

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18200030

研究課題名（和文） 血管内皮細胞のイオンチャネルを介した血流センシング機構

研究課題名（英文） Ion channel-mediated blood flow-sensing mechanism
in vascular endothelial cells

研究代表者

安藤 譲二（ANDO JOJI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20159528

研究成果の概要：

血流による血管の働きの調節は血管内皮細胞が血流に起因する力学的刺激である剪断応力を感知して応答する事に基づいている。我々は内皮細胞の剪断応力感知機構に細胞膜に分布する ATP 作動性イオンチャネル P2X4 を介する細胞外カルシウムの流入反応が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本研究により剪断応力の強さ依存性に放出される ATP が P2X4 を活性化すること、剪断応力による ATP 放出に細胞膜カベオラにある ATP 合成酵素が関与することが判明し、血流の情報が細胞内部に伝達される血流センシングの分子機構の解明が進んだ。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
2007年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
年度			
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：カルシウムイオン、剪断応力、ATP 受容体、細胞膜、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

近年、血管の働きがホルモンやサイトカインなどの化学的刺激だけでなく、血流に起因する剪断応力などの力学的刺激によっても調節を受けることが明らかになってきた。剪断応力による内皮機能の調節は循環機能の恒常性の維持だけでなく、生体で起こる血流依存性の現象として知られている血管新生や血管のリモデリングや粥状動脈硬化などの血管病にも深く関わっていることから、剪断応力に対する内皮細胞の反応に関する研究が世界的規模で展開されている。とくに申

請者らが行ってきた流体力学的に設計した流れ負荷装置で定量的な剪断応力を作用させて内皮細胞応答を解析する in vitro のバイオメカニクス研究により多くの知見が集積してきている。その成果として、内皮細胞は剪断応力を感知して情報を細胞内部に伝達することで、形態・配列の変化や様々な細胞機能の変化を起こすこと、また、剪断応力で内皮機能が変化する際には、その機能に関連した遺伝子の発現も変化することが明らかになった。しかしながら、剪断応力で活性化する情報伝達経路は多岐に渡り、多くの種類

の蛋白キナーゼが磷酸化し、その下流では NF κ B、AP-1、Egr-1、Sp1、GATA などを含む多くの転写因子が活性化することで、遺伝子全体の約 3% の発現が変化することも示された。しかしながら、どの経路が剪断応力に一次的で、どの経路が二次的なのか、あるいは、多くの経路が一斉に活性化することが剪断応力の情報伝達の特徴なのかどうかなど、未解決な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

内皮細胞の血流センシング機構を理解するためには内皮細胞が剪断応力を最初に感知する機構とそれに関わる血流センサー分子の本体を明らかにすることが最も重要である。これまで血流センサー分子の候補としては細胞膜に存在するイオンチャネルや、細胞と細胞外マトリックス間の結合に関わるインテグリン分子、細胞の形態を維持しているアクチンフィラメントなどの細胞骨格分子などが挙げられているが、まだ確定していない。申請者らは内皮細胞の剪断応力感知にカルシウムイオンを介した機構が働いていることを世界に先駆けて明らかにした。すなわち、内皮細胞に剪断応力が作用すると即座に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、その上昇の程度が剪断応力の強さに依存するのである。最近、我々はこの反応に ATP 作動性カチオンチャネル P2X4 が責任分子として働いていることを見出した。そこで本研究ではこのイオンチャネルに焦点をあて、内皮細胞の血流センシングの分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

- 1) ヒト肺動脈内皮細胞の培養: M199 基礎培地に 15% FBS と血管内皮細胞増殖因子を加えた培養液を用いて培養した。
- 2) 細胞外 ATP 濃度の定量: Luciferin-Luciferase 反応により得られる化学発光量をルミノメーターで測定することにより、細胞外の平衡塩溶液中の ATP を定量した。
- 3) 細胞外における ^3H -ADP の代謝の測定: 細胞外の平衡塩溶液中に ^3H -ADP を加え所定時間後に、溶液を薄層クロマトグラフィーで展開し、ATP、ADP、AMP、Adenocine を分離し、その放射活性量により定量した。
- 4) 免疫蛍光染色: ATP 合成酵素他の抗体を用いて染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- 5) カベオラ膜分画の単離: 細胞をホモジナイズした後、界面活性剤に分散させ、超遠心器を用いた密度勾配遠心法により、カベオラ・ラフト膜を単離した。
- 6) 免疫沈降・Western blotting: 細胞を RIPA buffer に可溶化させ SDS-PAGE で分離した。

