The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血管内皮細胞の低酸素環境への対応
Author(s)	近藤, 香那子
Citation	平成27年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2016
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54653
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

申請先学部　医学部保健学科
採択番号　No.4

平成 27 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏　　名	こんどうかなこ 近藤香那子	学部 学科	医学部 保健学科	学年	3 年
ふりがな 共　同 研究者名		学部 学科		学年	年
					年
アドバイザー教員 氏名	稲垣忍	所属	医学部保健学科		
研究課題名	細胞外刺激に対する血管内皮細胞の FoxO1 の局在変化				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

―研究目的―

血管厳しい環境下に向かって伸びていくが、血管を形成している細胞は低栄養状態に対する細胞の耐性を持つのか、また低栄養状態においてどのような機構で細胞の機能が維持されているのかを解明することを目的とした。

－研究方法－

細胞培養

材料としてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC：human umbilical vein endothelial cell）（cell applications Inc.）を使用した。HUVEC を細胞数が 3×10^4個/well となるように 24well プレート内で Endothelial basal medium(cell applications Inc.)にて培養した。血清濃度を変化させる実験では Fatal bovine serum(bio west)を 0%,0.5%,5%となるように DMEM/HG(nacalai tesque)に添加した。グルコース濃度を変化させる実験では、DMEM/HG(4.5mg/ml)および DMEM/ LG(1mg/ml) serum 5%にて HUVEC を培養した。時間経過を観察するために 1h,3h,6h,12h,24h で回収した。全ての実験は passage4-6 で行った。

免疫染色

培養した HUVEC を 4%PFA で 5min 室温で固定し、TBST で wash を行った。0.5% TNB blocking buffer で 30min blocking を行い、rabbit anti-FoxO1 antibody(1:500 cell signaling technology)と DAPI(1:5000 sigma)を一晩反応させた。TBST で wash を行い、goat cy3 anti-rabbit IgG(1:1000)室温で 2h 放置し、TBST で wash を行い、50%グリセロールで封入して検鏡し、FoxO1 の細胞内局在を観察した。

－研究結果－

1. HUVEC 用 medium 培養下での FoxO1 の局在変化

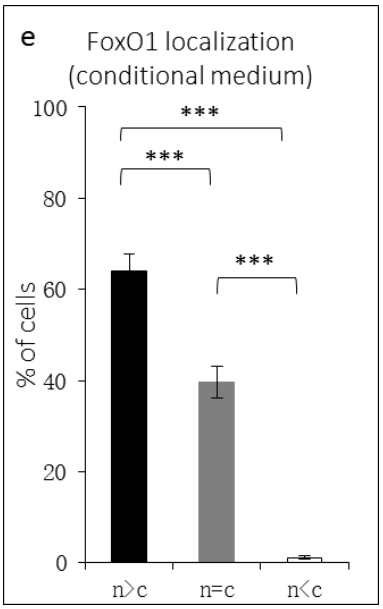

図 1. 定常状態での FoxO1 の細胞内局在およびその分類

HUVEC 用 medium で 6-12h 培養し続けた場合を定常状態とした。FoxO1 が核に優位に見られる細胞を核内優位型(n>c)、核と細胞質に均一に見られる細胞を均一型(n=c)、核と比較して細胞質に優位に見られる細胞を細胞質優位型(n<c)として分類した。また 1 視野あたりのそれぞれの型を示す細胞の全細胞に対する割合を示すと、核内優位型、均一型、細胞質優位型の順に割合が高かった。

n=3,*p<0.05,***p<0.001

HUVEC の FoxO1 は定常状態において核内優位型、均一型、細胞質優位型の 3 タイプに分類でき、定常状態では核内優位型の割合が高く、均一型、細胞質優位型と続くことがわかった（図 1.e)。

2. 血清濃度による FoxO1 の局在変化

FoxO1 はさまざまな栄養状態によって細胞内局在が変化することが知られている。そのため、まず身近な血清による FoxO1 の局在変化を観察するため、培地の血清濃度を変化させた。

