

バイオイメージングを用いた 血管内皮細胞の力学応答メカニズムの検討

佐藤 正明

医工学研究科 医工学専攻 生体機械システム医工学講座
生体力学研究分野 教授
E-mail: sato@bml.mech.tohoku.ac.jp



1. はじめに

内皮細胞は血流による流れ刺激、血圧変動に伴う壁の伸縮による繰り返し伸展刺激、血圧による静水圧刺激といった様々な力学刺激に絶えず曝されている(図 1-1)。近年、これらの力学刺激が内皮細胞の機能や形態に深く関わっていることが徐々に明らかになってきている。例えば、内皮細胞は比較的直ぐな血管内では血流方向へ伸長した楕円形の形態を呈しているが、血管の分岐部などでは配向方向に規則性のない敷石状の形態を呈しているため、血流によって内皮細胞に負荷される流れ刺激が内皮細胞の形態維持に重要な役割を担っているものと考えられている。さらに血管分岐部は動脈硬化症などの血管疾病の好発部位となっていることから、内皮細胞の形態と血管病理は密接に関わっていることが考えられている。そのため力学刺激が内皮細胞の形態におよぼす影響については、医学・工学などさまざまな学問分野で活発に研究が行われている。

培養内皮細胞に血行力学環境を模擬した力学刺激を負荷すると、内皮細胞はその形態や細胞骨格構造を変化させることは良く知られている。例えば流体せん断応力を負荷された内皮細胞は流れ方向へ伸長・配向し[1]、繰り返し伸展刺激を負荷された内皮細胞は伸展方向と直交方向へ伸長・配向する[2]。このような細胞形態の変化は単純な外力による変形とは異なり、細胞が自発的に力学環境に適応した結果であると考えられている。内皮細胞が力学刺激に対して応答しその形態を変化させる際には、1)力学シグナルから生化学シグナルへの変換(メカノトランスダクション)、2)細胞内シグナルの伝搬、3)細胞骨格の再編成という大別して3つのステップを経ると考えられている[3]。1)に関しては、細胞表面に存在する受容体やチャネル、焦点接着斑や細胞間接着を構成する分子がシグナル変換器の候補として挙げられているが、いずれが主

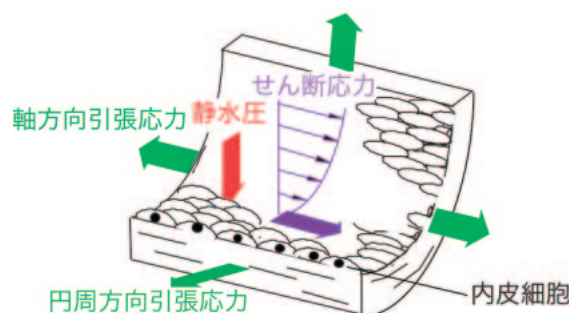


図 1-1. 血管内皮細胞が置かれる力学環境

たる機能を果たすのか、或いは複数の協調して機能するのかに関しては明らかになっていない。2)および 3)に関しては、どのようなシグナル経路を経て、細胞骨格再構成が活性化されるのかは徐々に明らかになりつつあるが、負荷された力学刺激の方向に対応して、特定方向に仮足形成やストレスファイバの形成が生じるメカニズムは依然不明である。そこで、我々はメカノトランスダクションと方向性を持った細胞の形態変化の關係に着目しており、マイクロスケール操作、分子生物学的手法、マイクロマニピュレーション技術などを用いてその解析に取り組んでいる。

我々は過去に細胞間接着のないスパーズ状態の内皮細胞に対してせん断応力負荷を行ったところ、コンフルエントな状態の内皮細胞にみられる形態的变化を示さなかったことを報告している[4]。従って、細胞間接着は内皮細胞の力学刺激に対する形態的応答過程において非常に重要な機能を有していることが考えられるが、その機能的役割については不明な点が多い。そこで、第一に細胞間接着部位の力学センサとしての役割に着目した。近年、細胞間接着分子の一種である PECAM-1(Platelet-Endothelial Cellular Adhesion Molecule-1)が力学刺激に対するセンサとして機能することが報

告されており[5], また内皮細胞がせん断応力に
応答して形態を変化させる上でも重要であることが
報告されている[6]. しかし, 細胞間接着部にのみ
力学的刺激を加え形態的応答を調べた研究はほと
んど行われていない. そこで, マイクロマニピュ
レーション技術を用いて細胞間接着部位を介して
内皮細胞に局所的に力学刺激を負荷し, その際の
内皮細胞の形態, 細胞骨格構造変化および細胞間
接着部位におけるシグナル分子の局在変化を調べ
た. 第二にせん断応力刺激を負荷された内皮細胞
の形態変化における細胞間接着部位の動的変化に
着目した. 特に内皮細胞における主たる接着分子
として機能する VE-Cadherin (Vascular Endothelial-
Cadherin)に注目し, 免疫蛍光染色法および蛍光タ
ンパク質融合ベクターを用いたライブセルイメー
ジングによって, VE-Cadherin のダイナミクスを観
察し, 細胞間接着の内皮細胞の形態・骨格構造変化
における役割を検討した.

一方, 細胞を細胞外基質と接着たらしめている
焦点接着斑およびそれらを連結しているストレス
ファイバ自身も力学刺激に対するセンサとして機
能することが示唆されている[7,8]. 伸展刺激を負
荷された内皮細胞では焦点接着斑の顕著な再配置
やストレスファイバの再配向が観察されるが, 刺
激負荷前初期状態のこれらの配置はランダムであ
り, 応答を解析することは困難であった. そこで,
マイクロマシニング技術を用いて規則正しい微細
構造を付与した弾性膜上に内皮細胞を播種して焦
点接着斑の形成パターンを予め制御し, これに繰
り返し伸展刺激を負荷した際の細胞の形態・構造変
化を観察することにより, 焦点接着斑およびスト
レスファイバの再配向と伸展刺激の関係を定量的
に評価することを試みた.

