実験技術

波動圧力負荷装置を用いた血管平滑筋細胞の
メカニカルストレス応答の解析

町田 拓自, 飯塚 健治, 平藤 雅彦

要約: 血管の機能は、生理活性物質や神経刺激のみならず血流及び拍動に伴うメカニカルストレスによっても調節されており、このメカニカルストレスの異常が循環器疾患の進展やさらなる関連疾患の発症に深く関わる。血管壁へ負荷されるメカニカルストレスは、大きくずり応力、伸展、圧力に分類できるが、この分野の研究においてはずり応力や伸展による細胞機能解析が先行している一方、圧力による細胞機能への影響は未だ不明な点が多い。血管内圧は、最高血圧と最低血圧の間を周期的に変動し、高血圧症や局所での病変部位においてはその範囲が大幅に変化する。そこで我々の研究室では、高血圧のモデルを想定する場合においても最高血圧と最低血圧をそれぞれ区別する必要があると考え、上限と下限を自由に設定することができ、さらにこれらの設定範囲の間で内圧が周期的に変動する波動圧力を培養細胞に負荷することができる装置（波動圧力負荷装置）を考案した。波動圧力負荷装置は、培養ディッシュが設置される加圧タンク、真空ポンプ、加減圧コントローラー、圧力トランスミッタならびにインキュベーターより構成される。加圧タンク内の圧力を圧力トランスミッタによりモニタリングし、圧力の下限に達すると加減圧コントローラーにより圧力が負荷され、上限に達すると圧力負荷を止めることでタンク内の細胞に周期的に圧力を負荷する。これまでにこの装置によって作製した収縮期高血圧を想定した高血圧モデル細胞において、細胞内エネルギー代謝が促進されて増殖が促進すること、また、インターロイキン-1 β 刺激による誘導型一酸化窒素合成酵素発現が抑制されること等の圧力による細胞応答の変化を見出した。圧力負荷による高血圧モデル細胞の機能を解明することで、治療薬の新たな作用機序の解明や新薬開発への足がかりとなるような知見が得られることが期待される。

1. はじめに

血管の機能は、生理活性物質や神経刺激のみならず血流及び拍動に伴うメカニカルストレスによっても調節されている。血管に負荷されるメカニカルストレスは、大きくずり応力 (shear stress)、圧力刺激 (pressure) および伸展刺激 (stretch) に分けることができる。血管の最も内側に存在する内皮細胞は、血管内腔の血流によって発生するずり応力などのメカニカルストレスを直接受ける。これまでのさまざまな検討から、培養血管内皮細胞へのずり応力の負荷あるいは伸展刺激は、内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) 発現を誘導し、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) を産生すること (1)、また NO と同様に血管拡張作用や血小板凝集抑制作用を有するプロスタグランジン I₂ (prostaglandin I₂: PGI₂) を産生すること (2, 3) が詳細に明らかにされており、このことから正常範囲におけるメカニカルストレスが、血管系の恒常性の維持の一端を担っていると認識されている。

血管中膜に位置する平滑筋細胞は、血管の最も内側に存在する内皮細胞とは異なり、血管内腔の血流によって発生するずり応力などのメカニカルストレスを直接受ける可能性は低い。一方、拍動に伴う血管径の変化によって発生する伸展刺激ならびに血管内圧の変動によって発生する圧力刺激については、血管平滑筋にも作用する重要なメカニカルストレスと考えられる。血管平滑筋細胞への伸展刺激は、タンパク質リン酸化経路を介して細胞増殖を促進すること (4) や、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) 発現を誘導すること (5, 6) が報告されている。圧力負荷による血管機能の変化については、実験動物から摘出した動脈血管の内部に培養液を灌流させて内

キーワード: 高血圧, 圧力ストレス, 血管平滑筋細胞, 誘導型一酸化窒素合成酵素, アンジオテンシン変換酵素
北海道医療大学 薬学部 薬理学講座 (〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757)

