

血管内皮のカルシウム・シグナリングを介した血流感知機構

山本希美子,^{*,a} 安藤 譲 二^b

Blood Flow Sensing Mechanism via Calcium Signaling in Vascular Endothelium

Kimiko YAMAMOTO^{*,a} and Joji ANDO^b

^aDepartment of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan, and ^bLaboratory of Biomedical Engineering, School of Medicine, Dokkyo Medical University, 880 Kita-kobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan

(Received June 15, 2010)

The structure and function of blood vessels adapt to environmental changes, for example, physical development and exercise. This phenomenon is based on the ability of endothelial cells (ECs) to sense and respond to blood flow. ECs are in direct contact with blood flow and exposed to shear stress. A number of recent studies have revealed that ECs recognize changes in shear stress and transmit signals to the interior of the cell, which leads to cellular responses that involve changes in cell morphology, cell function, and gene expression. Cultured human pulmonary artery ECs (HPAECs) showed Ca^{2+} influx via an ATP-operated cation channel, P2X4, in response to shear stress. We have recently found that shear-induced activation of P2X4 requires endogenously released ATP and that shear stress induced HPAECs to release ATP, which was mediated by cell-surface ATP synthase located in caveolae. To gain insight into its significance, we generated a P2X4-deficient mouse. P2X4^{-/-} mice do not exhibit normal EC responses to flow, such as Ca^{2+} influx and subsequent production of NO, a potent vasodilator. Additionally, vessel dilation induced by acute increases in blood flow is markedly suppressed in P2X4^{-/-} mice. Furthermore, P2X4^{-/-} mice have higher blood pressure than wild-type mice. Moreover, no adaptive vascular remodeling is observed in the P2X4^{-/-} mice. Thus, P2X4-mediated shear stress mechanotransduction plays an important role in the vascular homeostasis, including the control of blood pressure and vascular remodeling.

Key words—vascular endothelial cell; shear stress; mechanotransduction; Ca^{2+} signaling; nitric oxide

1. はじめに

血管内皮細胞は血圧の調節、血液の凝固・線溶、タンパクの選択的透過など、血管機能の制御に中心的な役割を果たしている。近年、こうした内皮細胞の働きがホルモン、サイトカイン、ニューロトランスミッターといった化学的刺激だけでなく、血流に起因する流れずり応力 (shear stress) などの力学的刺激によっても調節を受けることが明らかになってきた。Shear stress に対する内皮細胞応答は循環系の機能の恒常性の維持だけでなく、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ことから、盛んに研究が行われてきた。これまでわれわれは内皮細胞が shear stress を感知して情報を細胞内部に伝達することで様々な細胞機能の変化を起こすこと、また、その機能に関連した遺伝子の発現も変化することを明らかにしてきた。本稿では、内皮細胞が力学的刺激である血流によりその機能がどのように変化するのか、血流を感知する機構を中心に述べる。

2. Shear stress による内皮細胞の応答

2-1. 形態変化 血管内皮細胞は紡錘形だが、血管に接する血流が速い部分では長円形となり、その長軸が血流の方向に配向する。一方、血管の分岐部などで血流が遅く、二次流の発生する部分では類円形で一定の配向がみられない。このような内皮細胞の形態の違いを shear stress が決めていると考えられている。血流に伴う内皮細胞の形態変化は可逆

^a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), ^b獨協医科大学医学部生体医工学 (〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880)

*e-mail: k-yamamoto@umjn.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S52 で発表したものを中心に記述したものである。

的で、イヌの下行大動脈を切除し、元の血管軸と垂直になるように縫合すると、手術直後は内皮細胞の形態は血流と直角方向に向いているが、その後血流方向に再配向する。¹⁾ 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞は静的条件で培養するとその形態は類円形で一定の配向がないが、動脈レベルの shear stress (15 dyne/cm²) を作用させると、灌流液の流れの方向に伸展し、配列する。このときアクチンフィラメントの束であるストレスファイバーが流れの方向に配向することが観察されている。すなわち、shear stress に伴う内皮細胞の形態変化は細胞骨格の変化に基づいている。

2-2. 生理活性物質の産生 血流が増加すると血管が拡張することが知られているが、これには内皮細胞における生理活性物質の産生が関与している。Shear stress が内皮細胞に作用すると、平滑筋弛緩作用のある一酸化窒素 (NO)、プロスタサイクリン、アドレノメデュリン (AM)、内皮由来化分極因子 (EDHF)、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の産生が増加する一方、平滑筋収縮作用のあるエンドセリン (ET) の産生は減少することから、総合的には血管が拡張する。特に NO の働きは大きく、ウサギ腸骨動脈の *ex vivo* 実験において、灌流流量の増加に伴い血管径が増大するが、NO 合成阻害剤である L-NMMA を加えると消失することから、流れ刺激により血管内皮から NO が産生することが明らかになった。²⁾ また、筆者らは培養ウシ胎児大動脈内皮細胞に流れ負荷装置を用いて定量的な shear stress を作用すると、shear stress の強さに依存して NO の産生が増大することを観察した。^{3,4)}

