

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560203

研究課題名(和文)力学刺激による血管内皮細胞内ROCK2タンパク質の移動解析

研究課題名(英文)Translocation of ROCK2 in endothelial cells after mechanical stimulation

研究代表者

工藤 奨 (KUDO, Susumu)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70306926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管創傷治癒や血管新生は、内皮細胞の移動と増殖によっておこなわれる。そして、この細胞の移動過程では、Rho-kinaseのROCK2やDiacylglycerol (DAG)が関与することが知られている。本研究では、内皮細胞にマイクロピペットによりつつき刺激を負荷し内皮細胞内のDAGの移動の様子を調べた。その結果、つつき刺激を受けた細胞の末端部にDAGが集まる現象が観察され、つつき刺激を受けた細胞の隣接細胞ではDAGの変化は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：When endothelial cells are injured by mechanical stimulation using a microprobe, the endothelial cells migrate to the injured region. ROCK2 and Diacylglycerol (DAG) are involved in the regulation of endothelial cell migration after injury. In this study, we developed an experimental system to simultaneously visualize Ca²⁺ signaling and DAG distribution. Using this system, we mechanically stimulated a single cell to propagate Ca²⁺ waves and then examined DAG distribution. We investigated fluorescent images of intracellular Ca²⁺ levels and localization of DAG in response to mechanical injury. The fluorescent intensities decreased in the cells surrounding the stimulated cell, indicating the propagation of the Ca²⁺ wave. In the stimulated cell, there was a time-dependent increase in DAG in the periphery of the stimulated cell.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：メカノトランスダクション 内皮細胞 DAG ROCK2

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は、血管の内側に存在し、常に血流にさらされている細胞である。この血管内皮細胞は、血流による摩擦力であるせん断応力や、血管の伸展に伴う引っ張り応力などの力学的刺激を常にうけている。血管創傷治癒や血管新生は、内皮細胞の移動と増殖によって行われ、せん断応力などの力学刺激によって促進されることが知られている。そして、この血管内皮細胞の移動過程では、Rho-kinase の ROCK2 というタンパク質が関与していることが分かってきた。ROCK2 は細胞内を移動する特殊なタンパク質であり、不活性な状態では細胞質内に存在するが、活性化(リン酸化)状態になると、細胞膜に移動することがウェスタンブロッティングなどの生化学的手法で分かってきている。この ROCK2 の移動の特殊性が細胞の移動を決定する重要な鍵であると考え、本研究の発想にいたった

2. 研究の目的

血流による摩擦力であるせん断応力や、血管の伸展に伴う引っ張り応力などの力学的な刺激を常に受けている血管内皮細胞の移動メカニズムを明らかにすることを目的としている。

具体的には、引っ張り応力などが内皮細胞に加わった際、細胞内 Rho-kinase の ROCK 2 (ロック 2) が力学状態により偏りをもって移動することを仮定し、ROCK 2 をフォトクロミック蛍光タンパク質と融合させ、ROCK 2 の移動と細胞の移動を同時計測する。

3. 研究の方法

当初は ROCK2 と光転換型タンパク質の融合タンパク質を作製し、計測する計画であったが、融合タンパク質作製後も ROCK2 観察が非常に困難であったため、カスケードの上流物質である Diacylglycerol (DAG) を観察することとした。

(1) プラスミド

使用したプラスミドは GFP-C1-PKCgamma-C1A を Addgene から購入した(Addgene plasmid 21205) 本プラスミドはラット由来 PKCgamma から抽出した C1 ドメインを GFP でタグ付けしたものであり、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) の加水分解によって膜上に産生される DAG に反応し結合するため、細胞質から膜へと移動していく。

(2) 細胞培養およびトランスフェクション

ウシ大動脈由来血管内皮細胞 (Bovine aortic endothelial cells: BAECs, 東洋紡) を使用した。細胞培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) に 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS, Biological Industries) と 1% 抗生物質 - 抗真菌剤 (ペニシリン: 10000 単位/ml, ストレプトマイシン:

