

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 4 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700546

研究課題名（和文） 動脈硬化阻止システムとしての単球の血管内への逆浸潤過程の解析

研究課題名（英文） Analysis of reverse transmigration of monocytes across endothelium as the anti-atherogenic system.

研究代表者 橋本 謙（HASHIMOTO KEN）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80341080

研究成果の概要（和文）：動脈硬化形成過程で見られる単球の内皮下から血管内への“逆浸潤”の意義は不明である。我々は、逆浸潤の定量評価系を構築し、高濃度 IL-1 β が逆浸潤を選択的に抑制することを見出した。即ち、動脈硬化のような強炎症下では逆浸潤が阻害されることで内皮下の病態因子の排除能が減弱していることが示唆された。一方、浸潤する単球と内皮細胞との接触部では微細な膜の変形等の物理的・機械的な刺激が発生している。我々は、機械刺激感受性分子 TRPV2 の内皮細胞における役割を検討し、本分子が、内皮細胞が“動く”為に必要な分子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Pathophysiological significance of monocyte reverse transmigration from subendothelium back into the blood stream during atherogenesis is unclear. We established the quantitative evaluation system of reverse transmigration, and revealed that high dose of IL-1 β selectively impaired the process. This suggests that in strong inflammatory conditions like atherosclerosis, the clearance activity of pathogenic substances in subendothelium is impaired due to suppressed reverse transmigration. Meanwhile, mechanical stimulations like membrane stretch are generated at the border of migrating monocytes and endothelial cells. We evaluated the role of TRPV2, previously reported mechano-sensitive cation channels, and demonstrated its necessity for cells to move.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：循環生理学，動脈硬化

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：動脈硬化、血管内皮細胞、単球、逆浸潤、TRPV2

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳卒中等の心血管系疾患は死因別死亡率の過半数を占めているが、これらの主要な病因は動脈硬化である。我々は動脈硬化形成過程において、血中を循環する単球が、傷害を受けた血管内皮細胞へ接着し、内皮下組織へ潜り込む（浸潤）分子メカニズムを解明してきた。動脈硬化病変では酸化脂質と共に単球から分化したマクロファージが

観察されることから、単球の内皮下への浸潤現象は動脈硬化を発症させる重要な初期プロセスとして認識されている。しかし、我々の観察では、単球は内皮層に潜り込む（順方向浸潤）だけでなく、再び血管内皮上へ戻る（逆浸潤）といった複雑な現象が認められる。このことから、単球は内皮下に浸潤して酸化脂質等の病態因子を貪食し、逆浸潤により再び血流に戻ることで血管壁に蓄積した動脈

硬化因子を効率的に除去する、という“動脈硬化阻止システム”を生理的に有しており、この中の逆浸潤プロセスが傷害されると単球が内皮下に蓄積し、病態が進行するという仮説を着想するに至った。

一方、単球の内皮下浸潤に関する研究はこれまで、両細胞に多数存在する接着分子やケモカインといった“化学的”な観点での解析が主流であった。しかし、単球が内皮細胞間隙という非常に狭い空間をアメーバの様に変形しながら浸潤する際には、両細胞の接触部ではかなり大きな膜の変形・伸展といった“物理的・機械的（メカニカル）”な刺激が発生しており、刻々と変化するこれらの刺激を両細胞に伝達し、適切な分子再編成等の“化学的”応答に変換する制御系の存在が想定される。このような“機械的”制御系の理解が、これまで蓄積されてきた“化学的”知見と融合すれば、単球の浸潤過程の理解が飛躍的に進むことが期待できる。

2. 研究の目的

単球が生理的に“動脈硬化阻止機能”を有しており、これが機能不全に陥ることで動脈硬化が促進するという先述の仮説を検証する為、これまで注目されてこなかった逆浸潤現象の定量評価系を構築し、分子的基盤を明らかにし、更に動物実験も含め動脈硬化の本質を統合的に解明する。また、従来あまり着目されてこなかった機械的刺激・応答系の理解を進める為、既報の機械刺激感受性分子（メカノセンサー候補分子）のうち、生体にとって重要なメッセンジャーである Ca^{2+} の流入経路としても機能する TRPV2（Transient Receptor Potential Vanilloid 2）に着目し、内皮細胞における役割を検討する。

3. 研究の方法

（1）逆浸潤評価系の構築

ヒト末梢血より分離した単球を培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）に添加し、インキュベータ内で1時間反応後、PBS(+)で適切な回数洗浄することにより内皮細胞上の未浸潤単球のみを除去した。その後、反応を再開することで、一度浸潤した単球の逆浸潤プロセスを評価した。浸潤率は、各時点で取得した位相差画像において内皮上及び内皮下に存在する単球をカウントすることで算出した。順方向の浸潤率（内皮上→内皮下）は最初の1時間反応直後（洗浄前）の位相差画像から計算した。一方、逆浸潤率（内皮下→内皮上）は洗浄・反応再開後の各時点（数時間～最大2日程度）での位相差画像から計算した。本実験系により、単球の順・逆方向の浸潤を同時に且つ独立に評価することが可能である。

