

## 綜 説

## ずり応力刺激による脈管内皮細胞機能の制御機構

河 合 佳 子

信州大学医学部器官制御生理学講座

## Pivotal Roles of Shear Stress Stimulation in the Regulation of Biological Properties of Vascular Endothelial Cells

Yoshiko KAWAI

Department of Physiology, Shinshu University School of Medicine

**Key words**: biorheology, shear stress, nitric oxide, gene expression, carbon dioxide gas exchange, cell surface  $F_1/F_0$  ATP synthase

バイオレオロジー, ずり応力, 一酸化窒素, 遺伝子発現, 炭酸ガス交換, 細胞表面  $F_1/F_0$  ATP synthase

## I はじめに

生体内の血液や体液に代表される液体は、基本的に圧力勾配という物理的なエネルギーの差分を利用して移動している。また、血管、中でも壁の厚い動脈には壁周張力<sup>1)</sup>の変化によって血管平滑筋に伸展刺激<sup>2)3)</sup>が、血管内腔に面する内皮細胞には血液の流れ<sup>4)5)</sup>により、ずり応力という物理的的刺激が加わっていることは周知の事実である (図 1)。しかし、このずり応力が血管やリンパ管の内皮細胞の機能にどのような影響を及ぼして、その機能を制御しているかという視点から体系的に解説した論文はほとんど見当たらない。

そこで、本稿では流れ刺激が血管・リンパ管の内皮細胞機能に及ぼす影響について焦点を絞って、私共の教室で行ってきた研究成果を中心に解説したい。

## II 流れが医科学研究で注目され始めた歴史的背景

## A 流れと変形の学問, バイオレオロジーについて

レオロジー (rheology) とは、ギリシャ語のレオ = 流れを語源とした、「流れと変形の学問」であり、1930年代からその言葉が使われ出した<sup>6)</sup>。バイオレオロジー (biorheology) は、レオロジーの中でも生体に関与する「生体および生体を構成する物質の流れと変形の学

問」であり、本邦では当教室の前教授である故東 健彦先生が中心となって日本バイオレオロジー学会が設立され、今年で第36回を数えている。医学の分野では主に、血管、血液、各種臓器における物理的的刺激に対する反応特性の解析やその生理、病態生理学的役割や意義の解明といった研究が行われてきた。例えば、伸展刺激に対する血管平滑筋の収縮機構の解明<sup>7)~9)</sup>や動脈硬化症初期病変形成に関与するずり応力の影響<sup>10)11)</sup>、動脈瘤形成と壁周張力との関係<sup>12)</sup>、血小板の病的血栓成立におけるずり応力の意味づけ<sup>13)14)</sup>などの研究成果が今までに数多く報告されている。

## B 動脈硬化初期病変発生機構や血栓形成におけるずり応力の役割

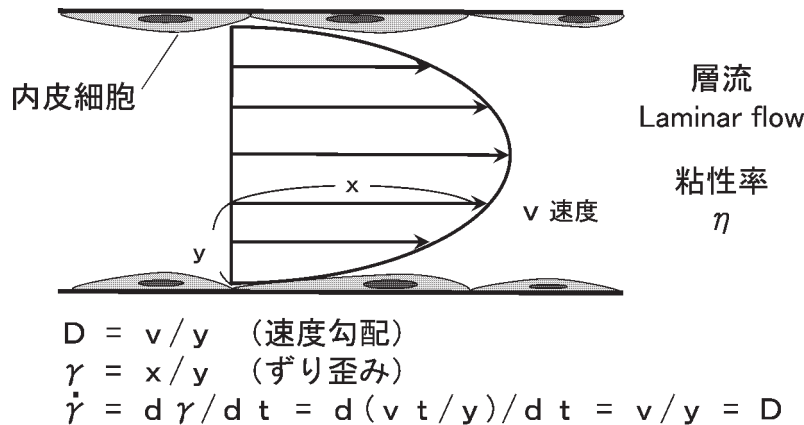
従来、動脈硬化症は代謝疾患として、形態学および生化学的な側面から研究が進められてきた<sup>15)16)</sup>が、動脈硬化の初期病変、特に脂肪線条や線維斑の発生には好発部位があることも同時に知られていた<sup>17)</sup>。1970年代になると、その好発部位は血管内の中でも流れの剥離やよどみの生じやすい部位に一致しているという報告が多数見られるようになり、中でも胸部大動脈と肋間動脈の分岐部の中枢側に発生する低ずり応力部位に初期病変が多発していることが確認され、動脈硬化初期病変の低ずり応力説が確立された<sup>10)11)18)19)</sup>。

また、細動脈の内皮細胞が何らかの理由で剥離し、そこに血小板が一旦固着すると、血小板にずり応力刺激が加わり、その表面に接着分子が発現し、次々と血

別刷請求先: 河合 佳子 〒390-8621

松本市旭 3-1-1 信州大学医学部器官制御生理学講座

E-mail: ykawai@shinshu-u.ac.jp



ずり応力 (shear stress)

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} = \eta \cdot D \text{ (Newtonの粘性法則)}$$

$$\tau = \eta \cdot (v / y) \quad \tau \propto v \text{ (}\eta \text{一定ならば)}$$

図1 ポアズィーユの流れとニュートン流体

剛体管の円管内を流れる流体の速度分布は、その流れがニュートン流体の層流であると仮定する（ポアズィーユの流れ）と、この流速パターン先端が描く軌跡は放物線形を描く。すなわち、中央部では速く、壁近くでは流体の粘性のために減速される。そのため、壁では流体により、図の計算式で近似できるようなずり応力が生じる。（文献6より改変）

血小板が集積し、病的血小板血栓を作ることも知られている<sup>13)14)</sup>。これがラクナ梗塞の一因を担うことも示唆されている。この高ずり応力刺激の作用機序の解明に分子生物学的な解析が進み、高ずり応力刺激によって血小板表面の糖タンパク GP IIb/IIIa の発現が亢進し、血小板相互の凝集が亢進することが確認された<sup>20)</sup>。

### III 脈管内皮細胞に対するずり応力刺激作用

血管や血小板における流れ刺激の作用や、その病態生理学的意義づけの研究は、1980～2000年代にかけて世界中の研究者によって精力的になされてきたが、リンパ管内皮細胞に対する流れ刺激の研究は、血管や血小板における研究に比べて全く行われていなかったといっても過言ではない。しかし、集合リンパ管には平滑筋が存在し、心臓様の自発的な収縮機構が存在する<sup>21)</sup>ことから、集合リンパ管の内皮細胞に対する流れ刺激は無視できるほど小さなものでなく、生体内では静脈と同等か、それよりも高いずり応力 ( $0.5 \sim 2.0 \text{ dyn/cm}^2$ )<sup>22)</sup>に暴露されていることが判ってきた（図2）。そこで、当教室では1980年代から流れ刺激によるリンパ管機能の制御様式について研究を進めてきた<sup>23)–26)</sup>。この成果の詳細については後に述べることにする。

