



Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction

井上, 通彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5045

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005045>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	井上 通彦
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5045 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque
angiogenesis and monocyte-endothelial interaction(血管内皮細胞特異的接着分子は、血管新生およ
び単球-内皮細胞相互作用を介して動脈硬化を制御する)

審 査 委 員

主 査	教 授	伊藤 智雄
	教 授	横野 浩一
	教 授	中野 俊一

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction

血管内皮細胞特異的接着分子は、血管新生および単球-内皮細胞相互作用

を介して動脈硬化を制御する

神戸大学大学院医学系研究科 医科学専攻

循環器内科学

(指導教員：平田 健一 教授)

井上 通彦

〔緒言〕

血管内皮細胞は血液循環中炎症細胞の血管壁への接着を抑制することで動脈硬化から血管壁を保護する役割を果たしている。血管内皮細胞の機能不全は動脈硬化の発生から進展におけるまで直接関連がある。内皮機能不全によってコレステロールを食したマクロファージが血管壁内に浸潤すると初期段階の病巣に蓄積していく事が知られており、動脈硬化の重要なステップであると考えられている。動脈硬化に関連する接着分子には主なものとして VCAM-1 や ICAM-1、P-selectin などが挙げられるが、これらは動脈硬化刺激により活性化され、マクロファージの接着や組織内への移行に関わる。

それに加え、動脈硬化の進展には血管外血管(vasa vasorum)といわれる微小血管の血管新生が関与していると言われている。血管外血管は血管壁に酸素を供給したり、血管壁での代謝産物(老廃物)を取り除く働きをしている。過去の研究では、血管外血管を抑制すると動脈硬化が抑制されるというデータがあり、血管外血管の血管新生が動脈硬化にも関与している事が示されている。このことから我々は血管外血管が炎症細胞の血管壁への供給や血管新生を制御することによって動脈硬化巣の形成に寄与していると考えた。

血管内皮細胞特異的接着分子(ESAM)はイムノグロブリン・スーパーファミリーの一員で、血管内皮細胞に特異的に高発現している。また ESAM は血管内皮細胞間のタイトジャンクションで ESAM 同士結合しており、血管新生・血管内皮透過性・好中球遊走を制御する事が明らかになっている。これらのことを考え合わせると、ESAM は動脈硬化発生過程において重要な役割を果たしている可能性が高く、それに関しては現在のところ報告されていない。ここでは ESAM-/-マウスと動脈硬化モデルマウスを使って ESAM の動脈硬化進展における役割を検討した。

〔方法と結果〕

マウスの準備

C57/BL6 マウス(野生型マウス)をバックグラウンドとして ESAM KO(シングルノックアウト)マウスを作成し、さらに動脈硬化モデルマウスである apoE-/-マウスと交配することで ESAM-/-,ApoE-/- (ダブルノックアウト)マウスを作成した。

血清脂質の測定

野生型マウス、ESAM-/-マウス、apoE-/-マウス、ESAM-/-,apoE-/-マウスそれぞれについて 夜間絶食の後、早朝空腹時採血を行った。オリエンタル酵母工業に依頼し、血清中の T-cho, HDL-cho, TG のレベルを測定した。その結果、3項目ともに ESAM-/-マウス群で有意な上昇を認めたが、動脈硬化と相関する T-cho/HDL 比、TG/HDL 比に関しては有意差を認めなかった。

動脈硬化巣の組織学的評価

16 週齢または 20 週齢の apoE^{-/-}、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}について、各種染色を行い上行大動脈起始部における動脈硬化巣の分析を行った。また、全大動脈の内皮表面の動脈硬化巣の定量比較を行った。結果、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}マウスは apoE^{-/-}マウスに比べて有意に動脈硬化を抑制していた。

また、免疫染色を用いてマクロファージに特異的な MOMA-2 染色を行い、動脈硬化巣におけるマクロファージの占有率を比較検討したところ、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}マウスでは有意にマクロファージの組織内への取り込みが減少していた。

