

血管細胞・分子の力学・病態生理学的解析手法

片岡則之*, 橋本謙**

* 日本大学工学部機械工学科 [〒963-8642 福島県郡山市田村町徳定字中河原 1]

** 川崎医科大学 生理学 1

1. 緒言

アテローム性動脈硬化症の発生プロセスでは、細胞や分子レベルで多くの力学因子が関与している。いまだにその発生メカニズムには未解明の事柄多く、生体工学的観点からの研究が寄与する余地は大きい。アテローム性動脈硬化症の発生初期には、局所的な力学刺激あるいは炎症性サイトカイン等の化学的刺激によって内皮細胞が活性化し、その部位における単球の接着・浸潤が特徴的である。単球の内皮下へ浸潤には、細胞間接着タンパクや細胞骨格成分のダイナミックな挙動が関与しているが、それらを *In vivo* で観察することは不可能である。よって、いかに病態生理学的な培養観察系を構築するが、血管病変発生メカニズムの解明のカギである。

我々は、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて単一細胞レベルでの単球の浸潤動態を 3 次元、連続的に観察するシステムを構築し、単球の内皮下浸潤挙動、ならびに、内皮細胞間の接着タンパクである PECAM-1 の動態観察を行った。

2. 実験方法

薄いコラーゲンゲル層 (厚さ 30-50 μ m) をカバーガラス上に作製し、ゲル上に、あらかじめ PECAM-1-GFP のベクターを導入したヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を培養した。HUVEC が十分に増殖後、IL-1 β で刺激を加え、ヒト末梢血より分離した単球 (CD14+) を添加して単球の浸潤挙動と PECAM-1-GFP の動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3. 実験結果及び考察

解析した 149 の単球浸潤 event のうち、98% は内皮細胞間を浸潤する Paracellular ルートであったが、2% (3 events) は、内皮細胞本体を貫通する Transcellular ルートであった。Paracellular 浸潤では、浸潤中の単球の周囲を内皮細胞 PECAM-1 がリング状に取り囲む様子が観察され、両細胞の PECAM-1 同士が結合していると考えられた。浸潤完了後は、単球が浸潤スポットを離れた後においても、浸潤後 10-20 分に渡って内皮細胞 PECAM-1

の浸潤スポットへの持続的集積が認められた (Fig. 1)。輝度増加は浸潤が起こっていない細胞間隙部位では見られなかったことから、単球の浸潤もしくは浸潤時に起こる PECAM-1 同士の結合が PECAM-1 集積のトリガーである可能性が考えられた。また、浸潤スポット近傍の細胞質部位では逆に輝度が減少しており、この部位から浸潤スポットへ向けて PECAM-1 が集積していると考えられた。

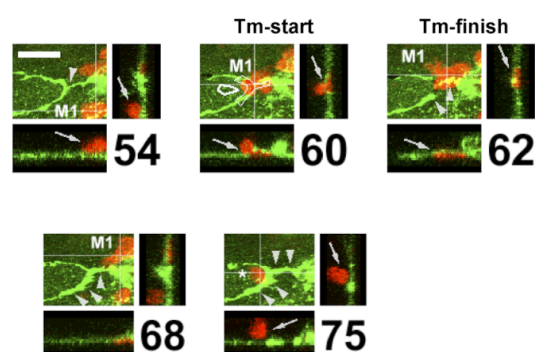


Fig.1 Typical example of PECAM-1 accumulation after monocyte transmigration. Green, PECAM-1-GFP in endothelial cells; Red, monocyte (M1).

ところで、コラーゲンゲル内に酸化 LDL を包埋し、その上に HUVEC を培養して単球の浸潤挙動を観察したところ、顕著に単球浸潤を促進した。これは、酸化 LDL が内皮細胞同士の接着に関わる 2 つの接着タンパク、PECAM-1 と VE-Cadherin の発現を一方は増加 (PECAM-1)、一方は減少 (VE-Cadherin) と絶妙にコントロールすることによって実現していることが分かった。VE-Cadherin は内皮細胞同士の接着に関与しているのみであるが、PECAM-1 は単球の同分子と homophilic 結合することにより、単球を引き込むように浸潤させることから、発現増強により単球の引き込みが促進されることが示唆された。

4. 結言

本研究では、単球浸潤を直接可視化な 3 次元培養システムを構築し、単球の内皮下浸潤に関わる分子挙動、とくに内皮細胞間接着タンパクの役割について明らかとなった。