### IV ずり応力刺激による脈管内皮細胞からの一酸化窒素分泌

流れ刺激によって血管内皮細胞からガス体である一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) が分泌され、それが血管拡張作用を示すことが1980年代に発見され<sup>27)</sup>、1998年のFurchgott教授らのノーベル生理学・医学賞受賞に結びついている。また、このずり応力刺激によるNO産生には律速酵素となる一酸化窒素合成酵素 (NO synthase: NOS) が関わっており、血管内皮細胞には内皮既存型 NOS (endothelial constitutive NO synthase: eNOS) が存在することも判明している<sup>28)</sup>。NOは活性酸素の一種であるために、血管内では赤血球内のヘモグロビンと結合して速やかにその活性を消失し、生理学的には血管壁～外膜側に拡散したものがパラクライン的に血管平滑筋に作用することも注目すべき事実の一つである。一方、マクロファージには炎症刺激時に様々なサイトカイン刺激で誘導されてくる誘導型 NOS (inducible NO synthase) が存在し、多量のNOを分泌し、酸素ラジカルとともに生体に侵入した細胞等を攻撃し、殺菌作用等を示すことも知られている<sup>29)</sup>。

では、赤血球が存在せず、低酸素状態のリンパ液が流れているリンパ管系ではNOを介する生理機能制

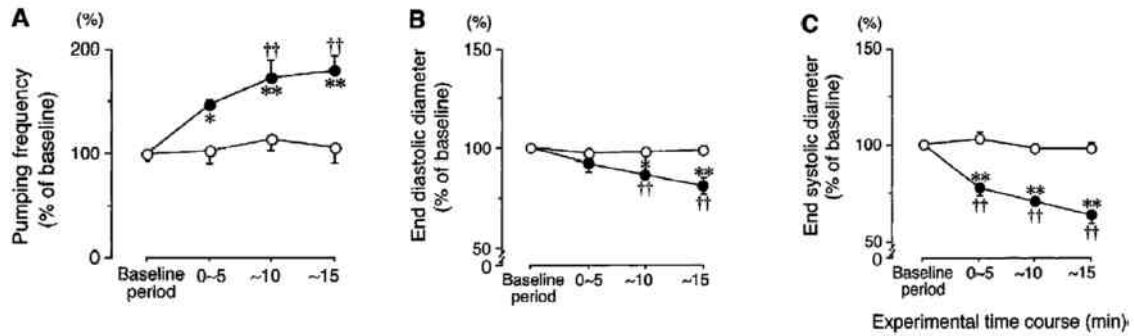


図2 麻酔下ラットの腸間膜リンパ管の能動的リンパ輸送機構に対する ecNOS 阻害薬 L-NAME の効果  
 A：心臓様収縮に対する30  $\mu$ M L-NAME の効果。 縦軸：薬物投与前の収縮頻度の平均値を100 %として基準化した相対的な収縮頻度の変化率 横軸：L-NAME を腸間膜表面に灌流した後の時間経過 \*：p<0.05, \*\*：p<0.01 (○ (L-NAME 非処置群) と● (L-NAME 処置群) との比較検討) ††：p<0.01 (Baseline period との比較検討)  
 B：心臓様収縮の拡張末期時の集合リンパ管口径に対する30  $\mu$ M L-NAME の効果。 縦軸：薬物投与前の拡張末期口径の平均値を100 %として基準化した相対的な拡張末期口径の変化率 横軸：panel A と同一指標 \*，\*\*，††，panel A と同一指標  
 C：心臓様収縮の収縮末期時の集合リンパ管口径に対する30  $\mu$ M L-NAME の効果。 縦軸：薬物投与前の収縮末期口径の平均値を100 %として基準化した相対的な収縮末期口径の変化率 横軸：panel A と同一指標 \*\*，††，panel A と同一指標  
 (文献24より引用)

御システムはどのようになっているのであろうか。解析を進めてみると、リンパ管内皮細胞には血管内皮細胞よりも多量の ecNOS の存在することが免疫細胞化学的手法によって証明され<sup>30)</sup>、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を引き金に、多量の NO を分泌していることが確認された<sup>31)</sup>。このリンパ管内皮細胞から分泌される NO は、集合リンパ管の自発性収縮リズム、収縮速度、収縮力を抑制し<sup>25)26)32)</sup>、生体内でリンパ液の流れ刺激で分泌されている NO はリンパの能動的な輸送機構を抑制することも確認されている<sup>24)–26)</sup>。

また、リンパ液中には NO を化学的に失活させるヘモグロビンが存在しないことや、低酸素環境であるため酸素ラジカルに反応する確率が低く、一旦 NO が産生されるとリンパ液の流れに乗って血管よりも広範囲にその影響を及ぼすことがリンパ管系の NO による生理機能制御の特徴の一つとして知られている<sup>25)26)</sup>。

### V ずり応力刺激による脈管内皮細胞からの NO 分泌のメカニズム

先に述べたように、ずり応力刺激によって脈管内皮細胞から分泌される NO の律速酵素が ecNOS であることは、血管でもリンパ管でも同じであるが、その ecNOS がずり応力刺激によってどのようにその活性を調節しているかが次の問題である。アセチルコリン

のムスカリン受容体刺激時でもずり応力刺激時でも、細胞内の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が第一義因子であることはすでに既知の事実として知られている<sup>25)26)</sup>。ところが、ずり応力刺激がどのような機序で細胞内の  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させるのかの詳細についてはまだ研究の途次であり、いくつかの可能性が示唆されている。①ずり応力刺激によって内皮細胞表面の非特異的陽イオンチャンネルが活性化され、細胞外より細胞内に  $Ca^{2+}$  が流入する<sup>33)</sup>。②ずり応力刺激によりフィブロネクチンに連結する細胞骨格の特性が変化し、内皮細胞相互間に存在するギャップジャンクションの  $Ca^{2+}$  透過性が変わり、細胞内の  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇する<sup>34)</sup>。③ずり応力刺激により内皮細胞相互の変形が起こり、細胞表面に存在するカベオリンの  $Ca^{2+}$  放出機構が変化したり、伸展刺激高感受性の  $Ca^{2+}$  チャンネルが活性化され、細胞内に  $Ca^{2+}$  が流入し、 $[Ca^{2+}]_i$  が上昇する<sup>35)</sup>。以上が現在までに知られているずり応力刺激による細胞内  $[Ca^{2+}]_i$  上昇機序である。

### VI ずり応力刺激による脈管内皮細胞における遺伝子・蛋白発現を介する細胞機能の制御

培養ヒト血管内皮細胞に流れ刺激をかけて、その細胞機能が遺伝子・蛋白発現を介して生理機能を制御している報告が最近散見されるようになってきている<sup>36)</sup>。私共も、培養ヒト集合リンパ管内皮細胞への流れ刺激

