation by modulating inflammatory cytokine expression by endothelial cells. Experimental Cell Research, 2011, 317:348-355. (査読有)
- 岡本貴行, 鈴木宏治: トロンボモジュリンを介した凝固炎症反応と敗血症性 DIC, Thrombosis Medicine, 2011, 11月号 (査読無)
- Kamada, H., Okamoto, T., Hayashi, T., Suzuki, K., An in vitro method for screening anti-platelet agents using a microchannel array flow analyzer. Biorheology. 2010, 47:153-161. (査読有)
- Kurata, T., Hayashi, T., Yoshikawa, T., Okamoto, T., Yoshida, K., Iino, T., Uchida, A. and Suzuki, K., Activated protein C stimulates osteoblast proliferation via endothelial protein C receptor, Thrombosis research, 2010, 125:184-191. (査読有)
- 岡本貴行, 鈴木宏治: トロンビン受容体, International Review of Thrombosis, 2010, 5:200-203. (査読無)
- 岡本貴行, 鈴木宏治: 凝固制御機序、救急・集中治療, 2010, 22:1402-1407. (査読無)

[学会発表] (計 10 件)

- Takayuki Okamoto, Tatsuya Hayashi, Koji Suzuki; Connexin32 regulates pro-coagulant activity of endothelial cells due to modulating tissue factor expression during inflammation; 2011 International Gap Junction Conference; 2011年8月6-11日ゲント大学
- Takayuki Okamoto, Tatsuya Hayashi, Koji Suzuki; Gap junction protein, connexin32 regulates expression of tissue factor and inflammatory cytokines in the endothelial cells; XXIII

- Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2011年7月23-28日 京都国際会議場
3. Tomoaki Yoshikawa, Yoshinori Saito, Tatsuya Hayashi, Tatsuya Kurata, Junji Nishioka, Takayuki Okamoto, Nobuyuki Akita, Kunihiro Asanuma, Akihiro Sudo, Atsumasa Uchida; Effect of protein C inhibitor on lipopolysaccharide-induced vascular permeability; XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2011年7月23-28日 京都国際会議場
  4. Kakunoshin Yoshida, Takayuki Okamoto, Kunihiro Asanuma, Tatsuya Hayashi, Koji Suzuki, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo; Anticoagulant activated protein C suppresses osteoclast differentiation via endothelial protein C receptor; XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2011年7月23-28日 京都国際会議場
  5. Tatsuya Hayashi, Chiemi Kato, Takako Mori, Kakunoshin Yoshida, Nobuyuki Akita, Takayuki Okamoto, Junji Nishioka, Koji Suzuki; Effect of endotoxin and inflammatory cytokines on protein S and C4B-binding expressions in the liver HepG2 cells; XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2011年7月23-28日 京都国際会議場
  6. Kunihiro Asanuma, Nobuyuki Akita, Takayuki Okamoto, Tatsuya Hayashi, Tomoaki Yoshikawa, Kakunoshin Yoshida, Yumiko Asanuma, Akihiko Matsumine, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo, Koji Suzuki; The inhibition of lung metastasis by inactivation of coagulation activity may lead to dissemination of tumor cells; XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2011年7月23-28日 京都国際会議場
  7. Nobuyuki Akita, Kakunoshin Yoshida, Takayuki Okamoto, Junji Nishioka, Tatsuya Hayashi, Koji Suzuki; Protein C inhibitor inhibits tumor cell growth, but promotes tumor cell metastasis by its procoagulant properties in vivo; XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2011年7月23-28日 京都国際会議場
  8. 岡本貴行、林辰弥、鈴木宏治 コネキシン

- 32 が血管内皮細胞の炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響; 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会: 2010年12月9,10日神戸市
9. Takayuki Okamoto, Tatsuya Hayashi, Koji Suzuki; Connexin32, a gap junction protein, modulates inflammatory cytokine expression in vascular endothelial cells; The 6th Asia Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis Congress:2010年10月13-16日インドネシア
  10. 岡本貴行、林辰弥、鈴木宏治 ギャップ結合を介した血管内皮細胞間相互作用は炎症と凝固の増幅を制御している第33回日本血栓止血学会 2010年4月23日鹿児島市.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岡本 貴行 (Okamoto Takayuki)  
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

該当する研究者はおりません。 ( )  
研究者番号:

##### (3)連携研究者

該当する研究者はおりません。 ( )  
研究者番号: