

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21220011

研究課題名(和文)血管細胞における力学応答の分子バイオメカニクス

研究課題名(英文)Molecular Biomechanics of Vascular Cell Mechano-Responses

研究代表者

安藤 譲二(Ando, Joji)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：20159528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 156,400,000円、(間接経費) 46,920,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞が血流に起因するshear stressを感知し、情報伝達する分子機構を解析した。内皮細胞にshear stressが作用すると即座に細胞膜カベオラの脂質の相状態が秩序液体相から無秩序液体相に変化し、膜流動性が上昇することを見出した。独自に開発した新規イメージング法によりshear stressによる膜の物理的性質の変化はATPの放出に繋がり、それがP2X4チャネルを活性化し、Ca²⁺の細胞内への流入と、それに続く細胞全体に伝搬するCa²⁺波を惹起することが示された。細胞膜自体がshear stressのセンサーとして働き、Ca²⁺を介した情報伝達が行われることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to elucidate how vascular endothelial cells (ECs) sense shear stress generated by flowing blood and transmit the signal into the cell interior. The results demonstrated that shear stress rapidly decreases the lipid order of EC membranes and changes caveolar membrane domains from the liquid-ordered phase to liquid-disordered phase. A similar decrease in lipid order occurred in the artificial membrane of liposomes exposed to shear stress, suggesting that the membrane lipid order change is a physical phenomenon. Shear stress clearly increased the membrane fluidity in ECs. A novel imaging method developed in our laboratory revealed that the shear-stress-induced changes in membrane physical properties were linked to ATP release at caveolae that evoked a Ca²⁺ influx via P2X4 channels and a subsequent Ca²⁺ wave that propagated throughout the entire cell. These findings indicated that plasma membranes act as a shear stress sensor that triggers Ca²⁺ signaling in ECs.

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：血管内皮細胞 Shear stress 血行力学因子 メカノセンサー カルシウム・シグナリング 細胞膜
アデノシン3リン酸 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

血管系の構築や機能は血流の制御を受けている。この機序に関して、我々は早くから血管内皮細胞に及ぼす血流に起因する力学的刺激である shear stress の作用が重要であることを示してきた。独自に開発した流れ負荷装置で培養内皮細胞に定量的な shear stress を作用させて細胞応答を解析するバイオメカニクス実験により、内皮細胞が shear stress に敏感に反応し、形態や生体の恒常性の維持に重要な様々な機能を変化させることを明らかにした。その力学応答の際に内皮遺伝子全体の約 3% に達する多くの遺伝子の発現が shear stress により変化することも示した。しかし、内皮細胞が shear stress を感知し情報を伝達するメカノトランスダクション機構はまだよく分かっていない。我々は shear stress のメカノトランスダクションに Ca^{2+} を介した機構が存在することを見出した。内皮細胞に shear stress が作用すると即座に ATP が放出され、それが ATP 作動性カチオンチャネル P2X4 を活性化して細胞外 Ca^{2+} の流入反応を起こすのである。しかしながら、shear stress を最初に感知するメカノセンシング機構と、それが ATP 放出や Ca^{2+} シグナリングや細胞応答とどの様に関係するかは依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究は内皮細胞における shear stress のメカノトランスダクション機構を解明することを目的とした。具体的には (1) Shear stress 作用下の細胞膜分子の挙動について、1) 細胞膜脂質相、2) 膜の流動性、3) 膜ミクロドメイン(カベオラ)の面から、(2) Shear stress のメカノセンシング機構について、ATP 放出と Ca^{2+} 反応の面から、(3) Shear stress の情報伝達と循環調節について、未分化細胞の分化誘導の面から解析を加えた。

3. 研究の方法

(1) の検討では膜脂質相 (lipid order) の変化を環境感受性色素 Laurdan と 2 光子顕微鏡によるイメージング法で解析した。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) と考えられているが、その性質 (lipid order) は様々な要因により変化する。最近、lipid order を Laurdan イメージングにより生細胞で解析することが可能となった。その原理は膜リン脂質のアシル鎖が配向して運動が制限される秩序液体相 (liquid-ordered phase) から、よりアシル鎖の運動が活発になる無秩序液体相 (liquid-disordered phase) に変化するとリン脂質二重層へ浸透する水分が多くなり Laurdan の蛍光が 50 nm 赤色へシフトすることに基づいている。この蛍光を測定し lipid order の指標となる generalized polarization(GP) 値を計算した。膜流動性 (fluidity) の変化は蛍光色素 DiI を用いた蛍光消退後の蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) で解析した。また、細胞膜のフラスコ状陥凹構造をとるカベオラの役割については caveolin-1 siRNA や膜コレステロールを除去する作用のある methyl- β cyclodextrin でカベオラを破壊する実験を行った。

