

血管硬化による血管内皮細胞の機能変化とその分子機構

岡本貴行

島根大学医学部 薬理学講座

【研究の背景】

心血管疾患、脳血管疾患など血管障害性疾患の基盤には、慢性的な炎症と血液凝固の活性化に加えて、動脈硬化など血管弾性(硬さ)の増加がみられる。血管硬化はコレステロール非依存的な心血管イベントのリスクであり、このことから血管硬化が血管内皮細胞の機能障害や血管病変の形成を促している可能性が指摘されている。

細胞には、細胞外環境の硬さなどの物理的性質を感知して、細胞内シグナル伝達に変換する仕組みが備わっており、細胞は硬さに応じて細胞増殖や分化、遊走などを調節する。血管内皮細胞は細胞外環境の硬さに起因する力学的シグナルによって細胞の形態や血管およびリンパ管新生を制御することが報告されている。血管組織の硬さ変化が誘導する力学的シグナルは既知の酸化ストレス、炎症性サイトカインなどとは異なる経路であると推測され、血管障害性疾患の予防や治療の新規治療標的として有用であると考えられている。

【目 的】

血管内皮細胞が細胞外基質の硬さをどのように感知して炎症や血液凝固など血管内皮細胞機能を制御しているのか、その分子機構を解明する。

【方 法】

正常血管の硬さは 5-10kPa 以下であり、動脈硬化性血管病変では 15-100kPa 以上を示す。これらの硬さを再現するハイドロゲル(1、2、4、8、25kPa)にコラーゲンをコートし、ゲル上でヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を培養した。培養 24 時間後に細胞の形態を観察し、転写共役因子 Yes-associated protein(YAP)の局在は蛍光免疫染色法で解析した。培養後の細胞から RNA を抽出し、Real time PCR 法を用いて各種遺伝子発現を解析した。

軟らかいゲル上で発現が上昇する Dll4(Delta-like protein 4) 遺伝子の役割を明らかにするため、Dll4、Notch1、Notch1 細胞内ドメイン(NICD)の各蛋白質を Western blot 法で検出して Dll4-Notch1 シグナルの活性化を評価し、NICD が誘導する HEY1 と HES1 遺伝子の発現を Real time PCR 法を用いて解析した。また、Dll4 に対する siRNA を細胞に導入し、軟らかい基質上で誘導される遺伝子発現が消失するか検討した。

【結 果】

軟らかいハイドロゲル(1kPa)上の HUVECs は糸状仮足様の構造を形成して細長くなるなどの形態変化が確認された。HUVECs の YAP タンパク質は軟らかいゲル上で培養した際には細胞質に存在するが、硬いゲル上では細胞核に移行し、並行して YAP 標的遺伝子の発現が増加した。

Dll4 の mRNA とタンパク質は軟らかいゲル上で培養した HUVECs で顕著にその発現が増加した。他方、Notch1 の mRNA とタンパク質に明確な変化は認められなかったが、Notch1 活性化後に切断されて生じる細胞内ドメイン(NICD)は軟らかいゲル上で増加した。さらに、NICD の増加に伴って Dll4-Notch1 シグナルの標的遺伝子である HEY1 と HES1 mRNA の発現

が増加した。

血管内皮細胞における炎症の活性化に関わるインターロイキン 6 (IL-6)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) の発現は軟らかいゲル上では発現が低く、ゲルの硬度が上昇するにつれて両者の発現も増加した。接着因子 intercellular adhesion molecule-1 と vascular cell adhesion molecule-1 の発現に目立った変化はなかった。また、血液凝固開始因子である組織因子と抗血液凝固因子のトロンボモジュリンの発現は軟らかいゲル上で増加する傾向を示した。Dll4 に対する siRNA を細胞に導入することで軟らかいゲル上で生じる HUVECs 遺伝子変化の一部が消失することが観察された。

【考 察】

本研究によって正常な血管と同等の硬さを有した軟らかいゲル上で培養した血管内皮細胞は、硬いゲル上で培養した細胞と比較して YAP の活性化抑制と Dll4 の発現亢進を示し、Notch シグナルを誘導することを見出した。すなわち、硬化血管の血管内皮細胞は Notch シグナルを抑制し、持続的に炎症を亢進している可能性を示した。また、我々は硬いゲル上ではマクロファージの炎症性 (M1) 分化が優位になること¹⁾、炎症刺激や血管内皮細胞の YAP 活性化は細胞そのものを硬化して血管炎症を促進することも確認している^{2, 3)}。これらの研究は、生化学的な刺激に加え、力学的な刺激が血管および血管内皮細胞の機能である炎症や血液凝固の調節することを示している。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では人工素材を用いているが、実際の正常な血管から硬化血管が示す硬さ変化の範囲で血管内皮細胞の機能が変化することを明らかにした。今後、動物モデルを用いた解析を重ねつつ、本研究で見出された一連の分子機構に介入することで血管内皮細胞機能を改善できるか検証を進める予定である。本研究成果を踏まえて力学的シグナルを標的として血管内皮細胞の機能を改善する手法を構築することで、各種血管障害性疾患の克服に向けた治療法や予防法の開発につながることを期待する。

【参考・引用文献】

上記の研究成果は学術論文として投稿中である。

- 1) Okamoto, T.; Takagi, Y.; Kawamoto, E.; Park, E.J.; Usuda, H.; Wada, K.; Shimaoka, M. Reduced substrate stiffness promotes M2-like macrophage activation and enhances peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Exp. Cell Res.* **2018**, *367*, 264-273
- 2) Okamoto, T.; Kawamoto, E.; Takagi, Y.; Akita, N.; Hayashi, T.; Park, E. J.; Suzuki, K.; Shimaoka, M., Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. *Sci Rep* **2017**, *7*, (1), 6134.
- 3) Okamoto T, Kawamoto E, Usuda H, Tanaka T, Nikai T, Asanuma K, Suzuki K, Shimaoka M, Wada K. Recombinant human soluble thrombomodulin suppresses monocyte adhesion by reducing lipopolysaccharide-induced endothelial cellular stiffening. *Cells* **2020**, *9*, (8), 1811.