

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300150

研究課題名（和文）血管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機構の解明

研究課題名（英文）Blood-flow-mediated mechanotransduction in vascular endothelial cells

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）：

血管の内面を覆う内皮細胞は血液の流れに起因する力学的刺激である shear stress を感知して応答し、血管の働きを調節している。本研究では、我々が独自に開発したイメージング法により、shear stress に対する内皮細胞応答である内因性 ATP の放出が細胞膜カベオラから起こり、P2X4 受容体を介してカルシウム・シグナリングを引き起こすことを明らかにした。更に、細胞膜カベオラは shear stress によりその lipid order を変化させ、膜の流動性を高めることにより、内皮細胞機能を調節することを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Endothelial cells (ECs) sense shear stress and transduce blood flow information into functional responses that play important roles in vascular homeostasis and pathophysiology. A unique feature of shear-stress-sensing is the involvement of many different types of membrane-bound molecules, but the mechanisms remain unknown. Shear stress evokes a rapid, dose-dependent increase in intracellular Ca^{2+} concentration caused by an influx of extracellular Ca^{2+} via ATP-operated P2X4 ion channels activated by endogenous ATP released by ECs. To analyze the dynamics of ATP release, we visualized ATP at the cell surface. When exposed to shear stress, ECs simultaneously released ATP at caveolae. Immediately after the ATP release, Ca^{2+} wave occurred at the same site as the ATP release. Caveolar membrane fluidity increased over the entire EC membranes in response to shear stress. These findings indicate that EC membranes directly respond to shear stress and that these changes link to shear-stress-mechanotransduction mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：バイオメカニクス、shear stress、血管内皮細胞、細胞膜、カベオラ、ATP

1. 研究開始当初の背景

血管内面を一層に覆う内皮細胞は血圧の調節、血液の凝固・線溶、蛋白の選択的透過など、血管機能の制御に中心的な役割を果たしている。近年、こうした内皮細胞の働きがホルモン、サイトカイン、ニューロトランスミッターといった化学的刺激だけでなく、血流に起因する shear stress 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。shear stress に対する内皮細胞応答は循環系の機能の恒常性の維持だけでなく、血流依存性の現象として知られている血管新生、血管のリモデリング、粥状動脈硬化などにも深く関わっていることから、世界の多くの科学者に注目され盛んに研究が行われてきた。これまで我々は内皮細胞が shear stress を感知して情報を細胞内部に伝達することで様々な細胞機能の変化を起こすこと、また、その機能に関連した遺伝子の発現も変化することを明らかにしてきた。Shear stress で活性化する情報伝達経路は多岐に渡り、多種類の蛋白キナーゼが磷酸化し、その下流では多くの転写因子が活性化することを示した。しかし、どの情報伝達経路が shear stress に一次的で、どの経路が二次的なのか、shear stress の情報伝達の特徴について未解決な点が多く残されている。この問題を解決するためには内皮細胞が shear stress を最初にセンシングする機構とそれに関わる分子を明らかにすることが最も重要である。

2. 研究の目的

これまで我々は shear stress のセンシング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。即ち内皮細胞が shear stress の強さの情報を細胞外カルシウムの細胞内への流入反応に変換して伝達する。このカルシウム・シグナリングに内皮細胞膜に存在する ATP 作動性カチオンチャンネル P2X4 が責任分子として働いていること、また、shear stress による P2X4 チャンネルの活性化に内皮細胞から放出される ATP が必須であり、その ATP 放出に細胞膜カベオラに存在する ATP 合成酵素が関わっていることを見出した。さらに、P2X4 を欠損させたマウスでさらに、P2X4 を欠損させたマウ

スで shear stress のカルシウム・シグナリングを起こらなくすると血管の拡張反応や血流変化に伴う血管のリモデリングが障害されるとともに、高血圧になるなど循環系に様々な異常が現れることを示した。このような成果に基づき、shear stress のメカノトランスダクションを解明するためには、まず shear stress 負荷直後に細胞膜で起こる現象、すなわち、カベオラに存在する ATP 合成酵素の活性化と ATP の細胞外への放出、それに続く P2X4 チャンネルを介したカルシウムの流入反応を解析し、次いで、その下流の情報伝達経路から遺伝子発現変化に至るカスケードを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