(2) の検討では細胞膜表面の ATP 濃度を実時間測定できる新規イメージング法を開発した。ピオチン・ルシフェラーゼ蛋白を遺伝子工学的に作製し、それをピ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る。細胞外にルシフェリンを加えておくと、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。ATP イメージングを行った同一細胞で Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fluo-4 と蛍光測光顕微鏡による細胞内 Ca^{2+} イメージングを施行した。

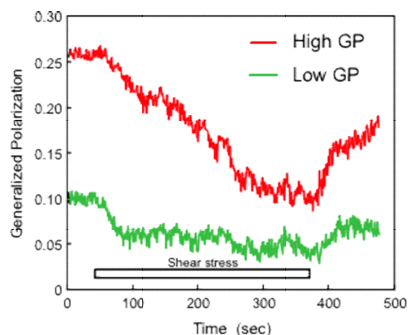
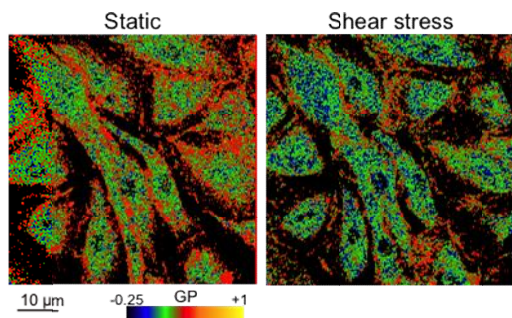
(3) の検討ではヒトの骨髄由来内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) やマウスの胚性幹細胞由来血管前駆細胞 (ES cell-derived vascular progenitor; ESVP) が成熟動脈内皮細胞に分化する現象に焦点を当てた。EPC と ESVP に shear stress を作用させて動脈内皮細胞のマーカーである ephrinB2 と静脈内皮細胞のマーカーである EphB4 の発現変化を蛋白レベル・遺伝子レベルで解析した。Shear stress に応答する遺

伝子については転写調節を受けるのか、あるいは mRNA の安定化を介するのかを分子細胞生物学の実験で解析した。さらに転写調節の場合は関与する転写因子と、それが結合する遺伝子のプロモーターにある結合モチーフ (shear stress 応答配列) を決定した。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞膜の lipid order の変化

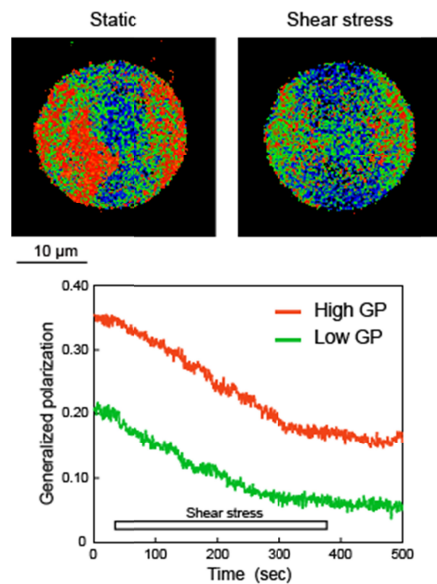
静的培養条件下のヒト肺動脈内皮細胞の細胞膜の lipid order は均一ではなく、細胞辺縁に局所的に lipid order の高い領域 (high GP area) が存在した (図上)。Shear stress を作用させると即座に膜全体の lipid order が減少したが、とくに high GP area での減少が顕著であった (図下)。この lipid order の低下反応は shear stress の強さ依存性でかつ可逆性であった。この lipid order の高い領域はコレステロールに富む膜ミクロドメインであるカベオラが集積する部位と一致していた。これらの所見は shear stress がカベオラの密に分布する細胞膜を秩序液体相から無秩序液体相に変えることを示している。これは shear stress が細胞膜の lipid order に影響を及ぼすことを初めて明らかにした研究成果である。



細胞膜 lipid order の減少

(2) 人工脂質膜の lipid order の変化

膜の lipid order に及ぼす shear stress の効果を人工脂質二重膜で検討した。細胞膜と類似の成分であるリン脂質とコレステロールで作製したリポゾームを Laurdan で標識したところ、lipid order は膜全体で均一ではなく、局所的に lipid order の高い領域が存在していた。リポゾームに shear stress を作用させると膜全体の lipid order が減少し、元々高い lipid order を示した領域は消失した。細胞膜では shear stress を止めると低下した lipid order は元に戻る傾向が見られたが、リポゾームでは lipid order が低下したままであった。これらの結果は shear stress による膜の lipid order の低下反応には生細胞に存在するイオンチャンネル、受容体、酵素などの膜分子や細胞骨格や代謝活動は関連しない、言わば物理現象であることを示唆している。



