

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮細胞におけるシェアストレス応答遺伝子の解析

指導教官 波利井清紀 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 大浦 紀彦

研究の目的・背景

血管内面を覆う内皮細胞は常に血流に起因するメカニカルストレスであるシェアストレスを受けている。内皮細胞には血流の変化をシェアストレスの変化として認識し、細胞応答を起こす性質がある。シェアストレスに対する内皮細胞応答は生体の血流依存性の現象として知られている血管新生、血管のリモデリング、あるいは粥状動脈硬化症の発生に深く関わりとされている。概して、*in vivo* で血流の増加は動脈径の増大と毛細血管数の増加を起こし、一方、血流の減少はその逆の反応を生じる。また、ヒトの粥状動脈硬化病変は動脈の湾曲部や分岐部の血流が停滞、再循環、剥離などの二次流を生じ、シェアストレスが相対的に低くて乱流性の部位に好発する。このことから内皮細胞に対する乱流性のシェアストレスの作用と粥状動脈硬化の関係が注目されている。

流れ負荷装置を用いて培養内皮細胞にシェアストレスを作用させる *in vitro* 実験により、内皮細胞がシェアストレスに敏感に反応して様々な細胞機能の変化を起こすことが示された。例えば、シェアストレスが加わると血管のトーンスの調節に関わる nitric oxide, c-type natriuretic peptide, adrenomedulin, endothelin, angiotensin converting enzyme、細胞増殖因子の

platelet-derived growth factor, heparin binding-epidermal growth factor, transforming growth factor- β , fibroblast growth factor、細胞同士の接着に働く vascular adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, selectin, integrin, connexin、血液の凝固・線溶に関わる thrombomodulin, tissue factor, tissue plasminogen activator, thrombin receptor などの産生・発現が変化する。シェアストレスで内皮機能が変化する際には、多くの場合、その機能に関連した遺伝子の発現も変化する。これまでにシェアストレスにより発現が変化する約30の内皮遺伝子が報告されている。しかしながら、これまでの検討のほとんどが個々の遺伝子の反応に関するものであり、多数の遺伝子の応答を網羅的に解析したものは極めて少ない。

そこで本研究では DNA マイクロアレイ法を用いてシェアストレスに応答する内皮遺伝子の同定と、その継時的応答パターンの包括的解析を行った。また、粥状動脈硬化と関連する乱流性のシェアストレスに反応する遺伝子についても併せて検討した。

実験方法

細胞培養: ヒト臍帯静脈から初代培養した内皮細胞 (HUVEC) と、Clonetics 社から購入したヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) を M199 培地に 15% 牛胎児血清、内皮増殖因子 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と heparin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた培養液で培養した。実験には継代数 7-10 の細胞を使用した。

流れ負荷: 層流は平行平板型装置で、乱流は回転円錐型装置で細胞に負荷した。平行平板型装置では細胞の付着したガラス板に 200 μm の距離を離してアクリル板を対向させ、その中をポンプで培養液を灌流させた。細胞に作用するシェアストレス (τ , dyne/cm^2) は $\tau = 6\mu Q/a^2b$ (μ は液の粘性、 Q は流量、 a 、 b は流路の高さと幅) で計算した。回転円錐型装置では細胞の付着した円形のガラス板の入った 10 cm 径のディッシュの培養液中に浸した円錐盤をモーターで回転させた。細胞に作用するシェアストレス (τ , dyne/cm^2) は $\tau = \mu\omega/\alpha$ (μ は液の粘性、 ω は回転角速度、 α は円錐盤の角度) で、修正レイノルズ数 R は、 $R = r^2\omega\alpha^2/12\nu$ (r は中心からの半径方向の距離、 ν は動粘性係数) で計算した。乱流となる $R > 4$ の条件を満たすディッシュの中心から半径 2.4 cm より外側の細胞を乱流負荷のサンプルとした。

DNA マイクロアレイ解析: 遺伝子発現の網羅的解析に Affymetrix 社製の GeneChip システ

ムを用いた。細胞から RNA を抽出し、T7 RNA polymerase promoter を含む oligo-dT primer で 2 本鎖 cDNA にした後、無標識の ATP, CTP, GTP, UTP と biotin 標識した CTP と UTP の存在下で転写を行った。biotin 標識した cRNA を抽出して 50~150 塩基にランダムに切断したものを 5600 のヒト遺伝子のオリゴ・プローブが載った HuGene FL array に加えて 16 時間インキュベートした。array を洗浄後、streptavidin で染色して、Hewlett-Packard GeneArray Scanner で測定した。遺伝子発現の変化を静的コントロールに対する fold change として表した。

Real time PCR : 細胞から抽出した RNA を Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco) を用いて一本鎖 cDNA に逆転写し、urokinase plasminogen activator (uPA), tissue plasminogen activator (tPA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 遺伝子に特異的な primer と、TaKaRa EX Taq R-PCR version、SYBR Green I、Smart Cycler を使って PCR を行った。各遺伝子の発現の定量化のためにシエアストレスで変化しない GAPDH 遺伝子のシグナルで規格化した。

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) : HCAEC に乱流と層流のシエアストレス (1.5 dyne/cm², 1-48 h) を作用させて、灌流液を採取し、tPA, uPA, PAI-1 の蛋白量をサンドイッチ抗体法を用いた市販の ELISA キットで測定した。

