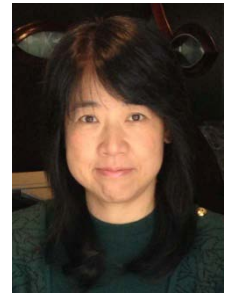


先進分子イメージングによる血管の血流関知機構の解明

研究代表者

山本希美子 東京大学 大学院医学系研究科 医用生体工学講座 システム生理学



1. 研究の背景と達成目標

細胞や組織が物理的環境に由来するメカニカルストレスを感知して反応することは、その機能や生存にとって極めて重要である。特に血管系の構築や機能は血流に伴う血行力学因子の制御を受けているが、そうした力学応答の仕組みはまだ十分解明されていない。本研究では、血管内面を一層に覆い、血流と接触する内皮細胞の力学応答に焦点を当て、内皮細胞が血流に起因する流れずり応力や伸展張力を感知して情報伝達する分子機構をナノスケールの生体分子レベルで解明する。流体力学的に設計した流れ負荷装置や伸展張力負荷装置を用いて培養血管細胞に定量的な応力を作用させたとき、申請者らが同定した血流センサーとして働くイオンチャネル P2X4 受容体の活性化機構を中心に、増殖因子受容体、ラフト、カベオラ、インテグリン、脂質二分子膜などの各種細胞膜分子の挙動を最新のバイオイメージング技術を駆使して解析し、内皮細胞におけるメカノセンシング機構を解明することを目的とした。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ATP 放出現象の可視化
- ATP 放出が惹起する P2X4 受容体を介したカルシウム波
- 血管内皮細胞膜と人工脂質膜の lipid order と流動性の変化
- 内皮細胞膜の lipid order と増殖因子受容体の活性化との関係

多くの研究者により血管内皮細胞が血流刺激を感知し応答する分子機構の解析が進められているが、まだ解明されるに至っていない。我々は内皮細胞の流れずり応力のセンシングに ATP とその受容体である P2X チャンネルを介したカルシウム・シグナリングが重要な役割を果たすことを世界に先駆けて見出した。本研究において独自に開発した新規イメージング法により流れずり応力による内皮細胞からの ATP 放出反応を高い時間・空間分解能でイメージングすることに成功したことは学術的にインパクト大きく、掲載された雑誌で注目すべき論文として取り上げられた。流れ負荷装置を2光子顕微鏡と組み合わせたシステムで流れずり応力が細胞膜の物理的特性である lipid order を変化させることを世界で初めて明らかにした。また、人工脂質膜巨大リポソームでも同様の結果が得られた事実はこうした膜反応が生細胞に備わっている分子などとは関係しない物理現象で、リン脂質二重膜が基本的に有している性質であるという基本概念を示したことはメカノセンシング機構にパラダイムシフトをもたらすインパクトを有している。

3. 研究成果

- (1) ATP 放出現象の可視化: ルシフェラーゼ蛋白を内皮細胞膜に結合させる新たな方法を開発し、流れずり応力が惹起する ATP 放出反応をイメージングすることに成功した。流れずり応力が作用すると、即座にカベオラ膜局所から高濃度 (10 μM) の ATP 放出が観察された。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上で有用で細胞科学研究に与える影響は大きいと思われる。
- (2) ATP 放出が惹起する P2X4 受容体を介したカルシウム波: ATP 放出が流れずり応力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。流れずり応力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 ATP 受容体の P2X4 を介して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。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画像で示した。

- (3) **血管内皮細胞膜と人工脂質膜の lipid order と流動性の変化**: 環境感受性色素の Laurdan と 2 光子レーザ一頭微鏡を用いた膜脂質相 (lipid order) の測定では、血管内皮細胞に流れずり応力が作用すると即座に形質膜の lipid order が流れずり応力の強さ依存性に減少し、特にカベオラ膜では lipid order が秩序液体相から無秩序液体相に遷移することが示された。一方、伸展あるいは低浸透圧刺激で細胞形質膜に伸展張力を与えると lipid order の増加が見られた。これは血流刺激が細胞膜の 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。また、蛍光消光回復法イメージングによる解析では、流れずり応力が形質膜の流動性を増加させる一方で、伸展張力は膜流動性を低下させることが示された。さらに同様の解析を人工脂質二分子膜巨大リポソームについて行った所、同様の傾向を観察した。これらの事実は力学的刺激に伴う膜反応が物理現象であることを示すと共に、膜物性の変化は様々な膜分子の活性化と関係することから、内皮細胞膜そのものが血流センサーとして働くことが考えられた。

4. 今後の展開

今回得られた知見は血管に留まらず、力学的環境に絶えず曝される様々な種類の細胞・組織の形態や機能の制御機構の解明にもつながり、遺伝情報と力学場を含む環境要因との相互作用から成り立つ生命現象の包括的理解にも役立つと思われる。血管内皮細胞の血流感知機構を明らかにすることは血流が増加する運動が生体の働きに及ぼす効果のメカニズムや血流状態がその病態に影響すると考えられている粥状動脈硬化症、動脈瘤、血栓症等の血管病の病態の理解に大きく寄与する。また、血流センシングを人工的に修飾できる手段が見つかるると新しい血管病の予防・治療法の開発につながる。これらは新たな研究分野としてのメカノバイオロジーの発展に貢献すると思われる。

5. 発表実績

学術論文

1. 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).
2. J. Ando and K. Yamamoto. Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **99**, 260-268 (2013).
3. A. Kamiya, M. Shibata, and K. Yamamoto. Assessment of myogenic power expenditure due to arterial wall smooth muscle contraction based upon the fractal nature of vascular trees. *Applied Mathematics*, **5**, 1750-1762 (2014).
4. S. Obi, H. Masuda, T. Shizuno, A. Sato, K. Yamamoto, J. Ando, Y. Abe, T. Asahara. Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **303**, C595-606 (2012).
5. K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, and J. Ando. Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca^{2+} waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 3477-3483 (2011).

招待講演

1. K. Yamamoto and J. Ando, "Endothelial cells sense shear stress through rapid changes in membrane physical properties" 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014), Kyoto, April 17, 2014.
2. K. Yamamoto, "Dynamic Mechanotransduction in Vascular Cells" Seminar in the TEMASEK Life Sciences Laboratory, National University Singapore, Singapore, December 5, 2013.
3. K. Yamamoto, "Flow detection and calcium signaling in vascular endothelial cells" Lecture in the Department of Bioengineering, Imperial College London, London, September 23, 2013.
4. K. Yamamoto and J. Ando, "Vascular endothelial cells respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases" 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, July 5, 2013.
5. K. Yamamoto and J. Ando, "Dynamic cellular mechanotransduction and nano-biomechanics" 8th Aso International Meeting (AIM), Kumamoto, May 17, 2013.