

平成 22 年 5 月 3 1 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17076002
 研究課題名（和文）力学的刺激に対する細胞の感知・応答の分子機構と
 組織構築技術への応用
 研究課題名（英文）Biomechanical force-sensing and response mechanisms in
 vascular cells and its application to tissue engineering
 研究代表者 安藤 譲二（ANDO JOJI）
 獨協医科大学 医学部 特任教授
 研究者番号：20159528

研究成果の概要（和文）：

生体の全ての臓器・組織に分化する能力を有する胚性幹細胞（ES 細胞）は再生医療に用いる細胞の供給源として期待されている。我々は ES 細胞の分化を誘導する方法に生体力学的刺激（Biomechanical force）を応用する研究を行った。その結果、液体の流れに起因する剪断応力はマウス ES 細胞由来の VEGFR 陽性細胞を血管内皮細胞へ、一方、圧力変化に基づく伸展張力は血管平滑筋細胞へ分化誘導することを明らかにした。これらの結果は Biomechanical force を ES 細胞の分化を調節する手段として再生医療に応用できることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Embryonic stem cells (ES cells) are attracting interests as a promising source of cells for use in regenerative medicine. The aim of the present study was to investigate whether biomechanical forces such as shear stress and cyclic strain affect ES cell differentiation. Fluid shear stress induced differentiation of cultured murine ES cell-derived VEGF receptor 2-positive (VEGFR2⁺) cells into endothelial cells (ECs), whereas cyclic strain promoted the differentiation of the cells into smooth muscle cells (SMCs). Thus, it seems likely that biomechanical forces act as key regulators of early vascular development in the embryo. Moreover, biomechanical force may provide an invaluable tool to directly control ES cell differentiation in the field of tissue engineering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	19,700,000	0	19,700,000
2006年度	19,700,000	0	19,700,000
2007年度	19,700,000	0	19,700,000
2008年度	19,700,000	0	19,700,000
2009年度	19,700,000	0	19,700,000
総計	98,500,000	0	98,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：血管、剪断応力、伸展張力、ES 細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、胚盤胞の内部細胞塊から樹立された胚性幹細胞 (ES 細胞) が生体の全ての種類の細胞に分化する能力を有することから、再生医療の有力な細胞源として注目を浴びている。しかし、ES 細胞の分化の分子機構や特定の細胞に分化誘導する方法に関してはまだ、十分解明が進んでいない。最近、ES 細胞の血管細胞への分化に関して、マウスの ES 細胞から分離した血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2) 陽性細胞に VEGF を作用させると内皮細胞へ、一方、血小板由来増殖因子 (PDGF) を作用させると壁細胞 (平滑筋細胞とペリサイト) に分化が誘導されることが示された。

ES 細胞は胚内で心拍動の開始により血流に起因する剪断応力や血圧変化に基づく伸展張力といった生体力学的刺激を受ける。最近、こうした流体力学的刺激が胚における器官形成に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。例えば、マウスの胎仔の腹側にある node と呼ばれる三角形のくぼみに繊毛が生えていて、それが回転運動をすることで流れ (ノード流) が生じているが、この流れの方向が臓器の配置の左右非対称性を決定していることが判明した。また、ゼブラフィッシュ胚で心臓発生時に心臓内の血流を阻害すると異常な第3室の形成や不完全な弁などの欠陥が現れることから、心臓内の血流動態 (強い剪断応力と渦流) が胚での心臓形成に必須な後天的要因であることが示された。しかし、未分化な ES 細胞が力学的刺激にどの様に反応するかについては不明であった。

2. 研究の目的

血管細胞へ分化する潜在能力を有する VEGFR2 陽性細胞を対象に、その細胞分化に及ぼす剪断応力と伸展張力の効果を *in vitro* で検討した。具体的には流体力学的に設計した流れ負荷装置とシリコンチャンバーを用いた伸展張力負荷装置にマウス ES 細胞由来の VEGFR2 陽性細胞を入れ、定量的な力学的刺激を作用させたときの各種細胞マーカーの発現変化を解析した。さらに力学的刺激が動静脈分化に及ぼす影響についても検討を加えた。

3. 研究の方法

細胞培養と力学的刺激負荷実験: ES 細胞株 (MGZ5) から VEGFR2 陽性細胞を磁気ビーズ法で分離した。実験には分化抑制因子 (LIF) を除いて3日間培養した細胞を使用した。剪断応力は平行平板型の流れ負荷装置で負荷