E-mail: tmachida@hoku-iryo-u.ac.jp 原稿受領日: 2017 年 7 月 29 日, 依頼原稿

Title: Analysis of vascular smooth muscle cell response to mechanical stress induced by pulsatile pressure-loading apparatus

Author: Takuji Machida, Kenji Iizuka, Masahiko Hirafuji

圧を一定の値に調整することにより作製した血管内圧上昇モデルにより, 圧力負荷に対する血管の応答を検討できることが明らかにされている(7). しかしながら, 血管平滑筋細胞がずり応力や伸展刺激を伴わない純粋な圧力負荷に対してどのような反応を示すかについては, 不明な点が多い.

日本高血圧学会高血圧治療ガイドラインの判定基準では, 140/90 mmHg 以上のどちらか一方, 又は両方の場合に高血圧と判定される. さらに, 年齢や合併症の有無によって, 降圧目標とされる収縮期血圧及び拡張期血圧が異なる. このことから高血圧のモデルを想定する場合においても最高血圧と最低血圧をそれぞれ区別する必要がある. そこで上限と下限を自由に設定することができ, さらにこれらの設定範囲の間で内圧が周期的に変動する波動圧力を培養細胞に負荷することができる装置(波動圧力負荷装置)を考案した. 本

稿では, 波動圧力負荷装置についての概略ならびにこの装置を用いて得られた知見についてその一部を紹介する.

2. 波動圧力負荷装置の概要

波動圧力負荷装置は, 培養ディッシュが設置される加圧タンク, 真空ポンプ(DAP-30, アルバック機工, 宮崎), 加減圧コントローラー, 圧力トランスミッター(KH25-1M3, 長野計器, 東京)ならびにインキュベーターより構成される(図1A). 培養インキュベーターの器内サンプル空気取り出し口にチューブを挿入し, 真空ポンプ, 加減圧コントローラーを介して, 加圧タンクに培養インキュベーターと同じ5%CO₂を含む大気を送る. 本研究室では, 加圧タンクとしてアクリル真空デシケーター(SB型, サンプラテック, 大阪)を用いている. 加圧タンク上部には大気の挿入口の他に,

図1 波動圧力負荷装置の構成

A: 波動圧力負荷装置の構成図. B: 加減圧コントローラー(写真). C: インキュベーター内の加圧タンク(左: 実物写真, 右: 構成図).

加圧タンク内の圧力を感知する圧力トランスミッタが接続されている。この圧力トランスミッタで、加圧タンク内の圧力を計測、電気信号に変換し、実圧をモニタリングする。加減圧コントローラーは、自作したものであり実圧をもとに任意の圧力で真空ポンプの稼働と停止を行う（図1B）。これによるタンク内の大気圧の変動が、設置されている培養シャーレ内の培養液の水圧の変動として細胞に圧力が負荷されることになる。例えば、加圧タンク内の圧力が80 mmHg以下になると真空ポンプを稼働させ、加圧タンク内に培養インキュベーターから大気を送り込むことで圧力を上げ、160 mmHgに達すると真空ポンプを停止させて圧力を下げるようにしておくと、80 mmHgと160 mmHgの間で圧力を繰り返し負荷できることになる。これはすなわち最高血圧のみが異常に高い収縮期高血圧を擬似的に再現することになり、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞で実験を行うことにより、収縮期高血圧を擬似的に再現した病態モデル培養血管細胞を作ることができる。本装置は、圧力の上限と下限を自由に設定することができるので、収縮期高血圧、拡張期高血圧の他、あらゆる種類の高血圧、または低血圧を再現した培養細胞を作製することができる。図2には、80 mmHgと160 mmHgの間で変動させた際の加圧タンク内の圧力変化を示した。