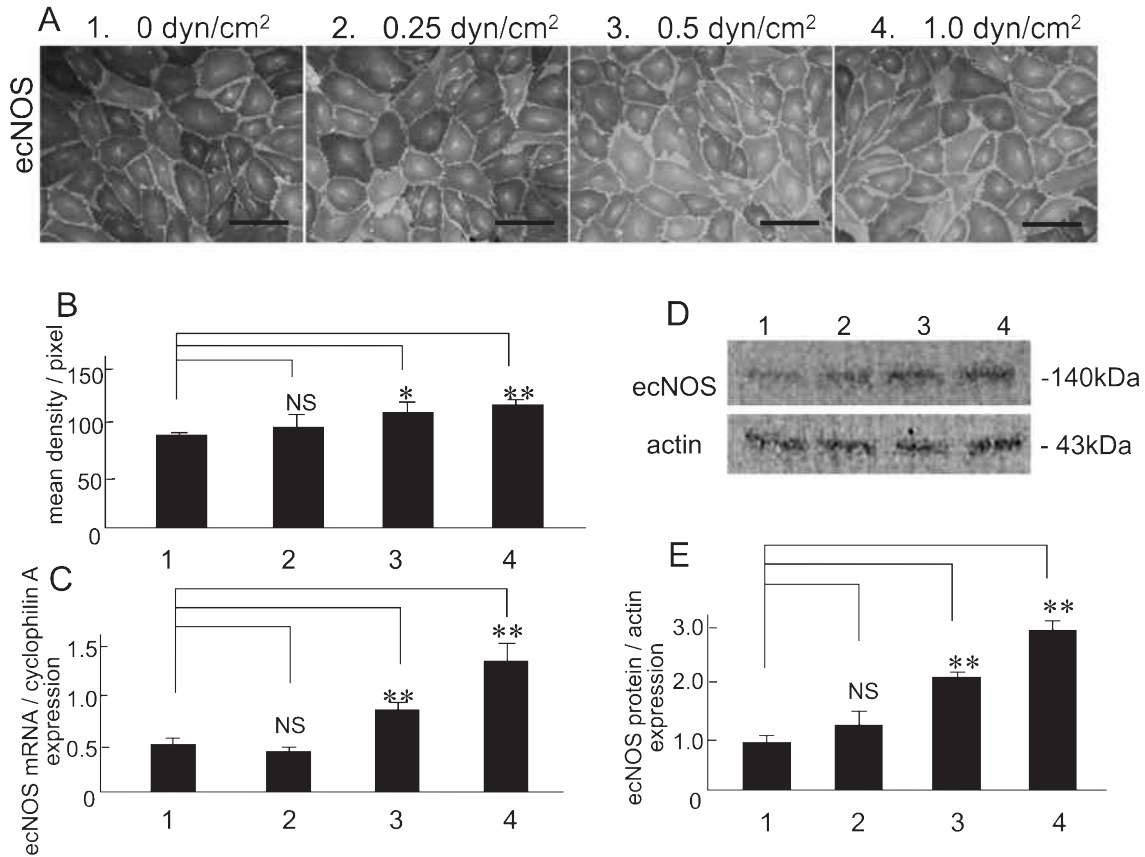


図3 流れ刺激負荷によるヒト集合リンパ管内皮細胞の ecNOS 発現増強効果

A：培養したリンパ管内皮細胞に流れ刺激を0～1.0 dyn/cm<sup>2</sup>負荷し、免疫細胞染色法にて ecNOS の発現を観察した蛍光顕微鏡写真の典型例。スケール：100 μm

B：panel A の蛍光輝度を5視野ずつ任意に抽出して Scion Image 解析ソフトを用いて定量化した実験結果。横軸の番号は panel A の指標に対応する。\*：p<0.05, \*\*：p<0.01 NS：有意差なし（流れ刺激なしを対照として比較検討）

C：培養したリンパ管内皮細胞に流れ刺激を負荷し、ecNOS mRNA の発現量変化について RT-PCR 法を用いて比較検討した実験結果。横軸の番号は panel A の指標に対応する。縦軸：ecNOS mRNA 発現量の相対値 \*\*：p<0.01 NS：有意差なし（流れ刺激なしを対照として比較検討）

D：培養したリンパ管内皮細胞に流れ刺激を負荷し、ecNOS 蛋白の発現量について Western blot 法を用いて比較検討した典型例。各バンドの番号は panel A の流れ刺激値に対応する。

E：panel D のバンドの輝度を Scion Image 解析ソフトを用いて比較検討した実験結果。縦軸：ecNOS 蛋白発現量の相対値 \*\*：p<0.01 NS：有意差なし \*\*：p<0.01 NS：有意差なし（流れ刺激なしを対照として比較検討）

(文献37より引用)

によって、リンパ管内皮細胞が NO を分泌するだけでなく、その産生酵素である ecNOS の遺伝子・蛋白発現までを亢進していることを見出した (図3)<sup>37)</sup>。この遺伝子・蛋白発現の亢進作用には培養リンパ管内皮細胞表面に存在する F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase から分泌された ATP が関与していることも明らかにした<sup>37)</sup>。すなわち、リンパ管内皮細胞の表面に存在する ATP の受容体、purinergic 2X/2Y receptor の阻害薬である suramin や、F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase の阻害薬である piceatannol を前処置しておく、ずり応力刺激による

ecNOS の遺伝子・蛋白発現が著明に抑えられることを薬理学的手法を用いた実験事実より証明した<sup>37)</sup>。さらに、ずり応力刺激によってリンパ管内皮細胞より分泌された ATP は細胞内の Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位（滑面小胞体）より Ca<sup>2+</sup>の遊離を引き起こし、Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel を特異的に活性化させることも見出した (図4)<sup>37)</sup>。この細胞内情報伝達系の活性化の過程で核内の ecNOS 遺伝子発現が亢進し、ecNOS 蛋白の産生を促していることを確認した<sup>37)</sup>。こうした事実より、流れ刺激は NO 分泌によるリンパ管や血管の弛緩反応だけでなく、



NO を合成する ecNOS の遺伝子や蛋白の発現までも促進させ、内皮細胞の流れ刺激に対する感受性を自己制御している可能性が示唆されている。

**VII ずり応力刺激がセンチネルリンパ節内の微小環境形成に及ぼす影響**

癌原発巣の周囲は、癌細胞の増殖により組織間隙の低酸化、pH の低下、静水圧の上昇など、様々な環境変化が惹起されてくることが知られている<sup>38)-40)</sup>。

