B103 流れ刺激依存RhoGTPase活性変化に対する内皮細胞形態の影響

Effect of morphology of endothelial cell on flow-induced activation of RhoGTPases

○学 西尾 和真 (東北大・工)
正 坂元 尚哉 (東北大院・工)

正 植木 洋輔 (東北大院・工)
正 佐藤 正明 (東北大院・医工, 工)

Kazuma NISHIO, Department of Mechanical and Aerospace Engineering, School of Engineering, Tohoku University, Aramaki-Aoba 01, Sendai 980-8579

Yosuke UEKI, Department of Bioengineering and Robotics, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Naoya SAKAMOTO, Department of Bioengineering and Robotics, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Masaaki SATO, Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Biomedical engineering, Tohoku University

Key Words: Endothelial cell, Shear Stress, RhoGTPase, Rac1, FRET

1. 緒言

培養内皮細胞に流体せん断応力を負荷すると、流れ方向へ伸長・配向することが知られている。内皮細胞の形態と血管病理には密接な関係があると考えられており、流れ刺激に伴う内皮細胞の形態変化メカニズムについて様々な研究が行われてきた。これまでに内皮細胞に流れ刺激が焦点接着斑や細胞間接着に存在するメカノセンサ分子によって生化学的なシグナルに変換され、様々なシグナル伝達分子を介して細胞骨格の再構築が生じ、最終的に細胞の形態が変化するというプロセスが考えられている。しかしこのような形態変化プロセスは同一の力学場にさらされたすべての細胞において同時に生じるのではなく個々の細胞で応答が異なることが知られている。例えばSugaya ら⁽¹⁾は、初期状態で流れと直交方向へ伸長していた内皮細胞は、流れ負荷後に伸長に先立って収縮を生じることを報告している。従って、同一の流れ刺激を負荷した場合でも細胞の初期形態によって形態変化に差異が生じることが考えられる。このような細胞間の違い注目し、これを調べることで流れ刺激による配向メカニズムの解明につながる可能性がある。

形態変化プロセスにおいて重要な役割を果たすシグナル伝達分子は数多く存在する。その中で、特にアクチン細胞骨格の再構築、葉状仮足の形成を司る低分子量GTP結合タンパク質RhoGTPaseファミリーの一員であるRac1の活性変化は注目されている。Tzima ら⁽²⁾はRac1活性が流れ負荷後30分で最も上昇し、その後流れ負荷以前の活性状態まで低下することや、Rac1の活性上昇が流れ下流方向の細胞端部で局所的に生じることを報告している。この報告から、Rac1の活性上昇が葉状仮足形成を伴った細胞伸長を促進することが考えられる。しかし初期形態の異なる内皮細胞

のRac1活性変化の違いについてこれまでに調べた報告はない。

そこで本研究ではFRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) によるRhoGTPase活性モニタリング技術を用いて、流れ環境下におかれた内皮細胞におけるRac1活性の経時的変化を計測し、内皮細胞の初期形態に着目した解析を行った。

2. 実験方法

2-1 細胞培養および遺伝子導入

試料には継代数3-6代目のヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell : HUVEC) を用いた。HUVECをガラスベースディッシュ (φ35, AGCテクノグラス) 上にサブコンフルエントまで培養した後、リポフェクトアミン LTX (Invitrogen) を用いてHUVECにRaichu-Rac1⁽³⁾を遺伝子導入した。Raichu-Rac1は蛍光タンパク質であるCFP (Cyan Fluorescent Protein) およびYFP (Yellow Fluorescent Protein)を有したFRETプローブである。プローブ内のRac1が活性状態となると、CFP-YFP間の距離が短くなりFRET効率が上昇するため、CFPを励起した際のYFPとCFPの蛍光強度比 (YFP/CFP) を得ることによりRac1活性を計測することが可能である。

2-2 流れ負荷実験

実験装置の模式図を Fig. 1 に示す。培養液 (M199 (Hank's) + 0.5% FBS) をシリンジポンプ (KDS210, KD Scientific) を用いて灌流し、倒立型蛍光顕微鏡 (IX81-ZDC, オリオンパス) のステージ上に設置した平行平板型フローチャンバー内のHUVECにせん断応力を負荷した。流れ負荷時間を30分間、細胞に負荷されるせん断応力値を2 Pa にそれぞれ設定した。3CCDカメラ (ASHURA-RGB, 浜松ホトニクス) を用いて、流れ負荷開始10分前から1分間隔で画像を取得した。光源には水銀ランプを用い、CFPおよびYFP蛍光像をCFP/YFP/HcRed用トリプルバンド吸収フィルタ (Semrock) を介してそれぞれ取得した。Labview 8.6 (National Instruments) を用いシリンジポンプの動作および画像取得のタイミングの制御を行った。

