

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス

### 2. 氏名

山本 希美子

### 3. 研究のねらい

血管内面を覆う内皮細胞には、血流に起因する流れずり応力が作用している。血流が増加すると血管内皮細胞がその変化を感知し、血管径を増大させると共に、組織での毛細血管数を増加させる等のリモデリング反応を起こし、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかし現在まで、内皮細胞が血流刺激をどの様に感知し応答するのか、その分子機構は明らかではない。本研究では、この問題を解明する為、血管で生じる力学現象をナノスケールで解析し、流体力学的に設計した装置を用いて、定量的な流れずり応力を作用させた血管細胞を最新の画像化技術を駆使して解析する。

### 4. 研究成果

内皮細胞の血流センシング機構を理解するためには、内皮細胞が流れずり応力を最初に感知する機構とそれに関わる血流センサー分子の本体を明らかにすることが最も重要である。これまで血流センサー分子の候補としては細胞膜に存在するイオンチャネルや、細胞と細胞外マトリックス間の結合に関わるインテグリン分子、細胞の形態を維持しているアクチンフィラメントなどの細胞骨格分子などが挙げられているが、まだ確定していない。最近、我々は内皮細胞の流れずり応力感知にカルシウムイオンを介した機構が働いていて、流れずり応力の大きさに依存して細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる分子として ATP 作動性カチオンチャネル P2X4 が働いていることを見出した。そこで本研究では、このイオンチャネルに焦点をあて、内皮細胞の血流センシングの分子機構の解明を目指した。

流れずり応力依存的なカルシウム流入に関与するATP作動性カチオンチャネルのサブタイプであるP2X4 遺伝子をノックアウトしたマウスの内皮細胞では、流れずり応力によるカルシウム流入とそれに引き続くNO産生が起こらず、そのことが血圧の上昇や血流変化に対する血管の拡張反応やリモデリングの障害につながった。最近、我々はこの流れずり応力によるP2X4の活性化に流れずり応力依存的に内皮細胞から放出されるATPが重要な役割を果たしていることを見出した。内皮細胞に流れずり応力を作用させると、その強さ依存性に内因性ATPが放出されるが、これを阻害するとP2X4 を介するCa<sup>2+</sup>流入反応が著明に抑制された。従って、流れずり応力によるATP放出の機構を探ることは流れずり応力の情報伝達の解明につながると考えた。

#### 1) 流れずり応力依存的な ATP 放出に ATP 合成酵素の働きが関与する。

ヒト肺動脈内皮細胞(HPAECs)に流れ刺激を 1 分間与えたときに灌流液中に放出されてくるATP量を luciferin-luciferase 法で定量した。流れずり応力の大きさに依存して細胞外にATPが放出され。このとき、細胞内ATP濃度には変化が起きなかった。この流れ刺激によるATP放出に寄与する分子を探索する為に各種の阻害剤を用いた所、ATP合成酵素の阻害剤である angiostatin、piceatannol が流れずり応力に伴うATP放出を顕著に抑制することが確認された。同様に、ATP合成酵素のβ-subunit に対する抗体(ATP synthase β Ab)によってもATP放出反応が有意に抑制された。一方、angiostatin、piceatannol、ATP synthase β Ab 共に細胞内ATP濃度に影響を及ぼさなかったことから、膜表面でATP合成酵素に作用し、その機能を抑制すると考えられる。これらの所見はHPAECsにおいて膜表面のATP合成酵素が流れ誘発性のATP放出に中心的な役割を果たしていることを示唆している。

## 2) 内皮細胞膜のカベオラに ATP 合成酵素が存在する。

ATP 合成酵素が HPAECs の細胞膜に存在するかについて、ATP synthase  $\beta$  Ab を用いた免疫蛍光染色で検討した。抗体が細胞膜を透過しない条件で得た染色写真から ATP 合成酵素は細胞表面に存在すること、その分布は細胞膜全体に局在するのではなく、細胞の一部の辺縁部分に集中することが示された。同様の分布は ATP 合成酵素の  $\alpha$ -subunit に対する抗体を使った免疫染色でも確認された。一方、抗体が細胞膜を透過する様に、細胞を triton X-100 で処理する条件で行った免疫染色では、ATP 合成酵素がミトコンドリアの場所に一致して豊富に分布していた。HPAECs を細胞膜カベオラの構成蛋白である caveolin-1 及びコレステロールに富む脂質ラフトのマーカー蛋白である cholera toxin B の抗体で免疫染色を行った所、ATP 合成酵素は caveolin-1 および cholera toxin と共局在していることが判明した。これらの結果から ATP 合成酵素が細胞膜の脂質ラフトに caveolin-1 と共存していると考えられる。この事実を更に確認するため、a detergent-free sucrose density gradient method で細胞膜の caveolae rich fraction 得て、ATP synthase  $\beta$  Ab と抗 caveolin-1 抗体を使った immunoblot analysis を行った。その結果、ATP 合成酵素が細胞膜の caveolae rich fraction に特異的に分布していることが示された。