Immobilon 膜に転写し、抗体で染色した後 HRP で検出した。

7) siRNA の調製と細胞内への導入: Caveolin-1 の siRNA を設計し、リポフェクション法により細胞内へ導入した。Caveolin-1 タンパクの発現減少を Western blotting により確認した。

4. 研究成果

Shear stress の情報伝達の一つに Ca^{2+} を介する経路がある。我々はヒト肺動脈内皮細胞に shear stress を作用させると即座に細胞外 Ca^{2+} の流入反応が生じ、その流入量は shear stress の強さに依存することを明らかにした。この Ca^{2+} 流入に ATP 作動性カチオンチャネルのサブタイプである P2X4 が中心的な役割を果たしていた。P2X4 遺伝子をノックアウトしたマウスの内皮細胞では shear stress による Ca^{2+} 流入とそれに引き続く NO 産生が起こらず、そのことが血圧の上昇や血流変化に対する血管の拡張反応やリモデリングの障害につながった。最近、我々はこの shear stress による P2X4 の活性化に shear stress により内皮細胞から放出される ATP が critical な役割を果たしていることを見出した。内皮細胞に shear stress を作用させるとその強さ依存性に内因性 ATP が放出されるが、これを阻害すると P2X4 を介する Ca^{2+} 流入反応が著明に抑制された。したがって、shear stress による ATP 放出の機構を探ることは shear stress の情報伝達の解明につながると思われた。

最近、ATP 合成酵素がミトコンドリアだけでなく細胞膜にも存在し、実際に細胞膜で ATP を合成することが判明した。この ATP が細胞内に取り込まれてエネルギー源になること (Unno et al, AJP 1996, Surgery 1997) や細胞膜の ATP 受容体を刺激することで細胞機能を修飾する可能性がある。これまで細胞膜の ATP 合成酵素の働きを抑えると内皮細胞の増殖が抑制される、あるいは癌の細胞死につながることが報告されている。このことは細胞膜 ATP 合成酵素が生理的あるいは病態的に重要な役割を果たすことを示唆している。そこで本研究では内皮細胞の膜 ATP 合成酵素が shear stress による ATP 放出に関わっているかについて検討を行った。

結果

1. 内皮細胞膜のカベオラに ATP 合成酵素が存在する。

ATP 合成酵素が HPAECs の細胞膜に存在するかについて、ATP 合成酵素の β -subunit に対する抗体を使った免疫蛍光染色で調べ

た。抗体が細胞膜を透過しない条件で得た染色写真から ATP 合成酵素は細胞表面に存在すること、その分布は細胞膜全体に瀰漫性ではなく一部の細胞辺縁に集中することが示された (図 1 A)。同様の分布は ATP 合成酵素の α -subunit に対する抗体を使った免疫染色でも確認された (data not shown)。一方、細胞を triton X で処理して抗体が細胞膜を透過する条件で行った免疫染色では、ATP 合成酵素がミトコンドリアの場所に一致して豊富に分布していた (data not shown)。HPAECs を細胞膜カベオラの構成蛋白である caveolin-1 及び cholesterol-rich な lipid rafts のマーカー蛋白である cholera toxin の抗体で免疫染色を行ったところ、ATP 合成酵素は caveolin-1 および cholera toxin と co-localize していることが判明した (図 1 A, Merged)。これらの結果から ATP 合成酵素が細胞膜の lipid rafts に caveolin-1 と共存していると考えられた。このことをさらに確認するため、a detergent-free sucrose density gradient method で細胞膜の caveolin-1 rich fraction 得て、anti-ATP synthase b-subunit antibody と anti-caveolin-1 antibody を使った immunoblot analysis を行った。その結果、ATP 合成酵素が細胞膜の caveolin-rich fraction に特異的