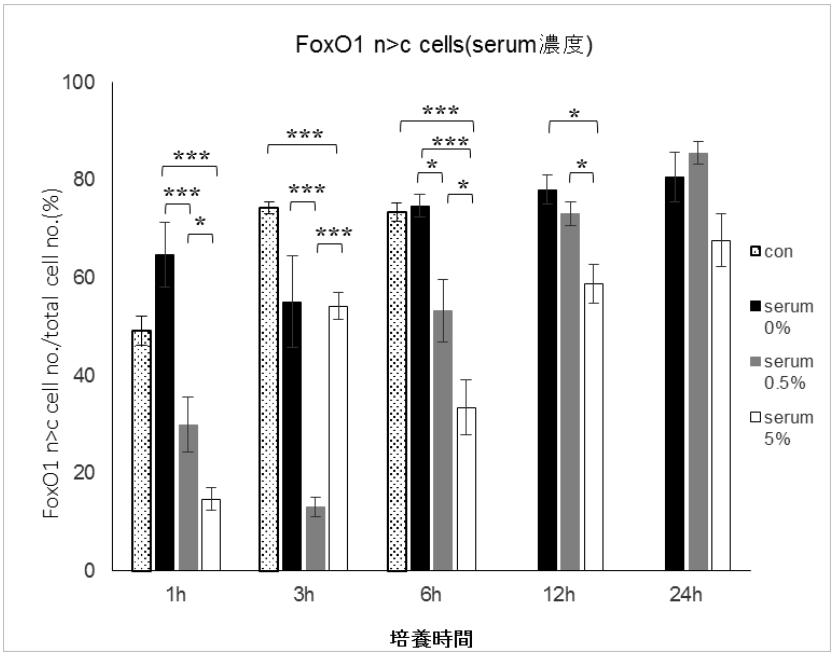

図 2. 血清濃度を変化させた場合の FoxO1 の核内優位型の割合

血清を濃度が 0%,0.5%,5% となるように DMEM(HG)に添加して、各条件で 1-24h 培養後回収した。

control では 1h 培養で定常状態よりも核内優位型が減少し、3h 後,6h 後には定常状態よりも核内優位型が増加傾向にあった。serum0%では 1h 培養で control よりも核内優位型の増加が見られた。各時間の血清濃度による核内優位型の割合を比較すると、3h 後を除いて血清濃度が低いほど FoxO1 は核内に入っていた。

HUVEC 用 medium での培養 1h で核内優位型の減少が見られ、その後定常状態よりも増加が見られた。全体の時間経過に伴う傾向を見ると、FoxO1 が核内から減少する期間と増加する期間に分けられ、血清濃度が高いほうが FoxO1 は核外に出る細胞数が多く、血清濃度が低いほうが FoxO1 は核内に入る細胞数が多いと言える。

control(HUVEC 用 medium)と DMEM(HG)serum5%下での培養では血清濃度が 5%と同等であるため比較すると、どの時間においても DMEM(HG)serum5%の核内優位型が低値の傾向を示した。

2. wash による影響の検討

図 2 の control において 1h 後に定常状態よりも核内優位型が減少していたことから、medium change の影響が疑われたため、以下の実験を行って関連性を検討した。

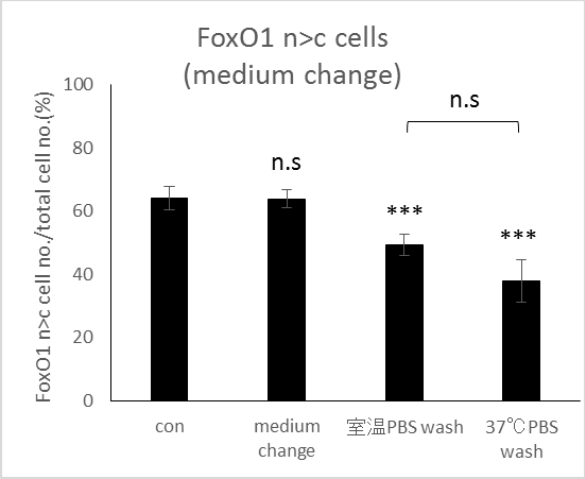

図 3.medium change および wash を行った場合の FoxO1 の核内優位型の割合

control では medium change を行わず、そのまま培養した。medium change では medium を新しい HUVEC 用 medium に入れ替えた。wash(+)と wash(温)ではそれぞれ常温の PBS での wash および 37℃に温めた PBS での wash を行い、新しい HUVEC 用 medium を入れた。培養後 1h で回収し、FoxO1 の核内優位型の細胞数を定量した。control と比較すると、wash を行わなかった場合には有意差は見られなかったが、常温の PBS での wash を行った場合と 37℃に温めた PBS での wash を行った場合では後者で核内優位型が有意に減少していた。常温と 37℃に温めた PBS での wash では有意差が見られなかった。

