

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26242043

研究課題名(和文)血管細胞における血流のメカノトランスダクション機構

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

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞が血流に起因する流れずり応力と血圧に基づく伸展張力を感知する分子機構と、それに果たす細胞膜の役割について解析した。培養内皮細胞の膜脂質相はずり応力で有意に減少し、伸展張力で増加した。同様の反応が生体膜と類似の脂質で作製したリポソームでも生じたことから、この反応は物理現象であることが示された。また、細胞膜の流動性はずり応力で明らかに増加し、伸展張力で減少した。力学的刺激による細胞膜の物性の変化は力学刺激による細胞増殖因子受容体の活性化に繋がっていた。以上から、内皮細胞は細胞膜を介して血流と血圧を異なる力学刺激として感知し、膜受容体を介して細胞内へ情報伝達していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to elucidate how the hemodynamic forces stretch and shear stress affect the physical properties of a vascular endothelial cell (EC) plasma membrane and whether plasma membranes can sense and differentiate between stretch and shear stress. The results demonstrated that EC plasma membranes show different responses to stretch and shear stress by rapidly changing their lipid order and fluidity in opposite directions. Artificial lipid bilayer membranes showed mechanoresponses that were similar to those of ECs, indicating that this is a physical phenomenon rather than a biological reaction. Furthermore, these changes in physical properties of the EC plasma membrane contribute to the mechanotransduction that activates membrane receptors specific to each force. Plasma membranes appear to have an intrinsic mechanoresponsive property and that this property seems to enable them to act as a mechanosensor that is capable of differentiating between stretch and shear stress.

研究分野：総合領域

キーワード：血流 ヨン 血管内皮細胞 shear stress 伸展張力 細胞膜 膜脂質相 膜流動性 メカノトランスダクシ

1. 研究開始当初の背景

血管内面を覆う内皮細胞は血流や血圧に起因するせん断応力 (shear stress) や伸展張力 (stretch) などの力学的刺激を感知し、応答することで循環系の恒常性を維持しており、それが正常に働かなくなると高血圧、血栓症、動脈硬化など様々な血管病の発生に繋がる。

我々は内皮細胞が力学的刺激を感知して情報を細胞内部に伝達 (メカノトランスダクション) することで血圧や血栓形成や炎症に関わる様々な細胞機能の変化を起こすことを明らかにしてきた。さらに力学的刺激が多くの種類の蛋白キナーゼをリン酸化し、その下流で多くの転写因子を活性化することで、遺伝子全体の約 3% に相当する多数の遺伝子の発現を変化させることを示してきた。しかし、内皮細胞のメカノトランスダクションに関して、力学的刺激が多様な膜分子を介して多岐に渡る情報伝達経路を活性化する仕組みや、力学的刺激を最初に感知するメカノセンサーの本体、さらには、内皮細胞が shear stress と stretch を分別する機構など未解決な問題が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は内皮細胞のメカノトランスダクション機構に関する上記の問題を解決することを目的とした。具体的には培養内皮細胞に定量的な力学的刺激 (shear stress と stretch) を負荷したときに細胞膜で起こる現象、すなわち、脂質相 (lipid order) と流動性などの物理的性質の変化について解析した。また、細胞膜の力学応答が shear stress で誘発される血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) 活性化や stretch で誘発される血小板由来細胞増殖因子受容体 (PDGFR) 活性化に及ぼす影響について検討した。さらに細胞膜の物理的性質に大きな影響を与える膜コレステロールの挙動についても解析を加えた。

3. 研究の方法

(1) 力学的刺激負荷実験: 培養したヒト肺動脈内皮細胞に平行平板型の流れ負荷装置 (FCS2) で shear stress を、細胞伸展装置 (STREX) と低浸透圧刺激で stretch を作用させた。

(2) 膜 lipid order の変化については環境感受性蛍光プローブ Laurdan と 2 光子レーザ顕微鏡を用いた解析を行った。リン脂質二分子層である細胞膜は膜リン脂質のアシル鎖が規則正しく配向して運動が制限されている秩序液体相 (liquid-ordered phase) と、アシル鎖の配向が不規則になり、活発に運動する無秩序液体相 (liquid-disordered phase) が混在しており、相互に遷移する。

