◆ 総 説 ◆

メカニカルストレスの血管への作用

安 藤 譲 二*

Effects of Mechanical Forces on Blood Vessels

Joji ANDO*

生体はメカニカルストレスが作用する物理的環境に置かれている。生体外からの重力などのほかに生体内で発生する圧力、張力、摩擦力などのメカニカルストレスが作用する。生体の組織、細胞、分子の機能は多かれ少なかれメカニカルストレスの影響を受けており、メカニカルストレスが変化するとそれらの機能も変化する。こうした現象は既に19世紀末に指摘されており、Thomaが鶏胚の観察で血管形成が血流速度に、Wolffが骨の増殖が過重に依存することを報告している。これまで、血管や骨だけでなく心筋、歯根膜細胞、内耳有毛細胞、乳腺細胞、気道上皮細胞、皮膚など多くの組織・細胞がメカニカルストレスに反応することが観察されている。血管に働くメカニカルストレスと、それに対する血管細胞の反応は蛋白の選択的透過性や血管のトーンズの調節、血液の凝固・線溶活性や平滑筋の増殖の制御、あるいは白血球との接着現象など正常な血管機能の維持に重要な役割を果たしている。さらに血管の成長、新生、リモデリングや粥状動脈硬化病変の発生といった血流依存性に起こる現象にも深く関わっているのである。ここではとくに血流に起因するメカニカルストレスである流れずり応力の血管への作用についてわれわれが得た実験結果を中心に概説することにする。

Key words : endothelial cell, shear stress, hemodynamic force, gene expression, calcium signaling

血管に作用するメカニカルストレス

血管内面を一層に覆う内皮細胞には血流に起因する流れずり応力(壁剪断応力: shear stress)と血圧に基づく伸展張力及び貫壁性圧力といったメカニカルストレス(血行力学的応力)が作用する。ずり応力は内皮細胞を血流方向に歪ませる力となる(図1)。ずり応力(τ)の大きさは血液の粘性(μ)と速度勾配(ずり速度; du/dr)の積、 $\tau = \mu \cdot du/dr = 4\mu Q/\pi r^3$ (u は流速, r は血管の半径, Q は血流量, π は円周率)として計算される。ヒトの生理的条件の大動脈では10~20 dyne/cm²、一方、静脈では

1~6 dyne/cm²のずり応力が血管壁に作用する¹⁾。一方、血圧に基づく伸展張力は内皮細胞と平滑筋細胞を円周方向に引っ張り、貫壁性圧力は細胞を押つぶす力として作用する。心拍動に伴い血管径が伸展する割合はヒトの大動脈で9~12%、頸動脈で1~2%、大腿動脈で2~15%、肺動脈で6~10%と報告されている²⁾。

メカニカルストレス負荷実験

ずり応力の作用を *in vivo* で検討する場合、動静脈シャントを作成して血流を増加させるか、あるいは血管にクリップをかけて血流を減

* 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〔〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1〕
System Physiology, Dept. of Biomedical Engineering, Post Graduate School of Medicine, Univ. of Tokyo
〔7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033〕
Tel: 03-5841-3659 Fax: 03-5800-6928 e-mail: joji@m.u-tokyo.ac.jp

図1 内皮細胞に作用する流れずり応力

図2 培養細胞にずり応力を負荷する平行平板型装置

小させる実験が行われる。一方, *in vitro* では培養した内皮細胞に流体力学的に設計した流れ負荷装置を使って定量的なずり応力を作用させる実験が行われている。図2は平行平板型の流れ負荷装置である³⁾。カバースリップに培養細胞を付着させ、それをチャンバーに入れてガスケットを挟んで固定する。チャンバーの中をポンプを使って培養液を灌流すると図の計算式で示す強さのずり応力が細胞にかかる。回路全体を炭酸ガス・インキュベータに入れて 37°C, 5%炭酸ガスの環境で実験を行う。平行平板型以外には回転円盤粘度計に類似した回転円錐型⁴⁾、ガラス管やシリコン・チューブの内面に細胞を培養して流れを負荷するチューブ型⁵⁾などもある。ここで紹介するデータは主にこうした負荷装置を使った *in vitro* 実験で得られたものである。