## 3) 細胞膜の ATP 合成酵素は ATP 産生能を有している。

膜表面に存在する ATP 合成酵素の機能を調べるため、HPAECs に  $^3\text{H}$ -labeled ADP を作用させ、上清中のヌクレオチド誘導体の相対量を薄層クロマトグラフィ (TLC) で定量した。作用後 1 分以内で上清中に  $^3\text{H}$ -labeled ATP が出現し、5 分後に最大となり、その後減少した。このとき細胞内には  $^3\text{H}$  の放射活性がほとんど検出されなかったことから、 $^3\text{H}$ -labeled ADP は細胞内では代謝されず、細胞表面で反応していると考えられる。細胞を ATP 合成酵素の阻害薬である angiostatin で処理すると、細胞表面での  $^3\text{H}$ -labeled ADP から  $^3\text{H}$ -labeled ATP への conversion が著明に抑制された。これらの結果は HPAECs の細胞膜に存在する ATP 合成酵素は ADP から ATP を合成する機能を有していることを示している。

## 4) カベオラ・ラフトの破壊は流れ誘発性 ATP 放出反応を消失させた。

ATP 合成酵素がラフトに局在することが流れ誘発性 ATP 放出にどのような意味があるかを検証した。細胞膜のコレステロールを除去する作用がある methyl- $\beta$  cyclodextrin (M $\beta$ CD) で HPAECs を処理した所、脂質ラフトが消失し、ATP 合成酵素が細胞膜全体に広く分布するようになった。これにコレステロールを添加すると再びラフトが現れ、ATP 合成酵素も細胞辺縁の一部に集積して分布するようになった。Western blot による定量から、M $\beta$ CD とコレステロールによる細胞処理は細胞全体と膜に存在する ATP 合成酵素や caveolin-1 の量には影響を及ぼさないことが示された。HPAECs を M $\beta$ CD で処理すると流れ刺激依存性の ATP 放出は有意に抑制された。この M $\beta$ CD の ATP 放出抑制効果はコレステロールの添加で回復した。このことは流れ誘発性の ATP 放出に細胞膜 ATP 合成酵素が関わるためにはラフトに分布することが必須であることを示唆している。

更に、ATP 合成酵素が caveolin-1 と共存することが流れ誘発性 ATP 放出にどのような意味があるかを検証した。HPAECs に caveolin-1 の siRNA を導入した所、細胞膜の ATP 合成酵素の分布に大きな変化は見られなかったが、caveolin-1 の発現が明らかに減少した。一方、ATP 合成酵素の発現には変化が認められなかった。Caveolin-1 の細胞膜における発現を siRNA で抑制すると、流れ誘発性の ATP 放出が明らかに抑制を受けた。このことは流れ誘発性の ATP 放出に細胞膜 ATP 合成酵素が働く上で、caveolin-1 との関係が重要であることを示している。

## 5. 自己評価

本研究課題では、血管内皮細胞の血流センシング機構を解明するという目標に対して、既存の実験方法に加えて、イメージングを中心とした新たな手法を試行錯誤の基に立ち上げることに挑戦した。研究期間内に結論に到達した課題もあったが、実験系の樹立に時間を有した為結論にまで至っていない系もある。しかし、研究成果②に記載した通り、主な課題の解決に必要な基礎の準備と検討は既に終了しており、今後も引き続き研究課題を推進することで、当初の目標を更に発展させようと考えている。

## 6. 研究総括の見解

血管内皮細胞の血流センシング機構を解明するため、装置の開発から細胞生物学、薬理学的手法、さらにイメージング手法を取り入れて、独自の実験系を綿密に構築した。特に、ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAECs) に流れ刺激を与えたときに灌流液中に放出されてくる ATP 量を定量することから、膜表面の ATP 合成酵素が流れ誘発性の ATP 放出に中心的な役割を果たしていることを見出し、剪断応力による ATP 放出が細胞膜カベオラ付近から放出されることを明らかにしたことは、大きな成果である。これらの知見をさらに発展させ、血管の老化と予防への足がかりに貢献することを期待する。

