

Shear stress応答性cDNAの包括的単離と動脈硬化における役割の解明

●山下静也¹⁾ ◆酒井尚彦¹⁾ ◆大屋 健¹⁾ ◆趙 漢軍^{1),2)} ◆野島 博²⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科分子制御内科学（現在の所属：循環器内科学）
2) 大阪大学微生物病研究所難治疾患バイオ分析部門分子遺伝研究分野

＜研究の目的と進め方＞

【研究の目的】

粥状動脈硬化は血流が大きく変化する血管の湾曲部や分岐部に好発することが知られており、血流の血管内皮に及ぼす物理的な力、ずり応力（shear stress）のかかり方が血管内皮細胞の遺伝子発現を変化させ、形態や機能を調節し、動脈硬化の発生に関与することが明らかになってきている。本研究ではshear stress応答性遺伝子を包括的にクローニングし、動脈硬化発症における役割を解明することを目的とした。

【研究の進め方】

1) shear-stress応答性新規遺伝子Recs28の機能解析

私共はヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）をマイクロビーズ上に培養し、培養液を攪拌して多方向からshear stressを負荷し、13個の新規遺伝子をクローニングした。この中にG蛋白質コンセンサス配列を有し、RhoファミリーのRhoA、Rac1やCdc42と非常に高いホモロジーを有しているクローンRecs28が存在した。Rhoファミリーは細胞骨格、細胞間接着を制御し、内皮の透過性に関与することが知られている。本研究はshear stressに反応して発現量に変化するこれらの分子の機能解析を通して、内皮細胞の形態制御と各種リポ蛋白、血球成分の透過性の関連、動脈硬化発症機構を解明せんと実験を行った。

RhoA、Rac1、Cdc42は活性型変異体、不活性型変異体となるpoint mutationの一時配列を共有しているが、Recs28についてもこの配列を保持しているため、この2つの変異体を作成して以下の検討を行った。

(a) 細胞形態学的検討

Recs28や2種の変異体を過剰発現させたHUVECのアクチン繊維を染色し、stress fiber formationやmembrane ruffling、lamellipodia、filopodiaなど細胞骨格の変化を観察し、細胞間接着分子の形態学的検討も行った。

(b) 血管内皮透過性に及ぼす効果の検討

Recs28、並びに2種の変異体を過剰発現させたHUVECを二重ウェルの膜上に一層に培養し、細胞間隙形成の指標であるデキストランの透過量を測定した。

2) Recs1ノックアウトマウスの作成とそれを用いたRecs1の機能解析

RECS1に関しては、ヒトRECS1（hRECS1）とマウスRECS1（mRECS1）の塩基配列をもとに、GST-hRECS1 N末端およびGST-mRECS1 N末端融合蛋白を大腸菌で発現できるプラスミドなど各種コンストラクトを作製した。まず、大腸菌で発現させたGST-RECS1融合蛋白を用いて、anti-hRECS1 N末端およびanti-mRECS1 N末端ポリクローナル抗体を作成した。ノーザンブロットでmRECS1の組織発現を調べ、ウェスタンブロットでhRECS1の細胞発現を調べた。mRECS1の遺伝子構造に基づいてtargeting vectorを設計し、RECS1ノックアウトマウスを作成し、胚、若年および加齢マウス組織切片を観察し、表現型を調べ、年齢ごとに血液生化学検査、血圧と心拍数測定を行った。大動脈切片のAlcian Blue/PAS染色、elastic van Gieson染色、大動脈内周囲長測定を行った。

大動脈組織抽出液のgelatin zymography、ウェスタンブロットおよび大動脈組織切片のin situ zymographyを行った。anti-mRECS1抗体及びanti-MMP-9抗体を用いて大動脈組織の免疫染色を行った。マウス大動脈平滑筋細胞を分離し、quantitative real-time PCR法及びgelatin zymography法でMMP-9の発現と蛋白合成を評価した。