した。剪断応力の強さ (τ , dynes/cm²) は以下の計算式から算出した。 $\tau = 6\mu Q/a^2b$, ここで μ は灌流液の粘性、 Q は流量、 a 、 b は形状パラメータ。胚内で ES 細胞が受ける剪断応力の強さは米国の Jones らの検討で 0-5.5 dynes/cm² であることが示された。伸展刺激は市販の STREX ST-140 (Strex, Osaka, Japan) を用い 2-12% の負荷を行った。細胞表面の各種細胞特異的マーカーの発現は抗体を使った免疫染色、ウエスタンブロット、あるいは FACS (Becton Dickinson) で解析した。マーカー分子の遺伝子発現変化はリアルタイム PCR で得られる mRNA レベルの変化を指標とした。また、増殖因子受容体の磷酸化についてはウエスタンブロットで評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞分化に及ぼす剪断応力の効果

VEGFR2 陽性細胞に剪断応力を作用させて内皮細胞のマーカー PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) と平滑筋細胞のマーカー SM α -actin の発現の変化を免疫蛍光染色写真で検討した。静的条件では PECAM-1 陽性細胞は少なく、90% 以上が SM α -actin 陽性細胞であったが、剪断応力負荷 24 時間後は PECAM-1 陽性細胞が著明に増加するのが観察された (図 1)。このことは剪断応力に VEGFR2 陽性細胞を血管内皮細胞へ分化誘導する作用のあることを示している。

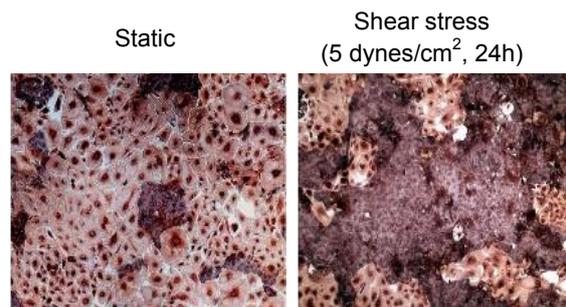


図 1. 細胞マーカー蛋白の免疫蛍光染色
PECAM-1 陽性細胞: 紫色、
SM α -actin 陽性細胞: 茶色

細胞膜の抗原量をフローサイトメトリで定量すると静的条件では内皮細胞マーカー (VEGFR2, VEGFR1, VE-cadherin, PECAM-1) の発現は培養 4 日まで増加し、その後は減少した。剪断応力が作用すると全ての内皮細胞マーカーが静的条件よりも顕著に増加する傾向が観察された (図 2)。

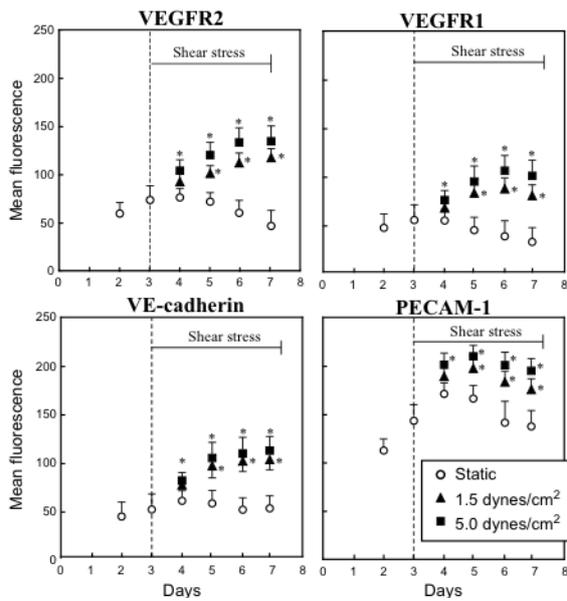


図2. 内皮細胞マーカー蛋白の発現変化

(*P<0.01 vs Static)

