

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700457

研究課題名（和文）力学環境に適応する血管壁リモデリングメカニズムの工学的モデルの構築

研究課題名（英文）Fundamental Study for Development of An Engineering Model of Remodeling Mechanism of Blood Vessel Walls in Response to Mechanical Environment

研究代表者

坂元 尚哉（SAKAMOTO NAOYA）

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20361115

研究成果の概要（和文）：

力学環境と血管壁リモデリング機能の定量的な関係解明を目的としてせん断応力環境に対する細胞機能応答の解析を行った。その結果、生理的なせん断応力環境において内皮細胞の血管壁分解活性が抑制され、高いせん断応力環境において分解活性が増加していることが示唆された。さらにせん断応力の大きさだけでなく、空間的せん断応力勾配に対しても内皮細胞の血管壁リモデリング機能が変化することを明らかにし、病変形成に対するせん断応力勾配の影響を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

To understand quantitative relationship between hemodynamic environment and remodeling of vessel walls, I investigated functional changes in vascular endothelial cells (ECs) exposed to fluid shear stress conditions. The results indicate that EC activity in wall degradation is suppressed under a physiological shear stress condition and higher shear stress may enhance the activity in degradation of vessel walls. Furthermore, I found that spatial gradient of shear stress also has an impact on ECs functions, which may be crucial to formation of vascular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：生体システム・フィジオーム、細胞・組織、力学刺激、リモデリング、血管内皮細胞、細胞外基質分解酵素

## 1. 研究開始当初の背景

血管壁には血流によるせん断応力や脈動に伴う血管壁の伸展といった力学環境に適応して再構築（リモデリング）を行い血管形状を維持する機能が存在する。この血管壁のリモデリングには血管内皮細胞と平滑筋細胞が重要な役割を持つ。血管内腔の内皮細胞

は血流による力学的刺激を感知し様々な生理活性因子産生を変化させる。そして内皮細胞由来の生理活性因子がシグナル伝達物質となり、血管壁中に存在する平滑筋細胞の機能変化を生じさせ、血管壁のリモデリングを引き起こすと考えられる。リモデリング機能の中でも平滑筋細胞はコラーゲンやエラス

チンといった主な血管壁成分である細胞外基質を産生する一方で、様々な種類の細胞外基質分解酵素 (MMP) を産生し血管壁成分を分解することが知られている。また、平滑筋細胞自身も伸展刺激に応答し機能変化を示すとともに、生理活性因子を産生して内皮細胞の機能に影響を与える。このように血管壁には力学環境を入力とし、内皮細胞および平滑筋細胞の機能変化を介した血管壁リモデリング制御システムが存在すると考えられる。しかし、これまでに血管壁のリモデリングに関して内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用やシステム構造の詳細については明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では内皮細胞および平滑筋細胞に流れによるせん断応力や伸展刺激を負荷したときの細胞の MMP と MMP 抑制因子である TIMP および生理活性因子産生を調べる。これらの結果を基にして、血管壁リモデリングを引き起こす血管壁の力学環境適応システムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

血管壁を構成する細胞の内、血流力学刺激に直接曝され、血管壁生理機能に最も重要な役割を有する内皮細胞に注目した研究を遂行した。

内皮細胞にせん断応力負荷を行い細胞外基質分解酵素である MMP と TIMP の産生変化を調べた。平行平板型フローチャンバを用いて均一なせん断応力を内皮細胞に 24 時間負荷した。その際、低せん断応力環境である 0.1 Pa から高せん断応力環境を想定した 10 Pa までのせん断応力を変化させた。その後、培養液中に含まれる MMP および TIMP 量をザイモグラフィ法およびドットブロッキング法にて評価した。本研究では MMP の内、主にコラーゲン分解に寄与する MMP-1, エラスチンを分解する MMP-2 および-9, ま

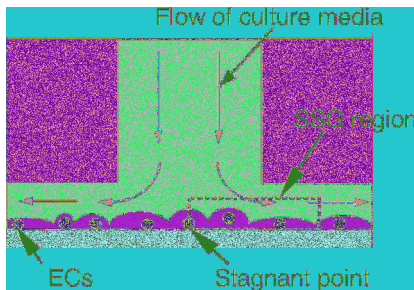


図1 T型フローチャンバの断面模式図。T型分岐中心のよどみ点 (Stagnant point) から流れの方向に沿って高い空間的せん断応力勾配 (SSG) が内皮細胞 (EC) に作用する。