血管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機構を解明する為、具体的には以下の項目について検討を行った。

1) 膜分子の力学応答：細胞膜（とくにカベオラ）に存在する ATP 合成酵素が shear stress により活性化して ATP 放出を起こすメカニズムについて細胞膜を介したプロトン勾配の測定や内因性 ATP 放出については遺伝子工学的に作製したストレプトアビジン・ルシフェラーゼ融合蛋白質と冷却型 CCD カメラを用いた細胞レベルでの局所的 ATP 分泌現象のイメージングを行った。

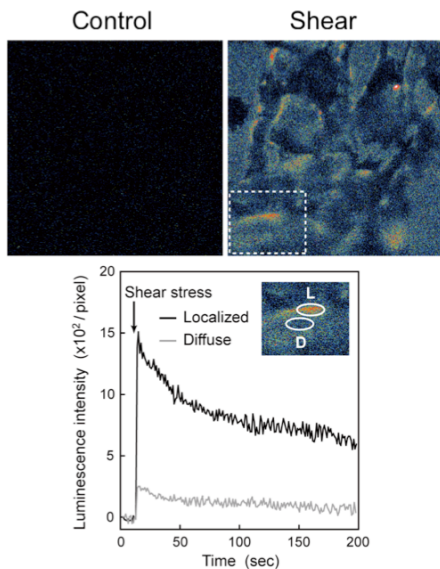
2) 細胞膜及び膜マイクロドメインの挙動：Shear stress によって惹起される細胞膜の物理的性質（親水・疎水性及び流動性）の変化を各種蛍光プローブと二光子顕微鏡システムを用いた分子イメージングで測定し、それと shear stress が活性化する情報伝達経路との関係を検討した。また、細胞膜のフラスコ状陥凹構造体であり、様々な外来の情報を細胞内部に伝達する玄関口とされるカベオラが shear stress のメカノトランスダクションに果たす役割について caveolin-1 を knock out した細胞で検討した。

4. 研究成果

1) 膜分子の力学応答

様々な外来刺激で起こる細胞からの ATP 放出反応は、その細胞が属する組織や器官の働きの調節に重要な役割を果たす。しかし、細胞膜表面で起こる ATP 濃度の変化を実時

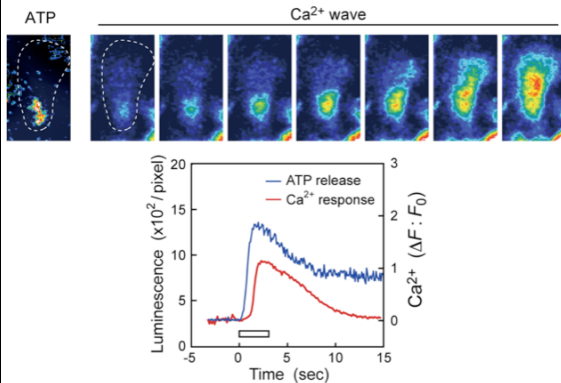
間にかつ感度良くイメージングできる技術がなかったため、ATP 放出反応の詳細な機構は不明な点が多かった。今回我々は遺伝子工学的に作製したルシフェラーゼ蛋白をアビジン・ビオチンシステムを介して培養内皮細胞膜に結合させる方法で shear stress が惹起する ATP 放出反応をリアルタイムでイメージングすることに成功した。Shear stress が作用すると即座に局所的に高濃度（数十から数百 μM ）の ATP 放出が生じた。その部位はカベオラが集積する部位と一致しており、caveolin-1 siRNA や methyl- β cyclodextrin でカベオラを破壊すると shear 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判明した。この新規 ATP イメージング法はエネルギー源として重要な ATP が、細胞膜に存在する ATP 受容体を活性化する情報伝達因子として働く様々な生命現象を解析するうえで有用なツールとなり、細胞科学の研究に与えるインパクトは大きいと思われる。



Shear stress による ATP 放出現象

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、ついで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。これは刺激により局所的に放出された ATP が、その下流でカルシウム波を引き起こすことを世界で最初に示したイメージングである。