特に静水圧の上昇は癌周囲の間質液の増加を主要因とするため、センチネルリンパ節に流入する輸入リンパ管の内皮細胞やリンパ節の辺縁洞内膜を形成するリンパ管内皮細胞様細胞には、他のリンパ節より多くのリンパ流を受けていることになると考えられる。生理学的に読み直してみると、センチネルリンパ節は強いずり応力刺激を受けているリンパ節と言い換えることもできる。事実、超音波造影剤ソナゾイドを用いたミニブタの胃近傍のリンパ節の可視化実験を用いてこの事

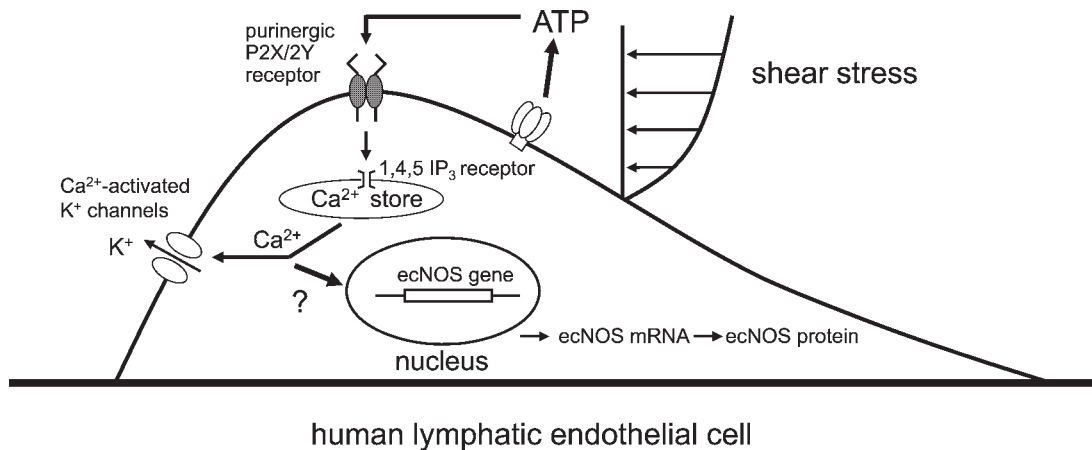


図4 流れ刺激によるヒト集合リンパ管内皮細胞での ecNOS 遺伝子・蛋白発現様式の模式図  
細胞表面に流れ刺激が負荷されると、その細胞表面の F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase から ATP が分泌され、purinergic 受容体をオートクライン的に刺激し、細胞内の Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位から Ca<sup>2+</sup>を遊離し、Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel を活性化する過程で ecNOS の遺伝子・蛋白発現を誘起する。  
(文献37より引用)

Injection volume : 0.1mL

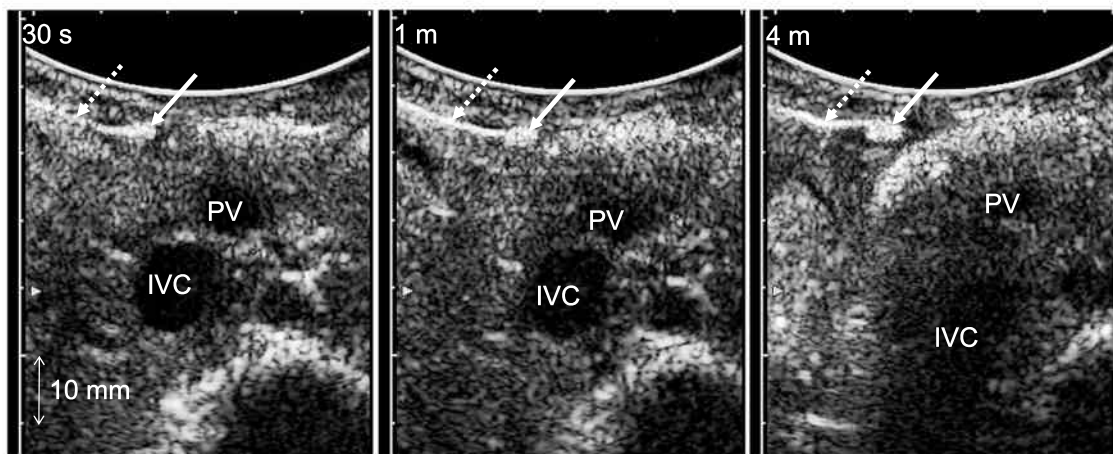


図5 超音波造影剤ソナゾイド® によるミニブタ胃近傍リンパ節の可視化実験結果の典型例  
ミニブタの胃粘膜内から粘膜下にかけて0.1mL のソナゾイドを注入し、胃の粘膜側から超音波プローブを当てて、30秒後(左)、1分後(中央)、4分後(右)の所属リンパ管網ならびにリンパ節を観察した動画写真の典型例。点線矢印:胃漿膜を走行する輸入リンパ管 矢印:胃漿膜側に存在する所属リンパ節 PV:門脈 IVC:下大静脈  
(文献41より改変)

実を *in vivo* 実験で証明した (図 5)<sup>41)</sup>。そこで、こうした作業仮説に基づいて、私共は流れ刺激によりセンチネルリンパ節に流入するヒトの輸入リンパ管の内皮細胞表面に発現する細胞接着分子の発現様式の変化について解析した<sup>42)</sup>。同時に、センチネルリンパ節の微小癌転移モデルとして、その接着分子を介したリンパ管内皮細胞と癌細胞との接着実験も合わせて行った<sup>42)</sup>。

上記の条件に合致したヒトの輸入リンパ管の培養内皮細胞に  $1.0 \text{ dyn/cm}^2$  のずり応力刺激を 2 時間以上負荷すると、細胞接着分子の一つである intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 がその内皮細胞表面に強力に発現してくることを免疫細胞染色法や mRNA の発現を指標とした分子生物学的解析により見出した<sup>42)</sup>。また、流れ刺激によって ICAM-1 発現が増強したリンパ管内皮細胞表面に、その特異的結合物質 CD 11a や CD 11b を持った癌細胞が有意に接着することを *in vitro* の接着実験で確認した<sup>42)</sup>。この事実より、流れ刺激によりセンチネルリンパ節内部の環境変化が誘起され、ICAM-1 を介して微小癌転移が出現してくる可能性が示唆された。

また、ラットの腸骨リンパ節を用いた *in vivo* 実験において、上記の培養実験や *in vitro* 実験の結果が同じように証明されるか否かについてさらに検討を行った。生体内でリンパ液の流れからずり応力を定量的に算出するのは困難であるため、流れ刺激をセンチネルリンパ節に加えた環境を擬似的に再現した状態、すなわち ATP を外因性に組織間隙や微小リンパ管内に投与した状態でリンパ節内に存在するリンパ管内皮細胞様細胞表面の ICAM-1 発現が増強するかどうかについて検討を行った<sup>42)</sup>。その結果、体外から組織間隙や微小リンパ管内に ATP を投与した群では、腸骨リンパ節内の ICAM-1 発現が有意に増強することを、特異抗体を用いた生体蛍光顕微鏡動画画像から確認した (図 6)<sup>42)</sup>。このことから、流れ刺激によりリンパ管内皮細胞表面に存在する  $F_1/F_0$  ATP synthase から分泌された内因性の ATP がリンパ節内部の微小環境変化を生み出している可能性が示唆された。すなわち ICAM-1 等の接着分子の発現や分泌された ATP が purinergic 2X/2Y 受容体刺激を介してリンパ節内に存在する免疫担当細胞等の機能を変化させていると想定される。

