

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461125

研究課題名(和文) 内皮細胞間ギャップ結合による血管新生の制御機構の解明

研究課題名(英文) Endothelial cellular gap junctions regulate the vascular angiogenesis

研究代表者

岡本 貴行 (Okamoto, Takayuki)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30378286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間ギャップ結合(GJ)は、コネクシン(Cx)分子によって形成されるチャンネルであり、小分子の直接の移送を介して細胞間情報伝達を行っている。血管内皮細胞間GJは血管の構造や機能維持に重要であると考えられている。過剰な炎症を原因とする動脈硬化や高血圧などの血管病の基盤には内皮機能障害と病的血管リモデリングが存在する。これまでに私は、内皮細胞のCx32が炎症と血液凝固の活性化を制御するなど内皮細胞機能を維持することを示してきた。本研究では、血管リモデリングに重要な過程である血管新生、特に、創傷治癒、新生血管形成、管腔形成におけるCx分子とGJの役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Gap junctions (GJs) are comprised of members of the connexin (Cx) family and endothelial GJs play an important role in vascular function, stability, and homeostasis. Endothelial dysfunction is related to cardiovascular diseases such as atherosclerosis. The alteration of Cxs expression in vascular endothelial cells contributes to the development of endothelial dysfunction and cardiovascular diseases. We have reported that endothelial GJs regulate vascular inflammation and blood coagulation. In this study, we have identified the role of endothelial GJ in vascular angiogenesis.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管生物学 血管内皮細胞 血管新生 ギャップ結合

## 1. 研究開始当初の背景

正常時の血管内皮は抗血栓性・抗炎症性因子を発現して血液流動性を維持している。傷害時には、これら因子の減少と向炎症・向血栓性因子の増加により、傷害部の拡大阻止に作用する血管収縮と止血血栓形成が起こり、同時に修復再生に作用する炎症細胞浸潤、細胞増殖など血管リモデリングが開始される。修復後にはこの一連の応答は収束し、正常状態へ移行して血液流動性が維持される。

生活習慣病などでは慢性的な炎症と血液凝固の活性化を伴う血管内皮機能障害と病的な血管リモデリングが起こり、動脈硬化、高血圧、各種動静脈血栓症など血管病の基盤になると考えられる。こうした機序に基づき、これまで内皮機能障害や血管病の病態形成に寄与する炎症、血液凝固、血管リモデリング関連因子の解析が精力的に進められている。

最近、血管構成細胞(血管内皮細胞、平滑筋細胞、白血球)に発現するギャップ結合(GJ)構成蛋白質のコネキシン(Cx)37、Cx40、Cx43の異常や機能不全が、高血圧、不整脈、心筋梗塞や動脈硬化などの疾患発症を促進することが報告された。GJは細胞質内の物質移送を介して細胞間情報伝達を行い、細胞機能や恒常性を維持する器官である。Cx37とCx40の異常は白血球の内皮細胞への接着を促進し、Cx43の発現増加は平滑筋細胞の増殖を亢進して動脈硬化病変を形成する。このGJを基盤とした直接の細胞間相互作用は血管病の病態形成に関与する新たな分子機序として注目を集めている。

## 2. 研究の目的

細胞間ギャップ結合(GJ)は、構成蛋白質のコネキシン(Cx)分子によって形成されるチャンネルであり、隣接する細胞の細胞質内を繋ぎ、小分子の直接の移送を介して細胞間情報伝達を行っている。我々はこれまでに血管内皮細胞に新たにCx32が発現していることを見出した。炎症時にはCx32の発現量が著しく低下し、Cx32欠損マウスでは敗血症に伴う炎症反応が増悪化することを報告してきた。また、Cx32強制発現時には機能障害の発症が抑制されること、Cx32が内皮細胞における組織因子発現を抑制して血液凝固を制御することを示した。これら一連の研究によってCx32を介した血管内皮細胞間のコミュニケーションの異常が、動脈硬化症などの炎症性血管病変の形成を促進する可能性を示してきた。

他方、Cx43欠損マウスでは心臓形成不全が起こり、白血球に発現するCx37やCx40は細胞接着や浸潤に関わることが知られている。これらの事実とこれまでの我々の成果から、我々はGJが血管新生を調節すると仮説を立てた。血管新生は、血管内皮細胞の発芽、遊走、増殖、管腔形成、血管の成熟・安定化によって成り立つ血管内皮細胞特有の性質で

