

静水圧負荷による HUVEC の形態および VE カドヘリン発現の変化

大橋 俊朗, 瀬川 圭, 坂元 尚哉, 佐藤 正明*

工学研究科 バイオロボティクス専攻 バイオメカニクス講座
生体機能工学分野 教授
E-mail: sato@bml.mech.tohoku.ac.jp



要旨

本研究では静水圧に対する内皮細胞の力学応答性を調べるため、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) に 25 mmHg および 100 mmHg の静水圧を負荷し細胞の形態と VE カドヘリンの発現の変化を評価した。静水圧負荷後、HUVEC は細胞中央に太いストレスファイバを発達させながら、一定の配向性はないが伸長し、不整な形態を示した。特に、25 mmHg を負荷した HUVEC はコントロール細胞や 100 mmHg を負荷した細胞と比較してより不整な形態を示した。静水圧負荷後、HUVEC はウシ大動脈由来内皮細胞 (BAEC) とは異なり複層化を示さなかった。蛍光染色像により、VE カドヘリン発現はコントロール細胞よりも静水圧負荷細胞において有意に減少していることがわかった。これらの結果から、静水圧により HUVEC の VE カドヘリン発現が局在化したことで細胞間においてランダムに多数の隙間が生じた結果、細胞形態において不整さを増した可能性が示唆された。

1. 緒言

血管内皮細胞は血流によるせん断応力、血管壁の収縮・弛緩による引張応力および血圧による静水圧を受けて形態や機能を変化させている。これまでにせん断応力と引張応力の影響に関する研究は数多く行われてきた。例えばせん断応力の研究においては、Kataoka ら[1]はせん断応力 2 Pa を負荷した内皮細胞の形態とアクチンフィラメントの観察を行った。その結果、せん断応力を負荷した細胞は流れ方向に伸長、配向した。また、静置培養した細胞では細胞周囲にアクチンフィラメントのデンスペリフェラルバンドが存在していたことに対し、せん断応力を負荷した細胞では細胞の形態変化に先立って流れ方向に沿ったアクチンフィラ

メントの太い束であるストレスファイバが形成されていた。これらの結果より、アクチンフィラメントは内皮細胞の形態変化に深く関与している可能性が示唆された。また、Masuda と Fujiwara[2]は細胞同士が全く接触していない低密度状態のウシ頸動脈由来内皮細胞にせん断応力 1 Pa を負荷した結果、細胞は形態変化を示さないことを報告した。このことから細胞がせん断応力に応答するには細胞間の接触が重要な役割を果たすことが示唆された。

以上の研究に比べて静水圧の影響に関する研究は極めて少ない。その中で Acevedo ら[3]はウシ肺動脈由来内皮細胞に最大 12 mmHg の静水圧を 7 日間負荷した。その結果、内皮細胞はランダムな方向に伸長し細胞長軸方向に沿ったストレスファイバの発達が観察された。さらに、生体内では報告されていない内皮細胞の複層化が観察された。一方、Sugaya ら[4]はウシ大動脈由来内皮細胞に静水圧 100 mmHg を 24 時間負荷した。その結果、静水圧負荷後の内皮細胞の形態は Acevedo らが報告したものと同様に伸長し複層化していた。これらの報告では、内皮細胞に対してその由来する部位の血圧に対応した静水圧を負荷しておりその絶対値は大きく異なる。Fisher ら[5]は内皮細胞が曝されている力学環境は血管の部位に依存することから、せん断応力に対する応答性は内皮細胞の由来する部位に依存する可能性があることを示唆している。したがって、静水圧に対する内皮細胞の応答性は十分解明されていないことに加えて、静水圧に対する応答性においても部位依存性が存在することが予想されるがその詳細は明らかではない。

そこで本研究では、静脈由来内皮細胞に静脈圧と動脈圧を想定して 25 mmHg と 100 mmHg の 2 種類の静水圧を負荷し内皮細胞の力学応答を評価した。内皮細胞の形態変化に加えて、アクチンフィラメントと細胞間接着タンパク質である VE カドヘリンの観察を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

ヒト臍帯静脈から内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)を単離した。内皮細胞の単離および培養については中浜ら[6]の方法に準じて行った。培養液には20%のウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma)および1ng/mlの塩基性線維芽細胞増殖因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF, Peprotech)を含むMedium 199(Invitrogen)を用いた。内皮細胞はゼラチンコートしたディッシュに播種した後、コンフルエント状態(細胞が密の状態)になった継代数2~5代目までの細胞を用いた。

2.2 静水圧負荷実験

静水圧負荷実験装置の概略を図1に示す。ダンピングチャンバ、フローチャンバ、リザーバ、ローラーポンプにより構成されている。フローチャンバは細胞培養ディッシュ(Asahi Techno)とI/Oユニットにより厚さ1mmのガスケットを挟み込み平行平板型流路を形成している。フローチャンバ内に培養液をゆっくり灌流させ、リザーバとフローチャンバの高度差により静脈圧に相当する25 mmHgと大動脈圧に相当する100 mmHgの2種類の静水圧をそれぞれ24時間負荷した。培養液の緩やかな灌流は細胞に酸素と栄養を供給するためである。このとき内皮細胞に負荷されるせん断応力は0.1 Pa以下になるよう調整した。ウシ頸動脈由来内皮細胞を用いた実験よりせん断応力0.1 Pa以

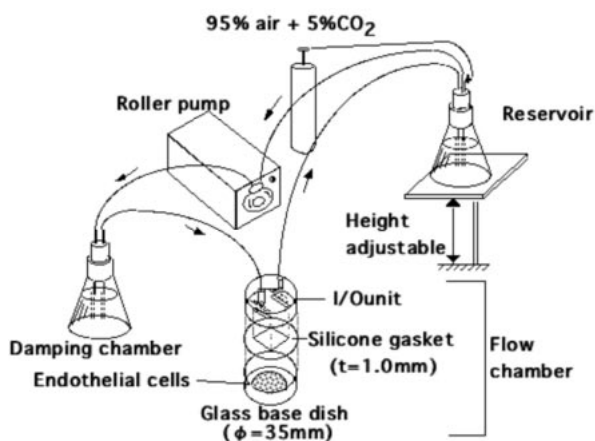


図1. 静水圧負荷実験装置の概略

下では細胞の形態変化は起こらないことが報告されている[7]。ダンピングチャンバを恒温水槽に浸すことで培養液を37°Cに維持し、リザーバに95%air/5%CO₂の混合ガスを供給することで培養液のpHを一定に保った。また本研究では24時間静置培養した細胞をcontrolとした。

2.3 アクチンフィラメントおよびVEカドヘリンの蛍光像観察

静水圧負荷実験終了後、10%中性緩衝ホルマリン液で細胞を固定した。続いて、リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))で2回洗浄した後、0.1%Triton-Xに5分間浸した。その後、PBS(-)で2回洗浄し、ローダミンファロイジン(Molecular Probes)、FITC結合VEカドヘリン抗体(Alexis Corporation)を用いて、アクチンフィラメントとVEカドヘリンをそれぞれ染色した。観察には倒立型システム顕微鏡(IX70, Olympus)を用いた。蛍光像から画像解析ソフトNIH Image 1.62を用いて細胞の形態を解析した。用いたパラメータはShape Index, Tortuosity Index[4]および配向角である。Shape IndexとTortuosity Indexは式(1)および(2)によりそれぞれ定義される。

$$\text{Shape Index} = 4\pi A/P^2 \quad (1)$$

$$\text{Tortuosity Index} = P/P' \quad (2)$$

ここで A は細胞の面積、 P は細胞の周囲長、 P' は相当楕円周囲長である。相当楕円とは面積および慣性モーメントが等しい楕円である。Shape Indexは伸長度を表し、細胞が細長くなるほど値は0に近くなり、円形であれば1である。Tortuosity Indexは細胞形態の複雑さを表すパラメータであり、細胞形態が複雑になるほど1より大きな値を示す。統計検定にはStudent's t-testを用いた。配向角は細胞を相当楕円に置換したときの長軸方向と流れ方向とのなす角であり、流れ方向を 0° として反時計回りに $+\theta$ 、時計回りに $-\theta$ として $\pm 90^\circ$ の範囲で定義した。各実験条件あたり3枚のディッシュから蛍光画像を取り込み、それぞれの画像から合計56個の細胞を抽出し形態測定を行った。

3. 実験結果

静置培養(control)および静水圧負荷後の内皮細胞のアクチンフィラメントとVEカドヘリンの蛍光染色像を図2に示す。control細胞において、アクチンフィラメントは細胞辺縁部に発達しデンスペ

リフェラルバンドが観察された(図 2a). VE カドヘリンは細胞の輪郭部に連続して分布し内皮細胞は隙間無く単層で存在していた(図 2b). 一方, 静水圧 25 mmHg 負荷後, アクチンフィラメントは細胞辺縁部に加えて中心付近において細胞長軸方向に沿って発達しストレスファイバを形成していた(図 2c). また細胞輪郭部において VE カドヘリンの発現が観察されない部位が局所的に存在していた(図 2d, 矢印). さらに, 静水圧 100 mmHg を負荷した細胞においても同様に, アクチンフィラメントが発達し(図 2e), 細胞輪郭部で VE カドヘリンの発現が観察されない部位が存在していた(図 2f, 矢印). いずれの場合においても内皮細胞は単層を維持しており複層化は観察されなかった.

図 2 において示したアクチンフィラメントと VE カドヘリン蛍光像の重ね合わせ画像を図 3 に示す. 細胞輪郭部でアクチンフィラメントの一端と VE カドヘリンが共局在している様子が観察された. 特にアクチンフィラメントが VE カドヘリンを介して隣接する細胞のアクチンフィラメントと共局在しているように観察された.

静水圧 25 mmHg 負荷の内皮細胞の Shape Index は control 細胞に比べて有意に減少した. また,

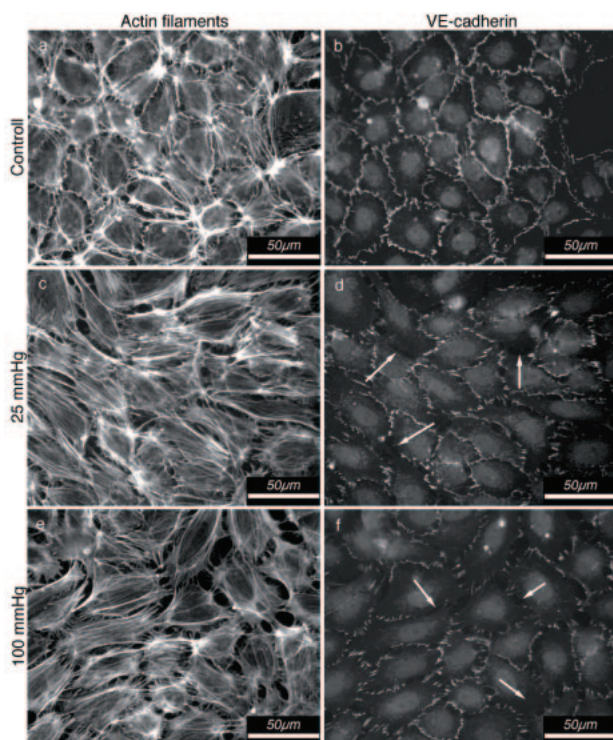


図 2 . 静水圧を負荷した HUVEC におけるローダミンファロイジン染色アクチンフィラメントと FITC 結合 VE カドヘリンの蛍光像

Tortuosity Index において, 静水圧 25 mmHg の内皮細胞は control 細胞と比べて有意な増加を示した. 一方, 静水圧 100 mmHg 負荷の内皮細胞では Shape Index は control 細胞と比べて有意差はないが平均値では減少傾向を示した. Tortuosity Index において, 静水圧 100 mmHg の内皮細胞は control 細胞と有意な差は見られなかった. 内皮細胞の配向角の変化を図 5 に示す. control 細胞では配向性は見られなかったが, 静水圧 25 mmHg 負荷の内皮細胞では $\pm 30^\circ$ の範囲に全体の約 45% が存在していた. また, 静水圧 100 mmHg 負荷の内皮細胞で $\pm 30^\circ$ の範囲に全体の約 42% が存在していた. 以上の形態パラメータを表 1 にまとめて示す.