なお、加圧タンク内には、湿度を保つための滅菌精製水を入れた大きめのシャーレが設置してある。その上に加圧タンク内径より一回り小さいアクリル板を置き、その上に培養ディッシュ（複数枚可）を静置する（図1C）。その加圧タンクごと37°Cに調節したインキュベーターに入れることで、培養インキュベーターと同じ大気、温度、湿度の条件を再現している。また当然のことながら、加圧タンクに静置する細胞と同様の薬物処理等をした細胞を別に用意し、圧力負荷と同じタイミングで通常（常圧）のCO₂インキュベーター

図2 加圧タンクの内圧変化

下限を80 mmHg、上限を160 mmHgに設定して、収縮期高血圧を想定した環境を擬似的に再現した。

で実験したものをコントロールとする必要がある。

二酸化炭素は酸素に比べて溶解度が高い上に、本装置では培養細胞を用いるため通常の大気より高濃度（5%）の二酸化炭素を含んだ大気を負荷することから、圧力負荷により培養液中へのCO₂溶解が促進されると考えられる。しかし、この圧力負荷による培地中CO₂濃度によるpH変化は培地の緩衝作用により相殺されると考えられる。実際、圧力負荷直後の培養液のpHを測定しても変化が認められなかった。

3. 波動圧力負荷による血管平滑筋細胞機能の変化

1) 細胞増殖に及ぼす影響

血管壁に作用するメカニカルストレスは、動脈硬化の発症、進展に深く関与する。これは、結果的に血管壁の可塑性を減少させることから病態をさらに増悪させて悪循環を形成するのみならず、動脈硬化病変部位のプラーク破綻を介して虚血性の脳・心血管疾患を招く。多くの動脈硬化巣では様々な細胞が誘導、動員されるとともに病変部内においては血管平滑筋細胞の遊走や増殖が起こっている。

そこで我々は、血管平滑筋細胞の増殖能に及ぼす収縮期高血圧を想定した圧力負荷の影響を検討した。その結果、24時間にわたる波動圧力負荷は、ヒト大動脈平滑筋細胞（HASMCs）の細胞数を有意に増加させた（8）。同条件の圧力負荷は、TCA サイクル回転の指標の一つであるコハク酸脱水酵素活性を増加させることから（8）、波動圧力負荷による細胞内エネルギー産生の増大が細胞増殖と関連していることが考えられる。さらにHASMCsにおける波動圧力負荷が、細胞増殖に関与する extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を促進することも明らかにしている（9）。我々は過去に圧力変動のない160 mmHgの圧力負荷による細胞増殖がERK活性化阻害薬（PD 98059）により抑制されることを見出しており（10）、これらのことから波動の有無に関わらず160 mmHgの圧力は、細胞内でのERKの活性化を介して細胞増殖を引き起こすことが考えられた。以上より、血管における動脈硬化の進展過程において、純粋な圧力刺激がその要因の一つとして関与することが明らかとなった。

2) NO合成酵素に及ぼす影響

上述のように、ずり応力や伸展によるメカニカルストレスは、eNOSあるいはiNOSの活性化あるいは発現誘導に影響を与え、NOの産生量を調節する。血管平滑筋細胞においては、炎症性サイトカイン等の刺激により誘導されるiNOS由来のNOが生理学的あるいは

は病態生理学的に重要であることが示唆されている。しかしながら、高血圧や動脈硬化など多くの病態の発生や進展過程において、平滑筋細胞の iNOS がメカニカルストレスによってどのような影響を受けるかについては十分に明らかにされていない。そこで炎症病巣での血管の環境を再現する目的で、サイトカインの一種であるインターロイキン-1 β (interleukin-1 β : IL-1 β) を添加した条件下で、ラット初代培養血管平滑筋細胞を用いて iNOS 発現への収縮期高血圧を擬似的に再現した 80~160 mmHg の波動圧力負荷の影響を検討した。その結果、3 ng/mL の IL-1 β 刺激によって誘導される iNOS タンパク質及び mRNA 発現は、時間依存的に有意に抑制された (図 3A, B) (11)。一方、この実験において eNOS 及び nNOS の発現も微量ながら検出されたが、これらは圧力負荷による影響を受けなかった。