ある。生活習慣病などでは慢性的な炎症と血液凝固の活性化を伴う血管内皮機能障害と病的な血管リモデリングが起こり、動脈硬化、高血圧、各種動静脈血栓症など血管病の基盤になると考えられる。本研究では、血管リモデリングに重要な過程である血管新生に着目して、創傷治癒、新生血管形成、血管内皮細胞の発芽におけるCx分子とGJの影響を解析し、血管新生の調節や血管の病態生理におけるCx分子の役割の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Cx 遺伝子強制発現内皮細胞の作製

ヒト内皮細胞株であるEA.hy926細胞にCx32、Cx37、Cx40、Cx43発現プラスミドを遺伝子導入し、恒常的に各Cx遺伝子を強制発現した内皮細胞株を樹立した。遺伝子の発現はRT-PCR法、蛋白質の発現はWestern blot法で確認した。

### (2) GJ 機能阻害内皮細胞の作製

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)にGJ阻害剤であるカルベノキソロン、オレイン酸アミドを細胞培養液中に添加し、非特異的に内皮細胞間GJを阻害した。また、Cx32、Cx43を特異的に阻害するため、各Cx蛋白質に対するモノクローナル抗体を細胞培養液中に添加した。

### (3) 創傷治癒モデルを用いたCx分子の影響の解析

GJ阻害剤処理したHUVECs、Cx遺伝子強制発現EA.hy926細胞をコンフルエントになるまで培養し、チップにて一部を剥離除去した。剥離した周辺の細胞が増殖・遊走して剥離部位を修復する速度、細胞の形態変化を顕微鏡下で経時的に観察し、創傷治癒に及ぼすCx分子の影響を解析した。

### (4) Cx分子が細胞増殖に与える影響の解析

一定数のCx遺伝子強制発現EA.hy926細胞を播種し、12時間、24時間、48時間後の細胞数を計数してCx遺伝子が細胞増殖に与える影響を比較した。

### (5) 管腔形成を用いた新生血管におけるCx分子の影響の解析

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)または塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を加えたマトリゲル上に内皮細胞を播種し、培養した。血管内皮細胞による管腔形成、細胞の分岐の数、細胞形態変化を顕微鏡下で定量して解析した。

### (6) 血管の発芽におけるCx32の役割

野生型マウス、Cx32欠損マウスの大動脈を単離し、5mmほどの長さに切断した。この血管断片をVEGFを含むマトリゲル上培養し、血管の切断面から発芽する新生血管の数と長さを計測して比較した。

### (7) 生体内での血管新生におけるCx32の影響の解析

野生型マウス、Cx32欠損マウスの皮内にマトリゲルを注入して硬化させ、マトリゲル内に形成される血管を抗CD31抗体を用いた蛍光

免疫染色で検出し、マトリゲル内に侵入してきた細胞を核染色で検出した。これによって血管新生、および細胞遊走における Cx32 の影響を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) Cx 遺伝子強制発現内皮細胞の作製  
各 Cx 遺伝子発現ベクターを導入後、G418 耐性細胞のセレクションを行い、シングルコロニー由来の細胞を単離して各 Cx 遺伝子、蛋白を恒常的に発現する細胞株を構築した。

(2) GJ 機能障害内皮細胞の作製  
HUVECs を GJ 障害剤、抗 Cx 抗体にて処理し、色素移行評価法を用いて GJ の機能が障害されることを確認した。

(3) 創傷治癒モデルを用いた Cx 分子の影響の解析

コントロール細胞と比較して Cx32 遺伝子導入細胞では血管新生が亢進し、Cx37、Cx43 導入細胞では抑制された。また、抗 Cx32 抗体処理した細胞では血管新生が抑制された。

(4) Cx 分子が細胞増殖に与える影響の解析  
各 Cx 遺伝子導入細胞の形態、増殖能に顕著な差は見られなかった。

(5) 管腔形成を用いた新生血管における Cx 分子の影響の解析

コントロール細胞と比較して Cx32 強制発現細胞では管腔形成、細胞の分岐が著しく亢進していた。他方、Cx37、Cx40 強制発現細胞ではこれらが抑制されていた。また、抗 Cx32 抗体処理した細胞では、コントロール抗体、抗 Cx43 抗体処理した細胞と比較して管腔形成、細胞の分岐が抑制されていた。

