

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650250

研究課題名(和文)流れ剪断応力に应答するLDL受容体の探索

研究課題名(英文)Cloning of LDL receptors responding to fluid shear stress

研究代表者

山本 希美子(Yamamoto, Kimiko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00323618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞や脳梗塞等の血管病の原因となる粥状動脈硬化症の発症に関わる分子を探索した。粥状動脈硬化症は内皮細胞が乱流性の流れ剪断応力に曝される血管の分岐部に好発するが、その分子機構は明らかではない。そこで本研究では、完全長cDNAライブラリーを用いて乱流の剪断応力に应答するLDL受容体を発現クローニングした。ヒト血管内皮細胞において、遺伝子およびタンパクの発現が層流の剪断応力により減少し、乱流の剪断応力により増大する2種のクローンを特定し、ヒト動脈硬化病変に発現することを免疫染色により確認した。以上の結果から、本研究で発見した2種の分子が粥状動脈硬化症の発症機序に関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：LDL receptors, which were related to the onset of atherosclerosis caused vascular diseases such as the myocardial infarction or the cerebral infarction, were cloned. Although the pathological findings, which the atherosclerosis frequently appears on the endothelial cells exposed to turbulent fluid shear stress in the vascular bifurcation, were widely known, the details of the molecular mechanism were not fully apparent. Two kinds of clones that the mRNA and protein expression levels were down-regulated in response to laminar shear stress whereas those expression levels were up-regulated in response to turbulent shear stress were identified in human vascular endothelial cells by using a full-length cDNA library. The immunostaining study was confirmed that these two kinds of protein were expressed in human atherosclerotic lesions. These results indicate that the molecules discovered in this study play an important role in the mechanism of the onset of atherosclerosis.

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：流れ剪断応力 LDLコレステロール 動脈硬化 血管内皮細胞 乱流 完全長cDNAライブラリー 発現クローニング

1. 研究開始当初の背景

血管は組織に酸素や栄養素を供給する他、生体にとって多くの重要な働きを担っている。血管の働きはホルモンやサイトカイン、神経間伝達物質などの“化学的刺激”を介する調節を受けているが、近年、血管内に発生する血流や血圧に基づく流れ剪断応力や伸展張力といった“物理的刺激”によっても血管の働きが制御を受け、循環機能の恒常性の維持に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。また、血管の分岐部などに発生する乱流性の剪断応力により、粥状動脈硬化や動脈瘤などの血管病を発生することも指摘されている。

脳卒中や心筋梗塞は致死率が高く、生存しても重篤な後遺症を残すことから、その原因と病態の解明及び、効果的な予防と治療法の開発に対する社会的な要請は極めて大きい。これらの血管病の原因となる粥状動脈硬化巣では、動脈の分岐部や湾曲部の血液の流れが乱れ、かつ剪断応力の低い部位にコレステロールが沈着し、それをマクロファージが貪食して泡沫化することでアテロームが形成される。併せて、血管平滑筋細胞が遊走・増殖して血管内膜の肥厚が生じて血管内腔を狭窄し、血流を障害もしくは遮断する。これまでの多くの研究により、マクロファージの泡沫化やそれ以降の病変の進行の分子機構はかなり解明が進んでいるが、病変発生の最初に起こる血管壁へのコレステロール蓄積の機序に関してはまだよく分かっていない。血中 LDL の細胞内取りこみに関わる分子としては、唯一、Goldstein と Brown らが発見した LDL 受容体があるが、内皮細胞での発現は低く、どこまで機能しているかは不明である。また、この受容体を欠損した動物でも、内皮下の LDL 蓄積が起こることから、粥状動脈硬化発生には関係しないと考えられている。そこで本研究では、乱流性の剪断応力に応答する LDL 受容体を含む動脈硬化関連分子を新規に探索し、その機能を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