10000 µg/ml, アンテフォテリシン B: 25 µg/ml, GIBCO) を加えた培地を使用し、温度 37 °C, 湿度 100%, 5%CO₂ 95%Air に保たれたインキュベータ(BNR-110, ESPEC)内でおこなった。実験は継代数 7 代目から 10 代目の細胞を用いた。蛍光観察に用いた細胞の培養は φ27 のガラスベースディッシュ (3910-035, IWAKI) を使用した。GFP-C1-PKC gamma-C1A の遺伝子導入試薬として Hily Max (Dojindo) を使用した。遺伝子導入は細胞を継代後 14-16 時間の間におこなった。37 °C の opti-MEM (Gibco) で 2 回洗浄し、opti-MEM を 1 ml 添加後 37 °C でインキュベートした。インキュベート 1 時間後、4 °C の opti-MEM 100 µl に GFP-C1-PKC gamma-C1A (2 µl [1 µg/µl]) と Hily Max (4 µl) を混合し、15 分間室温 25 °C で静置した。15 分後、GFP-C1-PKCgamma-C1A と Hily Max の混合液を 37 °C でインキュベートした細胞の培地へ添加した。遺伝子導入 4 時間後に抗生物質を含まない 10%FBS の DMEM に培地を交換し培養した。遺伝子導入後の細胞は 10%FBS 含有の DMEM で培養を行い 100%コンフルエントになるまで 24h 培養した後実験に使用した。

(3) 薬剤

ATP を培養液中に添加することで DAG が細胞膜へ発現することが観察されている。そこで、細胞内に発現した GFP-C1-PKC gamma-C1A が DAG へ結合するかを確認するため 200 µM ATP (Sigma Aldrich) を BAECs へ添加しその前後の蛍光分布を観察した。

DAG が産生される経路として、phospholipase C (PLC) が活性化することで PIP₂ を加水分解し、DAG と IP₃ を産生する。そこで、PLC の活性を阻害する U-73122 を事前に細胞に 10 µM 負荷することで DAG 産生を阻害した。

ホルボールエステル的一种で DAG の類似体である phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) を 1 µM 負荷することで蛍光が細胞膜に分布変化を確認した。

細胞内 Ca²⁺伝播と DAG の分布変化の関連性を調べるため、Ca²⁺指示薬として Fura-2, AM cell permeant special packaging (F1221, Invitrogen) を使用した。

(4) 単一細胞へのつつき刺激

φ27 のガラスベースディッシュ(IWAKI)に細胞を培養し、粗動ハンドル(下図の A~C)(05068, NARISHIGE)と油圧駆動の微動ハンドルを用い、先端径は約 5µm のホウケイ酸ガラス電極 (B100-75, SUTTER INSTRUMENT) で任意の細胞を突いた。

(5) GFP-C1-PKCgamma-C1A の蛍光観察

Ca²⁺伝播と DAG の同時観察には、以下に示す落射蛍光顕微鏡を使用した。

蛍光観察には倒立顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-S, NIKON) と 40x 油浸レンズ (S-Fluo, NA=1.30, NIKON) を使用した。GFP-C1-PKCgamma-C1A の緑色蛍光を観察す

るために、キセノンランプ (C7773, HAMAMATSU) を用い 490 nm, 強度 30% で励起した。Fura-2,AM の緑色蛍光を観察するために、励起波長 380 nm, 強度 50% で励起した。サンプルからの蛍光はダイクロイックミラー (HAMAMATSU A7807) を使用し、535/26nm の蛍光フィルターを通して、GFP と Fura2 の同時観察をおこなった。蛍光はインテンシファイア (C8600-03, HAMAMATSU) で増幅後、CCD カメラ (C6790, HAMAMATSU) で検出し、PC に記録した。励起光の強度、励起光の切り替えは生体分野用イメージングシステム AQUACOSMOS (C7501, HAMAMATSU) を用いておこなった。画像の取得間隔は 256 ms で 134 秒間観察をおこなった。

