

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500535

研究課題名(和文) 内皮細胞層中の白血球浸潤部位に関するバイオメカニクスの検討

研究課題名(英文) Biomechanics of Leukocytes migration on Endothelial Cell Monolayer

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・教授

研究者番号：20250681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：あらかじめ、アクチンフィラメントの重合を可逆的に阻害するサイトカラシンで処理した内皮細胞に単球を投与して浸潤挙動を観察したところ、浸潤した単球が増加した。いっぽう、ざくろに含まれるポリフェノールの代謝物であるエラグ酸はアレルギー等の抑制効果があることが知られている。そこで、培養内皮細胞をIL-1で活性化、さらには酸化LDLを投与させた後にエラグ酸を同時に投与して単球挙動を観察したところ、浸潤した単球数が減少した。単球の内皮下浸潤は、アクチンの構造とともに、酸化ストレスが重要な因子であることが確認された。

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. To elucidate this phenomenon, we have observed the effects of cytoskeletal structure. Human umbilical vein endothelial cells (Huvecs) were cultured on the porous membrane and/or cell culture dishes. Huvecs were stimulated with IL-1beta and oxLDL. Then monocytes isolated from human blood were added to Huvec monolayer, counted migrated monocytes underneath Huvecs and observed monocytes behavior. When Huvecs were treated with cytochalasin D which blocks polymerization and the elongation of actin, migrated monocytes were decreased. That means that actin filaments are important cytosolic structure for monocyte trans-endothelial migration. In addition, Ellagic Acid hydrolyzed from Ellagitannin which is bioactive polyphenols from pomegranate, has been shown anti-atherogenic effect.

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：血管内皮細胞 単球 アクチンフィラメント アテローム性動脈硬化

### 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激、あるいはサイトカイン等の化学的刺激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)。ただし、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)。

これまで我々は、アテローム性動脈硬化症の発生プロセス解明の観点から、単球と内皮細胞の相互作用による細胞メカニクス変化、細胞のダイナミクスの解析を行ってきた。単球の内皮細胞への接着により、内皮細胞のp125FAK量とアクチンストレスファイバーの減少。また、それらの変化に関連して内皮細胞-基質間の微小間隙の増加、内皮細胞の弾性率低下が生ずることを報告した(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002)。これらの変化は、次のステップである単球浸潤を促進すると考えられた。その後我々は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた独自の実験系により個々の単球の3次元浸潤ダイナミクスを高精細蛍光像としてイメージングする系を確立し(*Atherosclerosis*, 2004)、動脈硬化発症因子である酸化LDLが内皮細胞間隙分子の発現制御(PECAM-1の増加、VE-cadherinの抑制)により単球浸潤を促進することを報告した(*Atherosclerosis*, 2007)。古くから、動脈硬化好発部位では内皮細胞の形状は丸く、ストレスファイバーの発現は少なく、内皮細胞は軟らかいと報告されてきた。我々のこれまでの一連の研究から、内皮細胞層を微視的に見た場合にも(百数十から数百 $\mu\text{m}$ オーダー)単球浸潤が生ずる部位は、他の部位と比較して何らかの違いがあるものと推測している。

### 2. 研究の目的

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、接着タンパクを中心にそのプロセスは良く研究されている。しかしながら、白血球の浸潤メカニズムについては、その経路、詳細な部位など、不明な点が多い。本研究では、1) 単球は内皮細胞上を遊走する際、内皮細胞の力学特性、すなわち「硬さ」を感知し、2) あるいは、内皮細胞の基質

への接着が弱い部位を感知して、部位選択的に浸潤する、という作業仮説のもと、内皮細胞を軟化させ、白血球浸潤部位の特定を目指す。同時に、強力な抗酸化作用を持つ物質の単球浸潤阻害を直接観察し、動脈硬化発生のメカニズムとともに予防方法の検討を行う。

### 3. 研究の方法

内皮細胞のメカニクスに直接関与する、細胞内構成要素であるアクチンフィラメントの生細胞中の観察手法の確立と、内皮細胞間接着タンパクであり、単球にも発現しているPECAM-1の働きについて検討した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞は牛胎児血清、抗生物質、各種成長因子を含むHuMedia-EG2(クラボウ)で継代培養し、 $5 \times 10^5$ 個の細胞に遺伝子導入システムAmaxa(Lonza)を用いて、LifeactとGFPのプラスミドベクターを導入した。プラスミドベクターを導入、フィブロネクチンをコートしたガラスベースディッシュに播き、 $\text{CO}_2$ インキュベーター内で培養した。

PECAM-1は、細胞内ドメインにGFP、あるいはDsRedを融合して発現するベクターを作成した。内皮細胞へのベクターの導入は、継代培養した細胞を一度ディッシュから剥離し、Amaxa(Lonza)を用いて行った。プラスミドベクターを導入、フィブロネクチンをコートしたガラスベースディッシュに播き、 $\text{CO}_2$ インキュベーター内で培養した。