脳卒中や心筋梗塞の原因となる粥状動脈硬化症は動脈の分岐部や湾曲部の血液の流れが乱れている局所に好発することが以前より報告されている。粥状動脈硬化症は悪玉コレステロールとして知られている LDL コレステロール (LDL) が血管内皮細胞に沈着することにより始まり、最終的には血管壁が肥厚し、血流を障害もしくは遮断する。これまで、血管内皮細胞へどのような分子機構で LDL が取り込まれるかの詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では、粥状動脈硬化症の原因分子を探索することを目的として、乱流性の剪断応力に応答する LDL 受容体を新規にクローニングし、その生理的・病態的な意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 完全長 cDNA ライブラリーの発現クローニング

ヒト臍帯静脈内皮細胞から 12 万種類の完全長 cDNA 溶液を調製し、cDNA ライブラリーを作製した。96 well plate に培養した COS-7 細胞に、リポフェクション法により遺伝子を導入した。ヒト末梢血から精製した LDL に 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetra-methyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI-C₁₈) をラベルし (DiI-LDL)、密度勾配遠心及び透析操作で精製した。遺伝子導入後 2 日目の COS-7 細胞に、DiI-LDL を反応させ、蛍光顕微鏡及びマイクロプレートリーダーを用いて細胞への取りこみを定量した (1 次スクリーニング)。DiI-LDL を取り込む働きのある遺伝子を再度 COS-7 に導入し観察を 2 回繰り返すことで、再現性を確認した (2 次、3 次スクリーニング)。3 次スクリーニングで陽性反応のある遺伝子の塩基配列を DNA シーケンサーで同定し、遺伝子を検索した。アミノ酸配列から、タンパクの二次構造を検索し、既知の LDL 受容体との相同性を解析した。

(2) ターゲット遺伝子の同定

各種ヒト血管内皮細胞 (大動脈、冠動脈、肺動脈、臍帯静脈、微小血管) を培養し、mRNA を抽出し、total RNA を精製した。制限酵素で消化した cDNA をプローブとして、ノーザンブロット法により、ターゲットの遺伝子のヒト血管内皮細胞における発現を定量した。また、内皮細胞以外のヒトの臓器や組織、マクロファージ細胞における遺伝子発現を検討する為、ノーザンブロット法と同様に確認した。

また、各種ヒト内皮細胞の中でも、特に動脈硬化のできやすい冠動脈内皮細胞について、層流と乱流の流れ剪断応力を負荷し、mRNA を抽出した。Real-time PCR 法によりターゲットの遺伝子の発現を定量し、流れ刺激に応答するかどうかを確認した。ここで、遺伝子発現が層流刺激で減少し、乱流刺激で増大するものを選別した。また、ターゲット遺伝子の発現変化と LDL の取りこみに相関があるかをスクリーニングの際に用いた方法で確認し、特に相関の高いものを流れ刺激応答性の LDL トランスポーター遺伝子を決定した。さらに、乱流刺激により発現が上昇した内皮細胞に遺伝子配列を基に作製した siRNA を導入し、その発現を抑制したときに LDL の取りこみが減少するか検討した。

ヒト動脈硬化病変の病理組織を用いて in situ ハイブリダイゼーションを行い、動脈硬化巣にターゲットの遺伝子が存在するかどうかを確認した。

(3) タンパクの機能解析

アミノ酸配列から抗原となるペプチド配列を予測し、抗ペプチド抗体を作製する。ウエスタンブロット法や免疫蛍光染色に

よりタンパクの発現の定量及び細胞内での分布の局在を観察した。作製した抗体が中和抗体として機能するかどうかを確認する為に、遺伝子導入した COS-7 細胞に抗体を作用させた後、蛍光標識した LDL を反応させ、LDL の細胞への取りこみが阻害されるかどうかを検討した。

また、新規に作製した抗体を用いて、ヒト動脈硬化病変の病理組織の染色を行った。動脈硬化巣にターゲットタンパクが存在するかどうか確認した。さらに、ターゲットの完全長 cDNA に green fluorescent protein (GFP) の遺伝子を融合させる発現ベクターを構築する。ヒト血管内皮細胞及び、COS-7 細胞に遺伝子導入しその発現を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。流れ剪断応力を負荷し、その発現部位が移動するかどうか、また、蛍光標識した LDL を取り込ませた際に、LDL の集積部位と GFP 融合タンパクの発現部分が一致するかどうかをリアルタイムでイメージングした。更に、細胞を PFA で固定し、抗体で免疫蛍光染色し、GFP 融合タンパクと抗体が同じ部分に存在しているかどうかを検討した。