薬剤添加による DAG 観察には以下に示す共焦点レーザー顕微鏡を使用した。GFP - C1 - PKC gamma -C1A は固形レーザー 488 nm で励起した。共焦点スキャノユニット (D-ECLIPSE C1, NIKON) と 60x 油浸レンズ (S-Fluo, NA=1.30, NIKON) を使用した。蛍光は CCD カメラ (DS-Qi1Mc, NIKON) で検出し、PC に記録した。画像の取得間隔は 5 s で 110 秒間観察をおこなった。

(6) 画像解析

ATP, U73122, PDBu の薬剤負荷時の DAG の動態解析では、細胞膜から反対側の細胞膜へと細胞核を避け直線を引き、その直線上の蛍光輝度を解析した。直線上の両端 2 μm を細胞膜、それ以外を細胞質として解析をおこなった。

つつき刺激による細胞内 DAG の分布について、つつき刺激を与えた細胞の仮足に解析領域を設定し、刺激前後の蛍光輝度の解析をおこなった。つつき刺激を与えた細胞では、仮足以外に細胞質にも解析領域を設定した。また、隣接細胞につつき刺激を与えた際には、細胞同士が接合している部分に直径約 5 μm の解析領域を設定し、解析領域内の平均輝度で刺激前後の蛍光輝度を規格化し、解析をおこなった。

(7) 統計解析

有意差検定にはエクセル統計 2012 (SSRI) を使用した。ATP, U73122, PDBu 負荷時の細胞膜と細胞質の有意差検定には、Fisher の有意差検定法を用いた。つつき刺激時の有意差検定では、つつき刺激前と刺激後の各時間での輝度を Dunnett 法によって検定した。

4. 研究成果

(1) DAG の性質確認

GFP-C1-PKCgamma-C1A を導入した細胞において、ATP 添加後に蛍光が細胞膜へ移動することが観察された。ATP 負荷前と負荷後の蛍光輝度を解析したところ、ATP 添加後 30 s 以降の蛍光輝度は細胞質と比べて有意に上昇した。

U73122 を負荷することで PLC 活性を阻害し、DAG が産生されないように前処理し、

ATP 負荷をおこなった。U73122 で前処理した細胞では ATP を添加しても細胞膜への GFP-C1-PKCgamma-C1A 蛍光の移動は観察されず、ATP 添加前と添加後で細胞膜での有意な輝度上昇は確認されなかった。

GFP-C1-PKCgamma-C1A を導入した細胞では PDBu 添加後に蛍光が細胞膜へ移動した。PDBu 添加後 5 s から細胞膜での輝度が細胞質と比べて有意に上昇した。

以上のことから GFP-C1-PKCgamma-C1A により DAG の移動を観察できることが確認された。

(2) つつき刺激時の GFP-C1-PKCgamma-C1A の反応

刺激を与えた細胞において、仮足部分で輝度上昇が確認された。また、Fura-2,AM の輝度が隣接細胞でも減少していることから、刺激が隣接細胞に伝播していることが確認できた。

刺激細胞の仮足部分での輝度上昇の経時変化を調べた。Fura-2,AM は刺激後 1 s から輝度が減少し、 Ca^{2+} 濃度の有意な上昇が見られた。このことからつつきによる刺激が細胞に伝わっていることが確認できた。仮足での GFP-C1-PKCgamma-C1A は刺激後 7 s から輝度の上昇がみられた。また、細胞質での輝度は、刺激直後に一瞬の輝度上昇が観察された。その後、輝度は減少し、刺激後 10 s から刺激前に対して有意に減少した。

刺激細胞の仮足で輝度上昇が確認されたが、刺激細胞と隣接細胞の境界がはっきりしなかったため、隣接細胞で GFP-C1-PKCgamma-C1A が分布変化するかを確認した。刺激細胞に隣接する細胞の刺激細胞側の境界部分での輝度変化を観察したが、隣接細胞での蛍光輝度の変化は観察されなかった。