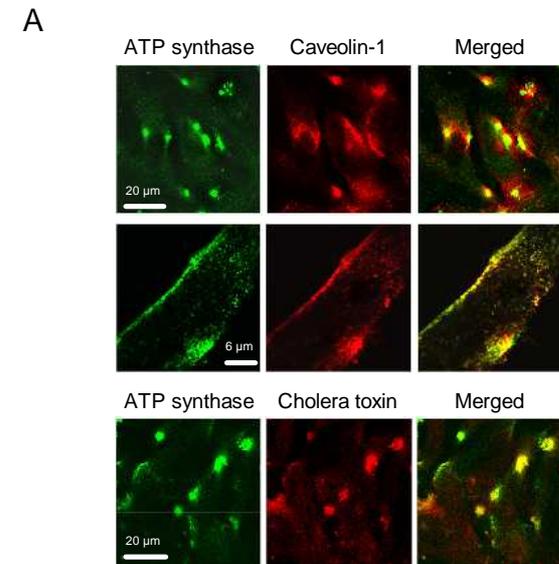


図 1 . ATP 合成酵素の細胞膜分布

に分布していることが示された (図 1B)。

2. 細胞膜の ATP 合成酵素は ATP 産生能を有している。

膜表面に存在する ATP 合成酵素の機能を調べるため、Confluent HPAECs を ^3H -labeled ADP と incubate し、上清中のヌクレオチド誘導体の相対量を薄層クロマトグラフィ (TLC) で定量した。Incubation 1 分以内で上清中に ^3H -labeled ATP が出現し、5 分後に peak を示した後、減少していくのが観察された (図 2 A)。このとき cell lysate には ^3H の放射活性がほとんど検出されなかったことから、 ^3H -labeled ADP は細胞内では代謝されていないと考えられる (図 2 C)。細胞を ATP 合成酵素の阻害薬である angiostatin で処理すると細胞表面での ^3H -labeled ADP から ^3H -labeled ATP への conversion が著明に抑制された (図 2 A, B)。これらの結果は HPAECs の細胞膜に存在する ATP 合成酵素は ADP から ATP を合成する機能を有していることを示している。

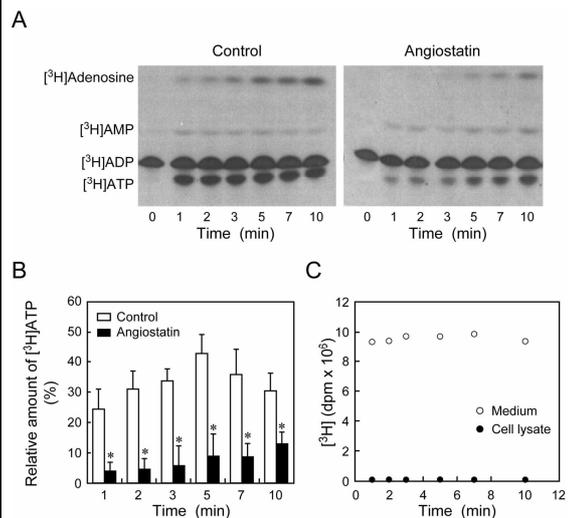


図 2. 細胞膜 ATP 合成酵素による ATP 産生
A: TLC 法による ^3H ADP から ^3H ATP への変換。B: ATP 産生に及ぼす Angiostatin の効果 C: 細胞内 (Cell lysate) の ^3H 濃度変化

3. 流れ刺激による ATP 放出反応は細胞膜 ATP 合成酵素を介している。

HPAECs に流れ刺激を 1 分間与えたときに灌流液中に放出されてくる ATP 量を luciferin-luciferase 法で定量した。流刺激により ATP が放出され、その量は shear stress の強度に依存した (図 3)。このとき、細胞内 ATP 濃度には変化が起きなかった (図 3 inset)。

この流れ刺激による ATP 放出に 細胞膜

ATP synthase が役割を果たしているかどうかを調べるため、細胞膜を通過しない ATP synthase 阻害薬の angiostatin あるいは ATP synthase 抗体を処理した HPAECs に流刺激を与えて放出されてくる ATP 量を測定した。その結果、angiostatin, ATP synthase 抗体とも流れ刺激による ATP 放出を著明に抑制することが判明した (図 3)。一方、angiostatin, ATP synthase 抗体とも細胞内 ATP 濃度に影響を及ぼさなかったことから、angiostatin, ATP synthase antibody は細胞膜を通過せず、膜表面で ATP 合成酵素に作用し、その機能を抑制したと考えられた。これらの所見は HPAECs において膜表面の ATP 合成酵素が流れ誘発性の ATP 放出に中心的な役割を果たしていることを示唆している。

