

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282128

研究課題名(和文)流れずり応力に対する内皮細胞形質膜の力学応答

研究課題名(英文)Mechanoresponses of endothelial cell membranes to fluid shear stress

研究代表者

山本 希美子 (Yamamoto, Kimiko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00323618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞は血流に起因する力学的刺激である流れずり応力や伸展張力をセンシングし、その情報を細胞内部に伝達することで血管の機能を維持している。本研究では、内皮細胞形質膜が血流センサーとして働くことを明らかにした。形質膜の脂質分子の配向性が流れずり応力により減少したが、伸展張力により増大した。この変化は人工脂質二分子膜でも同様に観察された為、物理現象であることを証明した。さらに、流れずり応力は血管内皮増殖因子受容体を、伸展張力は血小板由来増殖因子受容体を活性化するが、形質膜分子の配向変化を起こらなくすると、それぞれの受容体の活性化が抑制され、形質膜の物理的性質が細胞応答に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cells (ECs) respond to the hemodynamic shear stress and stretch by altering their morphology, functions, and gene expression. Here we conclude that plasma membranes differentiate between stretch and shear stress by undergoing transitions in their lipid phases. Shear stress decreased the lipid order of EC plasma membranes; stretching increased the membrane lipid order. Similar changes occurred in the artificial lipid bilayer membranes, indicating that these are physical phenomena. Blocking these changes in the membrane lipid order by depleting membrane cholesterol with M₁CD or by adding cholesterol resulted in marked inhibitions of the stretch or shear stress induced phosphorylation of PDGF receptors or VEGF receptors, respectively. These results indicate that EC membranes differently respond to hemodynamic forces and that the changes in membrane physical properties are involved in the mechanotransduction that activates membrane receptors by each force.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：流れずり応力 ノセンシング 血管内皮細胞 細胞膜 コレステロール 伸展張力 メカノトランスダクション メカ細胞増殖因子受容体

1. 研究開始当初の背景

細胞や組織が力学的環境に由来するメカニカルストレスを感知して反応することは、その機能や生存にとって極めて重要である。特に血管に作用する血行力学因子は血管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。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、血流に起因する流れずり応力や血圧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。特に流れずり応力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、粥状動脈硬化や脳動脈瘤の発症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、盛んに研究がなされてきた。これまで、血流の中でも特に血管内皮細胞に直接作用する流れずり応力のセンシングに、細胞膜のイオンチャネルや増殖因子受容体、G 蛋白共役型受容体、細胞間あるいは細胞と細胞外基質との接着に関わる接着分子、アクチンフィラメントなどの細胞骨格、さらには細胞膜と連結した細胞外マトリックスであるグリコカリックスや微絨毛のプライマリーシリアなどの関与が提唱されてきているが、実際の役割はまだ確定していない。

2. 研究の目的

我々は内皮細胞が流れずり応力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。特に、流れずり応力のセンシングにカルシウムイオン (Ca^{2+}) 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。この Ca^{2+} シグナリングに内皮細胞膜に存在する ATP 受容体である P2X4 が責任分子として働いていること、また、流れずり応力による P2X4 チャ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 放出と Ca^{2+} シグナリングが細胞形質膜でも特に、コレステロールとスフィンゴ脂質に富む脂質マイクロドメインであるカベオラ

から生じることを、我々が独自に開発した ATP の高感度リアルタイムイメージング法により明らかにした。また、カベオラの構造を壊すと、流れずり応力依存的な ATP 放出と Ca^{2+} シグナリングが起こらなくなった。さらに、P2X4 を欠損させたマウスで流れずり応力依存的な Ca^{2+} 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共に、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、流れずり応力のメカノトランスダクションを解明するためには、まず流れずり応力負荷直後に内皮細胞形質膜で起こる現象であるカベオラを直接観察し、さらに ATP の細胞外への放出、それに続く P2X4 チャネルを介したカルシウムの流入反応を解析し、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が必要かつ重要であると考えた。本研究では、流れずり応力や伸展張力などの血流刺激が誘発する内皮細胞形質膜の動的な挙動をリアルタイムで観察すると共に、形質膜自体の物理化学的性質の変化を解析することで、血流センシング機構を明らかにし、内皮細胞における血流刺激が誘発する力学応答を解明することを目的とした。具体的には、(1) 細胞形質膜及び脂質マイクロドメインの挙動について、形質膜の物理的な性質の指標となる膜脂質相転移と膜の流動性の視点から、(2) 膜分子の力学応答については、形質膜の物理的な性質の変化が血流刺激依存的に起こる ATP 放出反応や、増殖因子受容体の活性化に及ぼす影響について解析を加えた。