一方、剪断応力は平滑筋細胞のマーカーSM α -actin、血球系のマーカーCD3、上皮系の細胞のマーカーkeratinの発現には影響しなかった。剪断応力は内皮細胞マーカー蛋白の発現だけでなく遺伝子発現(mRNAの発現レベル)を増加させた。これらの所見は剪断応力がVEGFR2陽性細胞を平滑筋細胞、血球系の細胞、上皮系の細胞ではなく、特異的に内皮細胞へ分化誘導することを示している。また、VEGFR2陽性細胞はマトリジェルの上で管腔形成を起こすが、剪断応力を受けた細胞は静的条件と比べて明らかに管腔形成能が亢進するのが観察された。

剪断応力による内皮細胞への分化誘導効果にVEGFR2の活性化が重要な役割を果たしていた。VEGFRのキナーゼ阻害薬であるSU1498で細胞を処理すると剪断応力による内皮細胞マーカーの遺伝子発現増加が完全に抑制された。(図3)。剪断応力はリガンド

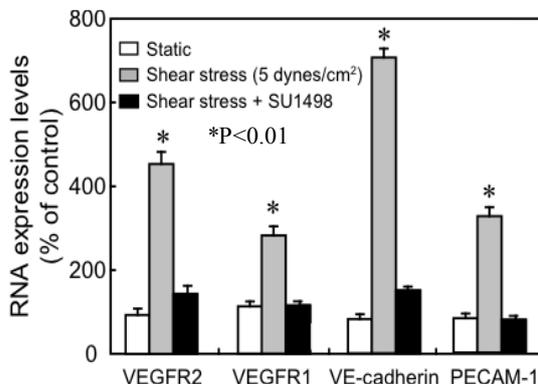


図3. 剪断応力の内皮細胞マーカー増加作用へのVEGF受容体活性化の関与

であるVEGFと同様、VEGFR2をチロシン磷酸化する。この磷酸化はSU1498で抑制されるが、VEGFの中和抗体では抑制出来なかった。このことから剪断応力がリガンド非依存性にVEGFR2を活性化すると考えられた(図4)。

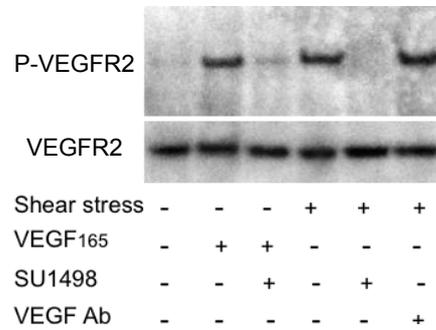


図4. 剪断応力によるVEGF受容体のリガンド非依存性磷酸化

(2) 動静脈分化と剪断応力

胚で動脈と静脈が形成される時、内皮細胞は動脈内皮細胞あるいは静脈内皮細胞に分化する。最近、動脈と静脈の内皮細胞を特異的なマーカー分子で区別することが可能となった。例えば、ephrinB2は動脈内皮細胞の、一方、EphB4は静脈内皮細胞のマーカーとなる。そこで剪断応力が動静脈分化に影響を及ぼすか否かについて検討するため、VEGFR2陽性細胞に剪断応力を負荷してephrinB2とEphB4の発現変化を解析した。その結果、剪断応力はephrinB2の蛋白発現を強さ依存性に増加させることが判明した(図5)。ephrinB2のmRNAレベルも剪断応力によ

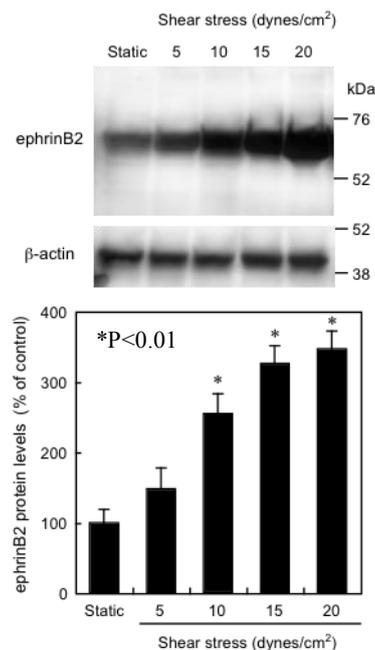


図5. ephrinB2の蛋白発現に及ぼす剪断応力の強さ依存性効果

り増加したが、一方、EphB4 の mRNA レベルは低下した。これらの所見は剪断応力に VEGFR2 陽性細胞を静脈内皮細胞ではなく動脈内皮細胞へ分化誘導する効果があることを示している。