2. 細胞間接着を介した局所力学刺激に対する内皮細胞の応答

2.1 実験方法

2.1.1 細胞培養および遺伝子導入

ヒト臍帯静脈から単離した血管内皮細胞
(HUVEC)を用いた. 20%ウシ胎仔血清(Sigma), 10
 $\mu\text{g/l}$ ヒトbasic FGF (Austral biological)を添加した
M199(Invitrogen)培地を用いて細胞を培養した. 培
養フラスコ上で静置培養しコンフルエントに達し
た後, 内径35 mmガラスベースディッシュ上に細胞

を播種した. 細胞骨格の一つであるアクチンフィ
ラメントを可視化するため, アクチン分子に蛍光
タンパク質であるEGFP(Enhanced Green Fluorescent
Protein) 融合させたEGFP-アクチンベクターを細胞
に遺伝子導入した. ガラスベースディッシュに播
種した細胞が50-70%コンフルエントに達した状態
でリポフェクション法を用いてベクターを導入し
た. 導入後72時間後に細胞がコンフルエントに達
したことを確認し実験に用いた. 実験には継代数
3~6代目の細胞を用いた.

2.1.2 局所力学刺激負荷

局所力学負荷実験装置の概略を図2-1に示す. 共
焦点レーザ走査型顕微鏡(オリンパス) のステー
ジ上にCO₂インキュベータ(オリンパス)を取り付け
ることにより, 温度・湿度・ガス環境を制御しな
がら実験を行った. ガラスベースディッシュの中
で隣接してEGFP-アクチンを発現した2つの内皮細胞
を実験対象とした. まず3Dマイクロマニピュレー
タ(ナリシゲ)に取り付けたガラス製マイクロニード
ルを一方の細胞核側面に接触させ, 他方の細胞か
ら遠ざける方向に細胞核を10 μm 変位させること
により, 細胞間接着部位に引張り刺激を負荷した [9].
核を変位させた時刻を0分とし, 以後5分置きに60
分後まで細胞の蛍光画像および微分干渉画像を取
得した.

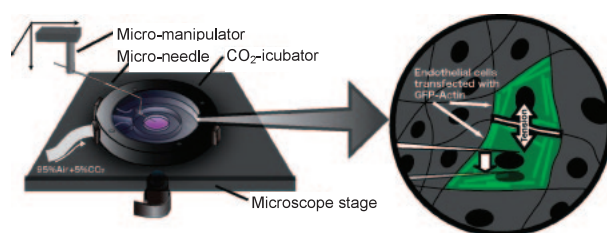


図 2-1. 局所力学刺激負荷実験の模式図

2.1.3 画像解析

細胞蛍光画像の解析を行うことにより, 局所力
学刺激負荷に伴う細胞の形態・ストレスファイバ
構造変化を定量的に評価した. ニードルが接触し
ている細胞はダメージを受けている可能性が考え
られるため, 他方の細胞に対して解析を行った.
画像処理ソフトウェアImageJ1.36b(NIH)を用いて細胞輪
郭をフリーハンドでトレースし相当楕円近似
を行った後, 引張り方向と長軸方向がなす角度を

細胞配向角，短軸長軸比を細胞伸長度として評価した．短軸長軸比は1.0のとき真円を表し，0により近い値が伸長した状態を表すパラメータである．次にKaunasら[10]の報告を参考にストレスファイバ構造の解析を行った．式(2-1)に示す係数行列 K_h および K_v からなるフィルタによる畳み込み処理を行うことによってストレスファイバの検出を行い，またSobelフィルタを用いた畳み込み処理を別途行うことによりストレスファイバ配向角を算出した．

$$K_h = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 2 & 0 & -1 \\ -2 & 0 & 4 & 0 & -2 \\ -4 & 0 & 8 & 0 & -4 \\ -2 & 0 & 4 & 0 & -2 \\ -1 & 0 & 2 & 0 & -1 \end{bmatrix}, K_v = K_h^t \quad (2-1)$$

細胞内全てのストレスファイバを単位ベクトル法によって合成し，ストレスファイバ平均配向角およびストレスファイバ平均合成ベクトル長を算出して評価パラメータとして用いた．ストレスファイバ平均合成ベクトル長は，細胞内でのストレスファイバ配向方向の統一性を表すパラメータであり，1.0が全てのストレスファイバが同一の方向に配向した状態を示し，0がストレスファイバの配向方向が完全にランダムな状態を表す．

図 2-2 に本手法によって蛍光画像より検出されたストレスファイバとその角度分布を示す．得られた各パラメータの時間変化を一元配置分散分析(one-factor repeated measures ANOVA)を用い検定し，さらに 0 分と 60 分の値を Bonferonni の多重比較を用いて検定した．

2. 1. 4 免疫蛍光染色

PECAM-1に負荷される力学刺激に依存して，細胞間接着に集積すると考えられているチロシンフォスファターゼの一種であるSHP-2の免疫蛍光染色を行った．内皮細胞を1 mMオルトバナジン酸ナトリウムで30分間処理した後，5分間局所力学刺激負荷を行った．その後，直ちに培地を吸い取り，1 mMのオルトバナジン酸ナトリウムを含む4%パラホルムアルデヒド中性緩衝溶液（和光純薬工業）を加えて10分間固定した．固定された細胞をPBS(-)（生化学工業）で3回洗浄し0.1%トライトンX-100（和光純薬工業）で処理した．その後再びPBS(-)で3回洗浄した後ブロックエース（大日本住友製薬）を加え室温で1時間放置してブロッキング処理を施した．次にマウスモノクローナル抗SH-PTP2抗体（Santa cruz biotechnology）を加え，4℃で12時間静置

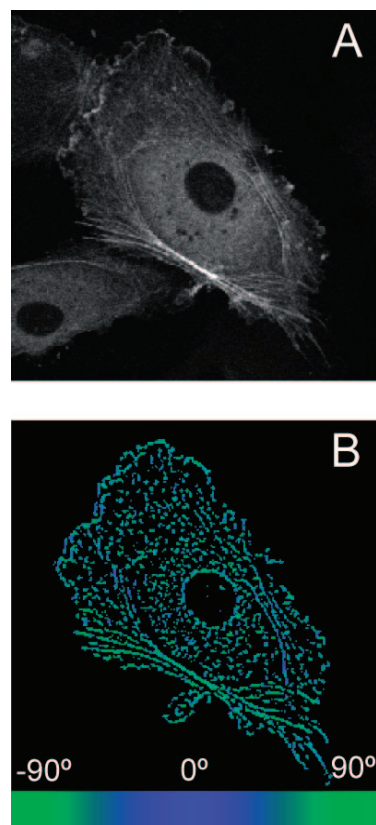


図 2-2. 画像解析によるストレスファイバの配向角検出 A: EGFP-Actin 画像, B: ストレスファイバ検出画像

した．PBS(-)で3回洗浄した後，AlexaFluor594標識抗マウスIgG抗体（Invitrogen）を加えて室温で2時間静置し，SHP-2を蛍光標識した．