3. 研究の方法

(1) 細胞形質膜及び脂質マイクロドメインの挙動について、流れずり応力や伸展張力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、それと力学的な刺激が活性化する情報伝達経路との関係を解析した。細胞膜を構成するリン脂質は二分子層構造をとる。ゲル状のリン脂質二分子膜に水が入り込むと、脂質の相状態 (lipid order) が液体状態 (液晶相) へ相転移する。この相転移のときに波長がシフトす

る蛍光プローブ Laurdan と 2 光子レーザー顕微鏡を用いて、ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAECs) の形質膜の物理的性質の変化を解析した。波長 770 nm の波長で 2 光子励起すると、疎水性の強い領域である秩序液体相 (L_o) が測光波長 400-460nm (蛍光強度 I_1) で、一方、親水性の強い領域である無秩序液体相 (L_d) が測光波長 470-530 nm (蛍光強度 I_2) で観察できる。このデータから極性の標準化を行った Generalized polarization (GP) 値を $GP = (I_1 - G \cdot I_2) / (I_1 + G \cdot I_2)$ 、尚 G は補正係数、で算出し GP 値の大きさを指標とした疑似カラー画像を作製した。また、生細胞で Laurdan GP 画像を取得した後、カベオラのマーカーである caveolin-1 抗体で蛍光免疫染色を行い、GP 値の大きさと caveolin-1 の局在との相関を同一細胞で比較した。

さらに、飽和型のリン脂質である 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) と不飽和型のリン脂質である 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine DOPC、コレステロールを所定モル比で混合して構成した細胞サイズの人工脂質二分子膜巨大リポソーム (GUVs) を用いて、脂質ミクロドメインの shear stress および stretch に対する応答ダイナミクスを明らかにすることを目的として、内皮細胞における解析と同様に、Laurdan GP 画像を取得した。流れ負荷装置で shear stress を負荷すると共に、浸透圧が 200 mOsmol/L の緩衝液から 50 mOsmol/L の緩衝液に交換することで、脂質二分子膜を低浸透圧膨張させることにより stretch の刺激を加えたときの脂質二分子膜の相転移の変化を解析した。

また、細胞膜における分子の拡散のしやすさを測定することで内皮細胞形質膜の流動性の変化を捉えた。蛍光分子のフォトブリーチングを利用した光褪色後蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) を応用し、形質膜局所における拡散係数を算出した。内皮細胞形質膜を蛍光プローブ DiIC₁₆ で標識し、流れずり応力及び、伸展張力負荷時の FRAP を共焦点レーザー顕微鏡で測定し、拡散係数の変化を解析した。また、細胞膜のコレステロールを除去する作用のある Methyl β -cyclodextrin (M β -CD) や膜ミクロドメインであるカベオラ/ラフトを

破壊する siCaveolin-1 で細胞を処理したときの変化も同様に検討した。

(2) 膜分子の力学応答については、我々が独自に開発した、高速、かつ高感度、実時間で細胞膜表面の ATP 濃度を測定できるイメージング法を用いて HPAECs の膜の物理的性質の変化が流れずり応力依存的な ATP 放出に及ぼす影響を検討した。ビオチン融合ルシフェラーゼ蛋白を遺伝子工学的に作製し、それをビオチン化した培養内皮細胞表面にストレプトアビジンを介して結合させ、ルシフェリンを含む灌流液で細胞に流れずり応力負荷する。放出された ATP が細胞膜表面でルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を起し化学発光を生じるので、それを高感度 CCD カメラで測定した。