＜研究開始時の研究計画＞

Recs28及びRecs1の機能をin vitro及び欠損マウスでin vivoにて検討する。

＜研究期間の成果＞

1) Recs28の機能に関する細胞形態学的検討

Recs28並びに活性型変異体を発現させたHUVECではphorbol esterによるstress fiber形成刺激下で著しいstress fiber形成抑制が認められた。一方、不活性型変異体を発現させたHUVECではその抑制効果は認められなかった。また、HUVECの単層培養にphorbol esterの刺激を加えると、大きな細胞間隙を形成し、同部位の形質膜上のVE-cadherinの消失が見られるが、Recs28並びに活性型変異体を発現させたHUVECの単層培養では、共焦点レーザー顕微鏡レベルで見られる細胞間隙は認められず、VE-cadherinも細胞接着面に途切れることなく線状に染色された。

2) Recs28が血管内皮透過性に及ぼす効果の検討

Mockをtransfectionした単層培養HUVECは、phorbol esterの刺激で著しい透過性の上昇が見られるのに対し、Recs28並びに活性型変異体をtransfectionしたHUVECでは、デキストランの透過はほとんど見られなかった。さらに、不活性型変異体では、刺激の有無に関わらず透過性が亢進していた。

3) RECS1の機能解析

マウスRECS1（mRECS1）は309アミノ酸の疎水性の高い7回膜貫通構造たんぱく質をコードし、ヒトRECS1（hRECS1）遺伝子と88%の相同性を示すことが明らかになった。hRECS1強制発現したHT1080の細胞分画およびhRECS1-GFP融合蛋白を強制発現したHeLaS3細胞の共焦点レーザー顕微鏡観察で、RECS1がエンドソーム・ライソソームに局在することが判明した。また、hRECS1は培養ヒト内皮細胞及び血管平滑筋細胞で発現していることを確認した。一方、mRECS1は胸腺、精巣および脾臓を除くすべてのマウス臓器組織に発現していた。ウェスタンブロット法でマウス心臓と肝臓におけるmRECS1の発現を評価したところ、大動脈と肺で検出された34.4kDaの分子量とは異なり、mRECS1は心臓において58kDa、肝臓において48、69、82kDaの分子量として検出された。mRECS1の転写産物は2.2kbしか見られないことから、RECS1は心臓および肝臓において翻訳後修飾を受けていることを見出した。RECS1ノックアウトマウス（RECS1-KO）表現型を観察したところ、胚、3-6ヶ月の若齢マウスには異常見られなかったが、加齢（14ヶ月以上）RECS1-KOマウスでは嚢胞性中膜壊死（ムコ多糖類の沈

着)及び大動脈の軽度拡張が生じやすいことを見出した。HE染色法、anti-リンパ球染色及びanti-マクロファージ染色で嚢胞性中膜壊死部位に炎症性細胞浸潤は認めなかった。嚢胞性中膜壊死部位に細胞減少も確認した。血液生化学検査、血圧検査をしたところ、若齢マウス(3-6ヶ月)および加齢(14-17ヶ月)マウスにおいて野生型(WT)とKOの間には差異はなかった。Gelatin zymography法で検討した結果、RECS1-KOマウスにおいては生涯にわたって大動脈pro-及びactive-MMP-9、血漿NGAL-及びactive-MMP-9レベルがWTマウスより高いことを見出した。加齢マウス大動脈連続凍結切片をanti-MMP-9染色、Alcian Blue染色及びin situ zymographyで観察したところ、KOマウス大動脈MMP-9蛋白レベル及びゲラチナーゼ活性がWTマウスより高いことを確認した。また、増強したMMP-9シグナルはムコ多糖類の沈着およびゲラチナーゼ活性と一致することも確認した。さらにマウス大動脈平滑筋細胞を分離した。RECS1-/-細胞がRECS1+/+細胞よりMMP-9蛋白分泌が高いことを確認したが、RECS1-/-細胞とRECS1+/+細胞の間にMMP-9 mRNAレベルには差異はなかったため、RECS1は転写後レベルでMMP-9の量を抑制することが分かった。以上のことから、RECS1欠損はMMP-9生産を増加させることによって、嚢胞性中膜壊死に貢献していることが示唆された。