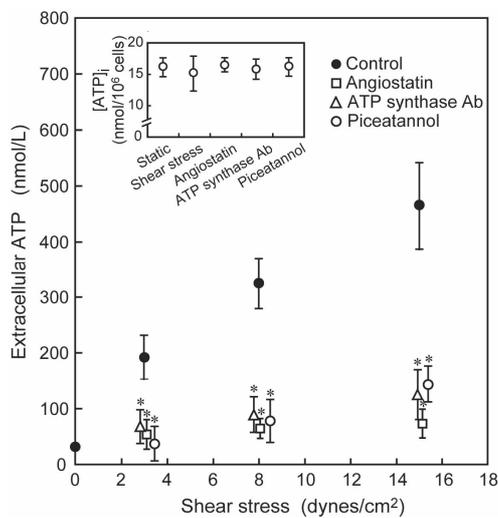


図 3 . 流れ刺激による ATP 放出反応挿入図は細胞内 ATP 濃度を示す。サンプル数は 5 で、*P<0.01。

4 . カベオラ・ラフトの破壊は流れ誘発性 ATP 放出反応を消失させた。

ATP 合成酵素がラフトに局在することが流れ誘発性 ATP 放出にどのような意味があるかを検証した。細胞膜の cholesterol を除去する作用がある methyl- β cyclodextrin (M β CD) で HPAECs を処理したところラフトが消失し、ATP 合成酵素が細胞膜全体に広く分布するようになった (図 4 a)。これに cholesterol を添加すると再びラフトが現れ、ATP 合成酵素も細胞辺縁の一部に集積して分布するようになった。Western blot で M β CD と cholesterol による細胞処理は細胞全体と膜の ATP 合成酵素や caveolin-1 の量には影響を及ぼさないことが示された (図 4 b)。HPAECs を M β CD で処理すると流れ刺激依存性の ATP 放出は明らかに抑制された

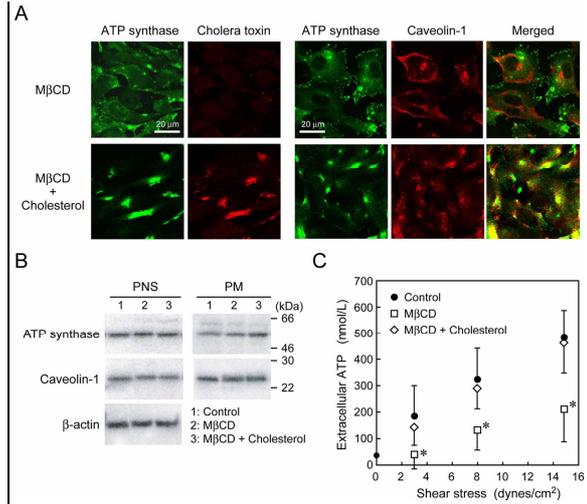


図 4 . ATP 合成酵素、ラフト、caveolin-1 の分布と流れ誘発性 ATP 放出反応に及ぼす cholesterol 除去の効果

A, 免疫染色写真 B, Western blot. PNS: postnuclear supernatant 分画、PM: plasma membrane 分画. C, ATP 放出反応 *P<0.01

(図 4 c)。この M β CD の ATP 放出抑制効果は cholesterol の添加で回復した。このことは流れ誘発性の ATP 放出に細胞膜 ATP 合成酵素が関わるためにはラフトに分布することが必須であることを示唆している。

さらに、ATP 合成酵素が caveolin-1 と共存することが流れ誘発性 ATP 放出にどのような意味があるかを検証した。HPAECs に caveolin-1 の siRNA を導入したところ、細胞膜の ATP 合成酵素の分布に大きな変化は見

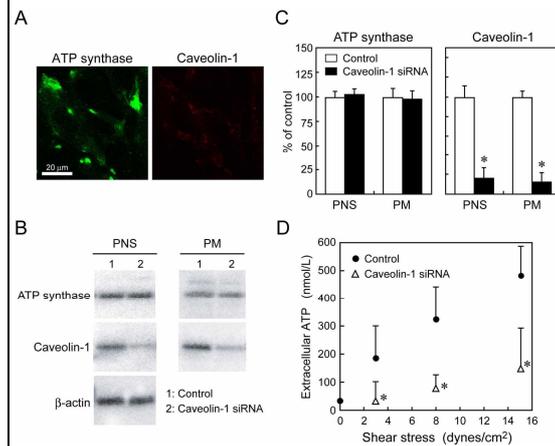


図 5 . ATP 合成酵素、caveolin-1 の分布と流れ誘発性 ATP 放出反応に及ぼす caveolin-1 のノックアウトの効果

A, 免疫染色写真 B, Western blot PNS: postnuclear supernatant 分画、PM: plasma membrane 分画. C, Western blot の結果の定量化 D, ATP 放出反応 *P<0.01