さらに、流れずり応力と伸展張力を負荷した際に血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2) と血小板由来増殖因子 (PDGFR) が活性化されるかどうかをウエスタン・ブロットイング (WB) 法を用いてリン酸化の程度を解析した。さらに、細胞膜のコレステロール量をコレステロール負荷や M β -CD の作用により変化させ、細胞膜の相転移状態を変えた時、VEGFR2 や PDGFR のリン酸化に影響が及ぶかどうかについて検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞形質膜及び脂質ミクロドメインの挙動

静的培養条件下の HPAECs において取得した Laurdan GP 画像から、細胞膜の lipid order は不均一の領域が混在しており、GP 値の高い L_o 相領域が細胞辺縁に局所的に存在した。この GP 値の高い L_o 相領域はコレステロールやスフィンゴ脂質を多く含むカベオラと呼ばれる脂質ミクロドメインのマーカー蛋白である caveolin-1 の局在と一致していた (図 1)。Caveolin-1 の siRNA でカベオラを消失させると、GP 値の高い L_o 相領域が無くなった。一方、コントロールの scrambled siRNA を作用させた場合では、高 GP 値領域と caveolin-1 の発現局所が一致していたことから、Laurdan GP 画像が生細胞におけるカベオラ膜をリアルタイムで観察する手段としても用いることができることが確認された。

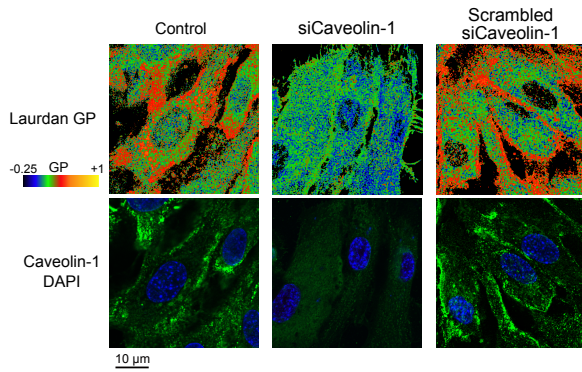


図1. ヒト肺動脈内皮細胞の形質膜における脂質相状態とカベオラ膜の局在.

流れ負荷装置を用いて HPAECs に流れずり応力を作用させると、即座に細胞膜の lipid order が低下し、相状態が L_o から L_d に変化し、この変化は流れずり応力の大きさに依存的でかつ可逆的であった (図 2)。さらに、この相状態の変化はカベオラ膜で顕著に観察された。一方、一軸伸展装置及び、低浸透圧膨張により細胞膜に伸展張力の刺激を与えると、形質膜の lipid order が増大し、相状態が L_d から L_o へ変化するといった、流れずり応力とは逆の反応が観察された。静水圧に対しては lipid order の変化は観察されなかった。

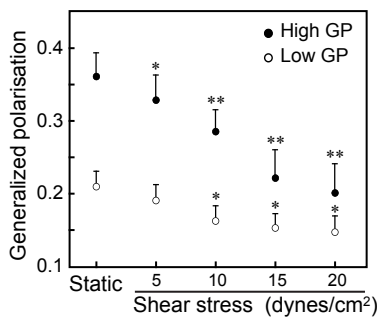
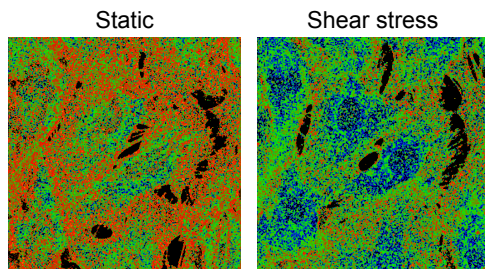


図2. ヒト肺動脈内皮細胞の形質膜における脂質相状態の力学応答.