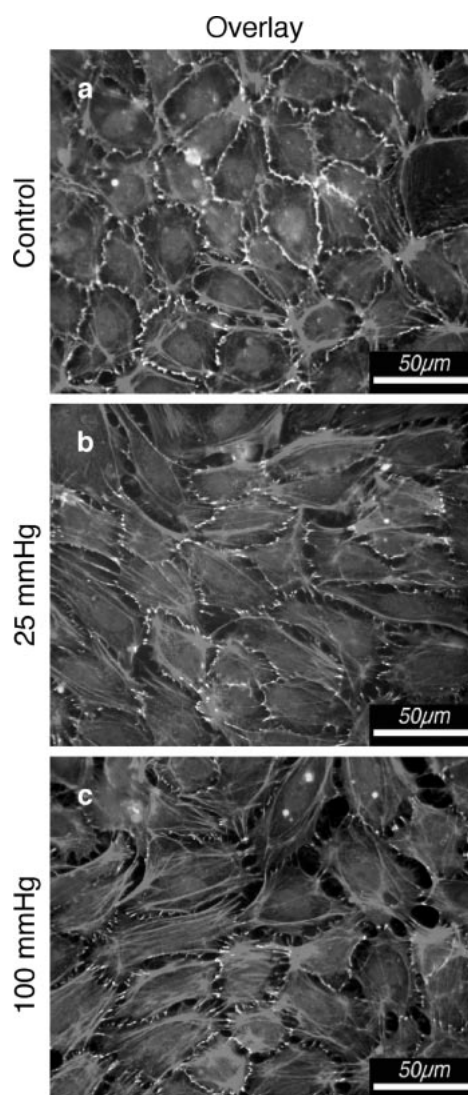


図 3 . 静水圧を負荷した HUVEC におけるローダミンファロイジン染色アクチンフィラメントと FITC 結合 VE カドヘリンの合成蛍光像

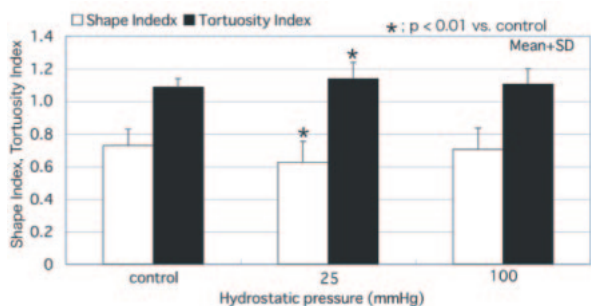


図4. 静水圧を负荷した HUVEC の Shape Index と Tortuosity Index

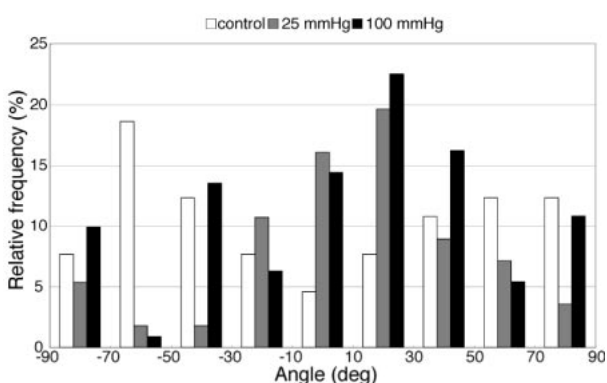


図5. 静水圧を负荷した HUVEC の配向角

4. 考察

静置培養および静水圧负荷後の HUVEC においてアクチンフィラメントと VE カドヘリンを観察した (図 2, 図 3)。静水圧を负荷した内皮細胞ではアクチンフィラメントが細胞の長軸方向に沿って発達しストレスファイバを形成した。肺動脈由来内皮細胞を用いた Salwen ら[8]や大動脈由来内皮細胞 (BAEC) を用いた Sugaya ら[4]の研究においても静水圧负荷後の内皮細胞はアクチンフィラメントの発達, ストレスファイバの形成を示した。これらの結果は本研究の結果と良く一致していた。また静水圧负荷後, 細胞輪郭部に VE カドヘリンの発現が観察されなかった部位が存在した。コンフルエント状態の内皮細胞には通常互いに VE カドヘリンを介して結合することで増殖抑制効果が働いている。この効果により, 内皮細胞は特徴的な敷石形状をの結果から以下のような仮説が考えられる。静水圧を内皮細胞に负荷すると, VE カドヘリン発現が局在化することより, 内皮細胞間の結合が弱まり, 増殖中の細胞に見られるような形態の不整さの増大が引き起こされる。例えば, Sumpio

ら[10]はウシ胸部大動脈由来内皮細胞に 40, 80 および 100 mmHg の静水圧を 9 日間にわたって负荷した結果, 静水圧负荷後の細胞の増殖能は圧力の増加とともに上昇したと報告した。細胞の由来部位が異なるため本研究と直接比較することはできないが, 増殖能の変化において VE カドヘリン発現の変化が介在している可能性も示唆される。しかしながら, これを証明するためには遺伝子導入技術を用いたアクチンフィラメントおよび VE カドヘリンの経時的観察を行うなどさらなる研究が必要である。本研究では図 3 において, 細胞輪郭部でアクチンフィラメントが VE カドヘリンを介して隣接する細胞のアクチンフィラメントと共局在している様子が観察された。