

血管細胞における力学応答の分子バイオメカニクス Molecular Biomechanics of Vascular Cell Mechano-Responses

安藤 譲二 (ANDO JOJI)
獨協医科大学・医学部・特任教授



研究の概要

血管内皮細胞が血流に起因するshear stressをどのように感知して応答するのか、そのメカノトランスダクション機構の解明を目指している。これまでの研究でshear stressが内皮細胞膜の流動性やカベオラのlipid orderを変化させ、内因性のATPが放出される現象を独自のイメージング技術で捉えた。細胞表面に放出されたATPはATP作動性イオンチャンネルを活性化し、カベオラから発火するカルシウム波を惹起した。

研究分野：生体医工学 循環生理学

科研費の分科・細目：総合領域・人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、メカノトランスダクション、血行力学因子、血管生物学

1. 研究開始当初の背景

血管内面を覆う内皮細胞は血流に起因するshear stressに敏感に反応して形態、機能、遺伝子の発現を変化させる。こうした内皮細胞の力学応答は循環系の恒常性の維持だけでなく、高血圧や動脈硬化など血管病の発生にも深く関わっている。しかし、内皮細胞がshear stressをどのように感知し情報伝達しているのか、その分子機構の詳細はまだよく分かっていない。

2. 研究の目的

我々は内皮細胞にshear stressが作用するとATPの放出反応が起こり、それがATP作動性イオンチャンネルのP2X4を活性化し細胞外カルシウムの流入反応が生じ、ついでカベオラから細胞全体に伝搬するカルシウム波が惹起されることを見出した。そこで本研究ではshear stressのメカノトランスダクション機構に関してイオンチャンネルP2X4の活性化に関わる細胞膜や膜分子の挙動とATP放出反応の面から解明することを目指した。また、shear stressが血管細胞の分化に果たす役割についても検討を加えた。

3. 研究の方法

培養内皮細胞にshear stress作用させたときの、1) 膜リン脂質のlipid order、2) 細胞膜の流動性、3) ATP放出反応、4) カルシウム反応、および末梢血由来内皮前駆細胞

や胚性幹細胞の分化に及ぼすshear stressの効果について各種イメージング法と分子細胞生物学的手法で解析した。

4. これまでの成果

1) 脂質二重膜のlipid orderの変化
細胞膜のlipid orderを蛍光色素Laurdanと2光子蛍光顕微鏡を使って解析した。静的培養条件下のヒト肺動脈内皮細胞の細胞膜のlipid orderは均一ではなく、細胞辺縁に局所的にlipid orderの高い領域(liquid-ordered region)が存在した。Shear stressを作用させると即座に膜全体のlipid orderが減少したが、とくにlipid orderの高い領域での減少が顕著であった。このlipid orderの低下反応はshear stressの強さ依存性で可逆性であった。このlipid orderの高い領域はコレステロールに富む細胞膜の小さなプラスチック状陥凹構造物であるカベオラが集積する部位に一致していた。これらの所見はshear stressがカベオラの密な細胞膜の物理的性質をliquid-orderedからliquid-disorderedに変化させることを示している。

2) 細胞膜の流動性

Laurdanイメージングを行った同じ細胞で蛍光色素DiIを用いたFRAP(fluorescence recovery after photobleaching)法で膜流動性の変化を解析した。膜流動性は細胞膜全体で均一ではなく、カベオラの集積する部

位は相対的に低かった。shear stress が作用すると細胞膜全体で膜流動性が上昇した。細胞をベンジル・アルコールで処理すると膜流動性は増加し、lipid order は減少した。一方、コレステロールを添加すると膜流動性は低下し、lipid order は増加した。このことから shear stress による細胞膜の流動性の増加の少なくとも一部に lipid order の低下が関与していると思われる。

3) ATP 放出反応のイメージング法の開発
今回我々は遺伝子工学的に作製したビオチン・ルシフェラーゼ蛋白をビオチン化した細胞膜にアビジンを介して結合させる方法で ATP 放出反応をリアルタイムでイメージングすることに成功した。Shear stress が作用すると即座に局所的に高濃度（数十から数百 μM ）の ATP 放出が生じた。その部位はカベオラが集積する部位と一致しており、caveolin-1 siRNA や methyl- β cyclodextrin でカベオラを破壊すると shear stress による ATP 放出反応が消失した。このことから shear stress による ATP 放出にカベオラが関わっていることが示された。

4) ATP 放出とカルシウム波の発生
ATP 放出が shear stress の細胞内情報伝達に果たす役割を検討するため同一細胞で ATP 放出イメージングとカルシウム・イメージングを行った。その結果、shear stress により最初に局所的な ATP 放出が起こり、同じ場所から細胞内カルシウム濃度の上昇反応が開始され、それがカルシウム波として細胞全体に伝搬することが明らかになった。血管内皮細胞においてカベオラで生じる ATP 放出はその近傍の膜に発現する ATP 受容体 (P2X4 channel) を介して shear stress の情報をカルシウム濃度変化として細胞内へ伝達するシグナリングのトリIGGERとして働いていると考えられた。

5) 細胞の分化と shear stress
今回の検討で shear stress がヒト末梢血由来内皮前駆細胞に作用すると転写因子 Sp1 を介して動脈内皮細胞マーカーである ephrinB2 の発現を増加させることで、静脈ではなく動脈の内皮細胞へ分化を誘導することが判明した。また、マウスの ES 細胞由来の血管前駆細胞についても shear stress が Notch シグナリングを活性化して ephrinB2 の遺伝子発現を増加させること、すなわち動脈内皮細胞へ分化誘導することが示された。このことから胚における器官形成の仕組みに shear stress が関わることを示唆された。また、今回の結果はメカニカルストレスを細胞分化誘導技術として ES 細胞や iPS 細胞を用いる再生医療に応用できることを示している。

5. 今後の計画

当初の具体的な3つの研究、①shear stress 作用下の細胞膜分子の挙動の解析、②shear stress のメカノセンシング機構、③shear stress の情報伝達と循環調節、を引き続き進めて行く。とくに①では血管内皮細胞増殖因子 (VEGF ; vascular endothelial growth factor) の受容体が shear stress で磷酸化する現象について、②では ATP 放出反応に関して細胞膜に発現する ATP 合成酵素の役割について、③では完全長 cDNA ライブラリーと機能イメージング・セルソーターを用いて shear stress に応答する遺伝子について解析を加える。

6. これまでの発表論文等

K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, and J. Ando: Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca^{2+} waves at caveolae in vascular endothelial cells. J. Cell Sci. 124:3477-3483, 2011

Y.M Chen, T. Kurokawa, T. Tominaga, K. Yasuda, Y. Osada, J.P. Gong, K. Yamamoto and J. Ando: Study on the sliding friction of endothelial cells cultured on hydrogel and the role of glycocalyx on friction reduction. Adv. Eng. Mater.12: B628-B636, 2010

K. Yamamoto and J. Ando: Differentiation of stem/progenitor cells into vascular cells in response to fluid mechanical forces. J. Biorheology 24:1-10, 2010

J. Ando and K. Yamamoto: Vascular Mechanobiology: Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. Circ. J. 73:1983-1992, 2009

T. Masumura, K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, and J. Ando: Shear stress increases expression of the arterial endothelial marker ephrinB2 in murine ES cells via the VEGF-Notch signaling pathways. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29:2125-2131, 2009

S. Obi, K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Kumagaya, T. Masumura, T. Sokabe, T. Asahara, and J. Ando: Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. J. Appl. Physiol. 106:203-211, 2009

ホームページ :

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/biomech/>