(6) 血管の発芽における Cx32 の役割

マトリゲル上で培養した大動脈からの血管の発芽は VEGF 添加によって誘導された。Cx32 欠損マウスの大動脈からの血管の発芽は、発芽数、新生血管の長さともに野生型マウスと比較して抑制されていた。

(7) 生体内での血管新生における Cx32 の影響の解析

野生型マウスと Cx32 欠損マウスの皮内にマトリゲルを移植し、10 日後に回収してマトリゲルの薄層切片を染色した。Cx32 欠損マウスでは血管の存在を示す CD31 のシグナル数が野生型と比較して少なかった。また、マトリゲル内へ浸潤する細胞を核染色にて検出したところ、Cx32 欠損マウスで浸潤する細胞数が少ないことが明らかになった。

以上のことから、Cx32 の過剰発現では血管新生が促進し、Cx32 障害・欠損では抑制され、Cx32 が血管新生を正に制御する可能性が示唆された。他方、Cx43 は負に制御することが示唆された。これらの結果から血管内皮細胞間 GJ が血管新生を制御することが示唆された。

#### 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 12 件)

1. 岡本貴行、ギャップジャンクションと血管内皮機能、膜(MEMBRANE) 41(2)、61-67、2016 (査読有り)
2. Akita N, Ma N, Okamoto T, Asanuma K, Yoshida K, Nishioka J, Shimaoka M, Suzuki K, Hayashi T. Host protein C inhibitor inhibits tumor growth, but promotes tumor metastasis, which is closely correlated with hypercoagulability. *Thrombosis research*. 135(6):1203-8. 2015 (査読有り)
3. 岡本貴行、島岡要：61. 細胞接着(インテグリン)生体の科学 Vol. 66 (5)、508-509、2015. (査読無し)
4. Okamoto T, Akita N, Hayashi T, Shimaoka M, Suzuki K. Endothelial connexin 32 regulates tissue factor expression induced by inflammatory stimulation and direct cell-cell interaction with activated cells. *Atherosclerosis*. 236(2):430-7. 2014. (査読有り)
5. Okamoto T, Akita N, Kawamoto E, Hayashi T, Suzuki K, Shimaoka M. Endothelial connexin32 enhances angiogenesis by positively regulating tube formation and cell migration. *Experimental cell research*. 15;321(2):133-41. 2014 (査読有り)
6. Okamoto T, Akita N, Nagai M, Hayashi T, Suzuki K. 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate modulates endothelial cell function and suppresses leukocyte adhesion. *J Nat Med*. 68(1):144-53. 2014. (査読有り)
7. 岡本貴行、鈴木宏治：凝固制御機序、救急・集中治療.. Vol. 26 no5・6 p. 633-638 2014.
8. 岡本貴行、島岡要：インテグリンの機能と創薬への応用、臨床血液 Vol. 55 No. 4, p. 405-417 2014. (査読無し)
9. 岡本貴行、好中球はネット状の構造物を放出して癌転移を促進する?、ファルマシア、p. 573、50 巻 2014. (査読有り)
10. Rao TP, Okamoto T, Akita N, Hayashi T, Kato-Yasuda N, Suzuki K. Amla (*Embllica officinalis* Gaertn.) extract inhibits lipopolysaccharide-induced procoagulant and pro-inflammatory factors in cultured vascular endothelial cells. *Br J Nutr.* 110(12):2201-6. 2013. (査読有り)
11. 岡本貴行、鈴木宏治：プラスミノゲンアクチベーター1 過剰症、別冊日本臨床 血液症候群, 31-34 2013. (査読無し)
12. 川本英嗣、岡本貴行、今井寛、島岡要：インテグリンと炎症 *Coagulation and Inflammation* vol.7 No.2 2013. (査読無し)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Akita N, Yoshida K, Okamoto T, Asanuma K,

- Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Molecular mechanism of regulation of osteoclast differentiation by activated protein C. 第77回日本血液学会学術集会 2015年10月16-18日石川県立音楽堂、ANAクラウンプラザホテル金沢、ホテル日航金沢、ホテル金沢、金沢市アートホール、もてなしドーム金沢(石川県・金沢市)
- Okamoto T, Kawamoto E, Akita N, Hayashi T, Suzuki K, Shimaoka M. Endothelial cell increases its rigidity during inflammation through modification of the gap junction. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2015年6月、トロント(カナダ)
  - Akita N, Yoshida K, Okamoto T, Asanuma K, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Possible mechanism of activated protein C-induced inhibition of osteoclast differentiation. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2015年6月、トロント(カナダ)
  - Hayashi T, Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K. Effect of endotoxin and various cytokines on protein C inhibitor production by HepG2 cells. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2015年6月、トロント(カナダ)
  - 川本英嗣、岡本貴行、今井 寛、島岡 要 トロンボモジュリン(TM)は白血球インテグリンと結合する: TM 抗炎症作用機序への関与の可能性. 第30回日本 Shock学会学術集会 2015年5月22-23日 京王プラザホテル八王子(東京都・八王子市)
  - 岡本貴行、川本英嗣、秋田展幸、林辰弥、鈴木 治、島岡要、炎症時における血管内皮細胞の硬さの解析. 第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月21-23日甲府市総合市民会館(山梨県・甲府市)
  - 秋田展幸、吉田格之進、岡本貴行、淺沼邦洋、西岡淳二、鈴木宏治、林辰弥. 活性化プロテインCは、EPCR、PAR-1およびapoEレセプター2を介して破骨細胞分化を抑制する. 第37回日本血栓止血学会学術集会 2015年5月21-23日甲府市総合市民会館(山梨県・甲府市)
  - 秋田展幸、吉田格之進、岡本貴行、淺沼邦洋、西岡淳二、鈴木宏治、林辰弥. 活性化プロテインCは血管内皮プロテインCレセプターとapoEレセプター2を介して破骨細胞分化を抑制する. 第87回日本生化学会大会 2014年10月15-18日国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)
  - 岡本貴行、秋田展幸、林辰弥、島岡 要、鈴木宏治、血管内皮細胞間ギャップ結合は炎症時の血液凝固活性化を制御調節する. 第60回日本薬学会東海支部 総会・大会、2014年7月5日 鈴鹿医療科学大学(三重県・鈴鹿市)
  - 鈴木宏治、秋田展幸、岡本貴行、西岡淳二、林辰弥. 海藻ヒトエグサ由来ラムナン硫酸の抗血栓・抗腫瘍作用に関する基礎的研究. 第60回日本薬学会東海支部 総会・大会、2014年7月5日 鈴鹿医療科学大学(三重県・鈴鹿市)
  - 岡本貴行、秋田展幸、林辰弥、島岡要、鈴木宏治、血管内皮細胞間ギャップ結合が血管新生に及ぼす影響の解析. 第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29-31日 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)
  - 秋田展幸、阪上由希子、東美帆、今井彩華、伊藤菜月、浅井友香、田崎友紀、岡本貴行、西岡淳二、鈴木宏治、林辰弥. 青切みかん含有成分の血液凝固系および肝細胞におけるプロテインCインヒビター産生に及ぼす影響. 第36回 日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29-31日 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)
  - Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Host protein C inhibits tumor cell growth, but promotes tumor cell metastasis by its procoagulant properties in vivo. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11-13日 ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道・札幌市)
  - Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Effect of protein C inhibitor on tumor cell growth and metastasis. 第86回日本生化学会大会 2013年9月11-13日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  - Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Hepatocyte growth factor down-regulates protein C inhibitor expression in hepatocytes via MEK pathway. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013年6月29日-7月4日 アムステルダム(オランダ)
  - Hayashi T, Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K. Structure and function of chicken protein C inhibitor. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2013年6月29日-7月4日 アムステルダム(オランダ)
  - 岡本貴行、林辰弥、島岡要、鈴木宏治、血管内皮傷害に起因する血液凝固の増幅・拡大は細胞間相互作用によって制御されている. 第35回 日本血栓止血学会学術集会、2013年5月30日-6月1日 山形国際ホテル(山形県・山形市)
  - 秋田展幸、岡本貴行、西岡淳二、鈴木宏治、林辰弥. 宿主プロテインCインヒビターは癌細胞の増殖を抑制し転移を促進する. 第35回 日本血栓止血学会学術集会、2013年5月30日-6月1日 山形国際ホテル(山形県・山形市)

〔図書〕(計 1件)

岡本貴行：プロテイン C の予後予測マーカーとしての有用性、敗血症の診断 / 治療の実状と病態、623(p148-153) 2013

〔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

[http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/molecular\\_pc/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/molecular_pc/)

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/molpath/>

## 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

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：