細胞間結合部に一端を連結したアクチンフィラメントはケーブルを形成し, 単層を形成する細胞のある方向に圧力がかかるとその方向に沿って張力を発生し伝播する役割を果たすと言われている[9]。細胞間接着部の VE カドヘリンによる固定結合にアクチンフィラメントが連結されることで隣接する細胞間での力学刺激感知ネットワークが構成され単層を維持していると考えられる。

本研究の結果から, 静水圧を负荷し HUVEC においても BAEC と同様に VE カドヘリン発現が減少し細胞間接着に障害が生じている可能性が示唆されるが複層化は観察されなかった。この原因の一つとして, 内皮細胞の部位依存性の可能性がある。動脈内皮細胞と静脈内皮細胞では異なる力学環境に置かれている。動脈では血流の拍動性があり変動圧と血管拡張による引張応力が内皮細胞に作用している。一方, 血管の末梢抵抗などにより血流の拍動性が除去される静脈において, 内皮細胞に引張応力はほとんど作用しておらず血圧は静水圧となる。静脈では動脈に比べ血流速度だけでなく血圧も低下する。Fisher ら[5]は由来する血管部位により内皮細胞はせん断応力に対し異なる応答

Table 1 静水圧を负荷した HUVEC の形態パラメータ

Experimental condition	Number of cells	Shape Index	Tortuosity Index	Angle of cell Orientation [deg]
Control	56	0.73 ± 0.10	1.08 ± 0.05	-4.14 ± 55.99
25 mmHg	56	0.63 ± 0.13*	1.13 ± 0.10*	0.00 ± 41.86
100 mmHg	56	0.70 ± 0.10	1.10 ± 0.09	7.87 ± 45.24

* p < 0.05 vs Control

を示す可能性を報告した。このことから動脈由来内皮細胞と静脈由来内皮細胞では静水圧に対して異なる応答を示す可能性がある。また他の原因として、動物種の違いが挙げられる。本研究ではヒトの静脈内皮細胞を用いたが、従来の研究[4,8]において内皮細胞の複層化が観察されたのはウシ大動脈あるいは肺動脈由来内皮細胞である。ウシとヒトでは生体内において血圧、血流速度、心臓の拍動周期など血流環境が異なっており、内皮細胞に負荷される力学刺激も異なる。そのため、由来する動物種により内皮細胞は異なる力学応答特性を持っている可能性がある。さらに細胞外基質との接着性の影響等と併せて今後詳細な検討が必要である。