2. 2 結果と考察

細胞間接着部位に引張り刺激を負荷した細胞のEGFP-アクチン経時観察結果の一例を図 2-3 に示す．図中 B の細胞の核を紙面下方向に変位させ，その後 A の細胞の形態・構造変化に着目した．刺激負荷前は水平に近い方向に伸長していた細胞が，垂直に近い方向へストレスファイバ発達をとめないながら配向していく過程が観察された．

局所力学刺激負荷に伴う各形態・ストレスファイバ構造パラメータについての時間変化を図 2-4 に示す．細胞配向角 (図 2-4A) およびストレスファイバ平均配向角 (図 2-4B) には時間経過に従った有意な変動が見られ，0 分と 60 分とを比較すると配向角は有意に減少していた．これは細胞およびストレスファイバが引張り方向に配向したことを示す．ストレスファイバ平均合成ベクトル長 (図

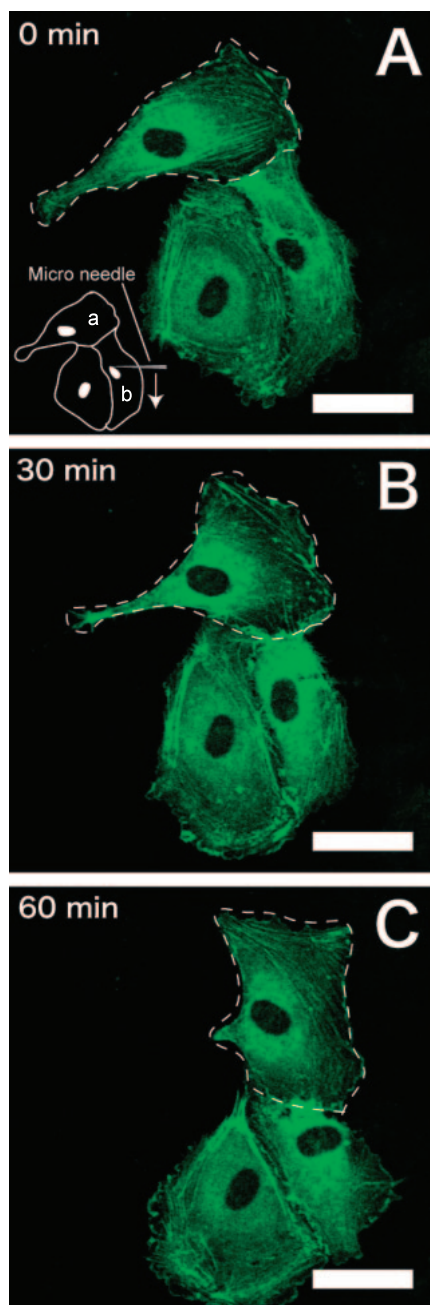


図 2-3. 局所力学刺激を負荷した内皮細胞の経時観察結果，白:EGFP-Actin，矢頭:マイクロニードル初期位置，矢印:マイクロニードル位置，bar = 40 μ m

2-4D)には，統計的な有意な変動は認められなかったものの，0 分と 60 分を比較すると合成ベクトル長は増加する傾向にあった．すなわち，局所刺激に伴って細胞内での各ストレスファイバの配向方向が揃う傾向にあることを示している．しかしながら，細胞の短軸長軸比(図 2-4C)には局所力学刺激に伴う変化は認められなかった．

局所力学刺激を負荷された内皮細胞における SHP-2 の蛍光染色像を図 2-5 に示す．大部分の

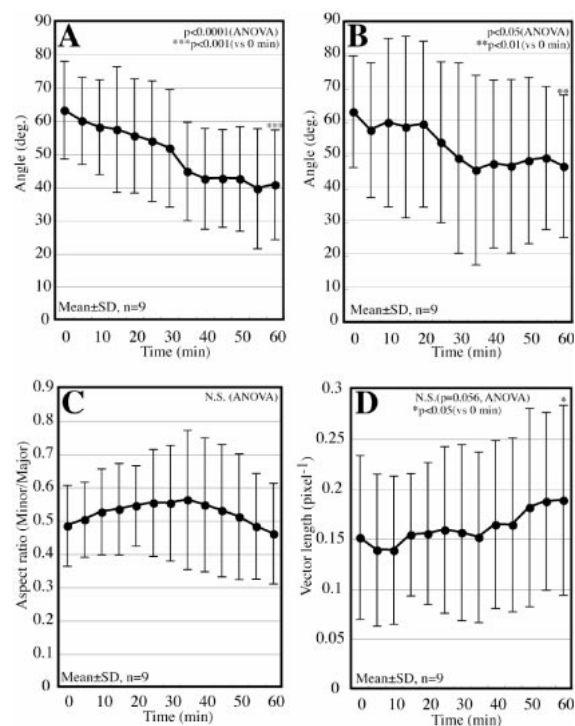


図 2-4. 形態・細胞骨格構造パラメータの経時変化．A:細胞配向角，B:SF 平均配向角，C:短軸長軸比，D: SF 平均合成ベクトル長

SHP-2 は細胞質に分布していたが，力学刺激が負荷された細胞間接着部位には特異的な SHP-2 の集積がみられた(図 2-5，矢頭)．

本研究では，細胞間接着部位を介して引張り刺激を負荷すると，SHP-2 が集積し，内皮細胞およびストレスファイバは引張り方向に配向する様子が観察された．この結果より SHP-2 の集積がみられた細胞間接着部位では PECAM-1 分子が力学センサとして機能したことが考えられる．したがって，力学刺激負荷により引張り刺激が作用した細胞間接着部位の位置が，細胞伸長およびストレスファイバ発達方向の決定に重要な意味を持つものと考えられる．過去に報告されているような力学刺激に対する内皮細胞の伸長に関しては，本研究では観察されなかった．伸長した細胞が配向方向を変える際には，一度収縮した後に再伸長することが知られている．したがって今回の 60 分の観察時間内ではこの再伸長を観察することができなかったものと考えられる．しかしながら細胞内ストレスファイバ配向方向の統一性は増加傾向にあった．すなわち，細胞形状の変化よりも顕著に特定方向のストレスファイバの発達もしくは消失が生じていることを示している．現在のところ，細胞間接着によって受容された力学刺激がどのような変換

