

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

山本 希美子*, 安藤 譲二**

*東京大学 大学院医学系研究科 システム生理学 [〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1]

**獨協医科大学 医学部医学科 生体医工学研究室[〒321-0293 下都賀郡壬生町北小林 880]

1. 緒言

血管内面を一層に覆う内皮細胞の働きは、ホルモンやニューロトランスマITTERなどの化学的メディエーターだけでなく、血流に起因する流れずり応力 (shear stress) や血圧に基づく伸展張力 (stretch) などの力学的刺激によっても調節を受けている。特に shear stress に対する内皮細胞応答は循環機能の恒常性の維持に加え、血流依存性の現象として知られている血管新生、血管のリモデリング、粥状動脈硬化の発症などにも深く関わっている。我々は内皮細胞膜の脂質ミクロドメインのカベオラから shear stress 依存的に内因性ATPが放出し、ATP 作動性のイオンチャネル P2X4 を介して細胞内へカルシウム (Ca^{2+}) が流入するメカノトランスダクション機構が血圧の調節や、血流依存性の血管拡張、血管のリモデリングに中心的な役割を果たしていることを見出してきた。本研究では、内皮細胞におけるメカノセンシング機構を明らかにすることを目的として、shear stress や stretch が誘発するカベオラを含む内皮細胞形質膜の挙動をリアルタイムで観察すると共に、細胞膜分子の活性化機構について検討した。

2. 実験方法

ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAECs) における膜脂質相 (lipid order) の変化を環境感受性色素 Laurdan と 2 光子顕微鏡によるイメージング法で解析した。細胞膜のリン脂質二分子層は規則正しく配列した結晶状態にあり、膜リン脂質のアシル鎖が配向して運動が制限される秩序液体相 (liquid-ordered phase : L_o) とアシル鎖の運動が活発な無秩序液体相 (liquid-disordered phase : L_d) の二つの相状態が存在する。 L_o から L_d に変化すると、Laurdan の極大吸収波長が 50 nm レッドシフトする性質に基づき、lipid order の指標となる generalized polarization (GP) 値を計算し、擬似カラー表示することで、 L_o と L_d の相状態を観察した。また、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) と dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) 、コレステロールを所定比率で混合して作製した人工脂質二分子膜リポソームにおいても同様の検討を行った。さらに、shear stress と stretch による lipid order の変化が血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2) と血小板由来増殖因子 (PDGFR) の活性化に及ぼす影響について検討する為に、VEGFR2 と PDGFR のリン酸化をウェスタン・ブロッティング法により解析した。

3. 実験結果

Laurdan を負荷した HPAECs の細胞膜では、 L_o と L_d が混在し、特に細胞膜辺縁に L_o が多く局在していた。カベオラのマーカー蛋白である caveolin-1 の発現と比較した所、 L_o 領域とほぼ一致することから、 L_o 領域がカベオラの指標となることが確認された。HPAECs に shear stress ($5\sim 20$ dynes/cm²) を負荷すると、即座に細胞膜の lipid order が減少し始め、 L_o から L_d に相転移した。Lipid order の減少率は shear stress の大きさに依存的で、可逆性であった。一方、シリコン製のチャンパーに接着させた HPAECs を一軸方向に 10% 伸展させる方法と、300 mosmol/L の等張液から 200 mosmol/L の低浸透圧溶液に交換することにより、HPAECs を低浸透圧膨張させ、形質膜に張力を与える 2 つの方法で stretch 刺激を負荷した所、lipid order が増大し、 L_o 領域が有意に増大した。また、人工脂質二分子膜リポソームでも、これら力学的刺激に伴う lipid order の変化が同様に観察されたことから、物理現象であることが示された。

さらに、HPAECs に shear stress を負荷すると VEGFR2 が、stretch を負荷すると PDGFR がそれぞれリン酸化する。HAPECs にコレステロール (100 μM , 4h) を添加して shear stress による lipid order の減少を阻害すると、shear stress 依存的な VEGFR2 のリン酸化が有意に抑制された。一方、細胞膜のコレステロールを除去する働きのある methyl β cyclodextrin (M β CD: 10 mM, 30min) の作用により stretch による lipid order の増大を減少させると、stretch 依存的な PDGFR のリン酸化が顕著に抑制された。これらの結果は細胞膜の物理的性質が細胞膜を足場とする膜タンパク質の活性化に影響することを示唆する。

4. 考察

これまで shear stress のセンシングには、細胞膜のイオンチャネルや増殖因子受容体、G 蛋白共役型受容体、細胞間あるいは細胞と細胞外基質との接着に関わる接着分子、アクチンフィラメントなどの細胞骨格、さらには細胞膜と連結した細胞外マトリックスであるグリコリックスや微絨毛のプライマリーシリアなど、細胞膜に存在するか、細胞膜と結合している分子の関与が提唱されてきているが、実際の役割はまだ確定していない。本研究の結果から、血管内皮細胞の形質膜自体がメカノセンサーとして働く可能性が考えられる。