形態パラメータの解析結果より(図4, 図5), HUVECは静水圧100 mmHgよりも25 mmHgに対しより大きく形態を変化させることがわかった。静水圧25 mmHgは生体内においてHUVECが負荷される静水圧の大きさに近いために細胞がより顕著な応答を示したと考えられる。静水圧負荷後のHUVECにおいて、約40~45%の細胞に流れ方向への配向性が見られた。従来の研究において、流れ負荷内皮細胞は負荷された力学的刺激の大きさだけでなく、その方向も感知していることが報告されている[1]。本研究においてHUVECは静水圧を感知してアクチンフィラメントを発達させランダムな方向に伸張し、その上、わずかなせん断応力を感知して流れ方向へ配向したと考えられる。これまでに0.1 Pa以下のせん断応力ではBAECは形態的応答を示さないことが報告されてきた[7]。生体内において静脈の内皮細胞に負荷されるせん断応力は動脈のそれと比較して低いため、HUVECは大動脈由来内皮細胞に比べて低いせん断応力により敏感に応答したと考えられる。以上の結果から、内皮細胞の形態に影響を与えるせん断応力の大きさには内皮細胞の由来部位に依存した閾値の存在が示唆される。

5. 結言

本研究では、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)に対して静水圧25 mmHgと100 mmHgを負荷しアクチンフィラメントとVEカドヘリンの発現を観察した。その結果、HUVECは静水圧に反応して伸長した形態を示し、細胞長軸方向にストレスファイバを発達させた。さらに静水圧はVEカドヘリンの発現を抑制し、その結果、細胞周囲の

不整さを増大させることが示唆された。これらの結果は、静水圧25 mmHgにおいてより顕著であった。しかしながら、ウシ肺動脈および動脈由来内皮細胞で見られたような複層化は観察されなかったことから、内皮細胞の力学応答は細胞の由来血管あるいは由来動物種に依存する可能性が示唆された。

謝辞

本研究の一部は文部科学省グローバルCOEプログラム「新世紀世界の成長焦点に築くナノ医工学拠点」、21世紀COEプログラム「バイオナノテクノロジー基盤未来医工学」および特定領域研究「マイクロ・ナノバイオメカニクスの開拓」の援助を受けた。記して謝意を表す。

文献

- [1] Kataoka N, Ujita S, and Sato M. The effect of flow direction on the morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells. *Med Biol Eng Comput* **36**, 122-128, 1998.
- [2] Masuda M and Fujiwara K. Morphological responses of single endothelial cells exposed to physiological levels fluid shear stress. *Front Med Biol Eng* **5**, 79-87, 1993.
- [3] Acevedo AD, Bowser SS, Gerritsen ME, and Bizios R. Morphological and proliferative responses of endothelial cells to hydrostatic pressure: role of fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* **157**, 603-614, 1993.
- [4] Sugaya Y, Sakamoto N, Ohashi T, and Sato M. Elongation and random orientation of bovine endothelial cells in response to hydrostatic pressure: comparison with responses to shear stress. *JSME Intl J Series C* **46**, 1248-1255, 2003.
- [5] Fisher AB, Chien S, Barakat IA, and Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Lung Cell Mol Physiol* **281**, 529-533, 2001.
- [6] 中浜健一, 室田誠逸. ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養方法. *血管と内皮* **1**, 81-83, 1991.
- [7] Masuda M and Fujiwara K. The biased lamellipodium development and microtubule organizing center position in vascular endothelial cells migrating under influence of fluid flow. *Biol Cell* **77**, 237-245, 1993.

[8] Salwen SA, Szarowski DH, Turner JN, and Bizios R. Three-dimensional changes of the cytoskeleton of vascular endothelial cells exposed to sustained hydrostatic pressure. *Med Biol Eng Comput* **36**, 520-527, 1998.

[9] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson DJ. 細胞骨格. 細胞の分子生物学 第3版, 12, 2000.

[10] Sumpio BE, Widmann MD, Ricotta J, Awolesi MA, and Watase M. Increased ambient pressure stimulates proliferation and morphologic changes in cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* **158**, 133-139, 1994.