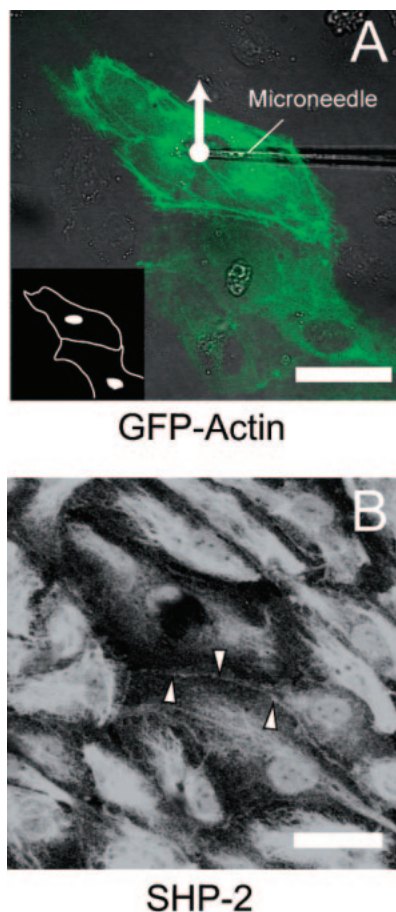


図 2-5. 局所力学刺激負荷した内皮細胞の Actin および SHP-2 蛍光画像, A: EGFP-Actin 像, B: SHP-2 染色像, 矢頭: 細胞間接着部位へ凝集した SHP-2

過程を経て, 細胞骨格の再構築, そして細胞形態変化へとつながるのかについては不明であるが, 現在我々は低分子量 GTP 結合タンパク質である Rho ファミリーの関与を検討しており, 今後は分子間相互作用をイメージングする FRET 法を用いることにより, 力学刺激受容部位からの空間的なシグナルの伝搬を解析することを予定している。

また, 本研究では隣接した細胞から, 細胞間接着部位に引張り刺激を負荷することを試みたが, 細胞膜や基質との焦点接着部位に負荷される力学刺激の影響を完全に排除することはできない。これらの要素にもメカノトランスデューサとしての機能が備わっていると考えられているため, 今後は他の要素を阻害した状態での実験や, 磁気ピンセットなどを用いた手法によって, より局所的な力学刺激負荷実験を行っていく予定である。

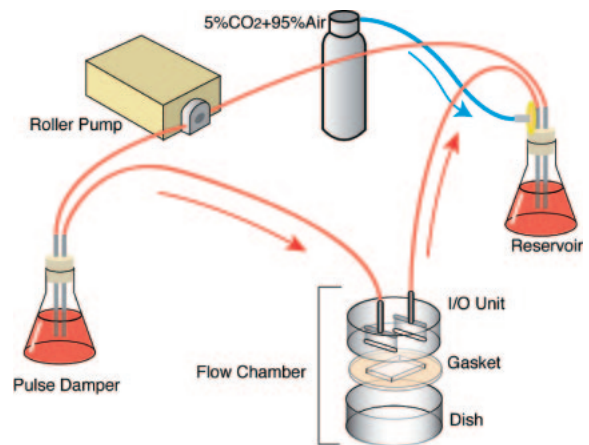


図 3-1. せん断応力負荷装置の模式図

3. せん断応力負荷内皮細胞における VE-Cadherin のダイナミクス

3.1 実験方法

3.1.1 細胞培養

2.1.1 項と同様の方法で培養したヒト臍帯静脈内皮細胞を使用した。

3.1.2 せん断応力負荷実験

図 3-1 にせん断応力負荷装置の模式図を示す。ダンピングチャンバ, フローチャンバ, リザーバ, ローラーポンプをシリコンチューブで接続し, 培養液を灌流することで, 細胞に 2 Pa のせん断応力を負荷した。実験中は恒温水槽によって培養液を 37°C に保温して実験系の温度を一定にした。また, 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。

3.1.3 免疫蛍光染色

流れ負荷実験後, 細胞を 2%パラホルムアルデヒド/0.2%Triton-X により固定し, PBS(+)で 3 回洗浄した。引き続きブロッッキングを行った後, 抗 VE-Cadherin 抗体 (Santa cruz) 及び Alexa Fluor488(Molecular probes)結合二次抗体を用いて VE-Cadherin を染色した。またローダミンファロイジン(Molecular probes)によりアクチンフィラメントを染色した。固定染色後, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の蛍光観察を行った。

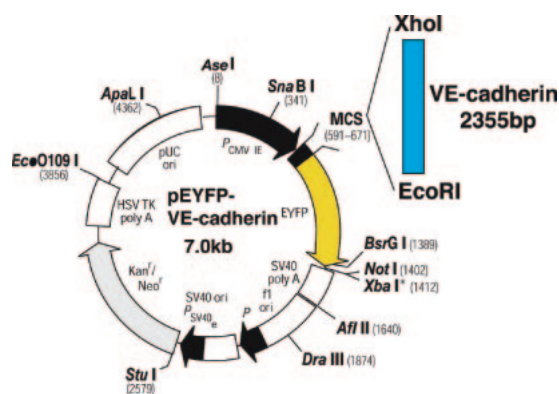


図 3-2. pEYFP-VE-Cadherin のマップ

3. 1. 4 画像解析

観察した画像から細胞形状を配向角及び短軸長軸比によって解析した． 2. 1. 3 項と同様の方法で細胞輪郭に対して相当楕円近似を行い，流れ方向を 0° として，細胞配向角および短軸長軸比をそれぞれ定義した．

3. 1. 5 Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) – VE-Cadherin ベクターの作製及び観察

