

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659281

研究課題名（和文）動脈硬化進展における P2Y₁₂ 受容体の関与研究課題名（英文）The role of ADP receptor (P2Y₁₂) in the development of transplant arteriosclerosis

研究代表者

梅村 和夫 (UMEMURA KAZUO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40232912

研究成果の概要（和文）：骨髄由来平滑筋様細胞の ADP (P2Y₁₂) 受容体が移植後動脈硬化の進展にどのように関与しているかを検討し、以下の結果を得た。ADP 安定体アナログである 2-methylthio-ADP で刺激した所、phosphoinositide 3-kinase-Akt 経路並びに extracellular signal-regulated kinase 経路を介して遊走能が有意に亢進することが明らかとなった。しかし、骨髄由来細胞から平滑筋様細胞への分化能に対して、P2Y₁₂ 受容体の関与は認められなかった。以上の結果から、血小板上に発現している P2Y₁₂ 受容体だけでなく、骨髄由来平滑筋様細胞に発現している P2Y₁₂ 受容体も、移植後動脈硬化の進展に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The role of ADP (P2Y₁₂) receptor on smooth muscle like cells (SMCs) in the development of transplant arteriosclerosis (TA) was examined. A stable ADP analog, 2-methylthio-ADP-induced cell migration was significantly decreased in P2Y₁₂-deficient-SMCs. In addition, the migration was significantly decreased by the pretreatment with wortmannin (phosphoinositide 3-kinase [PI3K] inhibitor) or PD98059 (extracellular signal-regulated kinase [ERK] inhibitor). However, the differentiation of bone marrow-derived cells into SMCs was not associated with P2Y₁₂ receptors. Thus, the migration of SMCs mediated by P2Y₁₂ receptors may play an important role in the development of TA, via PI3K-Akt and ERK signaling pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ADP (P2Y₁₂) 受容体、移植後動脈硬化、平滑筋様細胞、遊走、分化

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後、慢性期にみとめられる移植後動脈硬化の進展に、血小板に発現している ADP (adenosine diphosphate) 受容体の一つである P2Y₁₂ 受容体が寄与していることが最近報告された。しかし、P2Y₁₂ 受容体の発現は血小板以外でも報告されていることから、血小板以外の細胞における P2Y₁₂ 受容体を介した移植後動脈硬化進展への直接的関与が予

想される。

2. 研究の目的

そこで本研究では、P2Y₁₂ 受容体欠損 (KO) マウスより採取した骨髄細胞から分化させた平滑筋様細胞を用いて、P2Y₁₂ 受容体を介した遊走能並びに分化能への作用、および、その細胞内シグナルを検討した。

3. 研究の方法

野生型 (WT) マウスまたは KO マウスの骨髄 (大腿骨・脛骨・上腕骨) より単核球を採取した。次に、血小板由来成長因子 (Platelet-derived Growth Factor; PDGF) と塩基性繊維芽細胞成長因子 (basic Fibroblast Growth Factor; bFGF) を加えた DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 液で単核球を培養 (37°C、5% CO₂) し、平滑筋様細胞へ分化させた。各実験には5世代目の平滑筋様細胞 (Smooth muscle-like cells; SMLCs) を用いた。

細胞の遊走はボイデンチャンバー法にて評価した。アゴニストとして ADP 並びに ADP 安定体アナログである 2-methylthio-ADP (2MeSADP) を用い、24 時間刺激した。各ウェルあたりの遊走した細胞をランダムに 5 つのフィールドにてカウントし平均を $n = 1$ とした。1 群あたり 6 ウェルで実験を行った。

細胞内シグナルを検討するために、細胞の遊走に重要な役割を果たしていると考えられている phosphoinositide 3-kinase (PI3K-Akt) 経路、並びに extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路について市販のキットを用いて検討した。また、PI3K の阻害剤である wortmannin あるいは ERK の阻害剤である PD98059 で前処置し、同様の実験を行った。

最後に、骨髄由来細胞から平滑筋様細胞への分化能の評価を行った。DMEM に PDGF と bFGF を加えて分化させた群と、さらに、2MeSADP を加えて分化させた群とで刺激後 7 日目に比較検討を行った。また、P2Y₁₂ 受容体とは別の ADP 受容体である P2Y₁ 受容体の関与が予想されたため、P2Y₁ 受容体アンタゴニストである MRS2179 で前処置した際の比較検討も実施した。各ウェルあたりの分化した細胞をランダムに 10 個のフィールドにてカウントし平均を $n = 1$ とした。1 群あたり 3 ウェルで実験を行った。