我々はマウス大動脈active-MMP-2とactive-MMP-9レベルを大動脈直径と比較したところ、大動脈直径の増加はactive-MMP-2レベルと一致したことから、active-MMP-2レベルが大動脈拡張に直接関与することを見出した。若齢KOマウスの大動脈pro-及びactive-MMP-2、血漿pro-MMP-2レベルがWTマウスより低く、逆に加齢KOマウスの大動脈pro-及びactive-MMP-2、血漿pro-MMP-2レベルがWTマウスより高い結果をGelatin zymography法で確認したところ、若齢KOマウスで代償性MMP-2の低下と加齢KOマウスでの代償性MMP-2の高揚が示唆された。これらの結果から、RECS1ノックアウトによるMMP-9レベルの上昇と、加齢による大動脈MMP-2とMMP-9の活性化増強および加齢KOマウスにおける二次的なMMP-2増加が、加齢したRECS1-KOにのみ大動脈の軽度拡張及び嚢胞性中膜壊死が見られた原因であると結論した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

血管内皮の透過性については、thrombinやhistamineを用いた炎症性反応における物質の透過という面での研究が主流であり、これらの現象に対するRho small GTPaseによる制御の報告が散見される。炎症性刺激によりRhoAが内皮細胞内にstress fiberを形成することで細胞の収縮力が増加し、細胞接着面にかかる力が増大し、細胞間隙が形成されるとされている。しかし、動脈硬化の発症には血管内皮のバリア機能低下とLDLの透過が重要とされているが、その分子機構についてはRhoの関与を含めほとんど解明されていない。動脈硬化plaqueの内皮細胞には著明なstress fiberが見られることや、LDLを負荷した培養内皮細胞に著明なstress fiberの形成が見られることから、動脈硬化とstress fiber形成は密接に関連していると考えられ、shear stressによる細胞形態とstress fiberの形成の変化は血管内皮機能に多大な影響を与え、動脈硬化発症に関与すると思われる。以上のように、Recs28を発現させたHUVECではstress fiber形成抑制とデキストランの透過性の低下が認められた。

一方、本研究によって、新規シアストレス感受性遺伝子RECS1の機能を明らかにしたが、かかる遺伝子の報告は海外では見あたらない。RECS1は転写後レベルで

MMP-9生産を抑制することによって、病的血管リモデリングを抑制する機能を果たす重要な遺伝子である。本研究はまた以下の知見を得た。①MMP-2とMMP-9は大動脈拡張及に協力的に貢献するが、活性型MMP-2増加は不可欠である。②加齢によって、マウス大動脈及び血漿中のゲラチナーゼ合成は抑制されることに対し、活性化が増強する傾向がある。③年齢が大動脈拡張(あるいは動脈瘤)の危険因子として知られているが、そのメカニズムには加齢によるゲラチナーゼの活性化増強が関与している。④ELISA法で血中のゲラチナーゼと動脈瘤との関係を検討する際、加齢による血中ゲラチナーゼ合成及び活性化への反対的な影響を配慮しなければならない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Recs28のtight junctionにおける影響の検討

Recs1の動脈硬化における役割の検討

〈今後の課題〉

ヒトにおける動脈硬化発症におけるRecs28の意義

ヒトにおける動脈硬化発症におけるRecs1の意義

〈研究期間の全成果公表リスト〉

0305121945

Yoshizue H, Suzuki K, Kawabata A, Ohya T, Sakurada K, Taba Y, Sasaguri T, Sakai N, Yamashita S, Matsuzawa Y, Nojima H: A large scale isolation of shear stress-responsive genes from cultured human endothelial cells by preparation of a subtracted cDNA library. *Atherosclerosis* 162:323-334, 2002.

Zhao H, Ito A, Kimura S, Yabuta N, Sakai N, Ikawa M, Okabe M, Yamashita S, Matsuzawa Y, Nojima H: RECS1 deficiency in mice induces susceptibility to cystic medial degeneration. *Genes and Genetic Systems*, in press.