この脂質相の遷移に伴う膜内の水分量の変化が Laurdan の蛍光波長をシフトさせることを利用し、lipid order の指標となる generalized polarization (GP) 値を計算した。具体的には Laurdan を 770 nm の波長で 2 光子励起したときに発生する波長 400-460 nm (蛍光強度 I_1) と 470-530 nm (蛍光強度 I_2) の光を測定し、GP 値を $GP = (I_1 - G \times I_2) / (I_1 + G \times I_2)$ 、 G は補正係数、で算出し疑似カラー画像に変換した。この方法により秩序液体相にある細胞膜が GP 値の高い部位として、一方、無秩序液体相にある部位は GP 値の低い部位として描出できる。さらに、生体膜を構成する脂質で作製した巨大単一膜ベシクル (リポソーム) に shear stress と stretch を作用させたときの人工脂質 2 重膜の lipid order の変化についても解析し、生細胞の反応と比較した。

(3) 膜流動性 (fluidity) の変化は細胞膜における分子の拡散のし易さを測定することで流動性の変化を捉える蛍光消退後の蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) で解析した。内皮細胞を蛍光プローブ DiIC₁₆ で標識し shear stress あるいは stretch 負荷時の膜流動性の変化を共焦点レーザ顕微鏡で測定した。

(4) 膜に発現する細胞増殖因子受容体の活性化はウエスタンブロットで解析した。細胞膜へのコレステロールの添加、あるいは細胞膜コレステロールを Methyl β -cyclodextrin (M β -CD) で除去することで力学刺激が惹起する膜脂質相の変化の阻害が力学的刺激による細胞増殖因子受容体の活性化に及ぼす影響を解析した。

(5) 力学的刺激による形質膜のコレステロール含量の変化については生化学的測定を行った。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞膜の lipid order の変化

静的培養下 (static) の細胞膜の GP 値の分布は不均一で、GP 値の特に高い領域が斑状に存在していた。この GP 値の高い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が豊富な部位に一致していた。このことは細胞膜の lipid order は不均一で、秩序液体相と無秩序液体相が混在していることを示している。

細胞に shear stress を与えると、膜全体の GP 値が低下し、特に GP 値の高い領域が縮小、消失した (図 1A)。一方、細胞が接着したシリコン膜を stretch すると、細胞膜の GP 値が著明に上昇した (図 1B)。膜全体の GP 値が上昇する中、特に GP 値の高い領域が拡大した。低浸透圧刺激により細胞膜を stretch しても、同様に GP 値の上昇が惹起された (図 1C)。このことは細胞膜が stretch されると lipid order が上昇、すなわち無秩

序液体相から秩序液体相へ相転移を起こすことを意味している。このように細胞膜の lipid order の反応は stretch と shear stress で異なり、逆方向に変化することが示された。