ずり応力の内皮細胞への作用

形態・配列の変化

内皮細胞はずり応力に反応して形態・配列を変える。図3はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に 15 dynes/cm² のずり応力を 24 時間負荷した前後の位相差顕微鏡写真である。コントロールでは類円形で一定の配列を示さない細胞が、負荷後は形が細長くなり、その長軸を流れの方向と平行 (写真上、流れは左から右へ水平方向) に配列するようになる。こうした流れの刺激による形態・配列変化は可逆性で、細胞を再び静的培養条件に戻すと、ほぼ同じ時間で形態・配列が元に戻る。生体内の血管内皮の形態も血流の影響を受けており、血流が速くずり応力の強いところでは内皮細胞は紡錘形で長軸を血流方向に向けているが、血流が遅く乱流性のずり応力のところでは内皮細胞は類円形で

図3 ずり応力による内皮細胞の形態変化
ずり応力(15 dynes/cm²)を24時間、ヒト臍帯静脈内皮細胞に負荷すると形が類円形から紡錘形に変わり、その長軸を流れの方向に平行に向けて配列するようになる。

一定方向の配列を示さない⁶⁾。

こうしたずり応力による形態・配列変化は細胞骨格や接着斑蛋白の変化を伴う。実験動物で外科的に動静脈シャントや狭窄を作成してずり応力を増加させると、細胞の輪郭を描くように細胞辺縁部に多く分布していたアクチンフィラメントが消失し、かわって細胞内下部中央に血流方向に配列した長く太いアクチンフィラメントの束(ストレスファイバー)が出現する⁷⁾⁸⁾。この反応はずり応力の増加に対し、細胞がストレスファイバーを形成し細胞下マトリックスとの接着を強化することで剥離から身を守るためと考えられている。同様の現象は培養内皮細胞にずり応力を作用させる実験でも観察されている。ずり応力を培養内皮細胞に作用させるとストレスファイバーが細胞内に現れ、流れの方向に配列する⁹⁾。

内皮増殖能

ずり応力が作用すると内皮細胞の増殖能が変化する。動物の動静脈シャント手術で血流が約4倍に増加すると、血管径の増大がまだ起こらない時点で内皮細胞の密度が約2倍に増加することが観察されている¹⁰⁾。培養細胞では実験条件によって層流性のずり応力が内皮細胞の増殖を刺激する場合と、逆に抑制する場合が報告されている¹¹⁾¹²⁾。一方、乱流性のずり応力は内皮細胞の増殖を刺激する効果が認められている。ウシの大動脈内皮細胞に回転円錐型の装置で層流と乱流を負荷し³H-チミジンの取り込みを測定する実験で、層流のずり応力では変化が起こらないが、乱流のずり応力で³H-チミジンを取り込む細胞の比率が有意に増加する¹³⁾。

また、血管内皮はその一部が剥離しても速やかに剥離部周辺の内皮細胞が遊走・増殖して剥離部を修復する再生能を有している。こうした状況を模倣して培養内皮層の一部を人工的に剥離し、その後の再生の速さに及ばずずり応力の効果を観た実験では、ずり応力が内皮細胞の遊走を促進し、細胞分裂を刺激することが観察されている¹⁴⁾。

血管のトーンス

血圧を規定する血管のトーンスは神経系を介する中枢性調節の他に、血管内皮細胞や平滑筋細胞による局所性調節を受けている。血管内皮細胞による血管トーンスの調節には内皮細胞が産生する一酸化窒素(nitric oxide; NO)、プロスタサイクリン、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、アドレノメデュリン(AM)、エンドセリン、アンジオテンシン変換酵素といった多くの血管作動物質が関与している。ずり応力は概して内皮細胞における平滑筋弛緩物質の産生を促し、一方、平滑筋収縮物質の産生を抑制することで血管拡張の方向に作用する。

血流が増加すると血管が急性的に拡張する現

図4 ずり応力による内皮機能 (NO 産生) の変化
牛胎児大動脈内皮細胞にずり応力を負荷すると、細胞内 cGMP 量が増加する。この反応は NO 合成酵素の阻害薬である L-NMMA を投与すると消失するので、ずり応力により NO の産生が増加することが分かる。