2-3 画像解析

各時間で取得したYFP像およびCFP像を基に、画像

Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup

解析ソフトウェア AQUACOSMOS 2.6 (浜松ホトニクス) を用いて YFP/CFP 蛍光強度比像 (レシオ画像) を作成した。さらに細胞内の平均蛍光強度比を算出し, Rac1 活性度と定義した。

次に細胞の初期形態の計測を行った。画像解析ソフトウェア ImageJ 1.42 (National Institutes of Health) を用いて細胞の輪郭を相当楕円近似し, その長軸と流れ方向のなす角 (配向角 θ) を 0° から 90° の範囲で求めた。 θ が $0^\circ < \theta < 45^\circ$ を流れ方向に対して水平方向 (Parallel), $45^\circ < \theta < 90^\circ$ を流れ方向に対して垂直方向 (Perpendicular) とそれぞれ定義した。

3. 結果および考察

流れを負荷した内皮細胞のレシオ画像を Fig. 2 示す。水平方向に配向していた内皮細胞では流れ負荷開始後から Rac1 活性が上昇すると同時に流れ方向に葉状仮足を形成していた。一方, 垂直方向に配向していた内皮細胞では Rac1 活性の上昇は見られず, 流れに対して垂直方向への収縮を示した。

Rac1 活性度の時間変化を Fig. 3 に示す。水平方向の内皮細胞では, 流れ負荷開始直後から 5 分後程度まで急激な Rac1 活性上昇が生じた。その後緩やかな活性上昇が継続し, 流れ負荷後 30 分後では Rac1 活性が約 10% 上昇していた。一方, 垂直方向の内皮細胞では, 流れ負荷による Rac1 活性の上昇は見られなかった。

これらの結果から, 内皮細胞の初期形態によって流れ負荷依存 Rac1 活性の変化が異なることが明らかとなった。このことは, Sugaya らによって報告された, 初期形態による形態変化パターンの違いに合致する。また, 等しい大きさの流体せん断応力を負荷した場合でも, 細胞形態によってシグナル伝達経路の活性状態に差異が生じることを示している。この詳細なメカニズムについては現時点では不明である。しかし流れに対する配向性の違いにより細胞表面でのせん断応力分布に違いが生じることが予想される。その結果, 細胞間接着部や焦点接着斑に存在するメカノセンサ分子に加わる力に差異が生じ Rac1 活性上昇に変化が表れた可能性がある。

また, 垂直方向の細胞では Rac1 活性の上昇は見られなかったものの細胞収縮が観察された。このような細胞収縮の原因の 1 つとして, RhoGTPase ファミリーの一員でありストレスファイバーの収縮を司る RhoA の活性変化が考えられる。活性化 RhoA が Rac1 の活性化を阻害するという報告もなされており⁽⁴⁾, 細胞形態に応じて Rac1 と RhoA が互いに影響しながら活性を変化させることで, 流れ方向に伸長・配向していくメカニズムが考えられる。今後は, RhoA の活性変化に着目した実験および解析を進めていく予定である。

4. 結言

FRET による RhoGTPase 活性モニタリング技術を用いて, 流れ負荷環境下におかれた内皮細胞における Rac1 活性の経時変化計測を行い, 細胞初期形態に着目した解析を行った。その結果, 初期形態によって Rac1 活性が異なることが明らかとなり, 細胞形態によって力学刺激に対するシグナル伝達が異なることが示唆された。

謝辞

本研究は科学研究費補助金推進研究 (20001007) 及び特別研究員奨励費 (21-3835) の援助を受けて遂行した。また本研究で用いた Raichu-Rac1 プラスミドベクターは京都大学大学院生命科学研究科 松田道行教授から御提供頂いた。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- (1) Sugaya Y, et al, *JSME Int J Ser C*, 46, 1248-1255, 2003
- (2) Tzima E, et al, *EMBO J*, 21, 6791-6800, 2002
- (3) Itoh R, et al, *Mol Cell Biol*, 22, 6582-6591, 2002
- (4) Yamaguchi Y, et al, *J Biol Chem*, 276, 18977-18983, 2001

Fig. 2 YFP/CFP ratio images of Raichu-Rac1 in endothelial cells exposed shear stress (bar = $40\mu\text{m}$), (a) $0^\circ \leq \theta < 45^\circ$, (b) $45^\circ \leq \theta < 90^\circ$

Fig. 3 Time course of Rac1 activity in endothelial cells exposed to shear stress