られなかったが、caveolin-1 の発現が明らかに減少を示した (Fig. 5A)。Western blot で siRNA 処理により細胞全体及び細胞膜の caveolin-1 が著明に減少したが、ATP 合成酵素の量は変化しないことが示された (図 5a)。caveolin-1 の膜発現を siRNA で抑制すると流れ誘発性の ATP 放出が明らかに抑制を受けた (図 5b)。このことは流れ誘発性の ATP 放出に細胞膜 ATP 合成酵素が働く上で、caveolin-1 との関係が重要であることを示している。

まとめと考察

今回の検討でヒト肺動脈内皮細胞の細胞膜に ATP 合成酵素が存在し実際に ATP を産生することが示された。この細胞を ATP 合成酵素に結合して活性を阻害する抗体で処理すると流れ刺激による ATP 放出反応が著明に抑制された。同様の効果が ATP 合成酵素の活性を阻害する angiotensin II や oligomycin によっても観察された。これらの所見は細胞膜 ATP 合成酵素が流れ刺激による ATP 放出に深く関わっていることを示している。細胞膜 ATP 合成酵素は caveolin-1 の豊富な細胞の辺縁に分布していた。細胞膜のコレステロールを除去したり、siRNA で caveolin-1 の発現を抑制すると膜 ATP 合成酵素の量は変化せず分布状態が変化し、流れ刺激による ATP 放出反応が明らかに減弱した。このことは膜 ATP 合成酵素が流れ刺激による ATP 放出に関わるうえで細胞膜での局在が重要であることを示している。

内皮細胞に限らず様々な細胞が機械的刺激に反応して ATP 放出を起こすことが知られている。しかしながら、ATP 放出のメカニズムはまだ十分解明されていない。細胞に ATP を含む小胞が存在し、それが機械的刺激で ATP を分泌する機構がある。英国の Bodin と Burnstock はヒト臍帯静脈内皮細胞をゴルジのレベルで小胞の形成を抑える monensin や小胞が細胞膜にドッキングするのを抑える NEM で処理すると流れ刺激による ATP 放出反応が著明に抑えられることを観察した。ATP が細胞膜にある特定のイオンチャネル(ABC transporters)を通して放出される機構がある。内皮細胞は代表的な ABC 蛋白である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)、P-glycoprotein、ATP-sensitive K⁺ channel を発現している。しかし、今回、膜 ATP 合成酵素の活性を阻害する抗体、angiotensin II、oligomycin が流れ刺激による ATP 放出を完全には抑制しなかった。また、monensin や NEM、あるいは vesicle のゴルジと細胞膜の間の trafficking を阻害する brefeldin A、CFTR と ATP-sensitive K⁺ channel の阻害薬である glibenclamide は shear stress による

ATP 放出反応を部分的に抑制することを観察した (data not shown)。これらの結果からヒトの肺動脈内皮細胞における流れ刺激による ATP 放出に膜 ATP 合成酵素が大きな役割を果たしているが、小胞輸送による分泌や ABC transporter も関与している可能性が考えられた。流れ刺激がどのように細胞膜 ATP 合成酵素に作用して ATP 放出につながるのか、また、この機構が小胞輸送や ABC 蛋白を介する機構とどのように関連しているかは現時点では不明であり、この問題の解決には今後のさらなる解析が必要である。