従来、Notch シグナリングが胚における早期の血管形成や動静脈分化に関わることが知られている。今回、剪断応力による VEGFR2 陽性細胞の動静脈分化に Notch が重要な役割を果たすことが示された。Notch 受容体の proteolytic cleavage に関わる γ -secretase 阻害薬 (DAPT, L685, 458) は剪断応力による ephrinB2 の増加を完全に抑制し、一方、剪断応力による EphB4 の減少には影響しなかった (図 6)。VEGFR2 陽性細胞に剪断応力を作用させると Notch 受容体の cleavage が起こり、Notch intracellular domain (NICD) が細胞核に移行することが NICD の抗体による免疫染

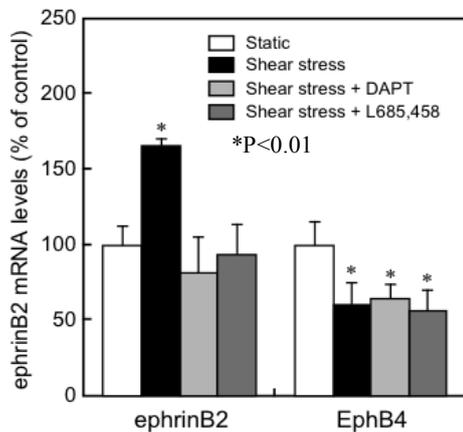


図 6. 剪断応力による ephrinB2 増加および EphB4 減少に対する γ -secretase 阻害薬の効果

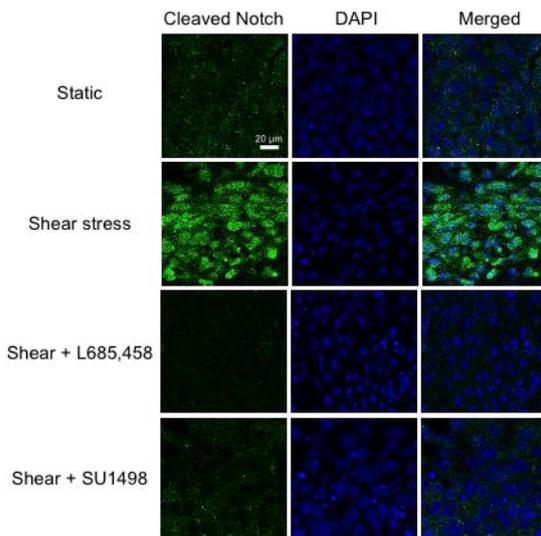


図 7. 剪断応力による Notch 受容体のクリベージと VEGF シグナルの関与

色により確認された (図 7)。核に移行した NICD により何らかの転写因子が活性化され、それが ephrinB2 の発現上昇を起こしたと考えられた。この剪断応力による NICD の核移行が γ -secretase 阻害薬 (L685, 458) と VEGFR のキナーゼ阻害薬 (SU1498) で完全に抑えられた。このことは Notch シグナリングの上流に VEGF シグナリングが関わっていることを示唆している。

(3) 細胞分化に及ぼす伸展張力の効果

弾性のあるシリコン膜に VEGFR2 陽性細胞を播種し伸展刺激を作用させたところ PECAM-1 陽性細胞は減少し、一方、SM α -actin 陽性細胞が増加して伸展の方向と直角に配列した (図 8)。ウエスタンブロットにより伸展張力で血管平滑筋細胞のマーカー (SM α -actin, SM-MHC) の蛋白が強さ依存性に増加することが示された (図 9)。また、伸展刺激は平滑筋細胞マーカー (SM α -actin, SM-MHC, SM22 α) の mRNA レベルを増加させた。一方、内皮細胞マーカーの VEGFR2 の mRNA レベルは伸展張力で減少し、他の内皮細胞マーカー (VEGFR1, VE-cadherin, PECAM-1) の mRNA レベルは変化しなかった。これらの結果は伸展刺激が VEGFR2 陽性細胞を特異的に血管平滑筋細胞へ分化誘導することを示している。