また、血管平滑筋 α -SMA 及び血管内皮細胞 isolectin に対する免疫染色を行い、動脈硬化巣周囲の血管外血管を同定した。apoE^{-/-}、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}マウスにおける動脈硬化周囲の血管外血管数の比較検討を行ったところ、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}マウスにおいて有意な血管数の減少を認めた。また、大動脈の外膜においても同様の免疫染色を行い、血管外血管の血管密度を定量したところ、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}マウスにて有意な減少を認めた。このことにより、ESAM^{-/-}、apoE^{-/-}は apoE^{-/-}マウスと比較すると、動脈硬化巣と血管外血管の血管密度が相関して減少することが示された。

In vitro における接着実験

ESAM と単球/マクロファージ細胞との接着性を確認するため、我々は Recombinant ESAM^{-/-} maltose binding 蛋白を精製し、ヒト単球/マクロファージ系細胞である THP-1 細胞を用いて接着実験を行った。その結果 ESAM 蛋白群はコントロール群に比して、有意に THP-1 細胞との接着が増加していた。このことにより、ESAM は動脈硬化の初期段階である単球・内皮細胞間の接着に関与している可能性が示唆された。ここで重要なことはマクロファージには ESAM が発現しておらず、このことは内皮細胞と単球の間に結合が存在していることを意味する。そこで我々は単球細胞上に存在する ESAM のリガンドを同定するべく、THP-1 上の主な接着分子である VLA-4、LFA-1、JAM-1、Mac-1、CD99 を siRNA の導入によってノックダウンし、同様の接着実験で両者の接着が抑制されるかどうかの検討を行った。結果、いずれの分子をノックダウンしても接着に有意差は認められず、リガンドは同定できなかった。

試験管内における THP-1 遊走実験

Corning 社の Transwell (ダブルチャンバーシステム) を用いて THP-1 の遊走実験を行った。正常内皮細胞であるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) またはヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) をシステム上層の底部でコンフルエントになるまで生育し、siRNA を用いて ESAM をノックダウンした群とコントロール群間で、システム下層に遊走してくる THP-1 の数に差があるかどうかを検討した。遊走刺激因子としては MCP-1 を使用した。結果、37℃ で 90 分間インキュベーションしたとき、ESAM ノックダウン群ではコントロール群と比較して有意に遊走 THP-1 数が減少していた。180 分間のインキュベーションを行うと、差が認められなかったが、これはほとんど

すべての THP-1 細胞が下層に遊走した結果と考えられた。この結果、ESAM は動脈硬化早期における単球の組織内への取り込みに関与している可能性が示唆された。

炎症惹起性物質を用いたマウス腹膜炎モデル

試験管内での結果を検証するため、我々はマウス腹膜炎モデルを用いた vivo におけるマクロファージ遊走実験を行った。4% チオグリコレート培地をマウスに腹腔内投与し、人工的なマウス腹膜炎モデルを作成した。腹腔内に遊走してくるマクロファージの細胞数をセルカウンターを用いてカウントし、ESAM^{+/+}マウス群と ESAM^{-/-}マウス群間で細胞数の比較検討を行った。その結果、ESAM^{-/-}マウス群では有意に遊走細胞数が減少していた。この結果は試験管内での結果を示唆するものであった。

【考察】

今回の研究では、動脈硬化モデルマウスである apoE^{-/-}マウスにおいて ESAM を非活性化させた結果、著明な動脈硬化巣の縮小を認めた。ESAM^{-/-}マウスでは、野生型マウスに比して、動脈硬化促進性の T⁻chol、TG の上昇と動脈硬化抑制的な HDL の上昇を認めたが、臨床で使用する T⁻chol/HDL 比に関しては有意差を認めなかった。現在のところ、ESAM^{-/-}マウスにおける T⁻chol、HDL、TG 上昇の機序は明らかではないが、ESAM の欠落により肝臓において、血清中のリポ蛋白のクリアランスが遅延している可能性がある。加齢性または病理性に肝静脈洞の間隙が変性することで肝細胞への脂質の取り込みが阻害され、高脂質血症を引き起こすことが知られている。また、ESAM は肝臓の肝静脈洞内皮細胞に発現していることが示されており、我々は別の研究で腎糸球体においても ESAM が内皮細胞間隙の維持に関与する事を証明した。これらのことから本研究においては ESAM が非活性化されたことで、肝静脈洞間隙の変性が生じ、脂質代謝に影響を及ぼした可能性が示唆される。