細胞膜のフラスコ状陥凹構造物でコレステロールが豊富なカベオラは様々な受容体とその下流で働く分子を集積して細胞膜に到達した刺激の情報伝達を開始される場所となっている。ヒト肺動脈内皮細胞で ATP 合成酵素はカベオラのマーカー蛋白である caveolin-1 が豊富な存在する細胞辺縁に集積していた。細胞膜コレステロールの除去を起こす methyl- β cyclodextrin で処理、あるいは siRNA で caveolin の発現を抑えると ATP 合成酵素の細胞膜での分布が変化した。このとき、細胞膜に存在する ATP 合成酵素の総量は変わらなかったが流れ刺激による ATP 放出が顕著な抑制を受けた。methyl- β cyclodextrin の効果は可逆的でコレステロールを添加すると ATP 放出反応は回復した。このことは ATP 合成酵素が流れ刺激による ATP 放出反応に関わるためにはカベオラに分布していることが必須の条件であることを示している。しかし、何故、ATP 合成酵素がカベオラにあると流れが作用したときに ATP 産生を起こすことができるのか、その理由は不明である。Park らは filipin や methyl- β cyclodextrin で内皮細胞を処理すると、流れ刺激による extracellular signal regulated kinase (ERK) のリン酸化が抑えられることを観察した。filipin や methyl- β cyclodextrin には caveolin-1 を膜から ER やゴルジに移動させカベオラの構造や分布状態を変化させる作用のあることが知られている。さらに caveolin-1 の抗体が流れ刺激による ERK のリン酸化を抑えることから、彼らはカベオラのような細胞膜にあるコレステロールが豊富なミクロドメインが流れ刺激のメカノトランスダクションに重要な役割を果たすことを指摘した。この他にもカベオラが流れ刺激のメカノトランスダクションに関わることを示す報告は多く見られる。したがって、カベオラを壊すと流れ刺激のメカノトランスダクションが起こらなくなるため ATP 合成酵素が活性化しなくなるのかもしれない。この他、膜の ATP 合成酵素の働きがカベオラの構造自体、あるいはそこに分布する他の分子に依存している可能性も考えられる。

5 . 主な発表論文等

(1) 雑誌論文 (計 2 3 件) 全て査読有

主要な英文学術雑誌

- 1) 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)
- 2) 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 b. *J. Appl. Physiol.* 104:766-772, 2008 (査読有)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)

(2) 学会発表 (計 5 2 件)

主要な招待講演

- 1) 安藤譲二, 血流による血管トーン調節の調節第 3 8 回日本心脈管作動物質学会、2009. 2. 6 岡山
- 2) J. Ando, Shear-stress-sensing and response mechanisms in vascular endothelial cells, The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, 2009.1.15, Sendai, Japan
- 3) J. Ando, Shear-stress-mediated endothelial signaling and vascular homeostasis., The 13th International Conference on Biomedical Engineering, 2008. 12. 5, Singapore
- 4) J. Ando, Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells., 2008 BMES Annual Fall Meeting, 2008.10.2, St. Louis, USA
- 5) J. Ando, Induction of vascular cell differentiation by fluid-mechanical forces in

embryonic stem cells., ISACB 11th Biennial Meeting, 2008. 9. 19, Bordeaux, France

- 6) J. Ando (教育講演), Blood-flow sensing by endothelial cells and its role in the regulation of circulatory system., 第 3 3 回日本微小循環学会、2008. 2. 22、東京
- 7) K. Yamamoto, Cell surface ATP synthase-mediated shear stress mechanotransduction in vascular endothelial cells., 16th IUPAB International Biophysics Congress, 2008. 2. 6., Long Beach, U.S.A.
- 8) 安藤譲二, 内皮細胞における血流刺激のメカノトランスダクション、シンポジウム「メカノバイオロジーの分子生物学」第 3 0 回日本分子生物学会、2007. 12. 14、横浜
- 9) 安藤譲二, 血流による血管構築・機能の制御と病態発生、第 1 2 回日本冠動脈外科学会学術総会 教育講演、2007. 7. 15、東京
- 10) 安藤譲二, ATP 受容体を介した血管内皮のメカノトランスダクション、専門別研究会「細胞バイオメカニクスの新展開：分子生物学的手法によるアプローチ」第 4 6 回日本生体医工学学会、2007. 4. 26、仙台
- 11) 安藤譲二, 血管のシアストレスセンサー、シンポジウム「感覚センサー：物理的的刺激センサーのセンシング機構と生理的意義」第 8 4 回日本生理学会、2007. 3. 21、大坂
- 12) 安藤譲二, シェアストレスと血管リモデリング、シンポジウム「血栓症：Virchow Code」第 2 9 回日本血栓止血学会、2006. 11. 18、宇都宮
- 13) K. Yamamoto, Fluid shear stress induces selective differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells., World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2006. 8. 28, Seoul, Korea.
- 14) 安藤譲二, 血管細胞のバイオメカニクス、第 2 回 REDEEM シンポジウム 医療工学の最前線、2006. 8. 12、東京
- 15) J. Ando, The role of endothelial P2X4 receptors in flow-dependent control of vascular tone and remodeling., 5th World Congress of Biomechanics, 2006. 8. 3, Munich, Germany.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 譲二 (ANDO JOJI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：2 0 1 5 9 5 2 8

(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：0 0 3 2 3 6 1 8

(3) 連携研究者

なし