象が起こるが、これは主に内皮からの NO の放出による¹⁵⁾。ずり応力が内皮の NO 産生を刺激することは培養内皮細胞を用いた実験でも示されている¹⁶⁾。ウシ胎児大動脈内皮細胞に平行平板型の流れ負荷装置でずり応力を細胞に作用させると NO 産生が増加して細胞内 cGMP 濃度が上昇する (図 4)。この反応の大きさはずり応力の強さに依存し、NO 合成の特異的阻害薬である L-NMMA の存在下で消失する。アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼの作用でつくられるプロスタサイクリンは強い平滑筋弛緩作用を有している。このプロスタサイクリン産生がずり応力により促進を受けるが、その反応は一過性である¹⁷⁾。同じく平滑筋弛緩作用のある CNP および AM の産生もずり応力で亢進する¹⁸⁾。一方、平滑筋収縮物質であるエンドセリン (ET) の内皮産生はずり応力に対して 2 相性に反応する¹⁹⁾²⁰⁾。すなわちずり応力が作用した初期には ET 産生は増加するが、その増加は一過性で、以降は逆に減少するのである。内皮細胞はアンジオテンシン I を強力な平滑筋収縮作用を持つアンジオテンシン II に変換する ACE を細胞膜に発現している。ずり応力は ACE の産

図5 TM の発現に及ぼす流れずり応力の効果
ずり応力をヒト臍帯静脈内皮細胞に作用させ、6 時間後および 24 時間後にフローサイトメトリーで細胞表面の TM の蛋白量を定量した。ずり応力で TM 量が増加した。

生を抑制するので²¹⁾、アンジオテンシン II が減少し、血管拡張に向かう。

内皮の抗血栓活性

内皮は血管内で血液凝固、血小板凝集が起こらないように高い抗血栓活性を発揮している。ずり応力は内皮の抗血栓活性を高める方向に作用する。例えば、ずり応力で増加するプロスタサイクリンや NO は共に強力な抗血小板凝集作用を有している。また、内皮細胞表面には糖蛋白トロンボモジュリン (TM) が発現している。TM はトロンビンと結合して、トロンビンのフィブリノーゲン凝固活性や血小板凝集活性を失わせ、同時に凝固因子を不活化するプロテイン C を活性化することで強い抗血栓活性を発揮する。この TM の発現がずり応力の強さに依存性に増強する²²⁾ (図 5)。また、抗血液凝固作用のあるヘパラン硫酸の産生もずり応力で増加する²³⁾。内皮はフィブリンを溶解するプラスミンの産生に関わるプラスミノゲン・アクチベータ (tPA) を分泌するが、この機能もずり応力により亢進する²⁴⁾。

図 6 ずり応力による内皮細胞の eNOS と ET の mRNA レベルの変化
ヒト臍帯静脈内皮細胞に 15 dynes/cm² のずり応力を 24 時間作用させたときの eNOS と ET の mRNA レベルの変化を示す。ずり応力は eNOS mRNA レベルの増加を、逆に ET mRNA レベルを低下させる。

増殖因子・サイトカイン産生

ずり応力は内皮の細胞増殖因子・サイトカインの産生を刺激する。増殖因子の PDGF (platelet-derived growth factor)²⁵⁾, HB-EGF (heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor)²⁶⁾, bFGF (basic fibroblast growth factor)²⁷⁾, TGF- β (transforming growth factor- β)²⁸⁾ やサイトカインの IL-1, IL-6 (interleukin-1, -6)²⁹⁾, 顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (granulocyte/macrophage colony stimulating factor; GM-CSF) の産生がずり応力で増加することが報告されている³⁰⁾。ずり応力による増殖因子やサイトカインの産生増加は血流依存性に起こる血管新生や血管のリモデリングに関わっている。

内皮と白血球との接着

血液中の白血球は内皮の上をローリングし、接着した後、内皮間隙をすり抜けて組織に入る。この現象は細胞表面に発現する接着分子の特異的結合を介している。これまでずり応力が接着分子の発現を修飾して両者の接着現象に影響を及ぼすことが分かっている。マウスのリンパ節の細静脈の内皮細胞にずり応力を作用させると