血管外膜の血管外血管は多くの研究で、ヒトや動脈硬化モデル動物における動脈硬化に関連していることが証明されている。今回我々は apoE^{-/-}、ESAM^{-/-}マウスにおいて血管外血管が有意に減少していることを発見した。以前の研究で我々は ESAM を非活性化させると内皮の遊走が減少することにより腫瘍血管新生が抑制されることを証明したが、このことは本研究において ESAM を非活性化させることにより、血管外膜の血管新生が抑制された結果として動脈硬化が減少したという事実を支持するものである。

Wegmann らによって、ESAM は炎症反応早期における好中球の遊走に関与しており、また ESAM を非活性化すると VEGF の発現が増強し血管透過性も上昇する事が示された。原らは ESAM-KO マウスは WT マウスに比してタイトジャンクションが形態学的に広くなり、血管透過性が上昇することを証明した。そのため、これらの変化は単球細胞の遊走にも影響を及ぼしていると考えられたが、実際今回の研究では ESAM と単球細胞は直接接着し、単球細胞の組織内への移行を制御している可能性

が示された。しかし **ESAM** と結合する分子を同定することは出来なかった。

ヒトの動脈硬化への **ESAM** の関与はまだ明らかではないが、近年 Rohatgi らは **Dallas Heart Study** に使用したヒトの検体において血清中の **ESAM** レベルを測定した。血清中の可溶性 **ESAM** は主な炎症マーカーと同様、主要心血管病変と相関することが示された。仮に、可溶性 **ESAM** の血清レベルが血管内皮に存在する **ESAM** の発現と比例するのであれば、今回の我々の研究データは Rohatgi らを支持するデータとなり、今回の研究はマウスだけではなくヒトにおいても動脈硬化の制御因子となっていることを想起させる。

ESAM は血清中の脂質プロファイルに関係なく、血管外血管の血管新生と **ESAM** 依存性の単球接着を介して動脈硬化巣のサイズと構成物を減少させる。我々がここに示したデータは **ESAM** が単球細胞上の未知の分子のリガンドで、血管壁内へのマクロファージの遊走を促進させているということを示した最初のデータであり、分子レベルでの動脈硬化の発生に新たな識見を提示するものである。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2 1 2 5 号	氏 名	井上 通彦
論 文 題 目 Title of Dissertation	Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction 血管内皮細胞特異的接着分子は、血管新生および単球-内皮細胞相互作用を介して動脈硬化を制御する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 伊藤 智雄 Chief Examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner 副 査 横野 浩一 Vice-examiner		

血管内皮細胞は血液循環中炎症細胞の血管壁への接着を抑制することで動脈硬化から血管壁を保護する役割を果たしている。血管内皮細胞の機能不全は動脈硬化の発生から進展におけるまで直接関連がある。内皮機能不全によってコレステロールを貪食したマクロファージが血管壁内に浸潤すると初期段階の病巣に蓄積していく事が知られており、動脈硬化の重要なステップであると考えられている。動脈硬化に関連する接着分子には主なものとして VCAM-1 や ICAM-1、P-selectin などが挙げられるが、これらは動脈硬化刺激により活性化され、マクロファージの接着や組織内への移行に関わる。それに加え、動脈硬化の進展には血管内血管(vasa vasorum)といわれる微小血管の血管新生が関与していると言われている。vasa vasorum は血管壁に酸素を供給したり、血管壁での代謝産物(老廃物)を取り除く働きをしている。過去の研究では、vasa vasorum を抑制すると動脈硬化が抑制されるというデータがあり、vasa vasorum の血管新生が動脈硬化にも関与している事が示されている。このことから発表者は血管外血管が炎症細胞の血管壁への供給や血管新生を制御することによって動脈硬化巣の形成に寄与していると考え、ここでは ESAM-/-マウスと動脈硬化モデルマウスを使って ESAM の動脈硬化進展における役割を検討した。