人工膜 lipid order の減少

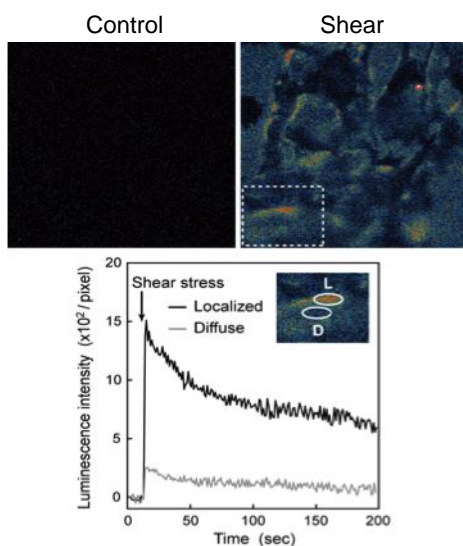
(3) 内皮細胞膜の流動性の変化

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 shear stress を作用させたときの膜流動性の変化を FRAP 法で解析した。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、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。細胞にコレステロールを添加すると shear stress による膜流動性の変化は起こらなくなり、shear stress による内皮細胞からの ATP 放出反応も有意に阻害された。膜流動性の変化は様々な膜分子の活性化と関係することから shear stress による膜流動性の変化が内皮細胞の ATP を介したメカノトランスダクションにも関係することが示された。

(4) ATP 放出現象の可視化

様々な細胞が刺激に反応して ATP を放出するが、これまで細胞膜表面で起こる ATP 濃度の変化を実時間で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、我々はルシフェラーゼ蛋白を内皮細胞膜に結合させる方法で shear stress が惹起する ATP 放出反応をイメージングすることに成功した(図上)。Shear stress が作用すると即座に ATP の放出が起こるが、それには細胞膜全体からの低濃度のびまん性(Diffuse)ATP 放出($1\ \mu\text{M}$ 以下)と、局所的(Localized)な高濃度($10\ \mu\text{M}$)の ATP 放出が見られた(図下)。局所的に放出される ATP は細胞膜に発現する ATP 受容体(イオンチャンネルの P2X や G 蛋白共役型受容体の P2Y)を十分活性化で

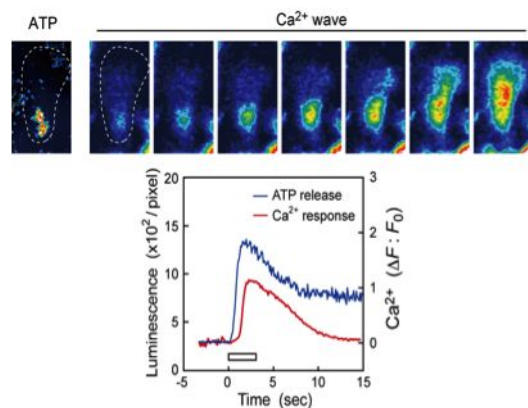


Shear stress による ATP 放出現象

きる濃度に達していた。高濃度に ATP が放出される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。今回開発した新規 ATP イメージング法は ATP 放出に関わる様々な生命現象を解析するうえで有用で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。

(5) ATP 放出が惹起するカルシウム波

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、図が示すように 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示された。血管内皮細胞においてカベオラが密に分布する場所で生じる ATP 放出はそこに発現する ATP 受容体 (P2X4) 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ガー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画像である。