Navarro ら[11]の方法に従って EYFP-VE-Cadherin ベクターを作製した(図 3-2)．そしてリポフェクション法を用いて内皮細胞への遺伝子導入を行った．静置培養と流れ負荷の 2 条件で EYFP-VE-Cadherin を発現した内皮細胞を観察した．

3. 1. 6 FRAP による VE-Cadherin の動的挙動の推定

細胞内での VE-Cadherin 分子の動的挙動を推定するために，FRAP(Fluorescent Recovery After Photobleaching)を行った．この手法は蛍光タンパク質を強力な励起光によって強制褪色させた後，蛍光強度の回復から分子の動的挙動を計測する方法である．EYFP-VE-Cadherin を発現した静置培養した内皮細胞の細胞間接着部に， $13.2 \mu\text{m}$ 四方の関心領域 (ROI) をを設定し，この領域に最大出力の波長 515 nm レーザを 15 秒間照射して EYFP-VE-Cadherin の蛍光を強制褪色させた．その後，5 秒間隔で蛍光輝度の変化を観察した．

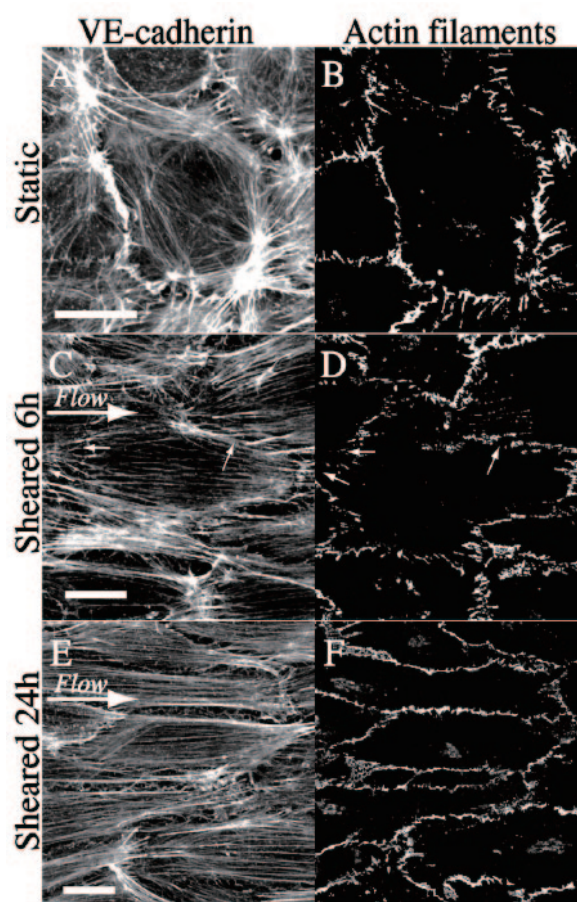


図 3-3. せん断応力を負荷した血管内皮細胞の(A, C, E)アクチンフィラメントおよび(B, D, F)VE-Cadherin の蛍光染色像．(A, B) 静置培養，(C, D) せん断応力負荷後 6 時間，(E, F) 24 時間，bar = $20 \mu\text{m}$

3. 2 結果及び考察

流れ負荷実験後の細胞の蛍光画像を図 3-3 に示す．静置培養の細胞では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(図 3-3A)．VE-Cadherin は細胞輪郭部に連続的に分布しており，アクチンフィラメント末端とデンスペリフェラルバンドに共局在した(図 3-3B)．流れ負荷 6 時間後にはデンスペリフェラルバンドが消失し，細胞辺縁部の糸状仮足から細胞中心部に向かってストレスファイバが発達した(図 3-3C)．VE-Cadherin はストレスファイバ末端の糸状仮足に凝集し，細いアクチンフィラメントだけが存在する部位ではあまり染色されなかった．(図 3-3C, D, 矢印)．流れ負荷 24 時間後，ほとんどの細胞が流れ方向に配向し，ストレスファイバも配向した(図 3-3E)．VE-Cadherin は細胞輪郭部で連続的に分布していた(図 3-3F)．

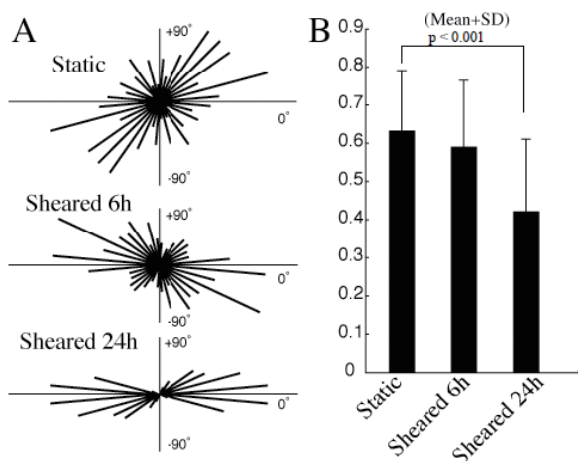


図 3-4. せん断応力を負荷された内皮細胞の形態パラメータ. (A)細胞配向角, (B)短軸軸長軸比

画像解析により得られた形態パラメータを図 3-4 に示す. 配向角分布図においてバーの長さは相対頻度, バーの傾きは配向角に対応している(図 3-4A). 静置培養した細胞はランダムな配向角分布を示した. 流れ負荷 6 時間では流れ方向に対して $\pm 45^\circ$ の範囲に配向した細胞数が増加し, 24 時間後にはほとんどの細胞が流れ方向に配向した. アスペクト比は時間の経過とともに一定の割合で減少した(図 3-4B).

流れ負荷後, デンスペリフェラルバンドの消失と糸状仮足の発達に伴い, VE-Cadherin には細胞辺イバとの共局在が観察された. 糸状仮足以外の部分ではアクチンリモデリングに伴いアクチンフィラメントと VE-Cadherin との連結が部分的にはずれ, VE-Cadherin の接着性が減少して細胞間接着の解離が生じると考えられる. そのため VE-Cadherin は細胞辺縁部で不連続な分布となった予想される. 一方, アクチン重合が活発に行われる糸状仮足では VE-Cadherin と連結が保たれ, 安定な細胞間接着となっている可能性がある. 画像解析の結果から, 流れ負荷 6 時間後の細胞でも伸長・配向する傾向が見られ, 細胞骨格や細胞間接着を調節することによりストレスファイバや仮足を発達させて伸長し, 徐々に流れ方向に細胞全体が向いていくと考えられる. 流れ負荷 24 時間後では流れ方向に沿ったストレスファイバが形成された. また, アクチンフィラメントがあまり存在しない部位においても VE-Cadherin は連続的に分布していた. VE-Cadherin はデスモプラキンを介して中間径フィラメントとも結合できること[5]から, そのような部位では中間径フィラメントと結合しているため安定な接着構造となっている可能性がある.