図3 圧カストレスは血管平滑筋細胞において IL-1 β 刺激による iNOS タンパク質発現誘導作用を減弱する
収縮期高血圧を想定した圧カストレスは、IL-1 β 刺激による iNOS 発現誘導作用を抑制した。A: IL-1 β および圧力負荷同時刺激後の時間経過による iNOS 発現量の変化、B: 各濃度での IL-1 β および圧力負荷同時刺激 24 時間後の iNOS 発現量、C: 圧力負荷による iNOS タンパク質発現抑制メカニズム。(A 及び B は文献 11 より転載)

また、正常血圧を擬似的に再現した 80~120 mmHg の波動圧力負荷は、IL-1 β 刺激による iNOS 発現に影響を及ぼさなかった。このことから、圧力負荷による iNOS 発現の抑制作用は、単に圧力負荷による細胞応答ではなく、最高圧力の高さあるいは最低圧力と最高圧力の高低差依存的に起こることが明らかとなった。さらに我々は、圧力負荷による iNOS 抑制作用の機序について検討した。IL-1 β 刺激による iNOS の発現には ERK の活性化とそれに続く nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化が必須である。血管平滑筋細胞において ERK の活性化は、IL-1 β 刺激後 1 時間以内に起こる一過性のものと、3 時間以降 24 時間まで続く持続性の活性化に分けられるが、iNOS 発現には持続性の ERK 活性化が関与している。そこで、IL-1 β 及び波動圧力の同時刺激 12 時間後における ERK-NF- κ B 経路の関与を検討した。その結果、80~160 mmHg の波動圧力負荷は、IL-1 β 刺激による持続性 ERK、I- κ B α 及びその下流にある NF- κ B の活性化全てを有意に抑制した(11)。従って、圧力負荷は IL-1 β 刺激による ERK-NF- κ B 活性化経路を抑制することで、iNOS 発現を抑制することが明らかとなった(図 3C)。

我々は、過去に脳血管障害及び本態性高血圧症のモデル動物である脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (stroke-prone spontaneously hypertensive rats: SHRSP) の胸部大動脈から単離、培養した血管平滑筋細胞での IL-1 β 刺激による iNOS 発現が、対照動物であるウィスター京都ラットの血管平滑筋細胞と比較して有意に低いことを見出しており(12)、上述の圧力負荷装置を用いたいわば実験的高血圧モデル細胞を用いた実験結果と SHRSP を用いた遺伝的高血圧モデル細胞での実験結果が一致している。血管内膜傷害部位では炎症性細胞が多く集積し、IL-1 β などのサイトカインにより血管平滑筋細胞で誘導される iNOS は、損傷を受けた血管内皮細胞での eNOS を介した NO 産生低下を代償する役割を担っていると考えられる(13)。従って、生体内において、炎症性細胞が多く集積しさらに圧力がより強く負荷される病巣部位、すなわち動脈硬化病変部位での NO 産生機能を維持するための治療法を検討する価値があると考えられ、その検討に本圧力負荷装置が有用であることが期待される。

3) アンジオテンシン変換酵素に及ぼす影響

臨床において繁用されているアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme: ACE) 阻害薬やアンジオテンシン II AT $_1$ 受容体拮抗薬は、いずれも動脈硬化や心血管リモデリングの抑制効果など、降圧以外にも多様な効果をもたらすことが明らかにされ始め、