4. 研究成果

ヒト臍帯血静脈内皮細胞の mRNA を用いて、10.5 万種のクローン数を持つ完全長 cDNA ライブラリーを樹立した。このライブラリーを COS-7 細胞に遺伝子導入し、2 日後に DiI-LDL を作用させた発現クローニングを行い、LDL の取り込みに対して陽性の 105 種類のクローンを選別した。さらに、2 次、3 次スクリーニングを繰り返すことで、42 種類の陽性クローンを確定した。全ての遺伝子の DNA 配列をシーケンス解析した結果、重複していたクローンと機能が既知である遺伝子を除く 7 種類の遺伝子を特定した。7 種のクローン全てには、DiI-LDL の濃度依存的に細胞内に取り込むことが確認された (図 1)。

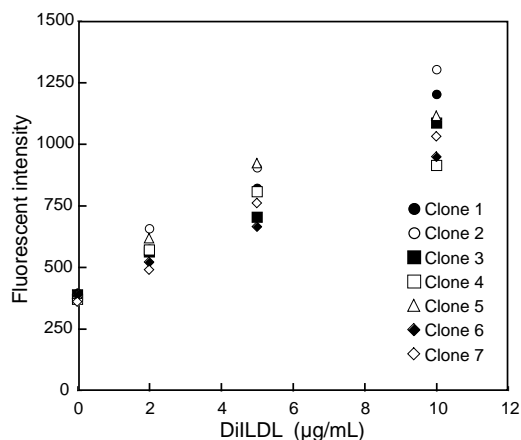


図 1. 完全長 cDNA を発現した COS-7 細胞への DiI-LDL の取り込み

LDL の取り込みが特異的であるかどうかを確認する為に、DiI でラベルしていない LDL (non-labeled LDL) を予め細胞に作用した後、DiI-LDL を加えた所、non-labeled LDL の濃度依存的に DiI-LDL の取りこみ量が減少した (図 2)。以上の結果は 7 種のクローン全てに LDL を特異的に取り込む性質があることを示す。

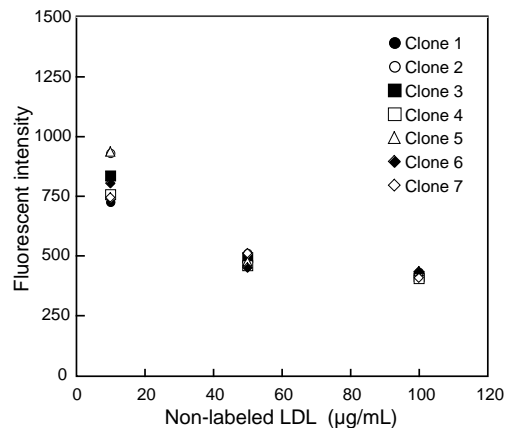


図 2. 完全長 cDNA を発現した COS-7 細胞への特異的な LDL の取り込み

さらに、冠動脈内皮細胞に層流 (Low flow: 1.5 dynes/cm²; High flow: 15 dynes/cm²) と乱流 (Turbulent flow) の流れ剪断応力を負荷し、それぞれの遺伝子の発現レベルを real-time PCR 法により定量した。既に発現レベルの変化が既知であるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (uPA) 遺伝子をポジティブコントロールとして、mRNA の発現レベルが層流の流れ剪断応力により減少し、乱流の流れ剪断応力により発現が増大する二種のクローンが特定されると共に (図 3)、免疫染色により、ヒト動脈硬化病変における発現を確認した (データは示さず)。