GUVs の二分子膜は L_o と L_d に相分離した膜構造を持つ。DPPC とコレステロールが集合した領域が L_o 相をとり、不飽和基による立体障害の大きい DOPC が集合した領域が L_d 相を呈する。GUVs は直径が約 $10\sim 20\ \mu\text{m}$ であり、内皮細胞の大きさとほぼ同一である。ポリ-L-リジンでコーティングしたカバーガラスに GUVs を接着させ、流れ負荷装置で流れずり応力を負荷した所、即座に膜の lipid order が減少し、 L_d 相の領域が増大し、 L_o 相の領域が減少した (図 3)。一方、低浸透圧膨張により細胞膜に伸展張力を作用させると、膜の lipid order が増大し、 L_o 相の領域が増大した。以上の結果は HPAECs で観察された結果と同様であったことから、内皮細胞膜で観察された流れずり応力と伸展張力刺激に伴う細胞膜の物理的性質の変化は物理現象であることが示された。

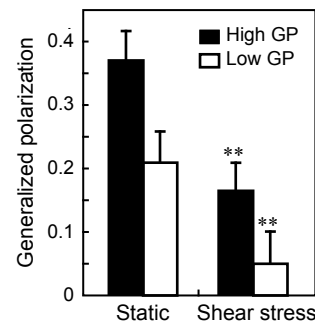
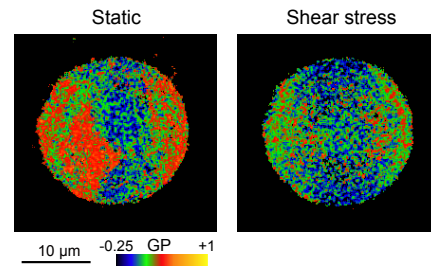


図3. 人工膜の脂質相状態の力学応答.

さらに、細胞膜の流動性の変化を光褪色後蛍光回復法で解析した。静的な条件下において、 L_o 相の領域では L_d 相の領域と比較して、拡散係数が小さく、膜流動性が低いことが明らかとなった。そこに、流れずり応力を負荷すると、形質膜の拡散係数が増大し、膜の流動性が増加した一方、伸展張力刺激では、拡散係数が減少し、膜の流動性が減少した (図 4)。以上の結果から、内皮細胞の形質膜自体が流れずり応力と伸展張力を異なる力学的刺激として区別することができることを示唆している。

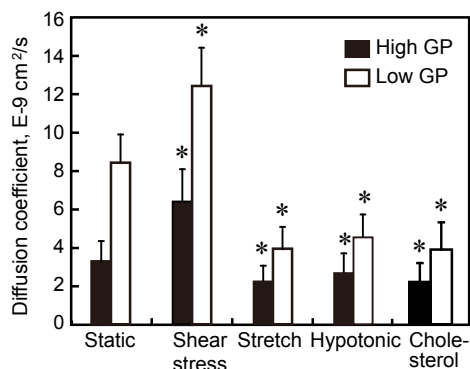


図4. ヒト肺動脈内皮細胞の形質膜における力学的刺激に伴う流動性の変化。
* $P < 0.01$ vs. Static.

(2) 膜分子の力学応答

内皮細胞形質膜の物理的な性質が力学的刺激に応答することで、内皮細胞の機能に及ぼす影響を検討する為、流れずり応力に対する代表的な反応である ATP 放出反応を解析した。細胞膜に 100 μM コレステロールを負荷すると、細胞膜の流動性が顕著に減少する (図 4)。この細胞に流れずり応力を負荷した所、流れずり応力依存的な ATP 放出が顕著に抑制された (図 5)。

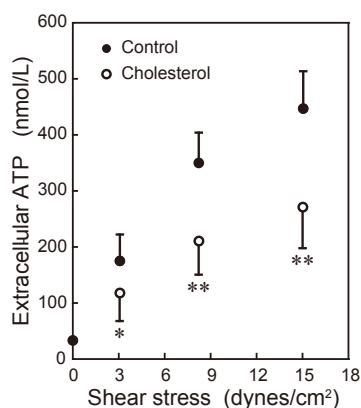


図5. ヒト肺動脈内皮細胞の形質膜における流れずり応力依存的な ATP 放出反応。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control.