現在もさまざまな観点から研究が行われている。そこで収縮期高血圧を想定した圧力を負荷した HASMCs を用いて、まず圧力負荷による ACE の変動について検討した。収縮期高血圧を想定した圧力を細胞に 3 時間負荷後、24 時間通常のインキュベーターで培養した細胞において、ACE 発現及び ACE 活性は圧力未負荷の細胞と比較して増加した(9)。また圧力負荷による ACE 活性の増加は、PD 98059 にて有意に抑制されることから、その機序には少なくとも ERK 経路が関与していることが考えられた(9)。本圧力負荷装置により作製した *in vitro* 高血圧モデル細胞において認められたこれらの結果は、高血圧モデルハムスターやラットにおいて血圧の上昇に伴い、心臓や動脈の ACE 発現が増加すること(14, 15) と一致しており、このことから本圧力負荷細胞は、ACE に関連する現象において *in vivo* での環境を再現できていると考えられる。

一方、ACE には細胞膜に局在して機能を発揮する ACE2 と呼ばれるアンジオテンシン II を切断するアイソザイムが存在し、この酵素を介して産生される angiotensin-(1-7) の生理学的役割にも注目が集まっている。我々は、本圧力負荷装置を用いて高血圧環境におけるヒト血管内皮細胞 (HAECs) における ACE2 の役割を明らかにすることを目的として検討を行ってきた。その結果、収縮期高血圧を想定した波動圧力負荷を 24 時間行くと、HAECs の細胞膜及び細胞質での

ACE2 発現が有意に増加した (図 4A) (16)。ACE2 は、ACE と同様に細胞表面に存在することで循環血中のアンジオテンシン II などのペプチドを加水分解するので、圧力負荷による細胞膜 ACE2 の増加は循環器病態の悪化に拮抗する役割を担っていることが考えられた。圧力未負荷の細胞においてアンジオテンシン II (1 μ M) の添加はまた、細胞膜及び細胞質での ACE2 発現を有意に増加した (図 4A)。しかし、圧力負荷環境下において認められた細胞膜での ACE2 発現の増加は、アンジオテンシン II の添加により有意に抑制された (図 4A, B)。さらにニフェジピンを添加すると、アンジオテンシン II による ACE2 の細胞質への移行を有意に抑制した (図 4B)。これらのことから、圧力負荷環境下において、アンジオテンシン II は ACE2 の細胞質への移行を促進し、ニフェジピンはこの移行を阻害することが明らかとなった。ニフェジピンによる HAECs 内の ACE2 局在への影響にカルシウムチャネル阻害作用が関与しているかについてはさらに検討する必要があるが、このことが循環器疾患に対するニフェジピンの新たな薬理作用機序である可能性を示した(16)。

4) 波動圧力負荷による細胞内シグナル伝達

これまで波動圧力負荷による細胞機能の変化を薬理的な観点からの検討を重ねてきた。一方、純粋な波動圧力負荷のみによる細胞内シグナル伝達の詳細に関してはこれから明らかにしなければならない課題であ

図 4 圧力ストレス存在下においてアンジオテンシン II は、血管内皮細胞の ACE2 局在を変化させる

アンジオテンシン II (Ang II) 及び圧力ストレスは ACE2 発現を増加させる。また、圧力ストレス存在下においてアンジオテンシン II は ACE2 の局在を変化させるが、その影響はニフェジピン (Nif) により消失する。A: アンジオテンシン II (1 μ M) および圧力負荷同時刺激 24 時間後の ACE2 発現量, B: アンジオテンシン II (1 μ M), ニフェジピン (1 μ M) および圧力負荷同時刺激 24 時間後の ACE2 発現量。(文献 16 より改変)

る。圧力負荷以外のメカニカルストレスに関しては、その細胞内情報伝達経路（いわゆるメカノトランスダクション）が解明され始めている。例えば心筋細胞における伸展刺激は、細胞膜の伸展感受性のイオンチャネルやインテグリン、また G タンパク質共役型受容体が活性化され、細胞内の Ras/Rho, ERK, PI3K などの活性化や細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が、多様な細胞反応を引き起こす(17)。