接着分子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の発現量が減少し、接着するリンパ球の数が減少する³¹⁾。接着分子に及ぼすずり応力の影響は内皮細胞の種類により異なり、ヒト臍帯静脈内皮細胞にずり応力を加えると VCAM-1 発現は変化せず、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) の発現が増加する³²⁾。

遺伝子発現の変化

ずり応力で内皮細胞機能が変化する際、その機能に関連した遺伝子の発現も変化することが多い³³⁾。図 6 はずり応力による NO 合成酵素 (eNOS) と ET の mRNA の変化を逆転写 PCR 法で解析した結果である。ずり応力により eNOS の mRNA レベルが増加し、一方、ET の mRNA レベルが低下していくのが観察される。

ずり応力で発現が促進される遺伝子としては tPA, PDGF, bFGF, HB-EGF, TGF- β , CNP, AM, c-jun, c-fos, c-myc, 単球走化蛋白 (monocyte chemotactic protein; MCP-1), ICAM-1, TM, 組織因子 (tissue factor; TF), 活性酸素の一つである O₂⁻ を不活化する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (super-oxide dismutase; SOD), 酸化した低比重リポ

蛋白を細胞内へ取り込む受容体 LOX-1 (oxidized LDL receptor), Integrin (α_v , β_1), 細胞間接着蛋白の Connexin 43, Hemeoxygenase, プロスタグランディン D2 合成酵素などがある。一方, ずり応力で発現が抑制を受ける遺伝子としては VCAM-1, ACE, ET 変換酵素-1 (endothelin-converting enzyme-1: ECE-1), β -tubulin folding cofactor D, ATP 作動性カチオンチャネルの P2X₄ などがある。

ずり応力による内皮遺伝子の発現調節には転写と, mRNA の安定化を介する機序がある。接着分子 VCAM-1 mRNA はずり応力で低下するが, これは遺伝子の転写が抑制を受けるために生じている。この反応には VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に存在する特定の配列 (TRE; tumor promoting agent response element; TGACTCA) が必須で, ここに変異を入れると転写抑制が消失する³⁴⁾。こうした配列をずり応力応答配列 (shear stress response element; SSRE) と呼んでいる。P2X₄ チャネル遺伝子の転写もずり応力で抑制を受けるが, これには転写因子 Sp-1 の結合部位が応答配列となっている³⁵⁾。一方, 転写の促進に関わる応答配列としては転写因子 NF κ B が結合する PDGF-B 鎖遺伝子の GAGACC³⁶⁾³⁷⁾, 転写因子 AP-1 が結合する MCP-1 遺伝子の TGACTCC³⁸⁾, 転写因子 SP 1 が結合する TF 遺伝子の GC rich region³⁹⁾, PDGF-A 鎖にある転写因子 Egr-1 (early growth response gene) の結合部位⁴⁰⁾ などが SSRE として報告されている。このように SSRE は単一ではなく遺伝子により異なっている。また, ずり応力で造血系サイトカインの GM-CSF mRNA レベルが上昇するが, これは転写の変化ではなく, mRNA の半減期がコントロール約 20 分から約 40 分と倍に延びるという mRNA の安定化を介している³⁰⁾。

定常流と拍動流

培養細胞にずり応力を負荷する実験では一定

の速度で灌流する定常流のほかに, 周期的に速度を変える拍動流を負荷することができる。実際, 定常流と拍動流の両方を負荷して比較した実験結果が報告されている。それによると, 同じ強さのずり応力の場合, おおむね定常流よりも拍動流の効果が大きい。流れによる内皮細胞の形態変化は拍動流のほうが強く現れ, 内皮細胞の食胞作用も定常流よりも 15 分ごとに拍動させた流れが促進効果が大きい。また, 拍動流によりプロスタサイクリンの産生が定常流の約 2.2 倍の増加を示すこと, c-fos mRNA の発現が拍動流のほうがより大きくなることが報告されている。

ずり応力の情報伝達

ずり応力により内皮細胞の形態・配列や多くの細胞機能が変化し, 同時にそれらに関連した遺伝子の発現が変わる事実は内皮細胞にずり応力を認識して, その情報を細胞内部に伝達する機構の存在することを示唆している。これまでの研究により図 7 に示すごとく多くの経路がずり応力により活性化されることが分かった⁴¹⁾。しかし, これらの経路が同等に活性化されるのか, あるいはどれかが一次的に活性化して他は二次的に活性化しているのかについては明らかになっていない。その最大の理由はずり応力を最初に感知する機構, センサー分子本体が分かっていないからである。現在のところ, センサー分子の有力な候補としてイオンチャネル, 接着分子, 細胞骨格などが挙げられる。