まず、ESAM-/-,ApoE-/- (ダブルノックアウト) マウスを作成した。野生型マウス、ESAM-/-マウス、apoE-/-マウス、ESAM-/-,apoE-/-マウスそれぞれについて 夜間絶食の後、早朝空腹時採血を行った。血清中の T-cho、HDL-cho、TG ともに ESAM-/-マウス群で有意な上昇を認めたが、動脈硬化と相関する T-cho/HDL 比、TG/HDL 比に関しては有意差を認めなかった。16 週齢または 20 週齢の apoE-/-、ESAM-/-,apoE-/-について、各種染色を行い上行大動脈起始部における動脈硬化巣の分析を行った。また、全大動脈の内皮表面の動脈硬化巣の定量比較を行った。結果、ESAM-/-,apoE-/-マウスは apoE-/-マウスに比べて有意に動脈硬化を抑制していた。

また、免疫染色を用いて MOMA-2 染色を行い、動脈硬化巣におけるマクロファージの占有率を比較検討したところ、ESAM-/-,apoE-/-マウスでは有意にマクロファージの組織内への取り込みが減少していた。

また、血管平滑筋 α -SMA 及び血管内皮細胞 isolectin に対する免疫染色を行い、動脈硬化巣周囲の vasa vasorum を同定した。また、ESAM-/-,apoE-/-マウスにおいて有意な血管数の減少を認めた。また、大動脈の外膜では ESAM-/-,apoE-/-マウスにて有意な減少を認めた。このことにより、ESAM-/-,apoE-/-は apoE-/-マウスと比較すると、動脈硬化巣と vasa vasorum の血管密度が相関して減少することが示された。

ESAM と単球/マクロファージ細胞との接着性を確認するため、Recombinant ESAM-maltose binding 蛋白を精製し、ヒト単球/マクロファージ系細胞である THP-1 細胞を用いて接着実験を行った。その結果 ESAM 蛋白群はコントロール群に比して、有意に THP-1 細胞との接着が増加していた。このことにより、ESAM は動脈硬化の初期段階である単球・内皮細胞間の接着に関与している可能性が示唆された。さらに、THP-1 上の主な接着分子である VLA-4、LFA-1、JAM-1、Mac-1、CD99 を siRNA の導入によってノック

ダウンし、同様の接着実験で両者の接着が抑制されるかどうかの検討を行った。結果、いずれの分子をノックダウンしても接着に有意差は認められず、リガンドは同定できなかった。次に正常内皮細胞であるヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）またはヒト大動脈血管内皮細胞（HAEC）をシステム上層の底部でコンフルエントになるまで生育し、siRNAを用いてESAMをノックダウンした群とコントロール群間で、システム下層に遊走してくるTHP-1の数に差があるかどうかを検討した。遊走刺激因子としてはMCP-1を使用した。結果、37℃で90分間インキュベーションしたとき、ESAMノックダウン群ではコントロール群と比較して有意に遊走THP-1数が減少していた。180分間のインキュベーションを行うと、差が認められなかったが、これはほとんどすべてのTHP-1細胞が下層に遊走した結果と考えられた。この結果、ESAMは動脈硬化早期における単球の組織内への取り込みに関与している可能性が示唆された。さらに、炎症惹起性物質を用いたマウス腹膜炎モデルを用いたvivoにおけるマクロファージ遊走実験を行った。4%チオグリコレート培地をマウスに腹腔内投与し、人工的なマウス腹膜炎モデルを作成した。腹腔内に遊走してくるマクロファージの細胞数をセルカウンターを用いてカウントし、ESAM+/+マウス群とESAM-/-マウス群間で細胞数の比較検討を行った。その結果、ESAM-/-マウス群では有意に遊走細胞数が減少していた。この結果は試験管内での結果を示唆するものであった。本研究はESAMが非活性化されたことで、肝静脈洞間隙の変性が生じ、脂質代謝に影響を及ぼした可能性を示し、apoE-/-、ESAM-/-マウスにおいてvasa vasorumが有意に減少していることを発見した。さらに単球細胞の遊走にも影響を及ぼしていることを見出し、データはESAMが単球細胞上の未知の分子のリガンドで、血管壁内へのマクロファージの遊走を促進させているということを示した最初のデータであり、分子レベルでの動脈硬化の発生に新たな識見を提示するものである。よって、従来ほとんど行われなかった重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。