圧力ストレスを感知するセンサーの役割を担う分子が細胞膜に存在するかについても現段階では不明であるが、上述したこれまでの検討から圧力ストレスによる細胞機能の変化に少なくとも ERK が重要な役割を果たしていると考えている。HSMCs を用いた検討においては圧力単独負荷により ERK の活性化が認められた一方(9)、ラットから単離した血管平滑筋細胞において、圧力負荷は IL-1 β 刺激による ERK 活性化を抑制した(11)。今後は、圧力単独負荷時や、IL-1 β などの生理活性物質による ERK 活性化に対する圧力負荷の経時変化を詳細に明らかにすることを足がかりに、圧力負荷を感知するセンサーの同定を含めたメカノトランスダクションの全容を解明することが必要である。

4. おわりに

上述したように本波動圧力負荷装置は、圧力の上限および下限を自由に設定することができる特徴がある。これにより幅広い高血圧を擬似的に再現できると考えられ、例えば肺動脈由来の細胞を使用することで新しい視点での肺高血圧症モデル細胞なども作製できるものと考えられる。一方、現状において本装置の改良すべき課題としては、加減圧の周期が実際の心拍数に及ばないところである。本装置の加減圧の周期は最高でも 1 分間に 11 回程度である。この改良には、真空ポンプによる加圧性能の向上とともに、減圧にも何らかの装置を用いる必要があると考えている。

本装置は、血管系の研究のみならず圧力ストレスを受ける他の細胞、例えば骨格筋細胞を用いた研究にも

応用可能である。運動は、骨格筋の収縮と弛緩の反復であり、骨格筋の収縮自体が細胞自身の代謝活性や遺伝子・タンパク質発現に変化を与え、筋肥大など状況に応じた適応をもたらす。また、骨格筋は、糖をはじめ、身体のエネルギー代謝に大きな役割を果たしており、その機能異常が糖尿病を始めとする多くの代謝性疾患と深い関わりをもっている。実際、我々も本圧力負荷装置を用いて圧力変動のない 160 mmHg の圧力を持続的に負荷すると骨格筋細胞から分泌されるホルモンである myokine や、乳酸の輸送に関わる monocarboxylate transporter 4 が変動することを確認している(18, 19)。従って、本波動圧力負荷装置は、血管系のみならずより複合的な病態モデル作製の基盤となり得ると考えている。

謝辞：本研究開発の一部は、日本学術振興会若手研究 (B) 24790082, 26860061 及び 2015–2016 年度 北海道医療大学個体差健康科学研究所の研究助成による支援を受けたものであることを付記いたします。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Yamamoto K, et al. Nat Med. 2006;12:133-137.
- 2) Hanada T, et al. Life Sci. 2000;66:215-220.
- 3) Di Francesco L, et al. Circ Res. 2009;104:506-513.
- 4) Richard MN, et al. J Biol Chem. 2007;282:23081-23088.
- 5) Standley PR, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;281:E1165-E1171.
- 6) Shah MR, et al. Int J Mol Sci. 2013;14:4334-4348.
- 7) Broz S, et al. Acta Physiol Scand. 2000;168:113-117.
- 8) 飯塚健治, 他. 循環器ストレス学. 南山堂; 2010. p. 76-82.
- 9) Iizuka K, et al. Cardiovasc Drugs Ther. 2008;22:383-390.
- 10) Morita N, et al. Mol Cell Biochem. 2004;262:71-78.
- 11) Machida T, et al. Eur J Pharmacol. 2014;731:44-49.
- 12) Hirafuji M, et al. Life Sci. 2002;70:917-926.
- 13) Machida T, et al. J Pharmacol Sci. 2016;132:211-217.
- 14) Shiota N, et al. Hypertension. 1992;20:168-174.
- 15) Li P, et al. Hypertens Res. 2002;25:757-762.
- 16) Iizuka K, et al. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2009;10:210-215.
- 17) Friedrich, et al. Prog Biophys Mol Biol. In press.
- 18) Iizuka K, et al. J Pharmacol Sci. 2014;125:125-131.
- 19) Iizuka K, et al. Ann Clin Lab Sci. 2014;44:272-293.