2-3. 抗血栓活性 内皮細胞には血管内での血液凝固や血小板凝集を防ぐために抗血栓活性があるが、shear stress は内皮細胞の抗血栓活性を高める方向に作用する。Shear stress により増加する NO やプロスタサイクリンはともに強力な抗血小板凝集作用がある。さらに、内皮細胞膜に発現するトロンボモデュリン (TM) はトロンビンのフィブリンノーゲン凝固活性や血小板凝集活性を低下させ、凝固因子を不活化するプロテイン C を活性化する。筆者らは内皮細胞の TM 発現が shear stress の大きさと作用時間に依存して増大することを確認した。⁵⁾ また、抗血液凝固作用のあるヘパラン硫酸の産生が

shear stress で増加し、フィブリンを溶解するプラスミンの産生に関与するプラスミノゲンアクチベータ (tPA) の機能が shear stress により亢進することが報告されている。⁶⁾

3. Shear stress による遺伝子発現の変化

Shear stress で内皮細胞機能が変化する際にはその機能に関連した遺伝子の発現も変化することが多く認められている。DNA マイクロアレイで網羅的に解析すると、内皮細胞が発現する全遺伝子の約 3% が 15 dyne/cm² の shear stress に反応することが示された。⁷⁾ 経時的な反応パターンをクラスター解析すると、すぐに反応を開始する遺伝子から、かなり時間が経過した後に反応するものまで多様であることから、shear stress に対する内皮細胞応答は時間的なプロファイルを持った多数の遺伝子の反応カスケードにより成立していると考えられる。Shear stress による内皮遺伝子の発現調節には、転写と mRNA の安定化を介するそれぞれの経路がある。Shear stress により発現が上昇する遺伝子として、PDGF 受容体では転写因子の NF- κ B が、動脈内皮マーカーの ephrinB2 では Sp1 が関与する。⁸⁾ 一方、shear stress により発現が減少する遺伝子として、VCAM-1 では AP-1 が、⁹⁾ uPA では GATA6 が働く。¹⁰⁾ 血管の分化や発達に関与する転写因子 KLF2 も shear stress で活性化することが示された。また、shear stress に応答する GM-CSF や uPA では mRNA の安定化を介して遺伝子発現を調節する。^{10,11)}

4. Shear stress の感知機構

4-1. Shear stress の情報伝達 以上で述べた通り、内皮細胞が shear stress に応答する多くの事実から、内皮細胞が shear stress を感知し、その情報を細胞内に伝達する情報伝達機構が存在することが示唆される。Shear stress で活性化する情報伝達経路は多岐に渡るが、どの情報伝達経路が shear stress に一次的で、どの経路が二次的なのか、ある



山本希美子

東京大学大学院医学系研究科システム生理学教室講師。医学博士・工学博士。1964年福岡生まれ。早稲田大学理工学部卒業。東京大学大学院医学系研究科博士課程修了。1997年日本学術振興会特別研究員。2000年東京大学医学系研究科助手。2003年より現職。2006-2010年科学技術振興機構戦略的創造事業さきがけ研究員(兼任)。

いは、多くの経路が一斉に活性化することが shear stress の情報伝達の特徴なのかなど、未解決な点が多く残されている。この問題を解決するためには内皮細胞が shear stress を最初に感知する機構とそれに係わる分子を明らかにすることが最も重要である。これまで shear stress のセンシングに細胞膜のイオンチャネルや G タンパク共役型受容体、細胞間あるいは細胞と細胞外基質との接着に係わる接着分子 (VE-cadherin や PECAM-1 など) やインテグリン、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 glycocalyx や primary cilia などの関与が提唱されている。

