◆技術講座◆

血管内皮細胞をひっぱる

—伸展刺激による血管内皮細胞リモデリング—

成 瀬 恵 治*

Stretching Cells: Stretch-Induced Morphological Changes and Its Intracellular Signaling in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Keiji NARUSE*

Key words: endothelial cells, stretch-activated ion channel, elastic silicon membrane

1. はじめに

生体内においてすべての細胞は何らかの物理的“ちから”を受けている。血管・心臓などの循環器系組織では血液から血流・血圧を受ける。モデル系として培養細胞が頻繁に使われるが、培養系に持ち込むと生体内でその組織・細胞が受けていた物理的“ちから”は消失してしまう、生体内で持っていた性質・形態を失ってしまう。

例えば、血管内皮細胞に加わる力として血流からのズリ応力、拍動による壁伸展などが考えられる。血管内で内皮細胞は血流方向へ整然とその細胞長軸を向けて並んでいるが、培養系に持ち込むといわゆる“敷石状”形態をとる。筆者は血管内皮細胞に加わる力のうちの伸展刺激に注目し、その受容機構・情報伝達に関して研究を進めてきた。本原稿では細胞に物理的な力を加えて“ひっぱる”装置について解説し、これまでに得られた知見を紹介する。

2. 方 法

細胞に物理的な力を与えるにはガラス棒で押したり、浸透圧を変えたりいろいろな方法が考えられる。しかし、細胞により定量的な再現性のある物理的な力を加えるために透明な伸展可能な医療用シリコン膜を基質として用いた。このシリコン膜上に細胞外マトリックスの一つであるファイブロネクチンをコーティングし、トリプシンで剥がした細胞をシリコン膜の上に播種した。接着性の細胞であればほぼどの細胞にも適用することができ、これまでに血管内皮細胞・血管平滑筋・骨格筋細胞・CHO・HEKなどの細胞を培養し“ひっぱって”いる。一枚のシリコン膜だけでは取り扱いにくいので、図1に示すように側壁もシリコン膜でできたシリコンチャンバーを最近では多用している¹⁾。底面積は自由を選ぶことができる。既存の機械として吸引をすることによりチャンバー底面を伸展するものが市販されているが、均一性・方向性などの点からみて不完全である。筆者はシリコン

* 名古屋大学医学部生理学第二講座〔〒466-0064 名古屋市昭和区鶴舞65〕

Pathology and Surgical Research, Children's Hospital, Harvard University〔Enders 910, 300 Longwood Ave, Boston, MA〕

knaruse@tsuru.med.nagoya-u.ac.jp

図1 伸展装置の説明
伸展装置の全景の写真 (A) と模式図 (B)。シリコンチャンバーの写真 (C) とその模式図 (D)

チャンバーに定量性・再現性よく伸展刺激を与えるためコンピュータコントロールのステッピングモーターとリニアガイドを組み合わせ、回転運動を直線運動に変換した (図1)。コンピュータのプログラムにより任意の周期・伸展率・加速度を与えることができる。

3. 実験結果

形態実験

シリコンは透明であるので位相差顕微鏡・微分干涉顕微鏡・蛍光顕微鏡などで細胞形態を観察することができる。生体内での血管拍動をシミュレートするために血管内皮細胞に周期的伸展刺激 (1Hz, 20%) を与えたところ図に示すような形態変化を観察することができた (図2A)²⁾。またこの時の細胞骨格系・細胞接着斑を蛍光抗体法により可視化した (図2B)。

細胞内カルシウム動態

使用するシリコン膜を十分薄くすればカルシウム蛍光色素を用いて細胞内カルシウム動態を

可視化することができる。装置の特性上、伸展中の細胞の様子を観察することはできないが、伸展刺激直後からのカルシウム動態を観察することができる²⁾。しかし、最近筆者が開発した装置により単一細胞が伸展される様子を可視化することができるようになった。