単球は、ヒト末梢血を採取し、全血からの単球分離キットEasySep(ベリタス)を用いて単球のみを分離し、Caイオン、Mgイオンを含むHank's Balanced Salt Solution(HBSS)中で培養した。

内皮細胞上の単球挙動の観察は、遺伝子導入後に35mm細胞培養ディッシュにコンフルエントになったHuvecをIL-1 $\beta$ で刺激を加え、分離した単球を投与、倒立顕微鏡にインキュベーターを設置し、タイムラプス観察を行った。あるいは、インキュベーターを備えた共焦点レーザー顕微鏡(YOKOGAWA CSU10)で観察した。一方、Huvecを多孔質メンブレン上に培養し、アクチンの重合を可逆的に阻害するサイトカラシンを投与して一時的にアクチンを破壊し、メンブレン下に浸潤した単球を観察して定量的な評価を行った。

ざくろに含まれるポリフェノールの代謝物であるエラグ酸はアレルギー等の抑制効果があることが知られている。そこで、多孔質メンブレン上に培養したHuvecをIL-1で活性化、さらには酸化LDLを投与した後にエラグ酸を同時に投与して単球挙動を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 内皮細胞中のアクチン観察は、新規アクチン結合ペプチドであるLifeactとGFPの融合タンパクを発現するベクターを用い、遺伝子導入を行って観察を試みた。遺伝子導入を

行った内皮細胞では、図1に示すようにファイバー状のアクチンが観察された。



20μm

図1 遺伝子導入を行った生内皮細胞中のアクチンフィラメント

(2) 内皮細胞中の PECAM-1 観察は、GFP あるいは DsRed との融合タンパクを発現するベクターを作成し、単球の浸潤時の PECAM-1 ダイナミクスを観察した。その結果、単球の浸潤に関して、内皮細胞間の浸潤では PECAM-1 が単球の PECAM-1 と homophilic に接着して、浸潤を促進。内皮細胞本体を貫通する経路では、内皮細胞辺縁部では PECAM-1 が単球浸潤部位に集積するが、内皮細胞の中心部を浸潤する場合は単球浸潤部位に PECAM-1 が集積しないことが分かった。

(3) 培養内皮細胞をあらかじめ炎症性サイトカインである IL-1 で活性化させ、また、内皮細胞下に酸化 LDL を投与し、その後、アクチンフィラメントの重合を可逆的に阻害するサイトカラシンを投与して単球の挙動を観察した。サイトカラシン投与量は、内皮細胞の剥離等が生じず、かつ、アクチンの破壊がごく局所的に生ずる程度とした。その結果、浸潤単球数の増加が観察された。

(4) いっぽう、ざくろに含まれるポリフェノールの代謝物であるエラグ酸はアレルギー等の抑制効果があることが知られている。そこで、培養内皮細胞を IL-1 で活性化、さらに内皮細胞下に酸化 LDL を投与させた後にエラグ酸を同時に投与して単球挙動を観察したところ、浸潤した単球数が顕著に減少した。これは、エラグ酸の抗酸化作用が大きく関与しているものと考えられた。

#### 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 2 件)

Sumita Yoshikawa W, Nakamura K, Miura D, Shimizu J, Hashimoto K, Kataoka N, Toyota H, Okuyama H, Miyoshi T, Morita H, Fukushima Kusano K, Matsuo T, Takaki M, Kajiya F, Yagi N, Ohe T, Ito H, Increased Passive Stiffness of Cardiomyocytes in the

Transverse Direction and Residual Actin and Myosin Cross-Bridge Formation in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic beta-Adrenergic Stimulation, Circulation Journal 77(3), 741-748, 2013 (査読有り)

K. Hashimoto, N. Kataoka, E. Nakamura, K. Hagihara, T. Okamoto, H. Kanouchi, S. Mohri, K. Tsujioka, F. Kajiya, Live-cell visualization of the trans-cellular mode of monocyte transmigration across the vascular, endothelium, and its relationship with endothelial PECAM-1, The Journal of Physiological Sciences 62(1), 63-69, 2012.

(査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

片岡 則之, 橋本 謙, 動脈硬化発生における細胞・分子のナノ/マイクロメカニクス、日本機械学会年次大会、2013 年 9 月 10 日、岡山大学(岡山県岡山市)

片岡 則之, 橋本 謙, 坂元 尚哉, 岡本 威明, 毛利 聡, アクチン結合ペプチド Lifeact を用いた遊走白血球中のアクチンダイナミクス観察、日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会、2013 年 1 月 11 日、産業技術総合研究所 つくばセンター(茨城県つくば市)

N. Kataoka, K. Hashimoto, T. Okamoto, S. Mohri, F. Kajiya, Realtime observation of actindynamics in living and migrating monocytic cells with Lifeact-GFP fusion protein, Biomedical Engineering Society Annual Meeting, 2012 年 10 月 25 日, Atlanta, GA, USA

〔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

#### 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・教授  
研究者番号：20250681

##### (2) 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