データは mean \pm SEM で表示した。統計解析には、unpaired student's t-test または one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

平滑筋様細胞を ADP で刺激した際の遊走した細胞 (紫色) の典型的な画像を図 1A 示す。ADP 刺激により WT 群では多くの細胞の遊走が確認されたが、KO 群では遊走細胞が

減少した。また、無刺激 (コントロール) の場合、WT、KO 両群共に細胞の遊走はほとんど起こらなかった。

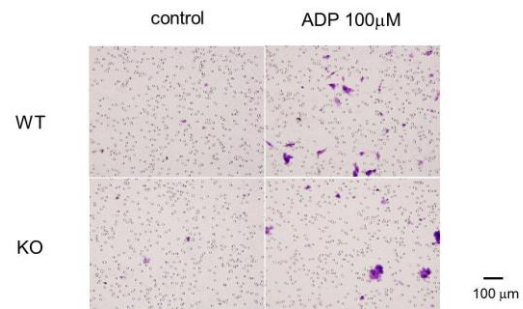
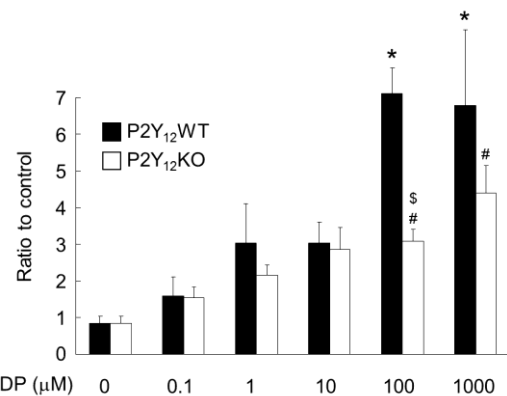


図 1A. ADP 刺激後の細胞遊走画像。Scale bar = 100 μ m for all images

上記結果を基に遊走した細胞数を計測したところ、WT 群、KO 群ともに ADP 100 μ M 以上の濃度で無刺激 (コントロール) 群に比して有意な遊走亢進が認められた (図 1B)。しかしながら、KO 群においては、ADP 100 μ M で WT 群に比して有意に遊走が減少した (図



1B)。

図 1B. ADP 刺激後の遊走細胞数の比較。* $p < 0.05$ relative to WT control. # $p < 0.05$ relative to KO control. \$ $p < 0.05$ relative to respective WT group.

次に、2MeSADP で平滑筋様細胞を刺激した時の遊走能の変化を検討した。遊走した細胞 (紫色) の典型的な画像を図 2A 示す。ADP の場合と同様、2MeSADP 刺激により WT 群では多くの細胞の遊走が確認されたが、KO 群では遊走細胞が減少した。また、無刺激 (コントロール) の場合、WT、KO 両群共に細胞の遊走はほとんど起こらなかった。

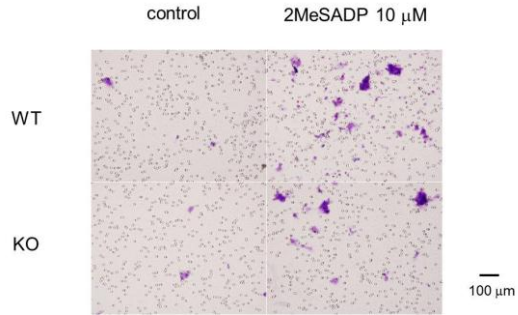


図 2A. 2MeSADP 刺激後の細胞遊走画像. Scale bar = 100 μm for all images

上記結果を基に遊走した細胞数を計測したところ、WT 群では 2MeSADP 1 μM 以上の濃度で、KO 群は 100 μM で無刺激（コントロール）群に比して有意な遊走亢進が認められた（図 2B）。しかしながら、KO 群においては、10 μM および 100 μM で WT 群に比して有意に遊走が減少した（図 2B）。

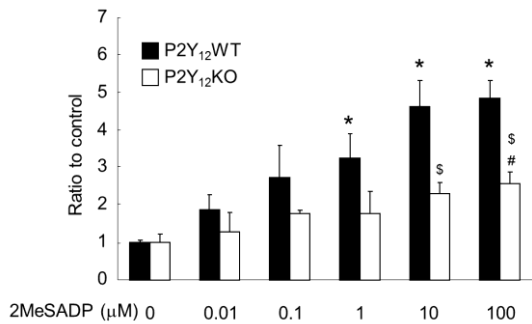


図 2B. 2MeSADP 刺激後の遊走細胞数の比較. * $p < 0.05$ relative to WT control. # $p < 0.05$ relative to KO control. $^{\$}p < 0.05$ relative to respective WT group.