イオンチャネル

細いガラス管の内面に培養した内皮細胞をパッチクランプしずり応力を作用させると K⁺ チャネルの内向き電流, すなわちチャネルの開口確率が増加する。この反応がずり応力の強さに依存することから, K⁺ チャネルがずり応力センサー分子として働く可能性が示された⁴²⁾。K⁺

図 7 ずり応力で活性化される細胞内情報伝達経路

チャネルが開くと細胞膜が過分極するので、それが細胞外 Ca^{2+} の細胞内流入の駆動力となり情報伝達が起こると考えられている⁴³⁾。

最近、われわれは ATP 作動性カチオンチャネルのサブタイプである P2X_4 purinoceptor が内皮細胞に優勢的に発現して、ずり応力のセンサー分子として働いている可能性を示した⁴⁴⁾⁴⁵⁾。細胞外に ATP (250 nM) が存在する条件下でヒト臍帯静脈培養内皮細胞にずり応力を加えると強さ依存性に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇反応が現れる (図 8)。これは細胞外 Ca^{2+} の流入反応であり、アンチセンス・オリゴで P2X_4 の発現をノックアウトすると消失することから、ずり応力がこのチャネルを活性化して Ca^{2+} 流入を起こしたと考えられた。また、元来、 P2X_4 を発現せず、流れ刺激に反応しない HEK 細胞に P2X_4 の cDNA を導入するとずり応力依存性の Ca^{2+} 反応を起こすように変化した。これらの事実はリガンド作動性のチャネルである P2X_4 が機械刺激により直接あるいは間接的に応答することを示唆している。

図 8 内皮細胞におけるずり応力のカルシウム・シグナリング

細胞外 ATP (250 nM) の存在下で、流れずり応力の強さに依存した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇反応が現れる。

接着分子

内皮細胞がずり応力で変形を受けると、細胞と細胞下のマトリックスとの接着に関わっているインテグリン分子に機械刺激が加わる。この情報がインテグリンが連結している細胞内の接着斑 (focal contact) 蛋白を介して伝達される可能性が考えられている⁴⁶⁾。実際、インテグリン分子に抗体を使って磁性体ビーズを結合させ、

それを磁場で捻転, すなわち, インテグリンにずり応力を加えると細胞が固くなる反応を起こすことが観察されている⁴⁷⁾. この他, 内皮細胞の辺縁に分布する接着分子 PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) がずり応力でチロシンリン酸化を起こすことから, この分子がずり応力センサーとして働く可能性も指摘されている⁴⁸⁾.

細胞骨格

細胞の形態を保持しているのはアクチンフィラメントや微小管や中間径フィラメントなどの細胞骨格である. 細胞がある形態をとるのは, これらの分子間に力学的な均衡がとれていることを意味している. これを細胞のテンセグリティ (張力均衡) モデルと呼んでいる⁴⁹⁾. ずり応力で細胞が変形するとテンセグリティが新しい状態に移るときに, 細胞骨格が直接, ずり応力の情報を受け取る機構の存在が考えられる. 実際, ずり応力 (12 dynes/cm^2) を内皮細胞に作用させると中間径フィラメントが数ミクロン変移することや⁵⁰⁾, ずり応力による内皮細胞の形態・配列変化や血管収縮物質であるエンドセリンの分泌反応に細胞骨格が関わっていることが報告されている⁵¹⁾⁵²⁾.