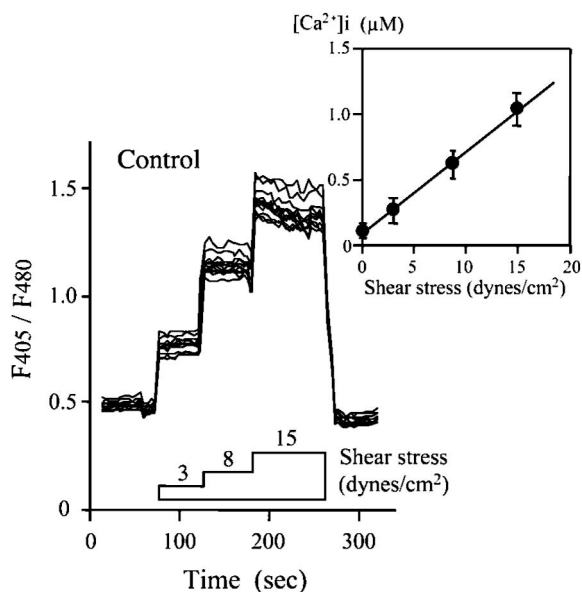


Fig. 1. Shear-stress-induced Ca²⁺ Responses in Cultured Human Pulmonary Artery Endothelial Cells

4-2. Shear stress のカルシウム・シグナリング

Shear stress の情報伝達にカルシウム (Ca²⁺)・シグナリングを介した機構が存在する。培養ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) に shear stress を作用させると、即座に細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇し、その程度は shear stress の大きさに依存する (Fig. 1)。この事実は内皮細胞が shear stress の強さの情報を細胞外カルシウムの細胞内への流入反応に変換して伝達することを意味する。Shear stress 依存的に上昇する Ca²⁺ は細胞外からの流入反応であることから、細胞膜に存在するイオンチャネルが関与している。筆者らはこのカルシウム・シグナリングに内皮細胞膜に存在する ATP 作動性カチオンチャネルである P2X₄ チャンネルが責任分子として働いていること¹²⁾ また、shear stress による P2X₄ チャンネルの活性化に内皮細胞から放出される ATP が必須であることを見出した^{13,14)}。

4-3. Shear stress の循環機能調節

Ca²⁺ を介した shear stress の情報伝達が生体の循環機能の調節に果たす役割を検討するため、P2X₄ チャンネルの遺伝子欠損マウス (P2X₄^{-/-}) を作製した⁴⁾ P2X₄^{-/-} の血管内皮細胞に shear stress を作用させると、野生型マウス (P2X₄^{+/+}) で観察される Ca²⁺ 反応が P2X₄^{-/-} では阻害された (Fig. 2)。また、P2X₄^{+/+} では shear stress 依存的に NO が産生されるが、P2X₄^{-/-} では NO 産生がほとんど起こらなかった (Fig. 3)。また、拳拳筋の細動脈の血流を増加させると、P2X₄^{+/+} では血管拡張反応が生じたが、P2X₄^{-/-} ではその反応が顕著に抑制された (Fig. 4)。全身に NO 合成阻害剤である L-

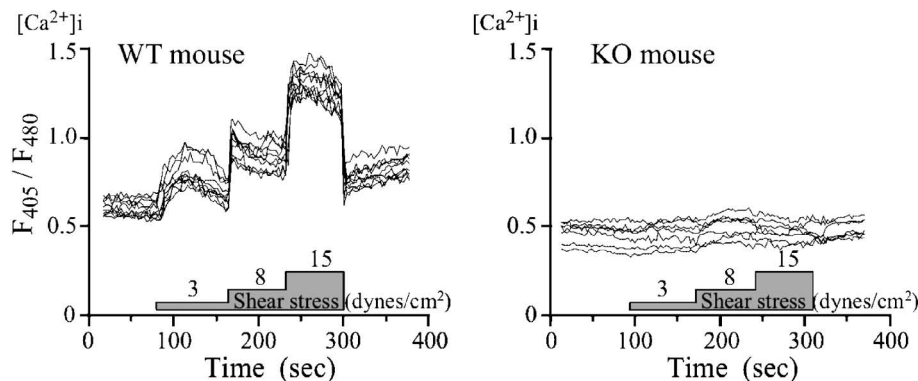


Fig. 2. Impaired Shear-stress-induced Ca²⁺ Responses in Cultured Endothelial Cells from P2X₄ Knockout Mice
WT mouse, wild-type mouse; KO mouse, P2X₄ knockout mouse.