（2）IL-1 β の逆浸潤に及ぼす影響評価

上記（1）の実験系において、培地中へのIL-1 β （1~1000pg/mL）の添加により、種々の強さの炎症状態を再現した環境下で順方向及び逆方向の浸潤を独立に評価した。

（3）内皮細胞接着因子の逆浸潤への関与

上記（1）の実験系において、順方向の浸潤に関与することが既に知られている内皮細胞間接着因子（PECAM-1, VE-cadherin）について、各々の阻害抗体を用いることにより、逆浸潤への関与を評価した。

（4）TRPV2 ノックダウン系の構築

siRNAの導入によりHUVECにおいてTRPV2のノックダウンを行った。siRNAの導入にはLipofectamine 2000（Invitrogen社）を用い、最適な導入条件を検討した。ノックダウン効率の評価はmRNAレベル（RT-PCR法）、及び蛋白レベル（Western blot法）の両方で行った。

（5）TRPV2 ノックダウン細胞における細胞の遊走活性、及び仮足形成能の評価

TRPV2のノックダウン細胞を用いてタイムラプス観察を行い、細胞の遊走活性、及び仮足形成能を評価した。これらの解析には画像解析ソフトImage Jを用いた。一部の実験は、EGTAにより細胞外 Ca^{2+} をキレートした条件下で行い、TRPV2機能における Ca^{2+} の必要性について検討した。

（6）スクラッチ実験

血清除去した内皮細胞層に微小チップにて多数の傷（スクラッチ）を入れ、強制的に細胞の増殖・遊走を刺激した。一定時間（4-5時間）経過後、細胞を回収してRT-PCRを行い、TRPV2発現量を定量した。

4. 研究成果

（1）逆浸潤評価系の構築

先述したような逆浸潤評価系において、単球添加1時間後のPBS(+)による洗浄の回数や強さを最適化することにより、内皮細胞層や内皮下に浸潤した単球にダメージを与えることなく、内皮上に接着した未浸潤単球のみを除去することが可能となった。これにより、順方向と逆方向の浸潤を独立且つ定量的に評価できる実験系の構築に至った。

（2）IL-1 β の逆浸潤に及ぼす影響評価

本実験系では、驚くべきことに、IL-1 β なしの条件下において単球は最も活発に内皮下に浸潤し、且つ、最も活発に逆浸潤した（図1）。一方、高濃度のIL-1 β の存在下では順浸潤、逆浸潤共に阻害されていた。実験の反復

数が十分とは言えないこと、また、現在の一般的な解釈を考慮すると、この結果については更なる詳細な追加実験・検討が必要と思われるが、今回得られた結果から考えられることは、実は単球は生理的条件下や弱い炎症下において非常に活発に血管内外を行き来しており、内皮下組織に少量蓄積する酸化脂質等の病態因子を常に貪食・処理しているのかもしれない、ということである。強い炎症条件下ではこのパトロール活性が阻害されることで、病態因子のクリアランス能力が低下し、結果として動脈硬化の病態プロセスが活性化されている可能性が考えられる。

(3) 内皮細胞接着因子の逆浸潤への関与

本実験については、現時点ではデータ収集の途上であり、最終的な解釈は困難な状況であるが、順方向の浸潤を促進することが知られている PECAM-1 については、阻害抗体により逆浸潤も阻害されており、このことは PECAM-1 が両方向の浸潤を共に促進していることを示唆している (図 2)。また、順方向の浸潤に対して抑制的に働くことが知られている VE-cadherin については更なる詳細な検討が必要である。

(4) TRPV2 ノックダウン系の構築

siRNA の導入条件を最適化することにより、HUVEC における TRPV2 の発現を mRNA レベルで 16%、蛋白レベルで 34% までノックダウンすることに成功した。また、siRNA の導入効率は 93% であった (蛍光標識 siRNA による評価)。

(5) TRPV2 ノックダウン細胞における細胞の遊走活性、及び仮足形成能の評価

TRPV2 のノックダウン細胞では細胞の動き・遊走能 (移動速度) が有意に阻害されていた (図 3)。画像解析の結果、細胞形状はより円形に近くなっており、葉状・糸状仮足等の形成阻害が考えられた。また、TRPV2 が正常に存在する場合でも、EGTA により細胞外 Ca^{2+} をキレートした条件下では TRPV2 ノックダウン細胞と同様の表現型を示したことから (図 4)、本現象においては TRPV2、及び TRPV2 を介して細胞内に流入する Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、細胞層に単一の微小な傷 (スクラッチ) を形成し、これに対する遊走・回復過程を観察したところ、TRPV2 ノックダウン細胞では傷により生じた空間を修復する為の遊走能が障害されていた。このことは、動脈硬化等において形成され得る内皮層の傷に対する回復障害を示唆するものと考えられた。