結果と考察

1. シエアストレスに応答する遺伝子の割合

層流性の動脈レベルのシエアストレス(15 dyne/cm², 24 h), に対して HUVEC では Up (fold change が 2 以上)する遺伝子が 50 ± 21 (mean \pm SD, n=3)、Down (fold change が 1/2 以下) が 133 ± 33 と、全体の約 3.2% (183/5600)が応答した。同様の条件で、HCAEC では Up が 50 ± 1 (n=2)、Down が 120 ± 4 で、全体の約 3.0%が応答した。静脈レベルのシエアストレス(1.5 dyne/cm², 24 h)では HUVEC で全体の 2.1%、HCAECs で 2.0%と、動脈レベルのシエアストレスよりも応答する遺伝子が減少した。また、HCAEC に対する乱流性のシエアストレス(1.5 dyne/cm², 24 h)負荷では全体の約 1.1%と、応答する遺伝子がさらに減少した。仮に、2 万の遺伝子が内皮細胞で発現しているとする、3%の場合、概算で約 600 の遺伝子がシエアストレス応答性であることになる。

2. 層流のシェアストレスに反応する遺伝子

HUVEC に対する層流のシェアストレス(15 dyne/cm², 24 h)負荷実験を 3 回行って再現性を持って発現が Up あるいは Down した遺伝子を検討したところ、様々な機能カテゴリに属する遺伝子が含まれていた。特記すべき所見としてシェアストレスで発現が Up する遺伝子に NAD(P)H, heme oxygenase, G6PDH, Thiredoxin reductase など抗酸化ストレスに働くものが多く見られた(全体の 29%)。これは層流のシェアストレスが内皮保護的に働くというこれまでの考え方を支持する結果と思われる。一方、Down する遺伝子の中には、cyclin B, thymidine kinase, cyclin-dependent kinase など DNA 合成や cell cycle に関わるものが多数(全体の 58%) 含まれていた。この所見から層流のシェアストレスが HUVEC の増殖を抑制する効果のあることが予想されるが、実際にそうなることが既に報告されている。

3. 経時的な遺伝子応答パターンのクラスター解析

HUVEC に層流のシェアストレス(15 dyne/cm²)を 3, 6, 12, 24, 48 h 作用させ経時的な遺伝子の応答パターンを解析した。その結果、全体を 9 種類の応答パターンに分類することができた。この中で、Up では 12 h をピークにした山型に増加するパターンが 20.2%、6 h まででは変化せず 12 h 以降に増加するパターンが 13.4%、また、時間とともに右肩上がりに増加するパターンが多く 50%に見られた。一方、Down では時間とともに減少するパターンが 2 パターンあり 35.1%と 31.5%で、3h で急激に減少するパターンは 8.6%であった。6h まで減少してから以後、元に戻っていく 2 パターンが 4.3%と 17.6%であった。このようにシェアストレスに対する遺伝子の応答パターンが多様である事実から内皮細胞でシェアストレス刺激が感知されてから遺伝子発現変化を起こすまでの情報伝達経路が多岐にわたっている可能性が示唆された。

4. 乱流のシェアストレスに反応する遺伝子

HCAEC に乱流 (1.5 dyne/cm²)と層流 (1.5 dyne/cm²) を負荷し、層流と比較して乱流で 2 倍以上に Up する遺伝子を DNA マイクロアレイで同定した。この中に fibrinolysis だけでなく細胞外マトリックスの分解や平滑筋の遊走や増殖を刺激する tPA, uPA、あるいは metalloproteinase など血管のリモデリングに関わる遺伝子が含まれていた。

5. tPA, uPA, PAI-1 の蛋白産生と遺伝子発現に及ぼす乱流の効果

HCAEC に乱流 (1.5 dyne/cm²)と層流 (1.5 dyne/cm²) を 1, 3, 6, 12, 24, 48 h 作用させ、分泌される tPA, uPA, PAI-1 の蛋白量を ELISA で、mRNA のレベルを real time PCR で測定し

た。その結果、乱流により tPA と uPA の分泌が時間とともに増加し、逆に PAI-1 の分泌は軽度減少するのが観察された。各 mRNA のレベルも蛋白の分泌とほぼ同様の变化を示した。一方、層流では tPA と uPA の分泌および mRNA のレベルは最初減少し、12 h で最低値を示した後、元に戻る反応が、PAI-1 のそれは軽度増加する反応が見られた。このことから HCAEC が乱流と層流の刺激を分別して認識していることと、乱流で発現の上昇する tPA, uPA が動脈硬化関連遺伝子として働く可能性が示唆された。

結語

本研究により、以下の5点が新たな知見として得られた。

1. 培養血管内皮細胞 (HUVEC, HCAEC) では層流の動脈レベルのシェアストレスでは全体の約 3%、静脈レベルのシェアストレスでは約 2%、乱流の静脈レベルのシェアストレスでは約 1%の遺伝子が反応して発現が変化した。
2. 層流のシェアストレスには培養血管内皮細胞の抗酸化ストレスに働く遺伝子の発現を高め、一方、細胞増殖に関連する遺伝子の発現を抑制する効果が認められた。
3. 層流のシェアストレスに対する内皮遺伝子の 48 h までの時系列的な反応パターンをクラスター解析し、9種類のパターンに分類することができた。応答パターンは一様ではなく多様であることが示された。
4. 乱流のシェアストレスに反応する内皮遺伝子を同定できた。その中には tPA, uPA, metalloproteinase など血管のリモデリングに関わる遺伝子が含まれていた。
5. 内皮細胞の tPA, uPA の分泌および mRNA レベルは乱流で増加し、層流で減少した。

今後さらに、こうした包括的な解析を進めることでシェアストレスに対する内皮細胞応答の背後にある多くの遺伝子や蛋白の相互作用のカスケイドが明らかになっていけば、血流依存性の現象である血管新生、血管のリモデリングあるいはヒトの粥状動脈硬化病変の発生のメカニズムの解明や新しい治療法の開発に有用な情報が得られると思われる。