## VIII ずり応力刺激の癌細胞への効果

最近の私共の研究では、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-231 に流れ刺激をかけると、癌細胞表面に多数存在している  $F_1/F_0$  ATP synthase を活性化して、脈管内皮細胞に対するずり応力刺激作用と同じように ATP が分泌されることを見出した (未発表所見)。癌細胞は転移の際に組織間隙内を移動する時やリンパ管・リンパ節内を移動する時に、かなり大きなずり応力刺激 ( $\sim 5.0 \text{ dyn/cm}^2$ ) を受けていると考えられる。こうした高ずり応力の刺激を受けると癌細胞はその刺激の大きさに応じて、血管やリンパ管の内皮細胞と同様に ATP と水素イオンを共分泌し、癌微小環境の低い pH 環境や高炭酸ガス分圧環境を作り出し、癌の転移や増殖の自己調節に関与している可能性が判ってきた (未発表所見)。

## IX ずり応力刺激によって ATP と共に分泌された水素イオンの生理学的役割について

培養の血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞では、流れ刺激により細胞表面の caveola 内に存在する  $F_1/F_0$  ATP synthase から ATP が分泌されることは、私共の実験<sup>37)</sup>の他、数多くの報告で実証されている<sup>43)44)</sup>。もともと  $F_1/F_0$  ATP synthase はミトコンドリアの内膜に存在し、エネルギー源である ATP を産生するとともに水素イオンを共分泌する分子である<sup>45)</sup>。分泌される ATP については前述のようにシグナル伝達物質として様々な生理機能を有していることが今までに報告されているが<sup>37)43)44)</sup>、共分泌される水素イオンの生理学的意義については今までに全く報告がなく、ほとんど看過されてきたのが現状である。そこで私共はずり応力刺激によって脈管内皮細胞から ATP と共に分泌されてくる水素イオンの生理的意義や意味を解明する研究の過程で、この水素イオンが肺の細動脈における炭酸ガスの産生、排出にきわめて重要な生理学的役割を果たしていることを見出した<sup>46)</sup>ので、以下にこの実験事実の詳細を解説する。

血管内皮細胞に流れ刺激をかけると細胞表面の  $F_1/F_0$  ATP synthase から ATP が分泌され、その反応は動・静脈の内皮細胞の中で、ヒト肺動脈がもっとも顕著であると報告されている<sup>43)44)</sup>。そこで私共はなぜ肺動脈で最も顕著なのか、その生理学的意義を検討している中で、流れ刺激によって肺動脈内皮細胞から ATP と共分泌される水素イオンが肺の重要な機能で

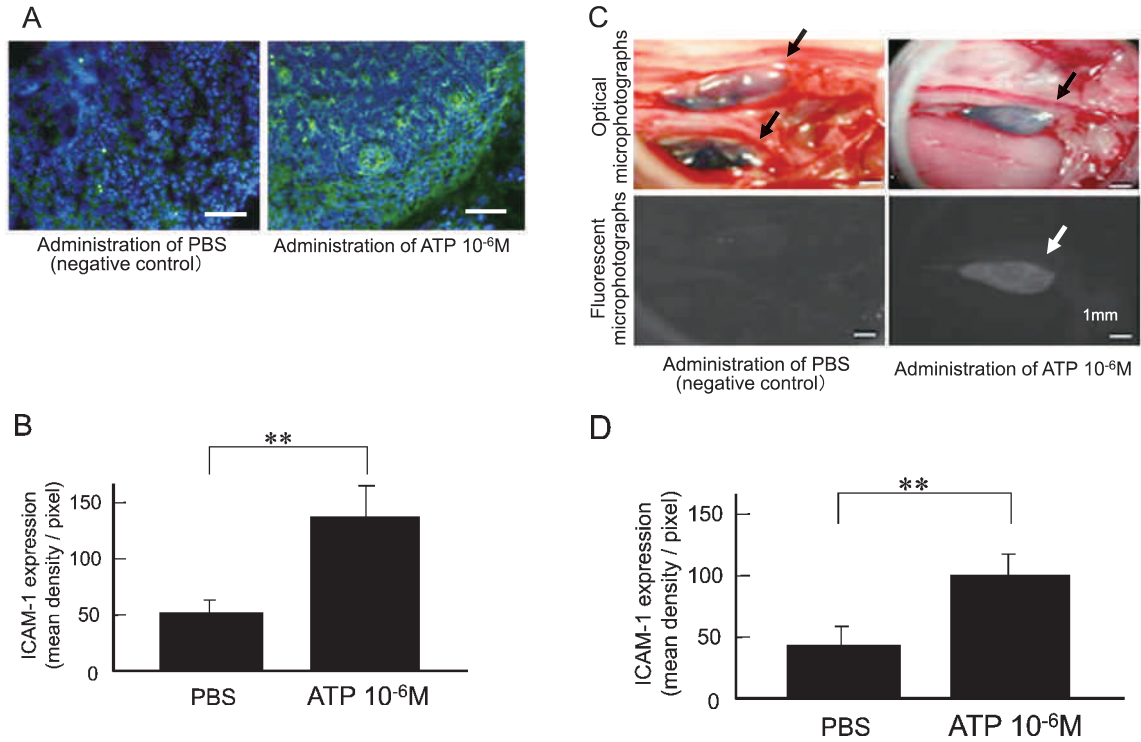


図6 ラット腸骨リンパ節の流れ刺激モデル（生体外よりATPを組織間隙あるいは微小リンパ管内に投与する）における生体内リンパ節の接着分子ICAM-1発現増強効果

A：生体外よりATP 10<sup>-6</sup>Mを尾部基始部の皮下組織間隙に投与（24時間）したラット腸骨リンパ節のICAM-1免疫組織染色写真の典型例。左：人工保生液（PBS）のみ投与群（negative control）の蛍光顕微鏡写真の典型例。腸骨リンパ節内にICAM-1発現はほとんど認められない。右：ATP 10<sup>-6</sup>Mを含んだPBS投与群の蛍光顕微鏡写真の典型例。腸骨リンパ節内の様々な細胞にICAM-1の発現を認めた。スケール：200 μm

B：panel A 実験結果をScion Image解析ソフトを用いて定量化して比較検討した実験結果。縦軸：ICAM-1蛍光発現量を定量化した値 \*\*：p<0.01 両群間の統計的検定結果