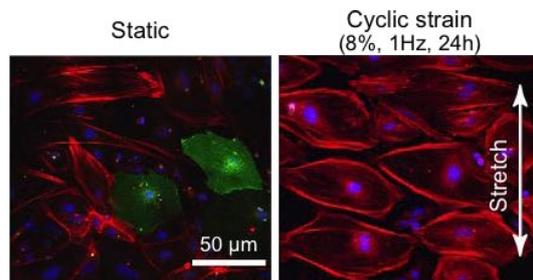


図 8. マーカー蛋白の免疫蛍光染色
PECAM-1 陽性: 緑、SM α -actin 陽性: 赤

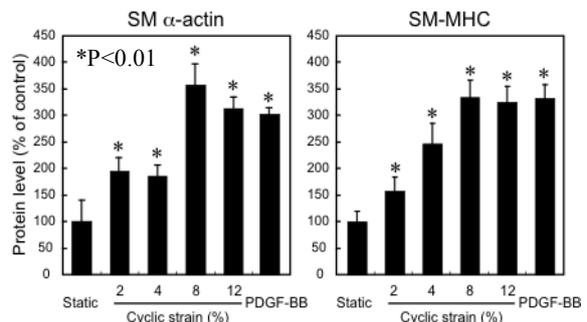


図 9. 平滑筋細胞マーカー SM α -actin と SM-MHC の mRNA レベルに及ぼす伸展刺激の効果

この伸展張力の効果に細胞膜に発現する PDGF 受容体の磷酸化が重要な役割を果たしていた。PDGF 受容体のキナーゼ阻害薬 AG1296 は伸展刺激による平滑筋マーカー蛋白 (SM α -actin、SM-MHC) の発現増加を完全に抑制した (図 10)。伸展刺激は PDGF 受容体の磷酸化を起こすが、これを PDGF や VEGF の抗体 (Ab) は阻止しなかった。また伸展刺激を作用させた細胞から得た conditioned medium は PDGF 受容体の磷酸化を起こさなかった (図 11)。このことから伸展刺激は PDGF 受容体をリガンド非依存性に活性化し、それが VEGFR2 陽性細胞の平滑筋細胞への分化誘導に繋がっていると考えられた。

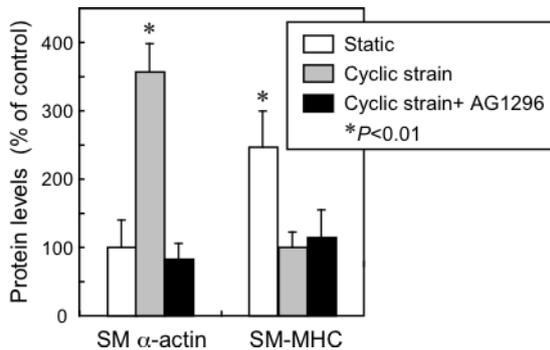


図 10. 伸展刺激の平滑筋マーカー増加作用への PDGF 受容体活性化の関与

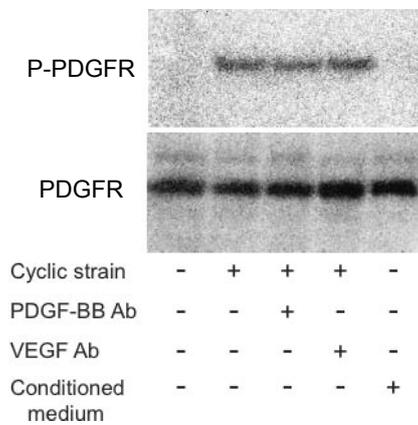


図 11. 伸展刺激による PDGF 受容体のリガンド非依存性磷酸化

(4) まとめと考察

今回の検討で成体の細胞だけでなく胚盤胞由来の ES 細胞など未分化な細胞も力学的刺激に反応することが示された。流れに起因する剪断応力は ES 細胞由来の VEGFR2 陽性細胞の VEGF 受容体をリガンド非依存性に磷酸化することで血管内皮細胞へ分化誘導し、一方、血圧変化に基づく伸展刺激は PDGF 受容体をリガンド非依存性に磷酸化することで血管平滑筋細胞へ分化誘導することが明ら

かになった。これらの事実は力学的刺激を介した血管新生や血管形成の調節機構が存在することを示唆している。今後、この機構の詳細を明らかにしていくことは、生体が有する血管形成の複雑なシステムを理解するうえで極めて重要であると思われる。