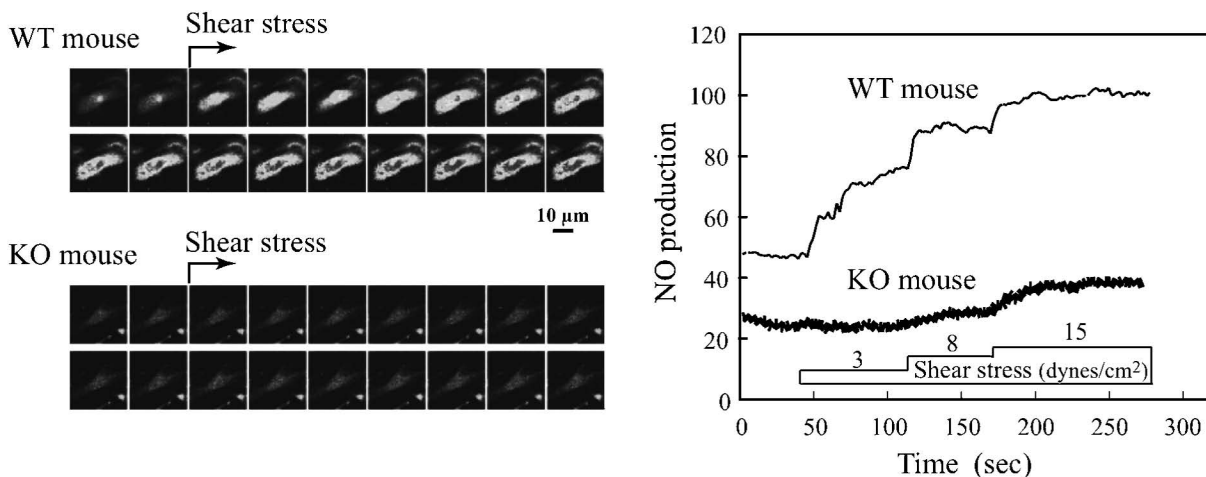


Fig. 3. Impaired Shear-stress-induced NO Production in Cultured Endothelial Cells from P2X4 Knockout Mice
 WT mouse, wild-type mouse; KO mouse, P2X4 knockout mouse.

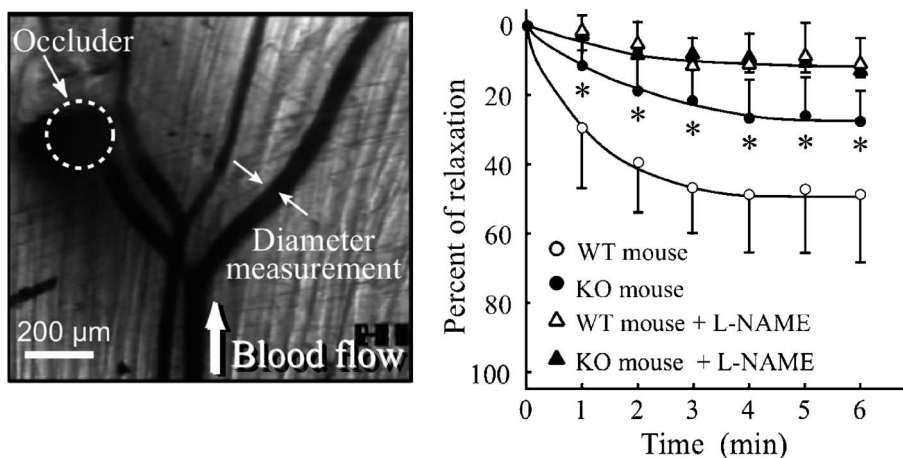


Fig. 4. Impaired Flow-induced Vasodilatory Response of Cremaster Muscle Arterioles in P2X4 Knockout Mice
 WT mouse, wild-type mouse; KO mouse, P2X4 knockout mouse. Data are expressed as the mean \pm S.D. * $p < 0.01$.

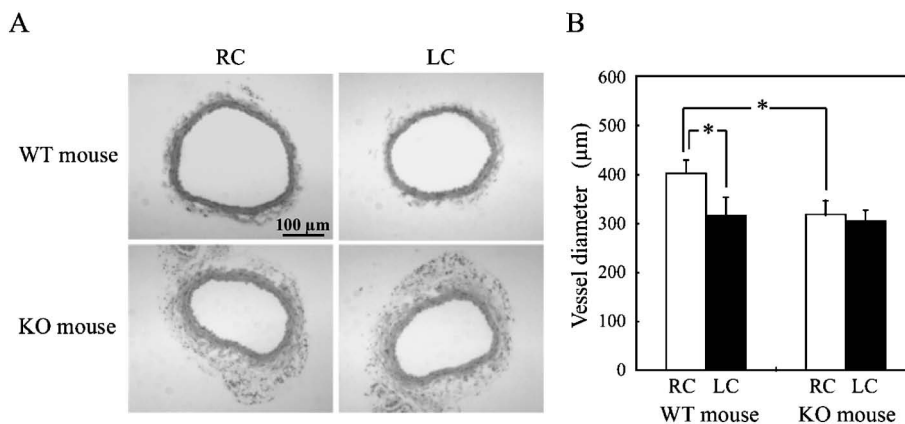


Fig. 5. Impaired Flow-induced Vascular Remodeling in P2X4 Knockout Mice
 The left external carotid artery of wild-type (WT) mouse and P2X4 knockout (KO) mouse were ligated for 2 weeks, and at the end of the 2 weeks the RC and LC were perfusion-fixed and analyzed. A, hematoxylin-eosin-stained cross sections of the right common carotid artery (RC) and left common carotid artery (LC). B, quantitative analysis of changes in lumen diameter. Data are expressed as the mean \pm S.D. * $p < 0.01$.

NAME を投与すると血管拡張反応が消失したことから、血流増加に伴う内皮細胞における NO 産生が関与していると考えられる。胸部大動脈に圧カトランスデューサーを挿入し、テレメトリー法で意識下の血圧を測定したところ、明らかに $P2X4^{-/-}$ が $P2X4^{+/+}$ より血圧が高いことが明らかとなった。また、外頸動脈を結紮することにより総頸動脈の血流を減少させ、血管のリモデリング反応を検討した。 $P2X4^{+/+}$ では血流減少に伴い総頸動脈の血管径が有意に減少するが、 $P2X4^{-/-}$ では変化がみられなかった (Fig. 5)。以上の結果から、 $P2X4$ チャネルを介した shear stress の情報伝達は内皮細胞の NO 産生を介して血管のトーンズの調節や血流依存的な血管拡張反応、リモデリング反応に重要な役割を果たしていると考えられる。

5. おわりに

血管内皮細胞は血流に伴う shear stress に様々な応答し、その機能に変化する。血流による内皮細胞機能の変化は遺伝子の発現変化を伴い、個体レベルでの循環機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになった。血流刺激の感知機構のさらなる解明を進めることにより、粥状動脈硬化症などの血管病の発症や予防に果たす役割が解明されるものとする。

REFERENCES

- 1) Flaherty J.-T., Pierce J.-E., Ferrans V.-J., Patel D.-J., Tucker W.-K., Fry D.-L., *Circ. Res.*, **30**, 23–33 (1972).
- 2) Cooke J.-P., Rossitch E., Jr., Andon N.-A., Loscalzo J., Dzau V.-J., *J. Clin. Invest.*, **88**, 1663–1671 (1991).
- 3) Korenaga R., Ando J., Tsuboi H., Yang W., Sakuma I., Toyooka T., Kamiya A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 213–219 (1994).
- 4) Yamamoto K., Sokabe T., Matsumoto T., Yoshimura K., Shibata M., Ohura N., Fukuda T., Sato T., Sekine K., Kato S., Isshiki M., Fujita T., Kobayashi M., Kawamura K., Masuda H., Kamiya A., Ando J., *Nat. Med.*, **12**, 133–137 (2006).
- 5) Takada Y., Shinkai F., Kondo S., Yamamoto S., Tsuboi H., Korenaga R., Ando J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1345–1352 (1994).
- 6) Diamond S.-L., Eskin S.-G., McIntire L.-V., *Science*, **243**, 1483–1485 (1989).
- 7) Ohura N., Yamamoto K., Ichioka S., Sokabe T., Nakatsuka H., Baba A., Shibata M., Nakatsuka T., Harii K., Wada Y., Kohro T., Kodama T., Ando J., *J. Atheroscler. Thromb.*, **10**, 304–313 (2003).
- 8) Obi S., Yamamoto K., Shimizu N., Kumagaya S., Masumura T., Sokabe T., Asahara T., Ando J., *J. Appl. Physiol.*, **106**, 203–211 (2009).
- 9) Korenaga R., Ando J., Kosaki K., Isshiki M., Takada Y., Kamiya A., *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, **273**, C1506–C1515 (1997).
- 10) Sokabe T., Yamamoto K., Ohura N., Nakatsuka H., Qin K., Obi S., Kamiya A., Ando J., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H2027–H2034 (2004).
- 11) Kosaki K., Ando J., Korenaga R., Kurokawa T., Kamiya A., *Circ. Res.*, **82**, 794–802 (1998).
- 12) Yamamoto K., Korenaga R., Kamiya A., Ando J., *Circ. Res.*, **87**, 385–391 (2000).
- 13) Yamamoto K., Shimizu N., Obi S., Kumagaya S., Taketani Y., Kamiya A., Ando J., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1646–H1653 (2007).
- 14) Yamamoto K., Sokabe T., Ohura N., Nakatsuka H., Kamiya A., Ando J., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H793–H803 (2003).