C：生体顕微鏡の動画画像を用いて生体内で腸骨リンパ節におけるICAM-1発現を評価した実験結果の典型例 ATPはpanel Aと同様、24時間前にラット尾部基始部の皮下組織間隙あるいは微小リンパ管内に投与し、撮影開始10分前に同一部位に蛍光標識したICAM-1抗体を投与し、腸骨リンパ節内のICAM-1発現を、蛍光輝度を定量化することによりICAM-1発現量を評価した。左上段：対照群（PBSを24時間処置）の典型的な光学顕微鏡写真。左下段：対照群のICAM-1抗体投与と10分後の典型的な蛍光顕微鏡写真。右上段：ATP 10<sup>-6</sup>M投与群の典型的な光学顕微鏡写真。右下段：ATP 10<sup>-6</sup>M投与群の典型的な蛍光顕微鏡写真。スケール：1 mm

D：panel Cの蛍光顕微鏡写真をScion Image解析ソフトを用いて定量化して比較検討した実験結果。縦軸：ICAM-1蛍光発現量を定量化した値 \*\*：p<0.01 両群間の統計的検定結果（文献42より引用）

ある炭酸ガスの排出に関与しているのではないかとこの作業仮説を持つに至った。これまでの呼吸生理学の教科書の定説として知られている肺における炭酸ガス産生・排出の機序は、肺毛細血管を通過している赤血球に酸素が取り込まれると、酸素化されたヘモグロビンから水素イオンが遊離する。そして赤血球内において、塩素イオンと交換して血漿中より流入した重炭酸イオンと反応し、二酸化炭素を合成する。その二酸化炭素が肺毛細血管から肺胞に拡散して、炭酸ガスとして肺から排出されてくるという考え方であった<sup>47)</sup>。

しかし、30年くらい前に行われた動物実験で、赤血球を含まない人工保生液で肺を灌流した場合でも、血液灌流時と全く同じ量の二酸化炭素が排出されるという報告<sup>48)</sup>や、ヒトでも重篤な貧血の患者さんの場合においても、肺の炭酸ガス排出能に異常をきたすという報告は見当たらず<sup>49)</sup>、この理由については長い間全く不明のままであった。そこで、私たちは、肺動脈内皮細胞よりもずり応力の強い肺細動脈の内皮細胞を用いて、流れ刺激を行うのが妥当であるとの結論に至った。その細胞を用いて細胞表面に存在するはずのF<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>



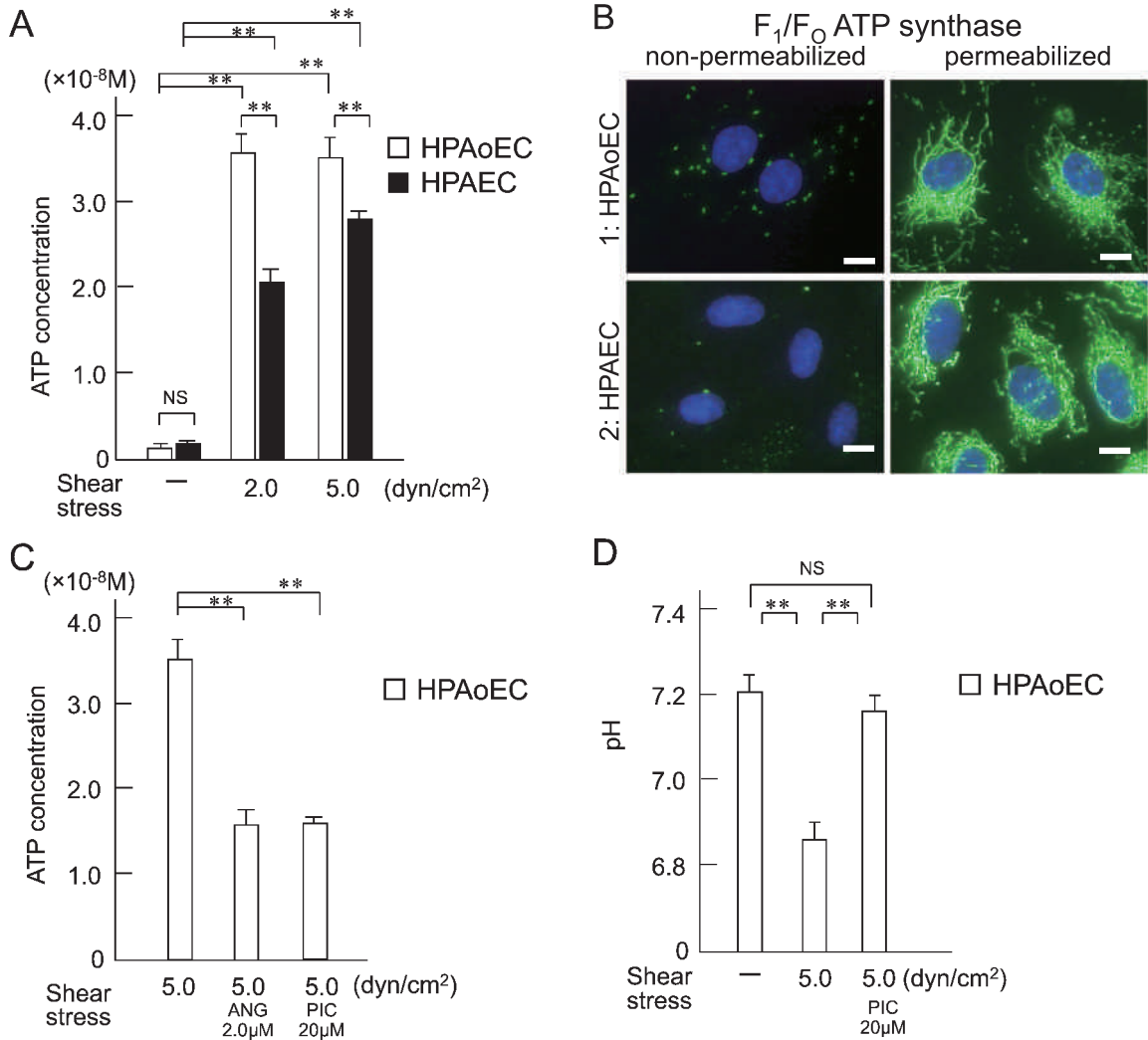


図7 培養したヒト肺細動脈内皮細胞に流れ刺激 (2.0~5.0 dyn/cm<sup>2</sup>) 負荷した際の ATP 分泌と培地 pH の変化  
A : 流れ刺激 (2.0~5.0 dyn/cm<sup>2</sup>) 時のヒト肺細動脈内皮細胞 (HPAoEC) とヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) からの ATP 分泌評価の実験結果。縦軸: 培地の ATP 濃度 (×10<sup>-8</sup>M) 横軸: 内皮細胞に負荷した流れ刺激。- は流れ刺激無処置群を示す。 \*\*: p<0.01 両群の統計的検定結果