た多くの MMP に対して抑制効果を有する TIMP-1 を対象とした。

血管壁のリモデリングに対してせん断応力の大きさだけでなく、空間的勾配も重要な役割を持つことが近年注目され始めた。そこで当初の予定していたせん断応力の大きさに加えて、空間的せん断応力勾配が内皮細胞の機能に与える影響も検討した。T型の分岐部を有するフローチャンバを設計し (図1)、分岐部の形状を変化させることで様々な大きさのせん断応力勾配を内皮細胞に負荷することを可能とした。T型フローチャンバを用いて内皮細胞にせん断応力勾配を負荷した後、リアルタイム PCR を用いて内皮細胞の遺伝子発現変化を調べた。T型フローチャンバ内で発生するせん断応力の平均値 (3.2Pa) および最大値 (9Pa) をそれぞれ空間的勾配のない環境で負荷した内皮細胞の遺伝子発現も合わせて調べ比較することでせん断応力勾配の影響を評価した。

## 4. 研究成果

平行平板型フローチャンバを用いて様々な大きさのせん断応力を内皮細胞に負荷した結果、動脈の生理的なせん断応力値である 1~2 Pa を中心にして、せん断応力値の増加および減少に伴いに全ての MMP 産生量および TIMP-1 産生量の増加が見られた。それぞれの MMP 活性をさらに検討するため MMP と TIMP の比を評価した結果、1~2 Pa のせん断応力環境で MMP と TIMP の比が最も低くなった。生理的なせん断応力環境において MMP 活性が抑制されていることが示唆された。また、せん断応力値が大きくなるほど MMP と TIMP の比が大きくなったことから、高いせん断応力環境では細胞外基質分解酵素活性が高くなり、血管壁の脆弱化が生じる

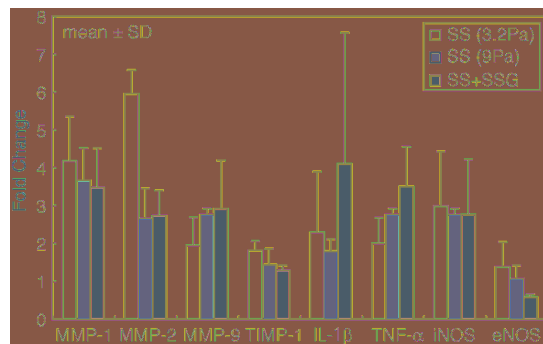


図2 せん断応力環境に曝した内皮細胞の遺伝子発現変化。静置培養した内皮細胞の発現量で規格化した値。SS, せん断応力; SSG, せん断応力勾配; MMP, 細胞外基質分解酵素; TIMP, 分解酵素抑制因子; IL, インターロイキン; TNF, 腫瘍壊死因子; NOS, 一酸化窒素合成酵素。

可能性が考えられた。

空間的せん断応力勾配を負荷した内皮細胞の 84 種類の遺伝子を調べた結果、勾配が存在しないせん断応力環境を負荷した場合に比べ、血管透過性制御因子、白血球接着因子、炎症性サイトカインなどの炎症反応に関連した遺伝子に 2 倍以上の大きな発現変化が見られた。血管病変形成に関与すると考えられる因子の発現変化を図 2 に示す。MMP-1, -2, -9 および TIMP-1, また血管壁リモデリングに係わる炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-1, 腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$ , 一酸化窒素産生酵素 (NOS) の内皮細胞 mRNA 発現を調べた結果、勾配がない環境に比べせん断応力勾配の存在により MMP-9, IL-1, TNF- $\alpha$  発現量の増加, NOS および TIMP-1 の減少が見られた。せん断応力の大きさだけでなく、せん断応力勾配の存在も内皮細胞機能に影響を与えることが明らかになり、せん断応力勾配が存在する環境では内皮細胞の血管壁リモデリング機能が変化し病変形成が引き起こされる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. R. Ichinose, H. Sano, K. Kishimoto, N. Sakamoto, M. Sato, E. Itoi: Alteration of the material properties of the normal supra-spinatus tendon by nicotine treatment in a rat model, *Acta Orthopaedica*, Vol. 81 (5), 634-638, 2010. (査読有)
2. N. Sakamoto, K. Segawa, M. Kanzaki, T. Ohashi, M. Sato: Role of p120-Catenin in the Morphological Changes of Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 398, pp. 426-432, 2010. (査読有)
3. Y. Ueki, N. Sakamoto, M. Sato: Cyclic force applied to FAs induces actin recruitment depending on the dynamic loading pattern. *The Open Biomedical Engineering Journal*, Vol. 4, pp. 129-134, 2010. (査読有)
4. Y. Ueki, Y. Uda, N. Sakamoto, M. Sato: Measurements of strain on single stress fibers in living endothelial cells induced by fluid shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 395, pp. 441-446, 2010. (査読有)
5. N. Sakamoto, N. Saito, X. Han, T. Ohashi, M. Sato: Effect of spatial gradient in fluid shear stress on morphological changes in endothelial cells in response to flow. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.