蛋白質・核酸実験

細胞内情報伝達系および、転写因子、蛋白合成などの生化学的・分子生物学的実験に供することもできる。周期的伸展刺激により惹起される形態変化に際して細胞内でのチロシンリン酸化が亢進することが判明した³⁾。周期的伸展刺激後約10分程度でチロシンリン酸化反応が観察され、paxillin, focal adhesion kinase (FAK), CASがチロシンリン酸化を受けることが判明し (図3)、また機械受容チャネルを通して流入したカルシウムが calcineurin, src を活性化することがわかった⁴⁾。

また、伸展刺激を加えた細胞から核酸を抽出することができ、ノザンプロットや RT-PCR に用いることができる。底面積が4 cm² のシリコ

図 2 シリコンチャンバー上に培養した血管内皮細胞の形態変化

A: 周期的伸展刺激 (矢印の方向へ 1Hz, 20%) を与えたときの同一視野の位相差像。

B: 周期的伸展刺激による細胞内構造の変化。ストレスファイバー (繊維状構造) と細胞接着斑蛋白 vinculin (点状構造) の二重染色像。

図 3 周期的伸展刺激による蛋白質チロシンリン酸化。

A: 抗リン酸化チロシン抗体による全細胞性分のウエスタンブロット。伸展刺激後、約 5 分程度からリン酸化亢進が観察され、約 20~30 分で最高値に達した。

B: 免疫沈降法により paxillin, focal adhesion kinase (FAK), CAS がチロシンリン酸化を受けることが判明した。

ンチャンバーを用いて周期的伸展刺激によるヒト血管内皮細胞におけるインテグリン $\beta 3$ サブユニットの発現を RT-PCR 法にて定量し

た⁵⁾ (図 4)。また、繊維芽細胞をもちいて cyclooxygenase-2 の発現を RT-PCR 法にて定量した⁶⁾ (図 5)。

図 4 周期的伸展刺激による蛋白質合成亢進。

A: 周期的伸展刺激により接着斑蛋白質 integrin β_3 が mRNA, 蛋白質レベルで増加した。

B: integrin β_3 抗体による蛍光免疫像。周期的伸展刺激によりドット状のシグナルが増加し、その分布状態も変化した。

図 5 RT-PCR 法をもちいた繊維芽細胞での cyclooxygenase-2 の発現。COX1, actin は周期的伸展刺激により変化しないが, COX2 は刺激後, 1 時間で mRNA レベル, 6 時間で蛋白質レベルでの増加が認められた。

4. おわりに

本稿では筆者が開発した細胞伸展装置を利用したこれまでの研究結果について概説した。この分野での最大の興味は伸展を感知する機構はなにかである。われわれは、イオンチャネルの一種である機械受容 (stretch-activated, SA) チャネルが細胞膜の伸展により活性化され、細胞外カルシウムが細胞内に流入することにより情報が伝達されると考えている⁷⁾。現在ではこの伸展装置の改良型がスカラテック (大阪) から市販されている。

文 献

- 1) 成瀬恵治, 曾我部正博: 細胞工学別冊「動脈硬化・高脂血症研究ストラテジー」, 90-94, 1997.
- 2) Naruse K, Yamada T, Sokabe M: Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch, *Am J Physiol*, **274**: H1532-H1538, 1998.
- 3) Naruse K, Yamada T, Sai X, Hamaguchi M, Sokabe M: Pp125^{FAK} is required for stretch dependent morphological response of endothelial cells, *Oncogene*, **17**: 455-463, 1998.
- 4) Naruse K, Sai X, Yokoyama N, Sokabe M: Uni-axial cyclic stretch induces c-src activation and translocation in human endothelial cells via SA channel activation. *FEBS Letters*, **441**: 111-115, 1998.
- 5) Suzuki M, Naruse K, Asano Y, et al.: Up-regulation of integrin beta3 expression by cyclic stretch in human umbilical endothelial cells, *Biophys. Biochem. Res Com*, **239**: 372-376, 1997.
- 6) Kato T, Ishiguro N, Iwata H, Kojima T, Ito, T, Naruse K: Up regulation of COX expression by uni-axial cyclic stretch in human lung fibroblast cells, **244**: 615-619, *Biophys Biochem Res Com*, 1998.
- 7) Naruse K, Sokabe M: Involvement of stretch-activated ion channels in Ca mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol*, **264**: C1037-1044, 1993.