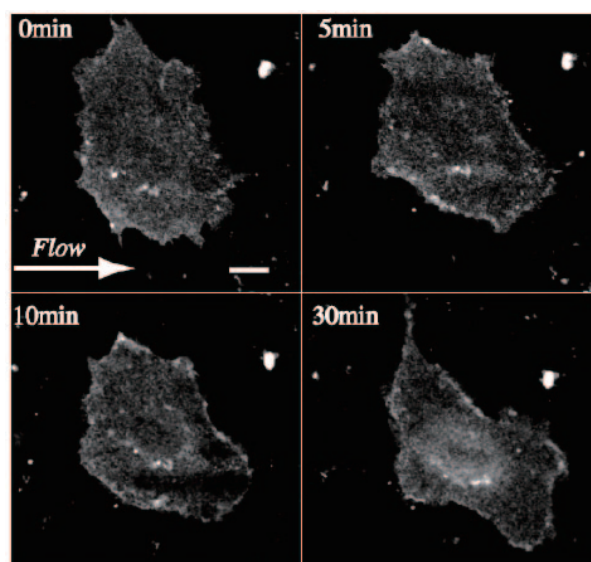


図 3-5. せん断応力を負荷した同一内皮細胞における EYFP-VE-Cadherin 染色像 bar = 20 μ m.

図 3-5 に EYFP-VE-Cadherin を発現した細胞の流れ負荷に対する経時変化を示す. EYFP-VE-Cadherin は細胞内に一様に分布するとともに細胞輪郭部に局在した. 流れ負荷後, EYFP-VE-Cadherin は細胞輪郭部においてクラスターを形成し, 葉状仮足や糸状仮足部位にも分布した. また, 細胞は葉状仮足を伸ばすことで形状を伸長させていく様子が観察された. 別途行った実験において静置培養(データ記載無し)と流れ負荷実験両群において, EYFP-VE-Cadherin は細胞間接着部位だけでなく, 活発化したラップリングや葉状仮足・糸状仮足発達部位に集積する様子が観察された. 細胞間接着部位の VE-Cadherin の挙動は比較的遅いが, ラップリングや仮足に分布した VE-Cadherin は活発に運動していた. VE-Cadherin が連続的に分布している部位では, アクチンフィラメント構造があまり変化せず安定した細胞間接着が行われていると考えられる. 一方, ラップリングや仮足が発達する部位では急速に細胞骨格構造が変化して細胞膜の形状が変化すると共に, VE-Cadherin の接着状態も不安定となり絶えず細胞間接着の解離と再形成が行われている可能性がある. また FRAP によって VE-Cadherin の動的挙動を観察した結果, 細胞質部分よりも細胞間接着部位にて, 顕著な蛍光回復が観察された(図 3-6). このことから, VE-Cadherin による細胞間接着も比較的短時間で接着と解離のサイクルを繰り返しており, この動的挙動がせん断応力依存の形態変化に寄与しているものと考えられる.

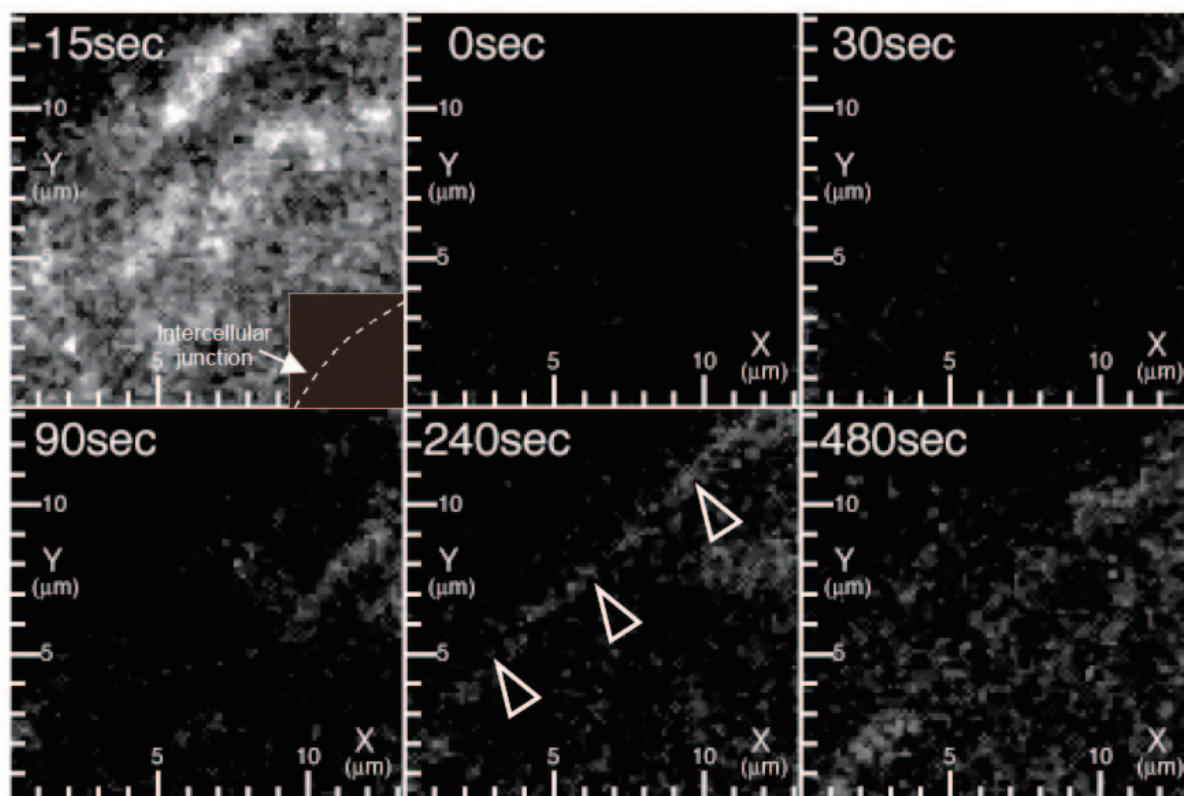


図 3-6. FRAP による VE-Cadherin の動的挙動の観察. 矢頭: 顕著な蛍光回復が観察された細胞間接着部位.