medium change による核内優位型の減少は見られなかった。しかし、PBS での wash を行った場合には核内優位型の減少が見られた。

また wash に使用する PBS を常温で用いた場合と 37℃に温めた場合で FoxO1 の細胞内局在に変化は見られなかった。

4. グルコース濃度による FoxO1 の局在変化

次に血清濃度以外の栄養状態として、培地のグルコース濃度を変化させた。

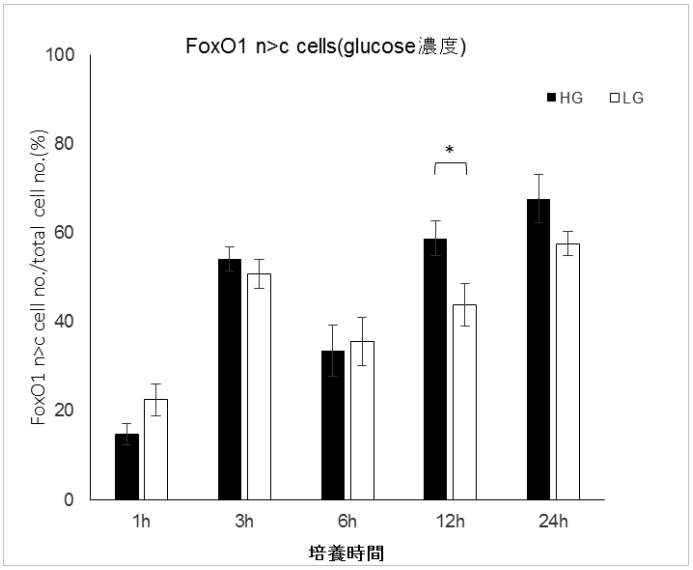

図 3.グルコース濃度変化させた場合の FoxO1 の核内優位型の割合

DMEM(HG)serum5%および DMEM(LG) serum5%にて、それぞれ 1-24h 培養後回収した。培地のグルコース濃度は HG で 4.5mg/ml、LG で 1mg/ml としている。どちらの条件でも時間経過とともに増加傾向を示した。12h 培養では HG より LG 条件での培養では有意に核内優位型の細胞数が少なかった。

グルコース濃度が異なる条件下であっても、培養後 3h を除くと、時間経過とともに核内優位型が増加する傾向にあった。しかし、HG に比べて LG の環境下では時間の経過につれて核内優位型の割合が小さくなる傾向にあった。

－研究成果－

まず、血清濃度を変化させた結果について述べる。

HUVEC 用 medium での 1h 培養では、定常状態と比較して、核内優位型の減少が見られたが、これについては medium change の影響が考えられたため、medium change による FoxO1 の細胞内局在への影響を確認した (図 3)。medium を変えずに培養し続けた場合と PBS での

wash を行った場合とでは FoxO1 の核内優位型が有意に減少したことから、PBS での wash は FoxO1 を核外に放出させる刺激であると言える。

また 3h 以上培養を続けると、定常状態よりも核内優位型が増加する現象が見られた。これは PBS での wash の刺激により FoxO1 が核内から減少したことを含む、細胞内の変化が生じ、FoxO1 が核内に入りやすくなっているなどの可能性が考えられるが、その他に今回の実験では定常状態を 6-12h で培養したものとしており、さらに長時間培養した場合などを定常状態の更なる検討が必要であると思われる。

血清濃度に対する FoxO1 の細胞内局在の依存性をみると、低血清濃度で核内への入りやすさは上昇し、核外への出やすさは低下していると言える。そのため、前者については低血清濃度のストレスへの応答が考えられる。後者については細胞内のエネルギーの低下による輸送の鈍化の可能性も考えられる。

HUVEC 用 medium と DMEM(HG)serum5%での培養を比較すると後者で核内優位型が減少していたことについては、まず HUVEC 用 medium に含まれる VEGF などの成長因子による影響が疑われたが、VEGF の FoxO1 を細胞外に誘導する刺激であることが報告されているため、VEGF による影響ではないと考えられる。また、栄養豊富な培地では細胞に対するストレスが少ないため、核内に入りにくいことが想定されていたが、HUVEC 用 medium のほうが FoxO1 を含むタンパク質の合成量が多いことが可能性として考えられ、細胞質内により高濃度となるため､核内に入りやすくなる刺激となることも推測される｡そこで､今後 FoxO1 の mRNA あるいはタンパク質の定量を行って FoxO1 の合成量の違いを調査したいと考えた。さらに、HUVEC 用 medium に含まれている血清と、血清濃度の調整に使用した血清の組成が異なるものであることについては精査する必要がある。

DMEM(HG) serm5%での 3h 培養で一時的に核内優位型が増加した現象については、PBS での wash により核内の FoxO1 が低下した後、一旦核内へ入ろうとする応答が生じるが、核内の濃度の急激な上昇により、核外への移動が促進されたことが考えられる。あるいは転写、翻訳されたタンパク質が核外に誘導する因子となった可能性が考えられる。

次にグルコース濃度を変化させた結果について述べる。

LG(1mg/ml)の環境下では一定時間が経過した後、FoxO1 が核内に入りにくくなると思われるが、これはヒトの空腹時血糖値が正常値で 100mg/dl 以下のため、実際は培養に適するグルコース濃度と細胞にストレスのないグルコース濃度に差があり、HG により細胞にストレスが生じている可能性が考えられる。さらに、細胞内のエネルギーの低下による輸送の鈍化の可能性も考えられるためエネルギー産生能を見る必要がある。

以上のことから HUVEC の FoxO1 は高血清濃度では核外に出やすく、低血清濃度では核に入りやすいことが示され、低血清濃度は FoxO1 を核内に誘導する因子となることがわかった。またグルコース濃度については、LG がストレスとなり FoxO1 が核内に誘導されると想定されていたが、LG 環境下でのエネルギー低下による輸送の鈍化の可能性と HG がストレスになっている可能性の双方が考えられ、更なる検討が必要である。