隣接細胞での輝度の経時変化を調べた。Fura-2,AM については刺激後 2 s で有意に輝度減少し、 Ca^{2+} 濃度の上昇が確認された。 Ca^{2+} はつつき刺激後 10 s を境に濃度が減少しはじめたが、刺激前と比較すると有意に濃度が高い状態を保った。このことからつつきによる刺激が隣接細胞に伝わっていることが確認できた。GFP-C1-PKCgamma-C1A は緩やかな輝度の減少を示したが、刺激前と比較して有意な輝度変化は観察されなかった。

(3) つつき刺激時の GFP の反応

つつき刺激を与えたとき、刺激細胞の仮足では GFP-C1-PKCgamma-C1A 輝度が上昇するが、隣接細胞では変化が無いことが分かった。この反応が DAG に特異的な反応であるかを確認するために、GFP のみを細胞に導入し、つつき刺激を与えた。刺激を与えた細胞において、仮足部分で輝度上昇が数例確認された。また、Fura-2,AM の輝度が隣接細胞でも減少していることから、刺激が隣接細胞に伝播していることが確認できた。

刺激細胞の仮足部分での輝度上昇の経時変化を調べた。Fura-2,AM は刺激後 2 s から輝

度減少し、 Ca^{2+} 濃度の有意な上昇が確認された。刺激後約5sで Ca^{2+} の濃度上昇は止まり、その後は刺激前と比べて有意に濃度が高い状態を保った。GFPは刺激後10s後から、有意ではないが、輝度上昇する細胞が数例観察され、その後輝度は減少した。細胞質でのGFPはつつき刺激直後に、有意ではないが一瞬の輝度上昇が見られた。その後輝度は減少し、刺激後17sから刺激前と比較して輝度が有意に現象した。

蛍光を示している細胞に隣接する細胞につつき刺激を与えた。隣接細胞においてGFPは輝度上昇を示さなかった。隣接細胞での輝度の経時変化を調べたところ、Fura-2,AMは刺激後3sから輝度の減少、つまり Ca^{2+} 濃度の有意な上昇が確認された。このことから、つつきによる刺激が隣接細胞に伝わっていることが確認された。GFPは刺激後、緩やかに輝度が減少し、刺激前と比べて有意な輝度変化は確認されなかった。

以上よりつつき刺激時に刺激を受けた細胞の仮足部分でGFP-C1-PKC γ -C1A輝度の上昇が確認された。一方でGFPの上昇も観察される細胞がいくつか見られた。今後は、DAG特有の現象であるかの詳細な検討が必要である。

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0件)

[学会発表](計13件)

Masataka ARAI, Kazuhiro NAKASHIMA, Toshihiro SERA, Susumu KUDO, Prolonged observation of PKC α in vascular endothelial cells, The Seventh Kyushu University-KAIST Joint Workshop on Frontiers in Mechanical Engineering. 2014. 09.25 - 26 「Fukuoka (Japan)」

Tetsuya Fujiwara, Toshihiro Sera, Masataka Arai, Yasuhiro Sunaga, Hideo Yokota, Susumu Kudo, 3D Modeling of PKC α translocation in endothelial cell based on experimental data, The 15th International Conference on Systems Biology 2014, 2014, 09.14 - 18. 「Melbourne (Australia)」

Susumu Kudo, Chiro Kora, Masataka Arai, Kazuhiro Nakashima, Toshihiro Sera, Effect of mechanical stimulation on PKC translocation in endothelial cells, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 2014.09.01-04 「Shima (Japan)」

S. Kudo, M. Arai, K. Nishimura, C. Kora, K. Nakajima, T. Sera, Mechanical and Chemical Stimulations Effect Translocation of Protein Kinase C α in

Endothelial Cells, World Congress of Biomechanics 2014, 2014. 07.06 - 11. 「Boston (USA)」

Masataka Arai, Kazuhiro Nakashima, Toshihiro Sera, Susumu Kudo, Long-time observation of PKC α in vascular endothelial cells, International Symposium on Mechanobiology 2014,05,23. 「Okayama (Japan)」

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004580/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 奨 (KUDO, Susumu)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：7036926