

MiR-126 and GAG are involved in HUVEC vascular network formation

佐々木 寛明 (筑波大学 生物学類)

指導教員：大井 雄一 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

心血管疾患は心臓や血管などの循環器の疾患を指し、高血圧、不整脈、心筋梗塞、脳卒中、動脈硬化症などが含まれる。世界保健機関の2017年の報告によると、2016年の世界の死亡者のうち、31%、数にして1790万人はこの心血管疾患が原因である。動脈硬化症にはいくつかの種類があるが、その1つにアテローム動脈硬化がある。肥満や過度な喫煙、アルコールが原因で、コレステロールなどからなる粥腫(アテローム)が血管内皮で隆起し、血管が狭窄した状況である。場合によっては血栓もでき、栄養や酸素の供給量を下げ、虚血性心疾患を引き起こすことがある。

このように動脈硬化によって虚血状態に陥った場合、血管近くの細胞がVEGF (Vascular endothelial growth factor = 血管内皮細胞増殖因子)を産生する。VEGFは血管新生を司る因子であり、受容した血管内皮細胞は移動、増殖、血管形成、成熟といった過程を経て血管新生を行う。その他の成長因子やケモカイン、miRNA (microRNA)なども血管新生を調節していることが知られている。血管新生に関わるケモカインの一種であるSDF-1 (Stromal cell-derived factor 1)は、CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12)としても知られ、CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)やCXCR7が受容体である。CXCR4やCXCR7はシグナルカスケードによって血管新生を促進する。

先行研究により、細胞表面上に存在する直鎖状の多糖類である、GAG (Glycosaminoglycans)はCXCR4を補助していることが知られており、BDX (b-D-xyloside)という化学物質が、このGAGの伸長を阻害することも知られている。また、miRNAの1種、miR-126はPI3K/AKT/mTORシグナル伝達経路及び、MAPK/ERKシグナル伝達経路を負に調節することにより、虚血状態の血管内皮細胞内で血管新生の促進に関わっていることが知られている。

本研究ではGAGやmiR-126が血管新生とどのように関わっているかを調べる実験を行った。

【材料と方法】

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell = ヒト臍帯静脈内皮細胞)を培養し、miR-126をトランスフェクションした。miR-126によるMAPK/ERKシグナル伝達経路への影響を調べるため、シグナル因子のSPRED1を対象にウェスタンブロットを行った。

また、BDXによりGAG伸長を阻害した場合の血管新生への影響を見るため、細胞培養の際にBDXで処理したHUVECと未処理のもので細胞遊走アッセイを行った。

同様に2種類のHUVECを用意し、平面における血管新生のイメージング解析を行った。

【結果・考察】

ウェスタンブロットでは、miR-126はSPRED1の量に変化を与えなかった。先行結果からは、miR-126はMAPK/ERKシグナル

伝達経路を調節するはずなので、今一度やり直す必要があると思われる。

細胞遊走アッセイでは、BDXによるGAGの伸長阻害が細胞遊走を促進した。細胞遊走アッセイでは、プラスチックの微細な穴を通り抜けるかどうかを調べる。細胞膜に存在する鎖状のGAGは、移動する上で摩擦を引き起こすため、BDX処理により摩擦が減った方が移動しやすかったと考えられる。

イメージング解析の結果(図1)、GAGが、平面における血管新生に必要なことが分かった。しかし、この実験はあくまでも平面上の話である。実際の血管新生は立体構造をとるので、立体構造を作れるような環境で実験することが必要である。

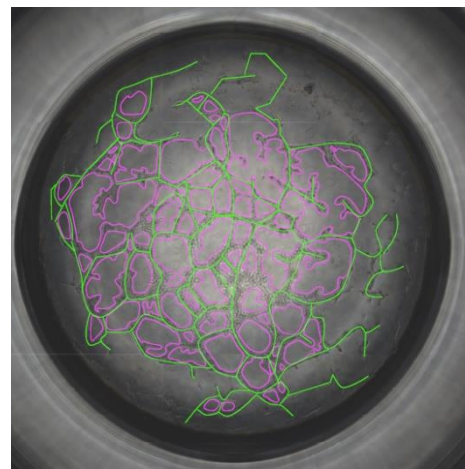


図1. イメージング解析の結果。ノードの数、細胞ネットワークの長さ、メッシュの数を測定した。BDXによる阻害がなければ、ネットワークが形成された。