まとめ

血管内皮細胞に血流情報をメカニカルストレスであるずり応力の変化として感知し, 細胞応答を起こすことで血管機能ひいては血液循環の恒常性を維持しようとする分子メカニズムのあることを述べた. 血管のサイズも血管壁にかかるずり応力の強さを一定に保とうとする内皮細胞の適応反応により調節されている⁵³⁾. このことは血管がもっとも少ない消費エネルギーで最大の血液を流すという効率の良い仕事を達成することにつながっている. すなわち, 血管の構造や機能の合理的な制御にメカニカルストレス

に対する細胞応答を介するフィードバック機構が働いているのである. これらは血管内皮細胞に限らず生体の組織を構成する細胞に普遍的に備わった機能かもしれない. これまでホルモンやオートコイドあるいはニューロトランスミッターといった所謂, 化学的刺激による細胞機能の制御が注目され多くの研究がなされてきた反面, メカニカルストレスについての研究は十分行われて来なかった. しかし, 今後, 生命科学においてメカニカルストレスに対する細胞応答の研究は益々その重要性を増すと思われる. それは, 生体機能の理解に留まらず, 新しい応用研究につながることを期待できるからである. 例えば, 前述したメカニカルストレスに対するセンサー分子は新しいバイオセンサーとして利用できるかもしれない. また, ずり応力応答配列を組み込んだ遺伝子を細胞に導入することで血流刺激を利用した細胞機能改変治療の開発も可能であろう. さらに, 培養細胞を使うハイブリット人工血管が高い強度を持ち, かつ生体の血行力学的条件にうまくマッチングするようにメカニカルストレスを加えながら作製するといった組織工学への応用も既に始まっている.

文 献

- 1) Kamiya A, Bukhari R, Togawa T: Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bull Math Biol* **46**: 127-137, 1984.
- 2) Dobrin PB: "Mechanical properties of arteries" in *The Mechanics of the Circulation*, eds. Caro CG, Pedley TJ, Schroter RC and Seed WA, Oxford University Press, New York, pp397-460, 1978.
- 3) Stathopoulos NA, Hellums JD: Shear stress effects on human embryonic kidney cells *in vitro*. *Biotechnol Bioeng* **27**: 1021-1026, 1985.
- 4) Nomura H, Ishikawa C, Komatsuda T, Ando J, Kamiya A: A disk-type apparatus for applying fluid shear stress on cultured endothelial cell. *Biorheology* **25**: 461-470, 1988.
- 5) Moore JE, Jr Burki, E Suciu, A Zhao, S Burnier, M Brunner, HR Meister, J-J: A device for subjecting vascular endothelial cells to both fluid shear stress and circumferential cyclic stretch. *Ann Biomed Eng* **22**: 416-422, 1994.
- 6) Nerem RM, Levesque MJ, Cornhill JF: Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomed Eng* **103**: 172-176, 1981.