細胞の分化を誘導する力学的刺激は細胞操作技術として組織工学・再生医療に応用が可能と考えられる。既に ES 細胞を使った人工血管開発も試みられている。微細孔を有するポリマー管に ES 細胞を播種し断応力と伸展張力が作用する拍動流下で培養すると内腔表面に内皮細胞マーカー PECAM-1 陽性細胞が、一方、管壁の微細孔内には平滑筋細胞のマーカー SM α -actin 陽性細胞が分布していた。このことは力学的刺激が ES 細胞の血管細胞への分化誘導と、分化した細胞が適切な組織化を起こすことを示唆している。今後、化学的な増殖因子や分化因子だけでなく、力学的因子を組み合わせることで目的の組織・器官を作製する再生医療技術が発展していくと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 35 件)

主要な英文学術雑誌

1) J. Ando and K. Yamamoto: Vascular Mechanobiology: Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. *Circ. J.* 73:1983-1992, 2009 (査読有)

2) 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 (査読有)

3) 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 (査読有)

4) N. Shimizu, K. Yamamoto, S. Obi, S. Kumagaya, T. Masumura, Y. Shimano, K. Naruse, J.K. Yamashita, T. Igarashi, and J. Ando: Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor β . *J. Appl. Physiol.* 104:766-772, 2008 (査読有)

5) M. Toda, K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, S. Kumagaya, T. Igarashi, A. Kamiya, and J. Ando: Differential gene responses in endothelial cells exposed to a combination of shear stress and cyclic stretch. *J. Biotechnol.* 133:239-244, 2008 (査読有)

6) K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, S. Kumagaya, Y. Taketani, A. Kamiya, and J. Ando:

Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 293:H1646-H1653, 2007 (査読有)

7) K. Yamamoto, T. Sokabe, T. Matsumoto, K. Yoshimura, M. Shibata, N. Ohura, T. Fukuda, K. Sekine, S. Kato, M. Isshiki, T. Fujita, M. Kobayashi, K. Kawamura, H. Masuda, A. Kamiya, and J. Ando: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* 12:133-137, 2006 (査読有)

8) H. Huang, Y. Nakayama, K. Qin, K. Yamamoto, J. Ando, J. Yamashita, H. Itoh, K. Kanda, H. Yaku, Y. Okamoto, Y. Nemoto: Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. *J. Artif. Organs* 8:110-118. 2005 (査読有)

9) K. Yamamoto, T. Sokabe, T. Watabe, K. Miyazono, J. Yamashita, S. Obi, N. Ohura, A. Matsushita, A. Kamiya, and J. Ando: Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288:H1915-H1924, 2005 (査読有)

〔学会発表〕(計 89 件)

主要な招待講演

1) J. Ando, Shear-dependent mechanotransduction via endothelial ATP receptors and its physiological role in the vascular system. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) Kyoto, Japan, 2009. 7.31.

2) J. Ando and K. Yamamoto, Shear-stress-sensing and response mechanisms in vascular endothelial cells. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, Sendai, Japan 2009.1.15

3) J. Ando and K. Yamamoto, Shear stress mediated endothelial signaling and vascular homeostasis. The 13th International Conference on Biomedical Engineering, Singapore, 2008.12. 5

4) J. Ando, N. Shimizu and K. Yamamoto, Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells. BMES Annual Fall Meeting, St. Louis, USA, 2008.10.2

5) J. Ando, K. Yamamoto and N. Shimizu, Induction of vascular cell differentiation by fluid-mechanical forces in embryonic stem cells. ISACB 11th Biennial Meeting, Bordeaux, France, 2008. 9. 19

6) J. Ando, Shear-stress-sensing and response mechanisms in vascular endothelial cells. The keynote lecture in NIH-funded Cellular Biotechnology Training Program Symposium,

The University of Michigan, Ann Arbor 2007.4.19

7) J. Ando, K. Yamamoto, T. Sokabe, and A. Kamiya, The role of endothelial P2X4 receptors in flow-dependent control of vascular tone and remodeling. 5th World Congress of Biomechanics, Munich, Germany 2006. 8. 3

8) J. Ando and K. Yamamoto, Shear stress induces differentiation of endothelial progenitor cells and embryonic stem cells into vascular endothelial cells. Japan-Korean Joint Symposium on Vascular Biology, Doosan Resort, Chuncheon, Korea 2005. 8.11

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 譲二 (ANDO JOJI)

獨協医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：20159528

(2) 研究分担者

山本 希美子 (YAMAMOTO KIMIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00323618