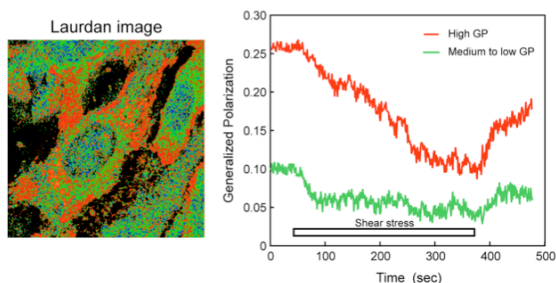
ATP 放出と Ca²⁺ 波のイメージング

2) 細胞膜及び膜マイクロドメインの挙動

細胞膜のリン脂質二分子層は規則正しく配列して結晶状態にあり、その内部は液体に近いので液晶 (liquid crystal) といわれるが、その性質 (lipid order) は様々な要因により変化する。最近、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 living cell で解析することが出来るようになった。その原理は細胞膜が liquid-ordered state から、より分子の運動が自由になる liquid-disordered state になり、脂質二重層へ水分の浸透が起こると Laurdan の蛍光が 50 nm 赤色へシフトすることに基づいている。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 area) 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フラスコ状陥凹構造物であるカベオラが

集積する部位であった。これらの所見から shear stress は細胞膜の lipid order を低下させる、すなわち柔らかくする作用のあることが判明した。これは shear stress が膜脂質分子に影響を及ぼすことを世界に先駆けて示した実験であり、学術的な意義が大きい。

細胞膜の物理的特性の指標として分子が膜内を拡散するし易さである膜流動性がある。Laurdan イメージングを行った同一の細胞において蛍光色素 DiI を用いた FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法で shear stress を作用させたときの膜流動性の変化を解析した。その結果、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いことと shear stress が作用すると細胞膜全体で膜流動性が上昇することが示された。膜流動性は細胞をベンジル・アルコールで処理すると増加し、コレステロールを添加すると低下したが、shear stress で起こる内皮細胞からの ATP 放出反応がベンジル・アルコールで促進され、逆に、コレステロール添加で抑制された。このことは細胞膜の流動性の変化が shear stress に対する内皮細胞の力学応答に重要な役割を果たす可能性を示している。



Shear stress による膜 lipid order の減少

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 18 件)

- ① K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, J. Ando. Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca^{2+} waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* 査読有 124, 2011, 3477-3483.
- ② K. Yamamoto, J. Ando. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: Blood flow sensing mechanism in vascular

endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.* 査読有 116, 2011, 323-331.

- ③ J. Ando, K. Yamamoto. Effects of shear stress and stretch on endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* 査読有 15, 2011, 1389-1403.

[学会発表] (計 42 件)

- ① K. Yamamoto, J. Ando, “Shear-stress-mediated control of vascular functions through endothelial ATP release and P2X4 ion channels” 14th International Congress of Biorheology and 7th International Conference on clinical Hemorheology, Istanbul, July 4, 2012. (Invited)
- ② K. Yamamoto, J. Ando, “ATP-gated P2X4 ion channel serve as transducers for shear stress mechanotransduction in vascular endothelial cells” Purine 2012 in Fukuoka: International Symposium on Purinergic Signaling in New Strategy of Drug Discovery, Fukuoka, June 1, 2012. (Invited)
- ③ 山本希美子、安藤譲二、「血管のメカノバイオロジー：血流刺激に対する内皮細胞応答」第 51 回日本生体医工学会大会 2012 年 5 月 10 日 福岡 (招待)

[図書] (計 3 件)

- ① K. Yamamoto, J. Ando, “Molecular Mechanisms Underlying Mechanosensing in Vascular Biology” in Masaki Noda (ed.), *Mechanosensing Biology*, Springer, Tokyo, 2011, pp 21-37.
- ② K. Yamamoto, J. Ando, “Endothelial mechanotransduction and its role in the control of vascular functions” in Shu Chien and Shi Yongde (eds.), *Recent Advances in Mechanobiology*, Shanghai Science and Technological Literature Publishing House, Shanghai, 2012, pp 175-179.

[その他]

ホームページ等

- ① <http://bme-sysphysiol.m.u-tokyo.ac.jp/>
- ② http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/sysbio/j/sakigake/saki_15.html

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)
 獨協大学・医学部・特任教授
 研究者番号：20159528