さらに、形質膜の物理的な性質の変化は細胞膜分子の活性化に関わっていた。Shear stress により血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) が stretch により血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) がそれぞれリン酸化するが、細胞にコレステロールを添

加して shear stress による lipid order の変化を起こらなくすると shear stress による VEGFR のリン酸化が有意に抑制され、膜コレステロールを除去する M β CD で細胞を処理して stretch による lipid order の変化を起こらなくすると、stretch による PDGFR のリン酸化が明らかに抑制された。これらの結果から細胞膜の物理的な性質の変化が内皮細胞のメカノトランスダクションに重要な役割を果たす、すなわち、形質膜自体がメカノセンサーとして働くことが示唆された。

5. 主な研究論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① K. Yamamoto and J. Ando. Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H1178-H1185 (2015). doi: 10.1152/ajpheart.00241.2015. 査読有
- ② Y. Senju, E. Rosenbaum, C. Shah, S. Hamada-Nakahara, Y. Itoh, K. Yamamoto, K. Hanawa-Suetsugu, O. Daumke, and S. Suetsugu. Protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation of PACSIN2 triggers the removal of caveolae from the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **128**, 2766-2780 (2015). doi: 10.1242/jcs.167775. 査読有
- ③ A. Kamiya, M. Shibata, and K. Yamamoto. Assessment of Myogenic Power Expenditure Due to Arterial Wall Smooth Muscle Contraction Based upon the Fractal Nature of Vascular Trees. *Applied Mathematics.* **5**(12), 1750-1762 (2014). doi: 10.4236/am.2014.512168. 査読有
- ④ S. Obi, K. Yamamoto, and J. Ando, Effects of shear stress on endothelial progenitor cells, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **10**, 2586-2597 (2014). doi: 10.1166/jbn.2014.2014 査読有
- ⑤ Y. Abe, Y. Ozaki, J. Kasuya, K. Yamamoto, J. Ando, R. Sudo, M. Ikeda, and K. Tanishita. Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor. *PLoS ONE* **8** (12), 1-12 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0082085. 査読有
- ⑥ J. Ando and K. Yamamoto. Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **99**, 260-268 (2013). doi: 10.1093/cvr/cvt084. 査読有
- ⑦ K. Yamamoto and J. Ando. Endothelial cell and model membranes respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases. *J. Cell Sci.* **126**, 1227-1234 (2013). doi: 10.1242/jcs.119628. 査読有

[学会発表] (計32件)

- ① K. Yamamoto and J. Ando, “Endothelial cell plasma membranes act as a mechanosensor that detects fluid shear stress” 10th World congress for Microcirculation, Kyoto, September 24, 2015 (Invited) (Kyoto International Conference Center)
- ② K. Yamamoto and J. Ando, “Vascular endothelial cells sense shear stress by changing the membrane lipid order” The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (JSB2014), Mie, September 2, 2014 (Invited) (Shima Kanko Hotel The Classic)
- ③ K. Yamamoto and J. Ando, “Endothelial cells respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases” International Symposium on Mechanobiology (ISMB2014), Okayama, May 22, 2014. (Invited) (Okayama University Junko Fukutake Hall)
- ④ K. Yamamoto and J. Ando, “Endothelial cells sense shear stress through rapid changes in membrane physical properties” 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014), Kyoto, April 17, 2014. (Invited) (Miyakomesse)
- ⑤ K. Yamamoto, “Dynamic mechanotransduction in Vascular Cells” Seminar in the TEMASEK Life Sciences Laboratory, National University Singapore, Singapore, December 5, 2013. (Invited)
- ⑥ K. Yamamoto, “Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells” Lecture in the Department of Bioengineering, Imperial College London, London, September 23, 2013. (Invited) (Imperial College London)
- ⑦ K. Yamamoto and J. Ando, “Vascular endothelial cells respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases” 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society in conjunction with 52nd Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (JSMBE), Osaka, July 5, 2013. (Invited) (Osaka International Convention Center)

[図書] (計3件)

- ① 山本 希美子、安藤 譲二、血管のメカノバイオロジー、メカノバイオロジー：細胞が力を感じ応答する仕組み(化学同人)曾我部正博編、333 (143-157)、2015.

[その他]

ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/bme/>

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