B : ヒト肺細動脈内皮細胞 (1: HPAoEC) とヒト肺動脈内皮細胞 (2: HPAEC) の細胞表面 (non-permeabilized) あるいはミトコンドリア内膜 (permeabilized) の F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase 免疫細胞染色結果の典型例。スケール: 10 μm

C : ヒト肺細動脈内皮細胞 (HPAoEC) の流れ刺激 (5.0 dyn/cm<sup>2</sup>) による ATP 分泌機構に対する細胞表面の F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase 阻害薬 angiotatin (2.0 μM, ANG), ならびに piceatannol (20 μM, PIC) 前処置評価の実験結果。縦軸: 培地の ATP 濃度 (×10<sup>-8</sup>M) \*\*: p<0.01 両群の統計的検定結果

D : ヒト肺細動脈内皮細胞 (HPAoEC) の流れ刺激 (5.0 dyn/cm<sup>2</sup>) による pH 変化と 20 μM PIC の効果。縦軸: 培地の pH 測定値 横軸: 内皮細胞に負荷した流れ刺激。- は流れ刺激無処置群を示す

\*\*: p<0.01 両群間の統計的検定結果

(文献46より引用)

ATP synthase のずり応力感受性, ならびに共分泌されるはずの水素イオンが炭酸ガス産生・排出に関与しているか否かについて解析する研究計画を立てた。しかし, ヒト肺細動脈内皮細胞は市販されていなかったため, まず信州大学医学部倫理委員会の承認を得て, 肺癌で摘出した肺の中で正常組織と思われる部分を一

部いただき, 肺細動脈内皮細胞を分離培養した。培養したヒト肺細動脈内皮細胞表面に生理的範囲のずり応力刺激を負荷すると二酸化炭素が顕著に排出されてくることを発見した<sup>46)</sup>。肺細動脈表面には, F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase が高発現しており, しかも, 水素イオンと重炭酸イオンを反応させて二酸化炭素を作る酵素



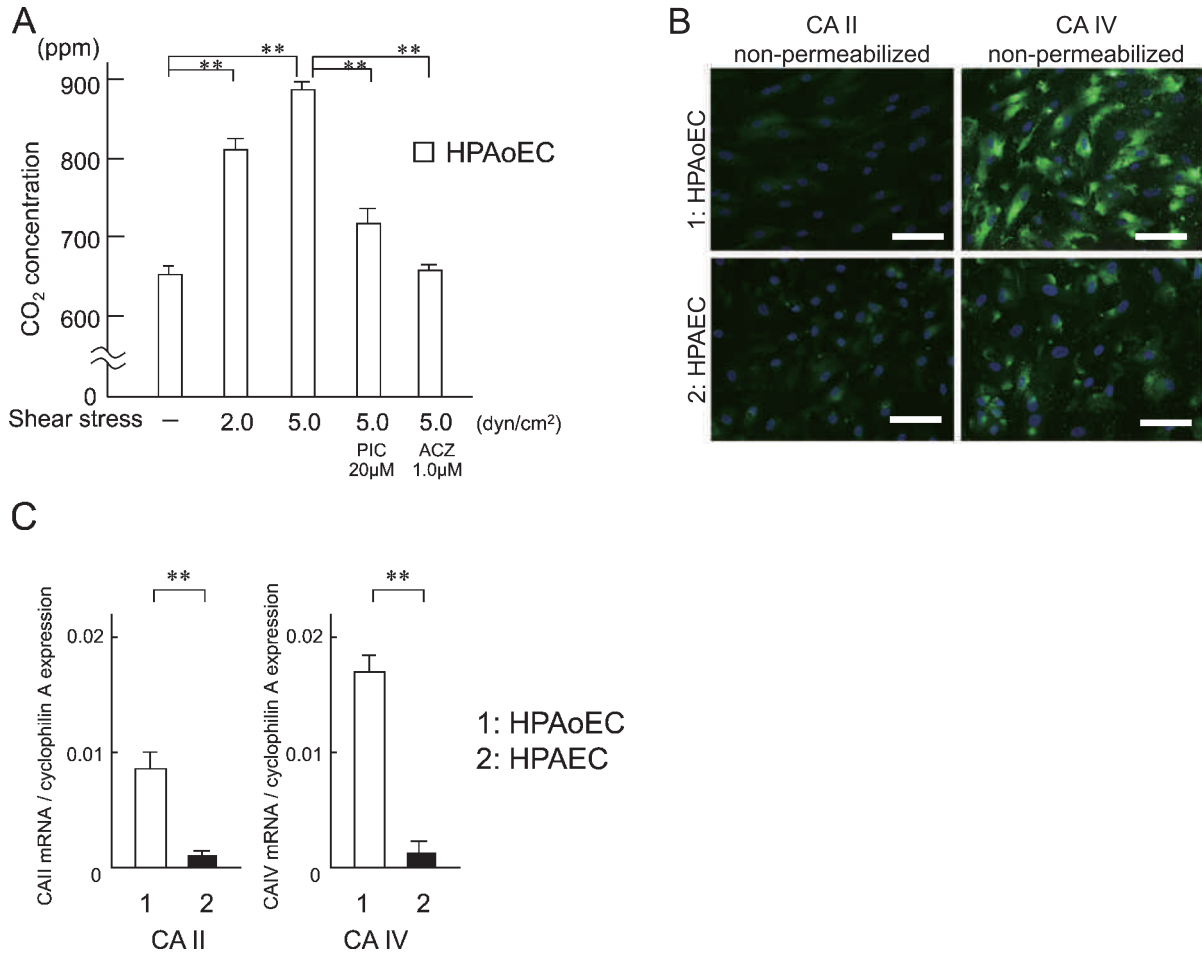


図8 ヒト肺細動脈内皮細胞 (HPAoEC) の流れ刺激 (2.0~5.0 dyn/cm<sup>2</sup>) による炭酸ガス排出

A: 流れ刺激 (2.0~5.0 dyn/cm<sup>2</sup>, -は流れ刺激無処置群) に対する HPAoEC からの炭酸ガス排出量の測定結果と, 20 μM PIC (細胞表面 F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase 阻害薬) と 1.0 μM acetazolamide (ACZ, 細胞表面 carbonic anhydrase (CA) IV 阻害薬) 前処置の影響。縦軸: 閉鎖培地容器内に排出された炭酸ガス量 (ppm)

B: ヒト肺細動脈内皮細胞 (1: HPAoEC) とヒト肺動脈内皮細胞 (2: HPAEC) の細胞表面に存在する CA II, CA IV の免疫細胞染色結果の典型例。スケール: 100 μm