- 7) Masuda H, Shozawa T, Hosoda S, Kanda M, Kamiya A : Cytoplasmic microfilaments in endothelial cells of flow loaded canine carotid arteries. *Heart and Vessels* **1** : 65-69, 1985.
- 8) Kim DW, Gotlieb AI, Langille BL : *In vivo* modulation of endothelial F-actin microfilaments by experimental alterations in shear stress. *Arteriosclerosis* **9** : 439-445, 1989.
- 9) Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr., Davies PF : The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* **103** : 177-184, 1981.
- 10) Masuda H, Kawamura K, Tohda K, Shozawa T, Sageshima M, Kamiya A : Increase in endothelial cell density before artery enlargement in flow-loaded canine carotid artery. *Arteriosclerosis* **9** : 812-823, 1989.
- 11) Eskin SG, Sybers HD, O'Bannon W, Navarro LT : Performance of tissue cultured endothelial cells. *Artery* **10** : 159-171, 1982.
- 12) Levesque MJ, Sprague EA, Schwartz CJ, Nerem RM : The influence of shear stress on cultured vascular endothelial cells : the stress response of an anchorage-dependent mammalian cell. *Biotechnol Prog* **5** : 1-8, 1989.
- 13) Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr : Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 2114-2117, 1986.
- 14) Ando J, Nomura H, Kamiya A : The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* **33** : 62-70, 1987.
- 15) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM : Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250** : H1145-H1149, 1986.
- 16) Korenaga R, Ando J, Tsuboi H, Yang W, Sakuma I, Toyo-oka T, Kamiya A : Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **198** : 213-219, 1994.
- 17) Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL : Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* **227** : 1477-1479, 1985.
- 18) Chun TW, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatusgu K, Korenaga R, Ando J, Nakao K : Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension* **29** : 1296-1302, 1997.
- 19) Malek A, Izumo S : Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* **263** : C389-C396, 1992.
- 20) Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y : Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161** : 859-864, 1989.
- 21) Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA Jr, Greene AS : Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res* **80** : 312-319, 1997.
- 22) Takada Y, Shinkai F, Kondo S, Yamamoto S, Tsuboi H, Korenaga R, Ando J : Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **205** : 1345-1352, 1994.
- 23) Arisaka T, Mitsumata M, Kawasumi M, Tohijima T, Hirose S, Yoshida Y : Effects of shear stress on glycosaminoglycan synthesis in vascular endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* **748** : 543-554, 1995.
- 24) Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV : Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* **243** : 1483-1485, 1989.
- 25) Hsieh HJ, Li NQ, and Frangos JA : Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am J Physiol* **260** : H642-H646, 1991.
- 26) Morita T, Yoshizumi M, Kurihara H, Maemura K, Nagai R, Yazaki Y : Shear stress increases heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA levels in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **197** : 256-262, 1993.
- 27) Malek AM, Gibbons GH, Dzau VJ, Izumo S : Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest* **92** : 2013-2021, 1993.
- 28) Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH : Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. *J Clin Invest* **95** : 1363-1369, 1995.
- 29) Sterpetti AV, Cucina A, Morena AR, Donna SD, D' Angelo LS, Cavallaro A, Stipa S : Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery* **114** : 911-914, 1993.
- 30) Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A : Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res* **82** : 794-802, 1998.
- 31) Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M, Kamiya A : Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am J Physiol* **267** : C679-C687, 1994.
- 32) Tsuboi H, Ando J, Korenaga R, Takada Y, Kamiya A : Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **206** : 988-996, 1995.
- 33) Ando J, Korenaga R, and Kamiya A : Flow-induced endothelial gene regulation. In "Mechanical Forces and the Endothelium", P.I. Lekes ed., Harwood Academic Publishers, London, pp111-126, 1999.
- 34) Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y, Kamiya A : Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol* **273** : C1506-C1515, 1997.
- 35) Korenaga R, Yamamoto K, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A Ando J : Spl-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* **280** : H2214-H2221, 2001.
- 36) Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF Jr., Gimbrone MA Jr : Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad*

- Sci USA **90**: 4591-4595, 1993.
- 37) Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA Jr, Collins T: Nuclear Factor- κ B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* **96**: 1169-1175, 1995.
 - 38) Shyy JY-J, Lin M-C, Han J, Lu Y, Petrim M, Chien S: The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8069-8073, 1995.
 - 39) Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GCN, Mackman N, Shyy JYJ: Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest* **99**: 737-744, 1997.
 - 40) Khachigian L, Anderson K, Halnon N, Gimbrone M, Resnick N, Collins T: Egr-1 activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-cain Promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2280-2286, 1997.
 - 41) Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**: 519-560, 1995.
 - 42) Olesen SP, Clapham DE, Davies PF: Haemodynamic shear stress activates a K^+ current in vascular endothelial cells. *Nature* **331**: 168-170, 1988.
 - 43) Nakache M, Gaub HE: Hydrodynamic hyperpolarization of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1841-1843, 1988.
 - 44) Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J: P2X4 receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol* **278**: H285-H292, 2000.
 - 45) Yamamoto, K, Korenaga R, Kamiya A, and Ando J: Fluid shear stress activates Ca^{2+} influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res* **87**: 385-391, 2000.
 - 46) Ingber D: Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* **3**: 841-848, 1991.
 - 47) Wang N, Butler JP, Ingber DE: Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**: 1124-1127, 1993.
 - 48) Masuda M, Osawa M, Shigematsu H, Harada N, Fujiwara K: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a major SH-PTP2 binding protein in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* **408**: 331-336, 1997.
 - 49) Ingber DE: Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* **59**: 575-599, 1997.
 - 50) Helmke BP, Goldman RD, Davies PF: Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circ Res* **86**: 745-752, 2000.
 - 51) Malek AM, Izumo S: Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* **109**: 713-726, 1996.
 - 52) Morita T, Kurihara H, Maemura K, Yoshizumi M, Nagai R, Yazaki Y: Role of Ca^{2+} and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ Res* **75**: 630-636, 1994.
 - 53) Kamiya A and Togawa T: Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* **239**: H14-H21, 1980.