次に PI3K 阻害薬である wortmannin を前処置した後に、2MeSADP で刺激した時の遊走能の変化を検討した。遊走細胞（紫色）の典型的な画像を図 3A 示す。wortmannin 前処置により、WT、KO 両群共に遊走細胞が減少した。

また、遊走細胞数をカウントしたところ、WT、KO 両群共に、wortmannin 前処置により、2MeSADP 刺激による遊走が有意に減少した（図 3B）。

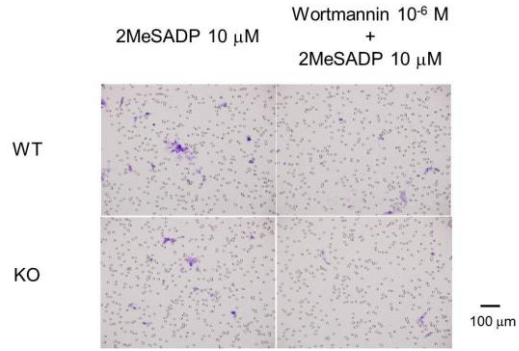


図 3A. PI3K 阻害剤 (wortmannin) 前処置後、2MeSADP 刺激による細胞遊走画像. Scale bar = 100 μm for all images

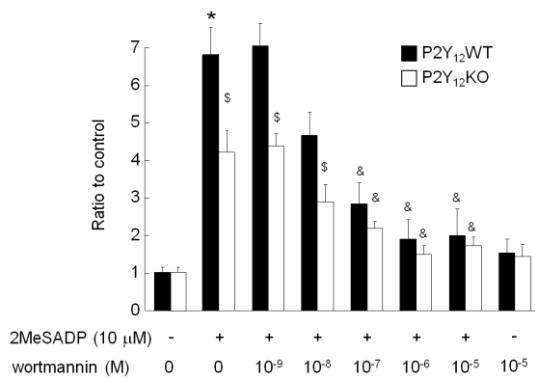


図 3B. 2MeSADP 刺激後の遊走細胞数の比較. * $p < 0.05$ relative to WT control. $^{\$}p < 0.05$ relative to respective WT group. $^{\&}p < 0.05$ relative to respective 2MeSADP group.

さらに、ERK の阻害薬である PD98059 を前処置した後に、2MeSADP で刺激した時の遊走能の変化を検討した。遊走細胞（紫色）の典型的な画像を図 4A 示す。PD98059 前処置により、WT、KO 両群共に遊走細胞が減少した。

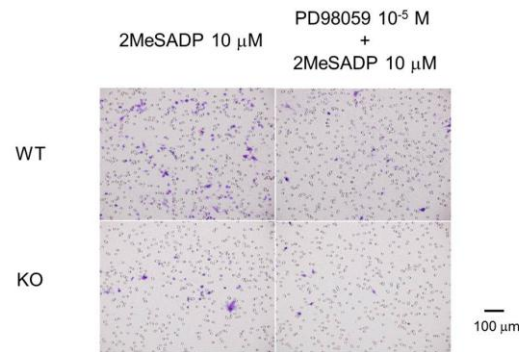


図 4A. ERK 阻害薬 (PD98059) 前処置後、2MeSADP 刺激による細胞遊走画像. Scale bar = 100 μm for all images

また、細胞数をカウントしたところ、WT 群では PD98059 10^{-6} M 以上の濃度において、2MeSADP 刺激による遊走が有意に減少した (図 4B)。KO 群では PD98059 10^{-5} M 以上の濃度において、2MeSADP 刺激による遊走が有意に減少した (図 4B)。

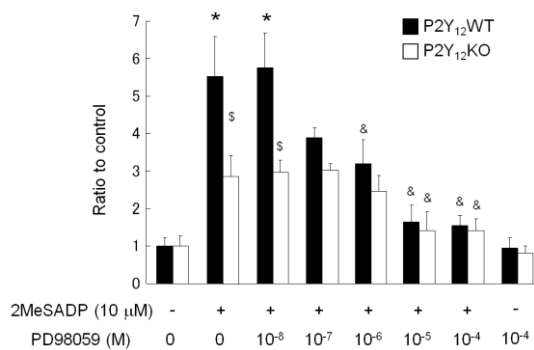


図 4B. 2MeSADP 刺激後の遊走細胞数の比較。

* $p < 0.05$ relative to WT control. [§] $p < 0.05$ relative to respective WT group. [&] $p < 0.05$ relative to respective 2MeSADP group.