## 7. 主な論文等

### 【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

#### ①論文

1. K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, S. Kumagaya, Y. Taketani, A. Kamiya, and J. Ando. Involvement of cell-surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: H1646-H1653 (2007).
2. M. Toda, K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, S. Kumagaya, T. Igarashi, A. Kamiya, and J. Ando. Differential gene responses in endothelial cells exposed to a combination of shear stress and cyclic stretch. *J. Biotechnol.* 133: 239-244 (2008).
3. J. Ando and K. Yamamoto. *Vascular Mechanobiology: Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress.* *Cir. J.* 73: 1983-1992 (2009).

#### ②特許

研究期間累積件数: 1件 (出願公開前)

発明者: グン チェンピン (34%)、陳 咏梅 (33%)、山本 希美子 (33%)

発明の名称: 足場材料

出願人: 国立大学法人 北海道大学

出願日: 平成 21 年 1 月 6 日

#### ③受賞

1. IEEE, Best Paper Award in 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2008) for the paper entitled "Cyclic strain induced ES cell differentiation into vascular smooth muscle cells via PDGF receptor  $\beta$  activation", 8 November, 2008, Nagoya.
2. 第 15 回日本血管生物医学学会 ポスター賞 2007 年 11 月 29-30 日 福岡

#### ④学会発表

1. K. Yamamoto, T. Masumura, N. Shimizu, and J. Ando, "Shear stress induces differentiation of arterial endothelial cells from murine embryonic stem cells" Medical Physics and Biomedical Engineering, World Congress 2009, Munich, September 8, 2009.
2. 山本希美子、神谷瞭、安藤譲二、「流れずり応力が惹起する内皮細胞膜特性の変化」第48回日本生体医工学学会大会 2009年4月23日 東京
3. K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, and J. Ando, "Caveola ATP synthase mediates ATP release in vascular endothelial cells exposed to shear stress" The 6<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, Kanazawa, 3 December, 2008.
4. K. Yamamoto and J. Ando, "Cell surface ATP synthase-mediated shear-stress mechanotransduction in vascular endothelial cells" The Joint Biophysics Society 52<sup>nd</sup> Annual Meeting and 16<sup>th</sup> IUPAB International Biophysics Congress, Long Beach, 6 February, 2008.
5. 山本希美子、熊谷晋一郎、安藤譲二、「二光子レーザー顕微鏡による血管内皮細胞膜の脂質ラフトの画像化」第15回日本血管生物医学会 2007年11月30日 福岡

⑤招待講演

1. 山本希美子、安藤譲二、「血管内皮のカルシウムシグナリングを介した血流感知機構」第83回日本薬理学会年会 2010年3月28日 岡山
2. 山本希美子、安藤譲二、「血管内皮細胞における血流感知機構」第83回日本薬理学会年会 2010年3月16日 大阪
3. 山本希美子、安藤譲二、「内皮細胞のシェアストレス応答と循環機能調節」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜
4. K. Yamamoto, and J. Ando, "Fluid-mechanical force-induced differentiation of murine ES cells towards vascular cells" The Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009, Engelberg, September 4, 2009.
5. K. Yamamoto and J. Ando, "Endothelial P2X4-mediated shear-stress-mechano-transduction and its roles in the control of vascular functions" Fukuoka Purine 2009, Joint with JSPS Core-to-Core Program, A Satellite Symposium for IUPS 2009, Fukuoka, July 23, 2009.

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. N. Shimizu<sup>#</sup>, K. Yamamoto<sup>#</sup>, S. Obi, S. Kumagaya, T. Masumura, Y. Shimano, K. Naruse, J. K. Yamashita, T. Igarashi, and J. Ando. (# These authors contributed equally to this work.) Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor  $\beta$ . J. Appl. Physiol. 104: 766-772 (2008).
2. T. Masumura<sup>#</sup>, K. Yamamoto<sup>#</sup>, N. Shimizu, S. Obi, and J. Ando. (# These authors equally contributed to this work.) Shear Stress Increases Expression of the Arterial Endothelial Marker EphrinB2 in Murine ES Cells via the VEGF-Notch Signaling Pathways. Arterioscler. Throm. Vasc. Biol. 29: 2125-2131 (2009).