(6) スクラッチ実験

細胞層に微小な傷 (スクラッチ) を多数形成することで強制的に細胞の遊走を刺激し

た条件下では TRPV2 の mRNA 発現量が有意に上昇していた (図 5)。

上記 (5)、(6) の結果より、TRPV2、及び TRPV2 を介して流入する Ca^{2+} は細胞が仮足を形成して動く、という生存にとって極めて基本的且つ重要な応答を遂行する為に必要な分子であることが示唆された。

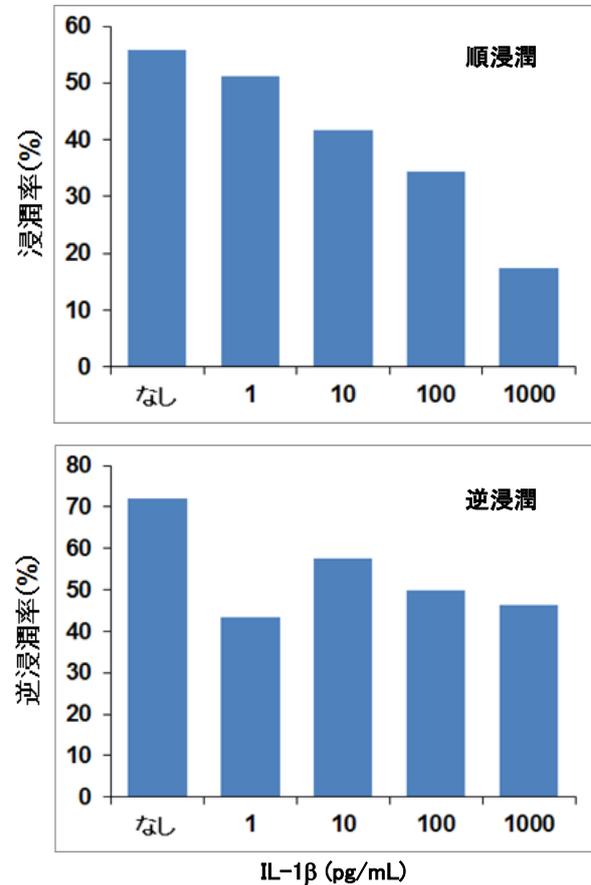


図1 IL-1βの逆浸潤に及ぼす影響

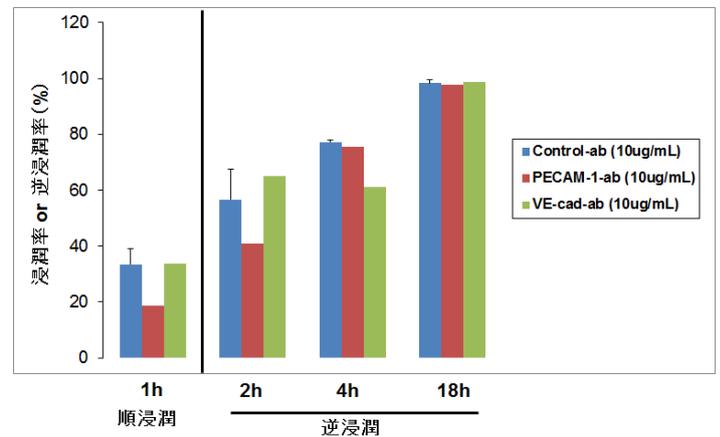


図2 内皮細胞接着因子の逆浸潤への関与

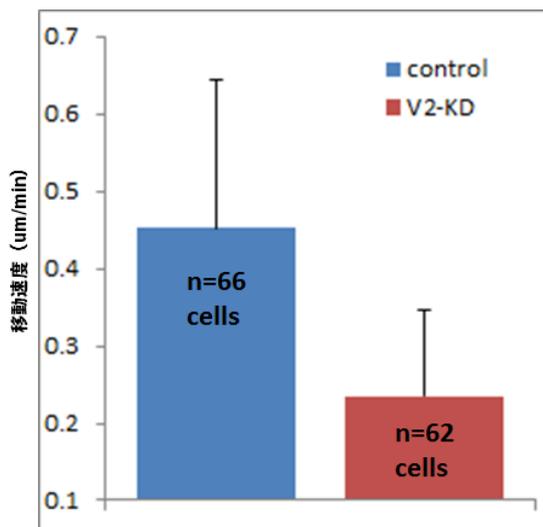


図3 TRPV2 ノックダウンによる細胞遊走能評価

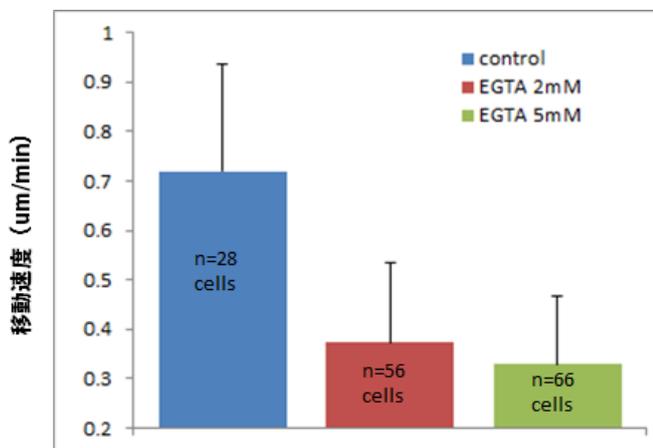


図4 EGTA による細胞遊走能への影響

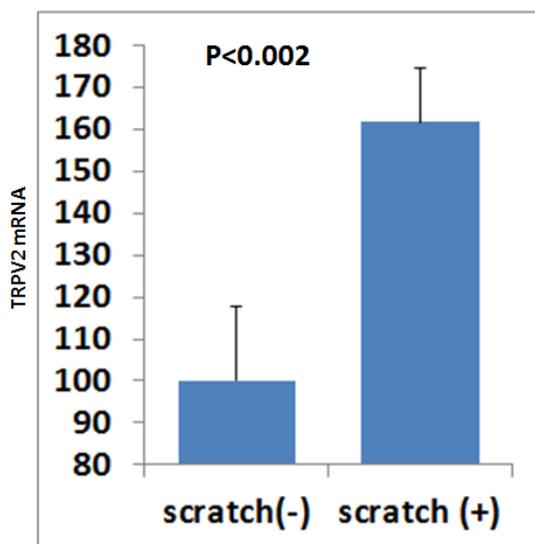


図5 スクラッチ実験

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 5 件)

- (1) 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 β -Adrenergic Stimulation. *Circ J*. 2013 Feb 25;77(3):741-8. 査読有
- (2) Himi N, Hamaguchi A, Hashimoto K, Koga T, Narita K, Miyamoto O. Calcium influx through the TRPV1 channel of endothelial cells (ECs) correlates with a stronger adhesion between monocytes and ECs. *Adv Med Sci*. 2012;57(2):224-9. doi: 10.2478/v10039-012-0044-4. 査読有
- (3) Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Hagihara K, Okamoto T, Kanouchi H, Mohri S, Tsujioka K, Kajiya F. Live-cell visualization of the trans-cellular mode of monocyte transmigration across the vascular endothelium, and its relationship with endothelial PECAM-1. *J Physiol Sci*. 2012 Jan;62(1):63-9. Epub 2011 Nov 23. 査読有
- (4) Hashimoto K, Kataoka N, Mohri S, Kajiya F. Cadherins in potential link between atherosclerosis and cancer. *Int J Cardiol*. 2011 Jun 16;149(3):397. Epub 2011 Apr 3. No abstract available 査読有