ATP 放出と Ca²⁺波のイメージング

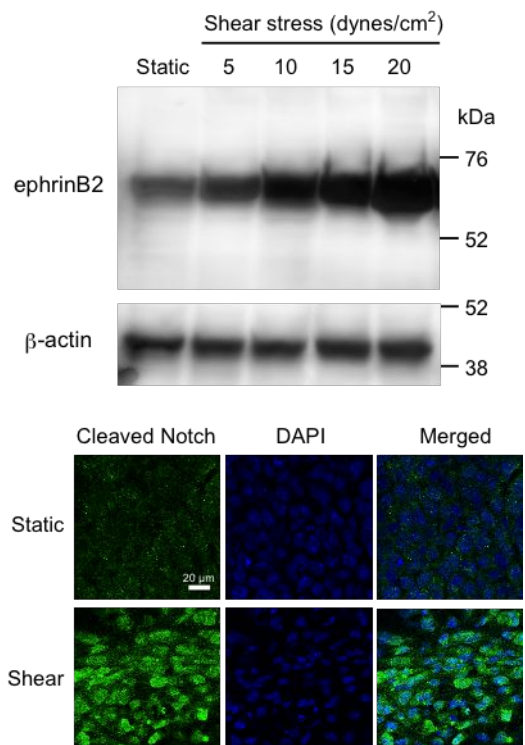
(6) 内皮前駆細胞の分化誘導

内皮前駆細胞 (EPC) は骨髄から末梢血に動員され、組織で血管形成に参加する。この過程で EPC は血流や組織液の流れに起因する shear stress を受ける。我々は既に shear stress が EPC の増殖と成熟内皮細胞への分化を促進することを報告しているが、本研究では EPC が shear stress に反応して動脈あるいは静脈のどちらの内皮細胞へ分化誘導するかについて検討を加えた。EPC に shear stress を負荷したところ動脈内皮細胞のマーカである ephrinB2 の mRNA レベルは増加し、一方、静脈内皮細胞のマーカである EphB4 の mRNA レベルは低下した。この ephrinB2 の増加と EphB4 の減少はともに shear stress の強さに依存していた。shear stress による ephrinB2 の遺伝子発現の増加は ephrinB2 蛋白の発現増加を伴っており、mRNA の安定化ではなく転写の亢進に基づいていた。この転写の亢進は shear stress が ephrinB2 遺伝子のプロモーターにある Sp1 応答配列に結合する転写因子 Sp1 を著明に増加させることに基づいていた。shear stress が EPC に作用すると Sp1 を介して ephrinB2 の遺伝子発現を増加させ、静脈ではなく動脈の内皮細胞へ分化を誘導すると考えられた。

(7) ES 細胞由来血管前駆細胞の分化誘導

胚の器官形成の過程で心臓の拍動が始まると細胞は血流による shear stress を受ける。我々は shear stress がマウス ES 細胞由来血管前駆細胞 (ESVP) の増殖・分化に影響を及ぼすことを明らかにしてきたが、本研究では動脈・静脈分化に及ぼす shear stress の効果を検討した。ESVP に shear stress を作用させるとその強さ依存性に動脈内皮細胞のマーカである ephrinB2 の蛋白 (図上) 及び遺伝子発現が増加し、一方、静脈内皮細胞のマーカである EphB4 の遺伝子発現が減少した。この ephrinB2 の遺伝子発現増加に Notch シグナリングが関与していた。shear stress により Notch 受容体が活性化し、cleavage された細胞内ドメインが細胞核に移行するのが観察された (図下)。Shear stress により Notch 受容体 1, 4 とリガンドである

Dll4, Jagged1,2 の発現が増加し、Notch 受容体の cleavage に関わる γ -secretase の活性も上昇した。Shear stress には Notch シグナリングを介して胚の血管前駆細胞を動脈内皮細胞へ分化誘導する効果があると考えられた。Shear stress に ES 細胞の分化を誘導する効果がある事実は胚における器官形成の仕組みにメカニカルストレスが重要な役割を果たす可能性を示している。また、今回の結果から ES 細胞や iPS 細胞を用いる再生医療においてメカニカルストレスが細胞分化誘導技術として応用できることが示された。



Shear stress による動脈内皮マーカの発現増加と Notch シグナルの活性化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計35件)

J. Ando and K. Yamamoto: Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 99:260-268, 2013 (査読あり)

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 (査読あり)

K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, and J. Ando: Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* 124:3477-3483, 2011 (査読あり)

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 (査読あり)

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 (査読あり)

[学会発表](計 6 0 件)

K. Yamamoto: Endothelial cells respond to shear stress by decreasing the lipid order of their plasma membranes. 15th International Conference on Biomedical Engineering, Singapore, 2013. 12. 6

J. Ando: Visualization of flow-induced ATP release and Ca²⁺ waves in vascular endothelial cells. ISACB 13th Biennial Meeting, London, 2012. 9. 13.

J. Ando: Shear-stress-mediated control of vascular functions through endothelial ATP release and P2X4 ion channels. 9th International Congress on Coronary Artery Disease, Venice, Italy, 2011. 10.24.

J. Ando: Biomedical force-induced differentiation of ES cells into vascular cells. Symposium on Mechano-transduction and vascular biology. XX World Congress

of International Society for Heart Research, Kyoto, 2010.5.16.

J. Ando:

Shear-dependent mechanotransduction via endothelial ATP receptors and its physiological role in the vascular system. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, 2009. 7.31.

[その他]

ホームページ

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/biomech/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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 : 00323618