最後に、骨髄由来細胞から平滑筋様細胞への分化能に対する P2Y₁₂ 受容体の関与を検討した。DMEM に PDGF と bFGF を加えて分化させたコントロール群と、さらに、2MeSADP を加えて分化させた群とで比較検討を行った。分化した細胞の典型的な画像を図 5A に示す。PDGF + bFGF で刺激したコントロール群と比較して、PDGF + bFGF + 2MeSADP で培養すると、WT、KO 両群共に分化細胞が多く認められた。また、P2Y₁ 受容体拮抗薬の MRS2179 で前処置したところ、WT、KO 両群共に分化細胞が減少した (図 5A)。

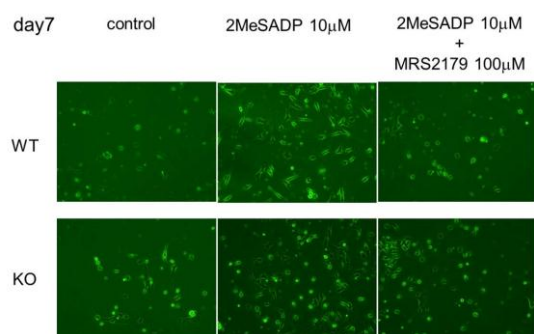


図 5A. 2MeSADP 刺激による分化能の比較。

2MeSADP で 7 日間刺激した後の分化細胞数は、WT、KO 両群共にコントロール群に比して有意に増加した (図 5B)。また、P2Y₁

拮抗薬の MRS2179 で前処置したところ、WT、KO 両群共に 2MeSADP 刺激による分化細胞数が有意に減少した。

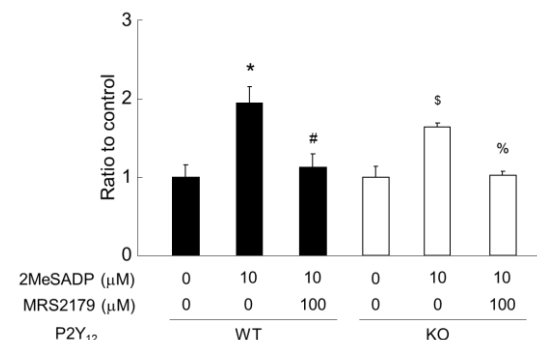


図 5B. 2MeSADP 刺激後の分化細胞数の比較。

* $p < 0.05$ relative to WT control. [§] $p < 0.05$ relative to KO control. # $p < 0.05$ relative to 2MeSADP-WT group. % $p < 0.05$ relative to 2MeSADP-KO group.

以上の結果から、P2Y₁₂ 受容体刺激による遊走能の亢進は、PI3K-Akt 経路、並びに、ERK 経路を介することが明らかとなった。一方、分化能の亢進には、P2Y₁₂ 受容体ではなく、もう一方の ADP 受容体である P2Y₁ 受容体が関与していることが明らかとなった。従って、血小板に発現している P2Y₁₂ 受容体だけでなく、骨髄由来平滑筋様細胞上に発現している P2Y₁₂ 受容体も、上記経路を介した遊走能の亢進により、移植後動脈硬化の進展に関与していると考えられる。これまでチクロピジンやクロピドグレルといった P2Y₁₂ 受容体拮抗薬は抗血小板薬として臨床適応されているが、本研究結果より、免疫抑制薬としての適応拡大の可能性が考えられる。さらに作用機序が異なるシクロスポリンやタクロリムス等の免疫抑制薬との併用による相乗効果も期待でき、移植患者の予後の更なる改善につながる可能性が考えられる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Yuji Matsumoto, Kosuke Harada, Kazuo Umemura. ADP receptor-mediated differentiation of bone-marrow-derived cells into smooth muscle-like cells. 第 85 回 日本薬理学会年会. 2012 年 3 月 14~16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 和夫 (UMEMURA KAZUO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40232912

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし