

平成22年 5月30日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300155
 研究課題名（和文） 流れ剪断応力下における内皮細胞膜分子の動態挙動
 研究課題名（英文） Shear-stress-induced molecular dynamics of endothelial cell membrane
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

血液が血管を流れることにより血管壁に発生する流れ剪断応力は血管の働きを調節している。これは血管内面を覆う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を起こすことに基づいている。以前我々は剪断応力の感知に ATP 作動性イオンチャネル P2X4 が重要な役割を果たすことを報告した。本研究では、P2X4 の活性化に内皮細胞から放出される ATP が必要で、ATP の放出機構には、細胞膜カベオラ・ラフトに存在する ATP 合成酵素の活性化が重要であることが解明された。

研究成果の概要（英文）：

Endothelial cells (ECs) release ATP in response to shear stress, a mechanical force generated by blood flow, and the ATP released modulates EC functions through activation of purinoceptors. In this study, we have demonstrated that cell-surface ATP synthase is involved in shear-stress-induced ATP release. Immunofluorescence staining of human pulmonary artery ECs (HPAECs) showed that cell-surface ATP synthase is distributed in lipid rafts and co-localized with caveolin-1, a marker protein of caveolae. Immunoprecipitation indicated that the cell-surface ATP synthase and caveolin-1 are physically associated. Measurement of the extracellular metabolism of ³H-labeled ADP confirmed that cell surface ATP synthase is active in ATP generation. When exposed to shear stress, HPAECs released ATP in a dose-dependent manner, and the ATP release was markedly suppressed by membrane-impermeable ATP synthase inhibitors, angiotensin II and piceatannol, and by an anti-ATP synthase antibody. Depletion of plasma membrane cholesterol with methyl-β cyclodextrin (MβCD) disrupted lipid rafts and abolished co-localization of ATP synthase with caveolin-1, which resulted in a marked reduction in shear-stress-induced ATP release. Down-regulation of caveolin-1 expression by transfection of caveolin-1 siRNA also markedly suppressed ATP-releasing responses to shear stress. These results suggest that the localization and targeting of ATP synthase to caveolae/lipid rafts, is critical for shear stress-induced ATP release by HPAECs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000 |
| 2008年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2009年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| | | | |
| 総計 | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

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、内皮細胞、カルシウム・シグナリング、メカノトランスダクション、ATP 合成酵素、カベオラ

1. 研究開始当初の背景

血管系は組織に酸素や栄養素を供給する他、生体にとって多くの重要な働きを担い、ホルモン、サイトカイン、神経間伝達物質といった“化学的刺激”の特異的な受容体を介する調節を受けている。近年、血管系の働きが“化学的刺激”だけでなく、血管内に発生する血流や血圧に基づいて発生する流れ剪断応力や伸展張力といった“物理的刺激”によっても制御を受けることが明らかになってきた。特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、剪断応力の感知機構や細胞内情報伝達経路の詳細については未解決な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究課題は内皮細胞の血流センシング機構を理解することを主題としている。最近、申請者らは内皮細胞における剪断応力の感知にカルシウムイオンを介した機構が働き、ATP 作動性カチオンチャンネル P2X4 受容体が血流センサー分子として機能していることを明らかにした。そこで本研究では、このイオンチャンネルに焦点を当て、内皮細胞の血流センシングの分子機構の解明を目指す。また、イオンチャンネルを含む細胞膜分子の挙動を詳細に検討する為に、従来の組織・細胞レベルの解析法に加え、分子レベルの解析法を導入した解析を行う。

3. 研究の方法

ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAECs) を M199 基礎培地に 15% FBS と血管内皮増殖因子を加えた培養液を用いて培養した。平行平板型流れ負荷装置を用いて、定量的な剪断応力を HPAECs に負荷した。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 は形状パラメータである。ATP 濃度は 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定量、細胞外の平衡塩溶液中とした。また、細胞外 ³H-ADP の代謝は薄層クロマトグラフィーで定量した。カベオラ膜分画を単離する為に、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を行った。得られたタンパクをウエスタンブロット法 (WB) で解析した。細胞膜に発現するタンパクは免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。更に、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 WB により確認した。

4. 研究成果

Shear stress の情報伝達の一つに Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺流入に ATP 作動性カチオンチャン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 Ca²⁺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 Ca²⁺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。

(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)。

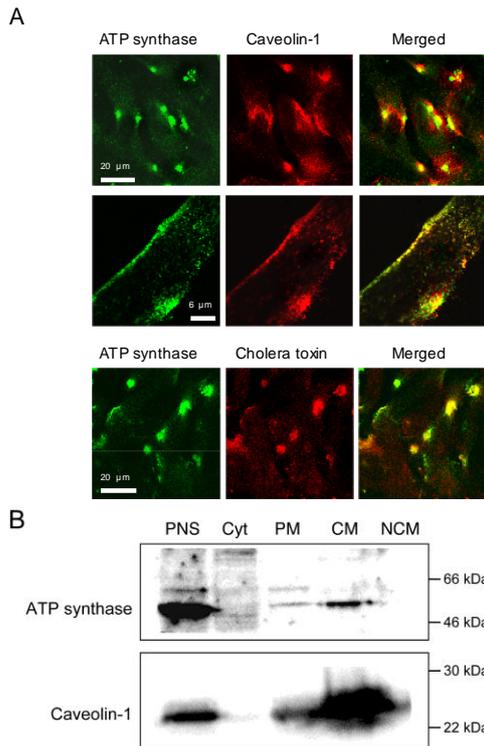


図 1. ATP 合成酵素の細胞膜分布

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、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 2A)。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 2C)。細胞を ATP 合成酵素の阻害薬である angiotensin 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 2A, 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

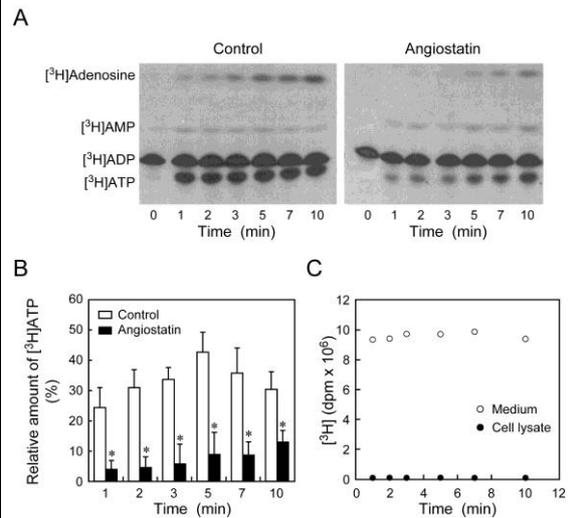


図 2. 細胞膜 ATP 合成酵素による ATP 産生
A: TLC 法による ^3H ADP から ^3H ATP への変換。B: ATP 産生に及ぼす Angiotensin の効果 C: 細胞内 (Cell lysate) の ^3H 濃度変化

ることを示している。

(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 angiotensin あるいは ATP synthase 抗体を処理した

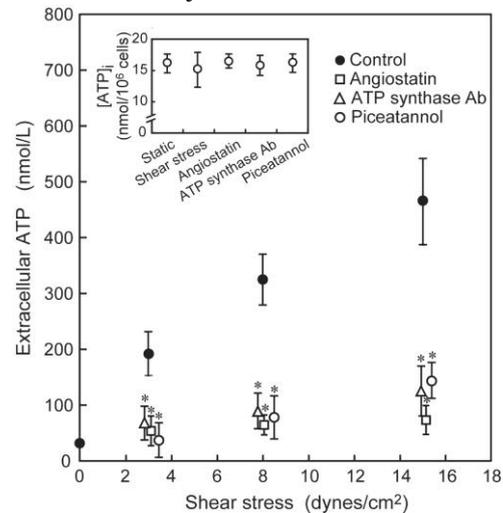


図 3. 流れ刺激による ATP 放出反応
挿入図は細胞内 ATP 濃度を示す。サンプル数は 5 で、* $P < 0.01$ 。

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。

(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 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

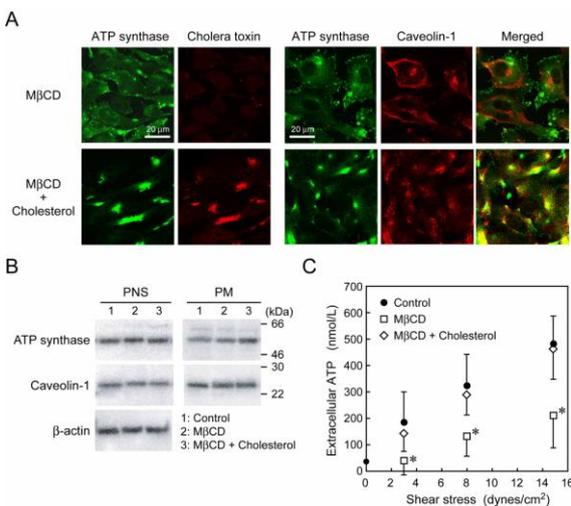


図 4. ATP 合成酵素、ラフト、caveolin-1 の分布と流れ誘発性 ATP 放出反応に及ぼす **cholesterol** 除去の効果

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

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られなかったが、**caveolin-1** の発現が明らかな減少を示した (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 5 a)。**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 5 b)。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。