4. 微細加工膜基質を用いた伸展負荷内皮細胞のリモデリング

4.1 実験方法

4.1.1 マイクロピラー膜基質の作製

マイクロピラー膜基質の作製手順を図 4-1 に示す. この鋳型に PDMS を真空中で流し込み, 伸展膜上に接着させた後に加熱硬化させ鋳型を剥がすことで微細加工膜基質を作製した[12]. 作製したマイクロピラーは, 直径 $6\ \mu\text{m}$, 中心間距離 $9\ \mu\text{m}$, 高さ $7\ \mu\text{m}$ であった.

4.1.2 細胞培養

試料としてウシ大動脈由来内皮細胞を用いた. DMEM に 10%ウシ胎児血清および抗生物質を添加した培養液を用いて 37°C , 5% CO_2 の環境下で細胞を培養した. 細胞と基質との接着性を高めるため, 細胞を播種する前に基質にフィブロネクチンコーティング($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$)を施した. 細胞をマイクロピラー基質上に播種し 2 時間後に実験を行った.

4.1.3 繰り返し伸展実験

伸展装置(スカラテック)を用いて, 細胞に繰り返し伸展刺激を負荷した. 20%, 0.5Hz の伸展刺激を細胞に 3 時間負荷した. 37°C , 5% CO_2 /95% Air に保たれたインキュベータ内で実験を行った.

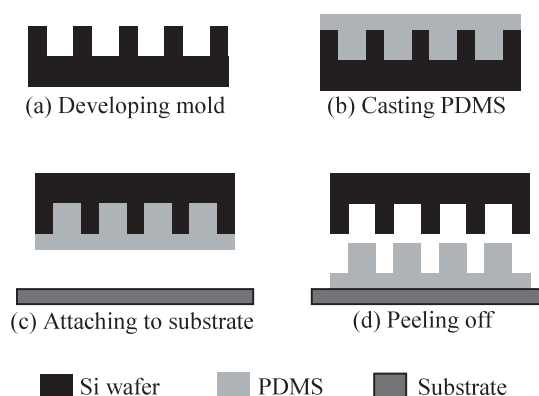


図 4-1. 微細加工基質膜の作製過程

4.1.4 免疫蛍光染色および画像解析

伸展実験後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。次に 0.1%Triton X に 3 分間浸すことで細胞膜の浸透性を向上させた。続いてローダミンファロイジンを用いてアクチンフィラメントを染色した。また、一次抗体として抗 Vinculin モノクローナル抗体(SIGMA)，二次抗体に Alexa Fluor 488 を用いて Vinculin を染色した。その後、蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて観察を行った。

蛍光顕微鏡観察で得られたアクチンフィラメント画像から細胞形態を評価した。形態評価には次式で定義される Shape Index(SI)を用いた。

$$SI = 4\pi A/P^2 \quad (4-1)$$

ここで、A は細胞面積、P は細胞周囲長である。SI は伸長度を表すパラメータであり、形状が長細くなると 0 に近づき、真円では 1 となる。細胞面積、細胞周囲長は画像解析ソフトウェア Image J を用いて測定した。

4.2 結果および考察

平面基質上およびマイクロピラー基質上で静置培養した細胞のアクチンフィラメントと Vinculin の蛍光画像を図 4-2 に示す。平面基質上の細胞において Vinculin は細胞全体にわたって発現していたが、マイクロピラー上において、Vinculin はマイクロピラー上面のみに発現していた。ストレスファイバは平面基質上とマイクロピラー上の細胞ともに焦点接着斑同士を繋ぐように形成されており、ランダムな方向に配向していた。平面基質上およびマイクロピラー上に播種した細胞の SI はそれぞれ 0.56 ± 0.13 および 0.62 ± 0.14 (mean $\pm$ SD) であり、両者の間に有意差はなかった。

平面基質上およびマイクロピラー上に播種し繰り返し伸展刺激を 3 時間負荷した後の蛍光画像を図 3 に示す。平面基質上およびマイクロピラー上の細胞においてストレスファイバはともに伸展方向に対してほぼ垂直方向に配向していた。しかし平面基質上の細胞のストレスファイバは、細胞の端から端へ細胞全体に渡って発達していたのに対し、マイクロピラー上の細胞のストレスファイバは平面基質上の細胞のストレスファイバと比べて短く、ストレスファイバは近接するマイクロピラー同士を繋ぐように発達していた。またマイクロピラー上の細胞の Vinculin は、伸展刺激負荷後に

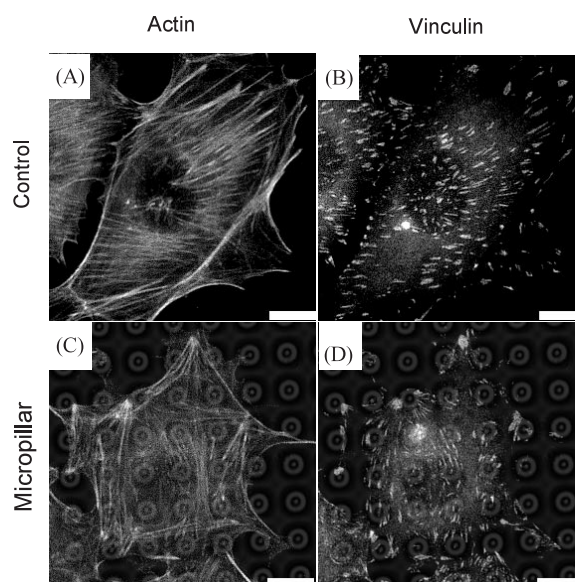


図 4-2. 静置培養した内皮細胞の蛍光染色像. (A, B)平面基質上, (C, D)微細加工基質膜上, (A, C)アクチンフィラメント, (B, D)Vinculin. bar = 10 μ m