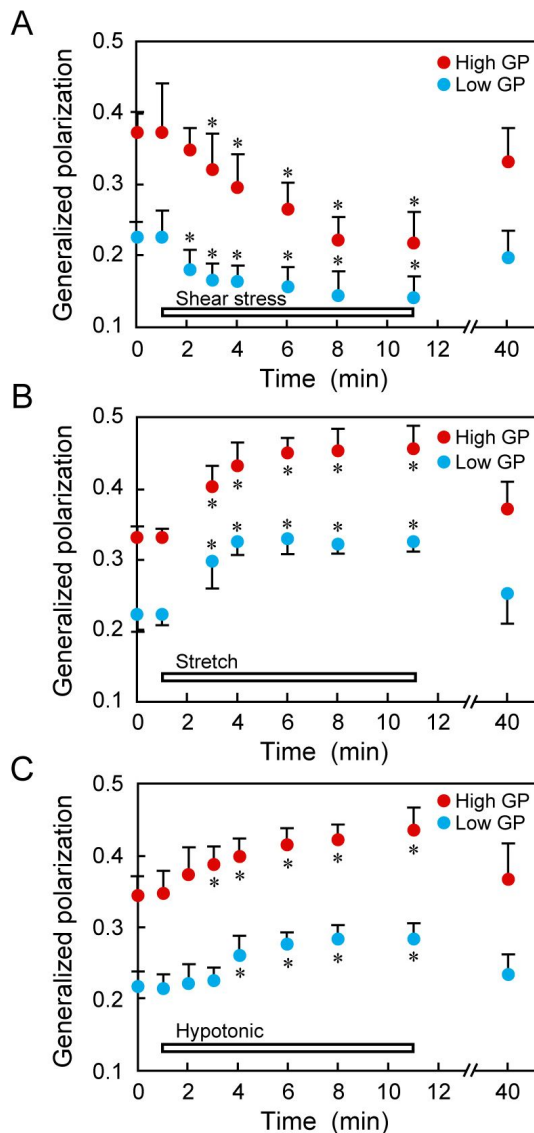


図1 力学的刺激による膜 lipid order の 継時変化
 数値は 5 - 6 回の実験から得られた各 3 0 細胞の平均 ± 標準偏差 * $p < 0.01$

(2) 人工脂質膜の lipid order の変化

形質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 GP 値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 GP 値が減少し、高い GP 値を示した領域は消失した(図 2 A, B)。一方、低浸透圧刺激でリポゾーム膜に stretch を与えると、GP 値が明らかな上昇を

示した(図 2 C, D)。これらの結果は力学的刺激による膜の lipid order の反応には生細胞に存在するイオンチャネルや受容体などの膜分子や細胞骨格や代謝活動は関連しない物理現象であることを示している。

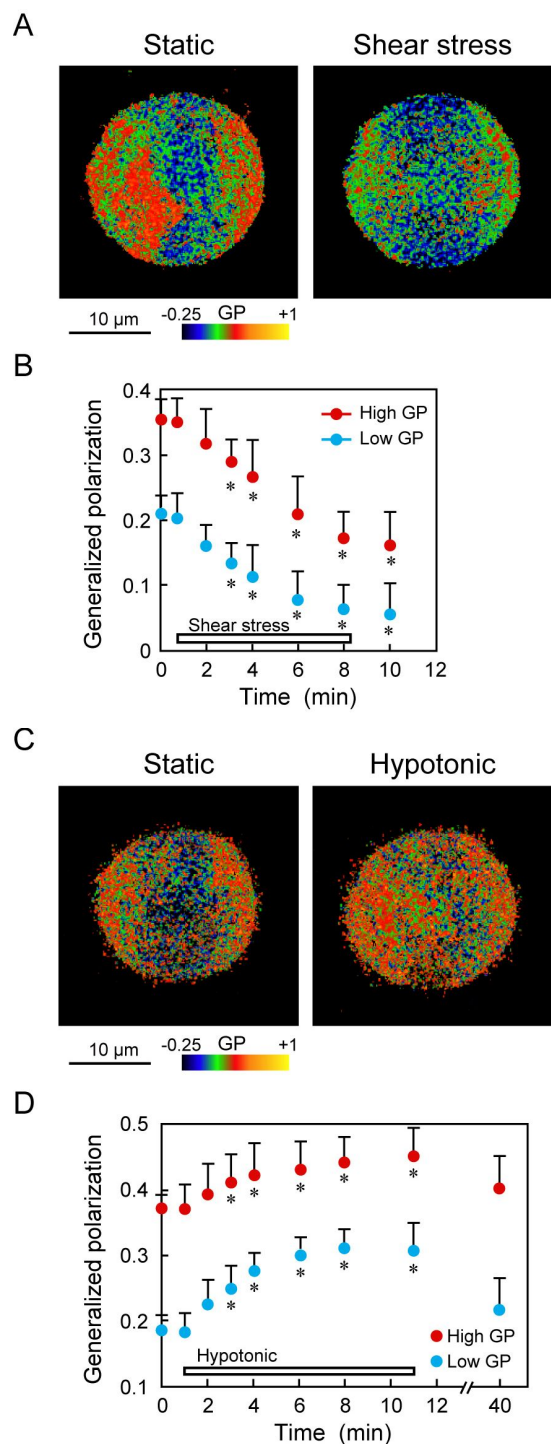


図2 力学刺激による人工膜 lipid order の 変化

A, C: GP 値の擬似カラー画像

B, D: GP 値の継時変化

数値は 1.5 (B)、1.2 (D) リポゾームの平均 ± 標準偏差 * $p < 0.01$

(3) 膜の流動性の変化

細胞膜は2次元の流動的構造体で脂質もタンパク質も移動が可能である。分子が膜内を横方向に拡散するし易さを膜の流動性と呼んでいる。内皮細胞膜の流動性は場所により異なっており、カベオラの豊富な lipid order の高い場所では低い流動性を示した。図3に示すように、細胞に shear stress を作用させると膜流動性が明らかに増加した。一方、細胞を stretch すると膜全体の流動性が低下した。低浸透圧刺激で細胞膜を stretch しても、同様に膜流動性の低下が惹起された。このことは細胞膜が力学的刺激に反応して流動性を変化させること、膜流動性は stretch と shear stress で逆方向に変わること示している。

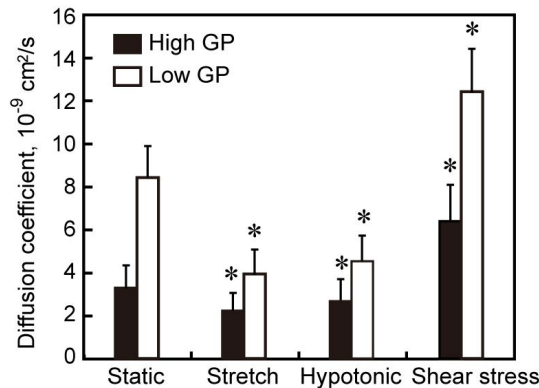
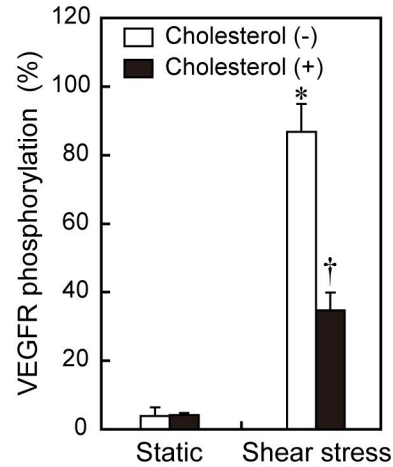


図3 力学刺激による膜流動性の変化 (膜流動性は拡散係数で表示)

(4) メカノトランスダクションに果たす膜物性変化の役割

これまで我々は shear stress が内皮細胞膜に発現する内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)をリガンド非依存性にリン酸化すること、及び、stretch が血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)をリガンド非依存性にリン酸化することを見出している。そこで細胞膜の物性変化が力学的刺激による細胞増殖因子受容体の活性化に与える影響を検討した。細胞にコレステロールを添加して shear stress で生じる膜 lipid order の低下を起こらなくすると shear stress による VEGFR のリン酸化が著明な抑制を受けた(図4A)。一方、細胞を MbCD で処理し細胞膜のコレステロールを減少させて stretch による膜 lipid order の上昇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(図4B)。このことは細胞膜の lipid order の変化が細胞増殖因子受容体のリン酸化を介したメカノトランスダクションに繋がっていることを示している。

A



B

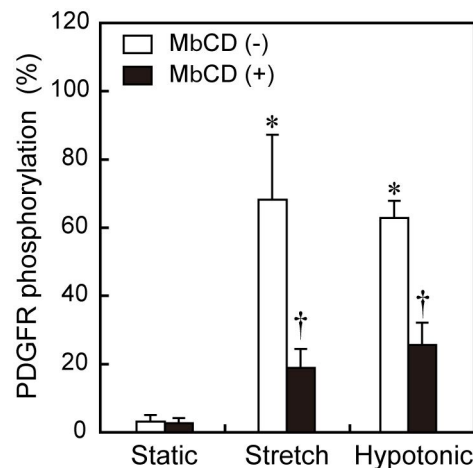


図4 膜受容体のリン酸化に果たす膜物性変化の役割

数値は各30細胞の平均±標準偏差

*p<0.01 vs 静的コントロール

†p<0.01 vs Cholesterol(-) or MbCD(-)

(5) 力学刺激による膜コレステロールの変化

Shear stress あるいは stretch を作用させた内皮細胞から細胞膜を分離し、コレステロール含量を測定した。その結果、shear stress により膜コレステロールは著明に減少し、一方、細胞伸展あるいは低浸透圧刺激による細胞膜 stretch により膜コレステロールが有意に増加するのが観察された(図5)。この機序としては、shear stress により膜 lipid order が低下し、膜内に水分が浸透すると疎水性であるコレステロールが膜から離れ、stretch では膜 lipid order の上昇に伴い膜内水分量が減少するため、コレステロールが膜に入ると考えられた。

以上の結果から、細胞膜の物性やコレステロールの変化を介して、shear stress と stretch を分別して感知する機能が備わっていることが判明した。本研究により細胞膜自体がメカノセンサーとして、膜に分布する蛋

白分子がトランスジューサーとして働く、これまで知られていない新しいメカノトランスダクション機構の存在が示唆された。

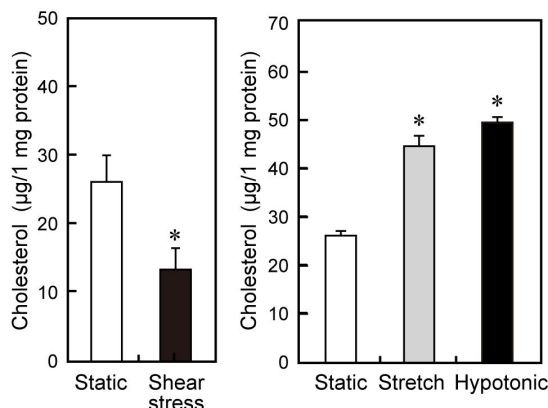


図5 力学刺激による膜コレステロールの変化
 数値は6サンプルの平均±標準偏差
 * $p < 0.01$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

H. Nakajima, K. Yamamoto, S. Agarwala, K. Terai, H. Fukui, S. Fukuhara, K. Ando, T. Miyazaki, Y. Yokota, E. Schmelzer, H.G. Belting, M. Affolter, V. Lecaudey, N. Mochizuki. Flow-dependent endothelial YAP regulation contributes to vessel maintenance. *Dev. Cell* 40:523-536, 2017.

安藤譲二 山本希美子: 循環系のメカノセンシング 血管医学 17巻 315-324頁 2016年

山本希美子 安藤譲二: 血管の動的な恒常性のメカニズム *CLINICAL CALCIUM* 26:107-114頁 2016年

山本希美子 安藤譲二: メカノバイロジからメカノメディシンへ; ずり応力センシング 医学のあゆみ 257巻 1008-1014頁 2016年

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:H1178-1185, 2015

M. Fukuda, S. Fukuda, J. Ando, K. Hasegawa: The role of wall shear stress on cerebral aneurysm development via P2X4 ion channel, a sensor for shear stress mechanotransduction, in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 28, LB669, 2014

S. Obi, H. Masuda, H. Akimaru, T. Shizuno,

K. Yamamoto, J. Ando and T. Asahara: Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells. *Physiol. Rep.* 2(3) e00261, 2014

S. Obi, K. Yamamoto and J. Ando: Effects of shear stress on endothelial progenitor cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10:1-12, 2014

〔学会発表〕(計24件)(うち招待講演 計19件)

山本希美子 安藤譲二 (招待講演)
 血流センシングと血管の生理・病理
 第94回日本生理学会大会 浜松アクティ
 ティコンgresセンター(静岡県・浜松市)
 2017.3.28.

S. Fukuda, J. Ando, K. Yamamoto, T. Tsukahara, Y. Ito, and K. Hasegawa
 Inhibition of the endothelial shear stress sensor, P2X4 purinoceptor drastically reduces cerebral aneurysm formation
 International Stroke Conference, Houston (USA), 2017.2.22.

山本希美子 (招待講演)
 血管のメカノバイロジ: 血流センシングと脳動脈瘤形成の分子機構 「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域 平成28年度キックオフ会 スペースアルファ神戸(兵庫県・神戸市) 2016.12.11.

山本希美子 安藤譲二 (招待講演)
 脂質分子膜の力学応答を基盤とする血流センシング 第24回日本血管生物医学学会 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市) 2016.12.10.

山本希美子 安藤譲二 (招待講演)
 血管内皮細胞における膜脂質分子を介したメカノセンシング 第39回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016.12.2.

K. Yamamoto (invited)
 Endothelial cell mechanotransduction and its role in vascular remodeling.
 13th Interdisciplinary Cerebrovascular Symposium Intracranial Stent Meeting, Kobe International Exhibition Hall (Hyogo, Kobe), 2016.11.27.

安藤譲二 山本希美子 (招待講演)
 血管のメカノバイロジ: 内皮細胞の血流センシングを介した循環機能調節
 日本生体医工学会東海支部学術講演会 株式会社スズケン本社(愛知県・名古屋市) 2016.10.22

K. Yamamoto and J. Ando (invited)
 Mechanotransduction in endothelial cells
 ESC CONGRESS 2016, Roma (Italy), 2016.8.30.

山本希美子 安藤譲二 (招待講演)

血管内皮細胞における形質膜を介したメカノセンシング機構 第39回日本バイオロジック学会年会 東海大学交友会館(東京都・千代田区) 2016.6.18.

山本希美子 安藤譲二 (招待講演)
内皮細胞における膜脂質相転移を介したメカノセンシング 第55回日本生体医工学大会 富山国際会議場・富山市民プラザ(富山県・富山市) 2016.4.28.

山本希美子 安藤譲二
内皮細胞形質膜を介した血流と血圧のセンシング機構 第23回日本血管生物医学学会神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2015.12.11.

K. Yamamoto and J. Ando (invited)
Endothelial cell plasma membrane acts as a mechanosensor that detects fluid shear stress. 10th World Congress for Microcirculation, Kyoto (Japan), 2015.9.24.

山本希美子 安藤譲二(招待講演)
内皮細胞形質膜を介した血流センシング機構 生理学研究所研究会“生体ホメオスタシスのgatewayとしての上皮膜輸送マイクロホメオスタシス機構”自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県・岡崎市) 2015.9.16.

K. Yamamoto and J. Ando
Stretch-induced endothelial mechanotransduction through transitions in cell membrane lipid phases The 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milano (Italy), 2015. 8. 28.

安藤譲二 山本希美子 (招待講演)
内皮細胞の血流センシングを介した血管機能調節 第47回日本動脈硬化学会総会 仙台国際センター(宮城県・仙台市) 2015.7.10

山本希美子 安藤譲二(招待講演)
内皮細胞は流体力学刺激のセンサーとして働く 第54回日本生体医工学大会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015.5.8

安藤譲二 山本希美子 (招待講演)
血管のメカノバイオロジー 第118回日本小児科学会学術集会 大阪国際会議場ノリーガロイヤルホテル大阪(大阪府・大阪市) 2015.4.18

K. Yamamoto and J. Ando (invited)
Vascular endothelial cells sense shear stress by changing the membrane lipid order. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Mie (Japan), 2014.9.2.

K. Yamamoto and J. Ando
Caveolar membrane lipid order affects ATP-mediated shear stress mechanotransduction in vascular endothelial cells. Purines 2014: International Conference on

Signaling, Drugs and Targets, Bonn (Germany), 2014.7.24.

山本希美子 安藤譲二 (招待講演)
内皮細胞の lipid order を介した shear stress のセンシング 第53回日本生体医工学大会 仙台国際センター(宮城県・仙台市) 2014.6.26

⑲ 山本希美子 安藤譲二 (招待講演)
内皮細胞の血流応答を介した血管リモデリング 第47回日本発生生物学会 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市) 2014.5.30

⑳ K. Yamamoto and J. Ando (invited)
Endothelial cells respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases. International Symposium on Mechanobiology, Okayama (Japan), 2014.5.22.

㉑ K. Yamamoto and J. Ando (invited)
Endothelial cells sense shear stress through rapid changes in membrane physical properties. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto (Japan), 2014.4.17.

㉒ S. Obi, H. Masuda, H. Akimaru, K. Yamamoto, J. Ando and T. Asahara
Dextran increases differentiation of circulating endothelial progenitor cells. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto (Japan), 2014.4.17.

〔図書〕(計3件)

K. Tanishita, K. Yamamoto (eds.), Vascular Engineering, Springer, Tokyo, 2016.

安藤譲二 山本希美子:血管のメカノバイオロジー:メカノバイオロジー 曾我部正博編 化学同人 2015年

安藤譲二:血管と血流の相互作用:新・血栓止血血管学・血管と血小板:編著 一瀬白帝、丸山征郎、内山真一郎 金芳堂 65-72頁 2015年

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://square.umin.ac.jp/vascbiol/index.html>

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・准教授

研究者番号:00323618