395, pp. 264-269, 2010. (査読有)

#### 6. Y. Ueki, N. Sakamoto, M. Sato:

Direct measurement of shear strain in adherent vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 394, pp. 94-99, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. N. Sakamoto, Tyrosine phosphorylation of endothelial cell-cell adhesion proteins induced by shear stress gradient. *BMES Annual Meeting 2010*, 2010 年 10 月 8 日, オースティン, 米国.
2. S. Sugita, Sorting of microtubules by length using micro-grooves fabricated on a chip. *BMES Annual Meeting 2010*, 2010 年 10 月 7 日, オースティン, 米国.
3. N. Sakamoto, Spatial gradient of shear stress induces phosphorylation of cell-cell adhesion proteins in endothelial cells. *KIST-Tohoku Joint Symposium on Nanobiomedical Engineering*, 2010 年 8 月 30 日, ソウル, 韓国.
4. T. Anno, PI3-kinase activity regulates lamellipodial formation of vascular endothelial cells exposed to shear stress. *The 6th World Congress on Biomechanics*, 2010 年 8 月 4 日, シンガポール, シンガポール
5. K. Nishio, Effect of initial morphology of endothelial cells on rhoGTPases activation induced by fluid shear stress. *The 6th World Congress on Biomechanics*, 2010 年 8 月 4 日, シンガポール, シンガポール
6. T. Okumura, Spatial gradient of shear stress modulates endothelial cell gene expression, associated with aneurysmal remodeling. *The 6th World Congress on Biomechanics*, 2010 年 8 月 4 日, シンガポール, シンガポール
7. N. Sakamoto, Effect of spatial gradient of shear stress on morphological responses of endothelial cells to flow. *Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region*, 2010 年 8 月 4 日, シンガポール, シンガポール
8. N. Sakamoto, Effect of cyclic stretch on production of inflammatory cytokines from macrophages *The 6th World Congress on Biomechanics*, 2010 年 8 月 4 日, シンガポール.
9. M. Sato, Dynamic lateral imaging and intracellular strain distribution of endothelial cells exposed to shear stress. *The 6th World Congress on Biomechanics*, 2010 年 8 月 3 日, シンガポール, シンガポール
10. N. Sakamoto, Morphological changes in vascular endothelial cells exposed to spatial gradient of shear stress.

MIT-NUS-NTU-Tohoku University Global COE  
Joint Workshop on Micro & Nano  
Bioengineering, 2010年1月12日, シンガポール,  
シンガポール

11. 植木洋輔, 血管内皮細胞の流れ負荷による変形挙動計測. 第22回バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月10日, 岡山.
12. 佐藤正明, せん断応力勾配が内皮細胞の形態応答に及ぼす意義. 第17回日本血管生物医学会, 2009年10月8日, 東京.
13. Y. Ueki, Effect of temporal pattern of cyclic force applied to focal adhesions on actin cytoskeletal reorganization. BMES 2009 Annual Fall Scientific Meeting, 2009年10月8日, ピッツバーグ, 米国.
14. N. Sakamoto, Morphological changes in cultured endothelial cells exposed to high shear stress and high shear stress gradient. BMES 2009 Annual Fall Scientific Meeting, 2009年10月8日, ピッツバーグ, 米国.
15. N. Sakamoto, Production of matrix metalloproteinases of endothelial cells under high shear stress condition. 6th International Intracranial Stent Meeting, 2009年8月6日, 仙台.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biomech.mech.tohoku.ac.jp/satolab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

坂元 尚哉 (SAKAMOTO NAOYA)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20361115

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：