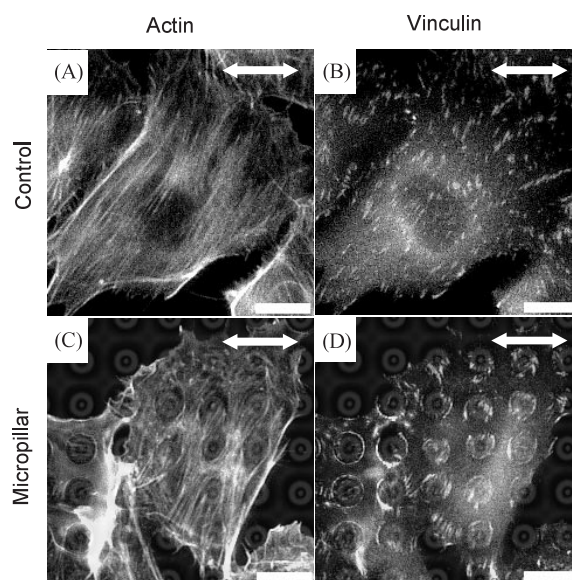


図 4-3. ひずみ 20 %, 周波数 0.5 Hz の繰り返し伸展刺激静置培養した内皮細胞の蛍光染色像. (A, B)平面基質上, (C, D)微細加工基質膜上, (A, C)アクチンフィラメント, (B, D) Vinculin. Bar = 10 μ m

は長細い形状を示し、主にマイクロピラー辺縁に発現していた。マイクロピラー上の細胞に対して、伸展刺激は、各マイクロピラーの間隔が変化することで負荷される。細胞はマイクロピラーの間隔の変化を感知し、ストレスファイバをマイクロピラー間に架橋して張力を発生させることで細胞内の力学バランスを保っていると考えられる。一方で、静置培養に比べて伸展刺激負荷後の SI に有意

な変化は見られなかった(平面基質; 0.56 ± 0.11 , マイクロピラー; 0.58 ± 0.10). コンフルエント状態で細胞は伸展刺激に対して細胞は細長く形態変化し, 伸展方向に対してほぼ垂直方向に配向することが知られている[2]. この理由として細胞間の接着が挙げられる. 本実験では, スパース状態の細胞を実験に用いたため細胞間での接着がなく, このことが SI に差が生じなかった要因であると考えられる.

Takemasa ら[13]は, 繰り返し伸展負荷時においてストレスファイバの消失および再構築は伸展刺激開始直後から分のオーダーで起こると報告している. マイクロピラー上の細胞におけるストレスファイバのリモデリングをより詳細に調べるためには, 今後短い時間間隔での観察が必要であると考えられる.

5. 結 言

内皮細胞の力学刺激に対する形態的応答における, 細胞間接着, 焦点接着斑およびストレスファイバの役割を複数のアプローチによって調べ, 次の結果を得た.

1. 内皮細胞に細胞間接着を介して局所的に引張り刺激を負荷すると, 細胞間接着部位には SHP-2 の集積が生じ, 内皮細胞は引張り刺激の方向に配向した. 細胞間接着におけるメカノトランスダクションと特定方向への内皮細胞の形態変化には, 空間的關係が存在することが示唆された.
2. 内皮細胞にせん断応力を負荷することにより, デンスペリフェラルバンド消失・ストレスファイバ形成に伴い VE-Cadherin の分布パターンが変化することを示した. また, EYFP-VE カドヘリンの蛍光観察から VE-Cadherin はラップリングや葉状仮足・糸状仮足にも存在し, VE-Cadherin による細胞間接着は非常に動的な挙動を示すことが示唆された.
3. 伸展膜上にマイクロピラーを有する微細加工膜基質を用い焦点接着斑の分布を制御した状態で内皮細胞に繰り返し伸展刺激を負荷した. 内皮細胞は近接するマイクロピラー同士を繋ぐように短いストレスファイバを発達させた. 内皮細胞はマイクロピラーの変位を感知し, 局所的なリモデリングを示した可能性が考えられた.

謝 辞

本研究の一部は文部科学省グローバル C O E 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」の援助を受けた. 記して謝意を表する.

文 献

- [1] Galbraith CG, Skalak R, and Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**, 317-330, 1998.
- [2] Shirinsky VP, Antonov AS, Birukov KG, Sobolevsky AV, Romanov YA, Kabaeva NV, Antonova GN, and Smirnov VN. Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J Cell Biol* **109**, 331-339, 1989.
- [3] Li YS, Haga JH, and Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* **38**, 1949-1971, 2005.
- [4] Kataoka N, Ujita S, Kimura K, and Sato M. The morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells to fluid-imposed shear stress in sparse and colony conditions. *JSME Int J Ser C* **41**, 76-82, 1998.
- [5] Osawa M, Masuda M, Kusano K, and Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol* **158**, 773-785, 2002.
- [6] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, and Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426-431, 2005.
- [7] Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, and Sheetz MP. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* **127**, 1015-1026, 2006.
- [8] Sokabe M, Hayakawa K, and Tatsumi H. Varieties of mechanotransduction: the cytoskeletal stress fibre as a force transmitter and a mechanosensor. In *Proceedings of the Australian Physiological society* **36**, Canberra, 95, 2005.

- [9] Ueki Y, Sakamoto N, Ohashi T, and Sato M. Morphological responses of vascular endothelial cells induced by local stretch transmitted through intercellular junctions. *Exp Mech* (in press).
- [10] Kaunas R, Nguyen P, Usami S, and Chien S. Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15895-15900, 2005.
- [11] Navarro P, Caveda L, Breviario F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, and Dejana E. Catenin-dependent and -independent functions of vascular cadherin. *J Biol Chem* **270**, 30965-30972, 1995.
- [12] Sakamoto N, Yamazaki Y, Ohashi T, and Sato M. Effect of Mechanical Environment of Focal Adhesions on Remodeling of Endothelial Cells Subjected to Cyclic Stretching Using Microsubstrates. *J Robot Mechatro* **19**, 557-564, 2007.
- [13] Takemasa T, Sugimoto K, and Yamashita K. Amplitude-dependent stress fiber reorientation in early response to cyclic strain. *Exp Cell Res* **230**, 407-410, 1997