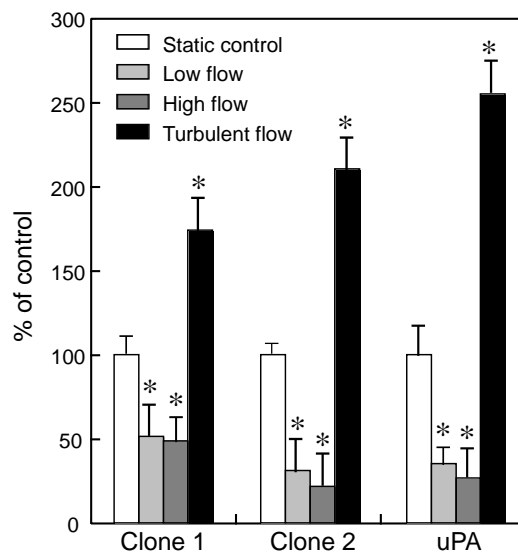


図 3. 冠動脈内皮細胞における mRNA 発現変化に及ぼす層流と乱流の流れ剪断応力の影響

以上の結果から、Clone 1 と Clone 2 の遺伝子は血管の分岐部に好発する粥状動脈硬化症の発生病序に参与する可能性が示唆された。これらの発見は粥状動脈硬化症の発生病構を明らかにするだけでなく、その治療や予防につながる新しい医薬品の開発につながる事が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. K. Yamamoto and J. Ando. Endothelial cell and model membranes respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases. *J. Cell Sci.* **126**, 1227-1234 (2013). (査読有り) Doi: 10.1242/jcs.119628.
2. J. Ando and K. Yamamoto. Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **99**, 260-268 (2013). (査読有り) Doi: 10.1093/cvr/cvt084.
3. Y. Abe, Y. Ozaki, J. Kasuya, K. Yamamoto, J. Ando, R. Sudo, M. Ikeda, and K. Tanishita. Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor. *PLoS ONE* **8** (12), 1-12 (2013). (査読有り) Doi: 10.1371/journal.pone.0082085.
4. S. Obi, H. Masuda, T. Shizuno, A. Sato, K. Yamamoto, J. Ando, Y. Abe, T. Asahara. Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **303**, C595-606 (2012). (Selected for Editor's Picks) (査読有り) Doi: 10.1152/ajpcell.00133.2012.
5. Y. Suzuki, K. Yamamoto, J. Ando, K. Matsumoto, T. Matsuda. Arterial shear stress augments the differentiation of endothelial progenitor cells adhered to VEGF-bound surfaces. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 91-97 (2012). (査読有り) Doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.088.

[学会発表] (計 19 件)

1. K. Yamamoto, "Dynamic Mechano-transduction in Vascular Cells" Seminar in the TEMASEK Life Sciences Laboratory, National University Singapore, Singapore, December 5, 2013. (Invited) (NUS)

2. K. Yamamoto, "Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells" Lecture in the Department of Bioengineering, Imperial College London, London, September 23, 2013. (Invited) (Imperial College London)

3. K. Yamamoto and Joji Ando, "Vascular endothelial cells respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases" 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society in conjunction with 52nd Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (JSMBE), Osaka, July 5, 2013. (Invited) (Osaka International Convention Center)

4. K. Yamamoto and Joji Ando, "Shear-stress-mediated control of vascular functions through endothelial ATP release and P2X4 ion channels" 14th International Congress of Biorheology and 7th International Conference on clinical Hemorheology, Istanbul, July 4, 2012. (Invited)

5. K. Yamamoto and Joji Ando, "ATP-gated P2X4 ion channel serve as transducers for shear stress mechanotransduction in vascular endothelial cells" Purine 2012 in Fukuoka: International Symposium on Purinergic Signaling in New Strategy of Drug Discovery, Fukuoka, June 1, 2012. (Invited) (Centennial Hall Kyushu University School of Medicine)

[図書] (計 1 件)

1. K. Yamamoto and J. Ando, "Endothelial mechanotransduction and its role in the control of vascular functions" in Shu Chien and Shi Yongde (eds.), Recent Advances in Mechanobiology, Shanghai Science and Technological Literature Publishing House, Shanghai, pp 175-179, 2012.

[その他]

ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/bme/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 希美子 (Yamamoto, Kimiko)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 00323618