- (5) Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Hagihara K, Hatano M, Okamoto T, Kanouchi H, Minatogawa Y, Mohri S, Tsujioka K, Kajiya F. Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent trans migratory activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions. *Int J Cardiol*. 2011 Jun 2;149(2):232-9. Epub 2010 Dec 28. 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- (1) 橋本 謙、氏原 嘉洋、毛利 聡、発生段階の心筋細胞の分化・分裂機構の解明に向けた予備的解析（Preliminary analysis of differentiation and proliferation program of cardiomyocytes in developmental stages.）第 90 回日本生理学会大会，2013. 3. 27-29，東京（J. Physiol. Sci. 63 (Suppl. 1), S120, 2013)
- (2) Noriyuki Kataoka, Ken Hashimoto, Takeaki Okamoto, Satoshi Mohri, Fumihiko Kajiya, Real-time observation of actin dynamics in migrating monocytic cells with Lifeact-GFP fusion protein. Biomedical Engineering Society Annual Meeting (2012 年 10 月、アトランタ)
- (3) 橋本 謙、氏原 嘉洋、片野坂 友紀、毛利 聡、動脈硬化初期の単球－血管内皮間相互作用におけるメカノセンサー（TRPV2）の役割、第 64 回日本生理学会中国四国地方会（2012. 10. 27-28, 高知）抄録集 p36
- (4) 片岡 則之、橋本 謙、毛利 聡、梶谷 文彦、マイクロピペットを用いたケモカイン投与による白血球の遊走制御
Observation of leukocyte migration induced by chemoattractant injection from micropipette, 第 50 回日本生体医工学会 2011. 4. 29-5. 1、東京、CD-ROM

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 謙 (HASHIMOTO KEN)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80341080