(5) まとめと考察

今回の検討でヒト肺動脈内皮細胞の細胞

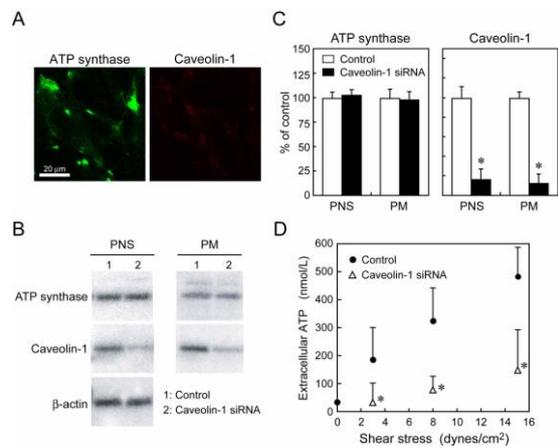


図 5. ATP 合成酵素、caveolin-1 の分布と流れ誘発性 ATP 放出反応に及ぼす **caveolin-1** のノックアウトの効果

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

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 **angiostatin** 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に分布状態が変化し、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)を通じ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、angiostatin, 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が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マイ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

[雑誌論文] (計 20 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. Biothechnol.* 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)

[学会発表] (計56件)

主要な招待講演

- 1) 山本希美子, 安藤譲二, 「血管内皮のカルシウムシグナリングを介した血流感知機構」第83回日本薬理学会年会 2010年3月28日 岡山
- 2) 山本希美子, 安藤譲二, 「血管内皮細胞における血流感知機構」第83回日本薬理学会年会 2010年3月16日 大阪
- 3) 山本希美子, 安藤譲二, 「内皮細胞のシェアストレス応答と循環機能調節」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜
- 4) 山本希美子, 安藤譲二, 「血流刺激による血管細胞の分化誘導」第17回日本血管生物医学会 2009年10月9日 東京
- 5) K. Yamamoto, T. Masumura, N. Shimizu, A. Kamiya, and J. Ando, "Fluid-mechanical force-induced differentiation of murine ES cells towards vascular cells" The Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009, Engelberg, September 4, 2009.
- 6) J. Ando and K. Yamamoto, "Shear Stress Mechanotransduction via Endothelial ATP Receptors and its Physiological Role in the Vascular System" The 36th International Congress of Physiological Science, Kyoto, July 31, 2009.
- 7) K. Yamamoto and J. Ando, "Endothelial P2X4-mediated shear-stress-mechanotransduction and its roles in the control of vascular functions" Fukuoka Purine 2009, Joint with JSPS Core-to-Core Program, A Satellite Symposium for IUPS 2009, Fukuoka, July 23, 2009.
- 8) K. Yamamoto, N. Shimizu, T. Masumura, and J. Ando, "Shear stress induces arterial differentiation of murine ES cells via the

VEGF-Notch signaling" The 14th Meeting on Thrombosis & Rheology, Tokyo, March 14, 2009.

- 9) 山本希美子, 安藤譲二, 「カルシウムシグナリングを介した血管内皮のメカノトランスダクション」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会) 2008年12月12日 神戸
- 10) 山本希美子, 古屋喜四夫、曾我部正博、安藤譲二, 「血管内皮細胞の流れずり応力依存的な内因性ATP放出」生理学研究所研究会 病態と細胞外プリン-治療標的としての可能性を探る- 2008年9月4日 岡崎
- 11) 古屋喜四夫, 山本希美子, 古屋園子, 安藤譲二, 曾我部正博, 「機械刺激によるATP放出のリアルタイムイメージング」生理学研究所研究会 2008年9月4日 岡崎
- 12) 山本希美子, 安藤譲二, 「内皮細胞のATP受容体を介した血流センシング」第31回バイオレオロジー学会年会 2008年6月5日 東京
- 13) Syotaro Obi, Kimiko Yamamoto, and Joji Ando, "Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells" The 13th Meeting on Thrombosis & Rheology, Tokyo, March 15, 2008.
- 14) 山本希美子, 安藤譲二, 「血管内皮細胞における剪断応力のメカノトランスダクション」第55回レオロジー討論会 2007年11月1日 金沢
- 15) 山本希美子, 「血管のバイオメカニクス」滋賀経済産業協会 ニューマテリアル研究会 2007年10月18日 大津
- 16) 山本希美子, 「血管内皮のATPレセプターを介したメカノトランスダクション」豊田理化学研究所特定課題研究「細胞の力学機構応答」討論会 2007年10月12日 名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://bme-sysphysiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし