

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870041

研究課題名(和文) 時空間変動高せん断流れ環境における血管内皮細胞のシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of signal transduction mechanism in endothelial cells under high shear flow with spatio-temporal changes

研究代表者

吉野 大輔 (YOSHINO, Daisuke)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80624816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管疾患好発部位の血流環境を模擬した流れ負荷培養系を用いて、時空間変動を伴う高せん断流れ刺激に対する血管内皮細胞の力学応答機構を調査した。流れ負荷直後の内皮細胞において、流れ刺激により発生する細胞内ひずみに対応した細胞間接着タンパク質の活性化局在が起ることを確認した。これにより、空間変動を伴うせん断流れ環境では、せん断応力と空間変動の組合せによって内皮細胞の流れ方向への配向性に違いが出ることがわかった。また、時空間変動を伴う高せん断流れ環境において、内皮細胞のプログラム細胞死の誘導過程が確認でき、血管疾患発症に対する時空間変動を伴う高せん断流れ刺激の影響を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated mechanisms in mechanical responses of vascular endothelial cells subjected to high shear flow with spatio-temporal changes. Fluid shear stress combined with a spatial gradient of shear stress can alter the localization of activated adherens junction proteins along the strain field as a result of shear flow. The results of this study, therefore, suggest that the strain field resulting from the combination of shear stress and its spatial gradient plays an important role in regulating the orientation and elongation of the endothelial cells along the direction of fluid flow. In addition, we confirmed the process leading to the programmed cell death in the endothelial cells under high shear flow with spatio-temporal changes. These results may potentially provide the basis for elucidating relationship between high shear flow with spatio-temporal changes and pathogenesis of a vascular disease.

研究分野：メカノバイオロジー、設計工学

キーワード：血管内皮細胞 せん断応力 せん断応力勾配 循環器系疾患 細胞内ひずみ

1. 研究開始当初の背景

我々の身体を構成する細胞は、絶えず受ける力学刺激を感知し、形態や機能を変化させることで生命維持に重要な役割を果たしている。血管内皮細胞は血流による流体せん断応力、壁変形による張力、血圧による静水圧を受けて形態や機能を変化させ、力学環境に適応している。正常環境下では、内皮細胞は腫瘍血管の新生に関与するタンパク質産生の抑制機能を有するが、時空間変動を伴う高せん断応力環境下では、抑制機能が正常に作用しなくなり、動脈瘤の発症や進展につながると考えられてきた。しかしながら、時空間変動を伴う高せん断応力環境下の細胞内シグナル伝達機構と最終的な細胞力学応答の詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究では、まず、血管疾患好発部位の血流を模擬した流れ負荷培養系を用いて、時空間変動を伴う高せん断流れ環境の血管内皮細胞の形態応答を観察する。また、細胞内シグナル伝達機構を関連タンパク質の活性・局在解析と数値計算モデルの併用により解明する。これらの結果を基にして、流体力学的要因に基づく動脈瘤発症や進展のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、まず、1) 血管疾患好発部位の血流を模擬した流れ負荷培養系を構築し、時空間変動を伴う高せん断流れ環境を再現した。次に、2) 構築した流れ負荷培養系を用いて、時空間変動を伴う高せん断流れ環境の血管内皮細胞の形態応答を観察した。また、3) 内皮細胞の3次元形状から再構築した計算モデルを用いて、流れ環境下の細胞内ひずみ分布を推定した。さらに、4) 時空間変動を伴う高せん断流れ刺激に対する細胞内シグナル伝達機構を関連するタンパク質の活性・局在に着目して解析し、内皮細胞の力学応答機構を明らかにした。

4. 研究成果

1) 血管疾患好発部位の血流を模擬した流れ負荷培養系の構築

血管疾患好発部位では、血管壁面におけるせん断応力が局所的に変化する流れ環境であることが知られている。本研究では、研究代表者らが開発済みの、一様なせん断応力空間勾配を発生可能なD型フローチャンバー(Yoshino et al. J. Biomech. Sci. Eng. 2013, DOI:10.1299/jbse.8.233)を改良し、小流量(従来の20分の1)かつ時間変動(1 Hzの拍動)を負荷可能な改良D型フローチャンバーを作製した(図1(a))。流路の基本構造は従来のフローチャンバーと同じである。開発したフローチャンバーをペリスタポンプ、2つの培養液リザーバ、シリコンチューブで構成される灌流回路に接続することで、流れ

負荷培養系を構築した(図1(b))。培養液の小流量化を実現したことによりCO₂インキュベーター内での実験も可能となった。

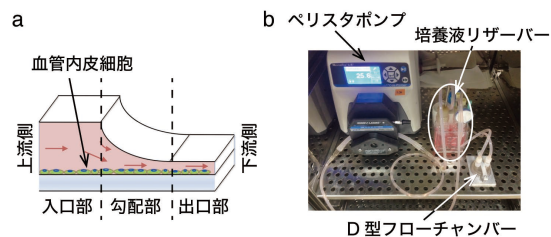


図1 血管疾患好発部位の血流を模擬した流れ負荷培養系 (a)D型チャンバーの流路構造: 勾配部においてせん断応力が線形に増加 (b)流れ負荷培養系の構成

2) 時空間変動を伴う高せん断流れ環境の血管内皮細胞の形態応答

本研究では、まず、空間変動のみを伴う高せん断流れ環境の血管内皮細胞の形態応答を観察した。構築した流れ負荷培養系で24時間培養した血管内皮細胞を4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定し、細胞核、細胞骨格、細胞間接着タンパク質の免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した(図2)。空間勾配の無いせん断流れ環境では、先行研究と同様に内皮細胞が流れ方向に配向、伸長した(図2上段)。一方、空間的勾配を有するせん断流れ環境では、内皮細胞は低せん断応力では流れ方向に配向、伸長せず、高せん断応力では流れ方向に配向、伸長することがわかった(図2中段、下段)。

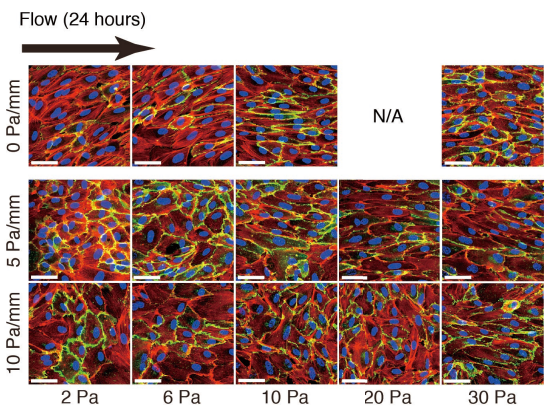


図2 24時間の流れ負荷培養後の血管内皮細胞の形態(青:細胞核、赤:細胞骨格、緑:細胞間接着タンパク質、スケールバー:50 μm) (上段)空間勾配の無いせん断流れ、(中段・下段)空間勾配を有するせん断流れ環境下の内皮細胞の様子

3) 流れ環境下の内皮細胞内のひずみ分布の推定

血管内皮細胞の3次元形状から再構築した計算モデルを用いた有限要素解析により、流れ刺激に曝された瞬間の細胞内ひずみ分布を推定した。空間勾配の無いせん断流れ環境では、細胞の上流側が圧縮、下流側が引張

のひずみ分布になるが、空間的勾配を有するせん断流れ環境では、細胞内全域で引張ひずみが分布することが確認された (図 3)。

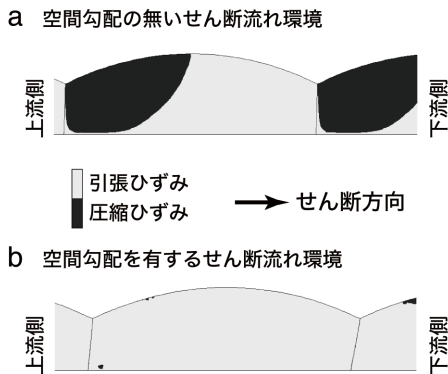


図 3 流れ刺激に相当するせん断力を負荷した場合の細胞内ひずみ分布の推定結果 (a)空間勾配の無いせん断流れ環境、(b)空間勾配を有するせん断流れ環境における細胞内ひずみ分布

4) 時空間変動を伴う高せん断流れ刺激に対する細胞内タンパク質挙動解析

まず、前項で確認した細胞内ひずみ分布と対応するタンパク質の活性挙動の解析を行った。引張の刺激のみに応答する細胞間接着タンパク質である血小板/内皮細胞接着分子-1 (PECAM-1) に着目し、そのリン酸化局在を検証するために、PECAM-1 のチロシンリン酸化部位に結合するチロシン脱リン酸化酵素 (SH-PTP2) の局在を免疫蛍光染色により確認した。空間勾配の無いせん断流れ環境においては、細胞の下流側に SH-PTP2 が局在する傾向が認められた (図 4(a))。一方、空間勾配を有するせん断流れ環境においては、SH-PTP2 が細胞の上流側および下流側に広く

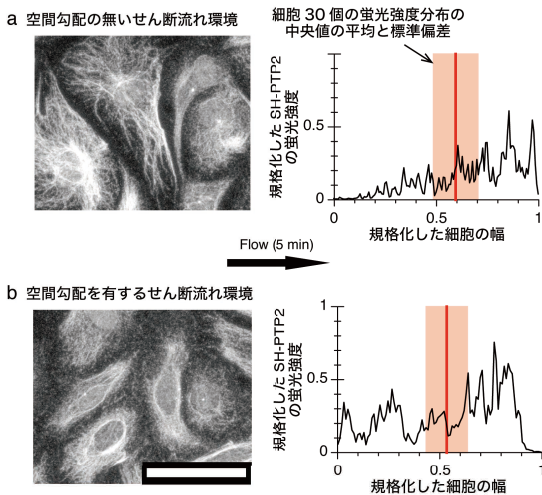


図 4 SH-PTP2 の細胞内局在 (a)空間勾配の無いせん断流れ環境、(b)空間勾配を有するせん断流れ環境の内皮細胞中の SH-PTP2 の様子 (左側、スケールバー: 50 μ m)、代表的な SH-PTP2 の蛍光強度分布 (右側)

分布し、細胞間を標識するような局在が認められた (図 4(b))。この結果から、PECAM-1 のリン酸化局在が間接的に確認され、細胞内の引張ひずみ分布と強い相関があることがわかった。これらの成果をまとめ、Integrative Biology 誌 (Yoshino et al. Integrative Biology, In press, DOI: 10.1039/C7IB00065K) に発表した。

次に、時空間変動を伴う高せん断流れ環境の血管内皮細胞の応答を観察した。時間変動のみの高せん断流れ環境では、流れ負荷後 3、6 時間でプログラム細胞死 (アポトーシス) を起こす内皮細胞はほとんど存在しない一方で、時空間変動を伴う高せん断流れ環境では、アポトーシスの過程で発生するホスファチジルセリンの膜転移が多く細胞で確認された。また、同様の条件でアポトーシスの誘導に関連するタンパク質である NF-kappaB の局在を確認したところ、時空間変動を伴う高せん断流れ環境において、NF-kappaB の核内移行が長時間維持されることがわかった (図 5)。

上記の内皮細胞のアポトーシスは動脈瘤を誘発する血管炎症反応と密接に関係する可能性が示唆されているため、現在はアポトーシスを誘導する細胞内タンパク質活性挙動を中心に解析を継続している。最終的にデータをまとめて国際誌へ論文投稿する予定である。

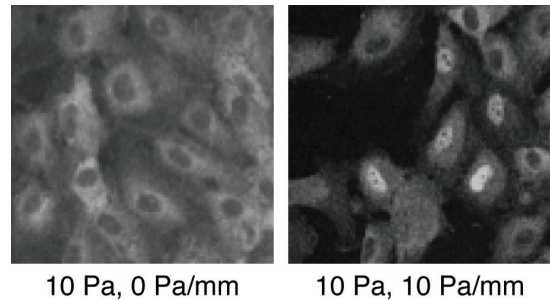


図 5 NF-kappaB の核内移行 (流れ負荷後 3 時間) (左) 時間変動のみの高せん断流れ環境における内皮細胞中の NF-kappaB、(右) 時空間変動を伴う高せん断流れ環境における内皮細胞中の NF-kappaB

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① [Daisuke Yoshino](#), Naoya Sakamoto, Masaaki Sato, Fluid shear stress combined with shear stress spatial gradients regulate vascular endothelial morphology, Integrative Biology, 2017, In press, DOI: 10.1039/C7IB00065K. 【査読有】

[学会発表] (計 3 件)

① [Daisuke Yoshino](#), Naoya Sakamoto and Masaaki Sato, Localization of protein tyrosine phosphatase in endothelial cells under shear flow,

14th International Symposium on Advanced Fluid Information, Sendai International Center, Sendai, Japan, 2014.10.8–10.

②Daisuke Yoshino, Naoya Sakamoto, Masaaki Sato, Relationship between cell orientation and strain distribution in endothelial cells under fluid shear stress with its spatial gradient, 15th International Symposium on Advanced Fluid Information, Sendai International Center, Sendai, Japan, 2015.10.27–29.

③Daisuke Yoshino, Naoya Sakamoto, Masaaki Sato, Mechanism of morphological changes in endothelial cells under fluid shear stress with its spatial gradient, The 16th International Conference on Biomedical Engineering, Singapore, 2016.12.7–10.

[図書] (計 0 件)
該当無し

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
該当無し

○取得状況 (計 0 件)
該当無し

[その他]
ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 大輔 (YOSHINO, Daisuke)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・
助教
研究者番号： 80624816

(2) 研究分担者
該当無し

(3) 連携研究者
該当無し

(4) 研究協力者

佐藤 正明 (SATO, Masaaki)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・
総長特命教授

坂元 尚哉 (SAKAMOTO, Naoya)
首都大学東京・システムデザイン学部・准
教授