C: ヒト肺細動脈内皮細胞 (1: HPAoEC) とヒト肺動脈内皮細胞 (2: HPAEC) における CA II mRNA, CA IV mRNA 発現量の定量的検索結果。縦軸: CA II mRNA, CA IV mRNA 発現量の相対値

\*\* : p < 0.01 両群間の統計的検定結果

(文献46より引用)

であるIV型炭酸脱水酵素も細胞表面に多く存在していることを免疫細胞染色および mRNA の発現解析によって確認した (図7, 8)<sup>46)</sup>。このことから, 今までの「赤血球の酸素化により炭酸ガスが産生される」という考え方よりも, 「肺細動脈内皮細胞に流れ刺激が加わると炭酸ガスが産生される」という新しい概念の方が, 過去の実験データや臨床的矛盾を一元的に説明できることを報告した (図9)<sup>46)</sup>。

#### X おわりに

これまで述べたように, 生体内では流れによるずり応力刺激が血管やリンパ管の内皮細胞において①細

胞内の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇をトリガーとして, 秒オーダーの生理機能, 例えば NO の産生分泌から②遺伝子, 蛋白発現を修飾して数時間から数日オーダーの生理機能, 例えば ecNOS の遺伝子・蛋白発現まで制御していることが判ってきた。さらに③脈管内皮細胞の表面に一般的に存在している F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase の活性を調節して ATP と水素イオンを共分泌し, それらの分泌物を介して生理機能を制御していることも看過できない事実として明白になってきた。特に私共が見出した共分泌された水素イオンが肺細動脈内皮細胞の炭酸ガス産生, 排出に関与しているという知見は, その典型的な事例の一つである。しかし, ずり応力刺

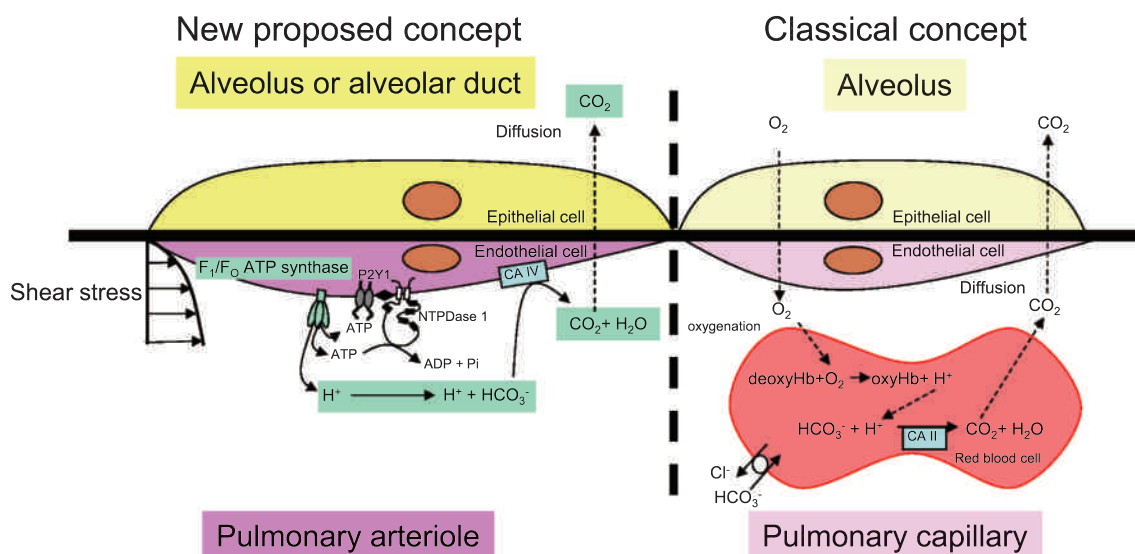


図9 私共の提唱しているヒト肺細動脈内皮細胞における流れ刺激による細胞表面の  $F_1/F_0$  ATP synthase 活性変化を介した炭酸ガス産生・排出機構の模式図  
 左：私共の提唱した炭酸ガス産生・排出の新しい考え方 右：赤血球内の炭酸ガス産生・排出を唱えた従来の考え方 (文献46より引用)

激がなぜ  $F_1/F_0$  ATP synthase を活性させるのかの分子機構についてはまだ不明であり、今後の課題である。

培養細胞を用いた分子生物学的手技により新しい物質や因子を捕まえる研究が最近隆盛を極めている。しかし、培地交換という分子生物学者にとってはごくごく当たり前の操作によっても圧変化や流れ刺激といった物理的刺激を細胞に与えてしまうことになる。そして、細胞のタンパク発現や遺伝子発現にまで影響を及ぼしてしまう可能性のあるという事実は、私共分子生物学的手技を用いる研究者にとっても肝に銘ずべきであると思われる。

また、生理学は生体内の機能を、細胞、臓器、生体レベルで広く解析する学問分野である。培養細胞を用いた分子生物学的手技による機能解析をするにあっても、今までに生理学分野で蓄積されてきた知識や情報を十二分に活用し、より生体内に近い環境を作り出して実験計画を吟味することによって新たな発見の手がかりになる可能性をこれらの研究を通して再認識したところでもある。

さらに、生理学研究では最終的に動物実験を用いた *in vivo* 実験が必要不可欠であるが、その動物実験のデータを解釈するにあたって十分に配慮すべき問題があることをお伝えしておきたい。例えば、静脈系やリンパ管系の低圧系の循環系では、ヒトやサルの上位動物とラット・マウスやウサギの四足歩行動物との間に循環動態に大きな違い、例えばヒトでは顔と下肢とのリンパ動態は重力の影響が強く、同一には考えられないという事がある。そのため、汎用されているラットやマウス等の実験動物で得られた結果が即ヒトに応用できるかというところに大きな問題が存在することは、さらに注意を喚起しなければならない点である。ゆえに、私共は培養細胞を用いる分子生物学的研究はヒト由来の細胞を用いることを旨としている。そして、培養細胞での研究結果をもとに、ヒトと四足歩行動物との機能特性の違いを十分に把握した上で、動物実験を計画することが、臨床応用にできるだけ短時間で近づけることになるのではないかと考えている次第である。

## 文 献

- 1) Azuma T, Oka S: Mechanical equilibrium of blood vessel walls. *Am J Physiol* 221: 1310-1318, 1971
- 2) Ohhashi T: Effects of microvibration on the activity of ureteral and portal smooth muscles. *Am J Physiol* 236: C192-C201, 1979
- 3) Azuma T, Ohhashi T, Sakaguchi M: An approach to pathogenesis of "white finger" induced by vibratory stimulation: Acute but sustained changes in vascular responsiveness of canine hindlimb to noradrenaline. *Car-*

diovasc Res 14 : 725-730, 1980

- 4) Davies PF : Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75 : 519-560, 1995
- 5) Chien S : Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis : the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 : H1209-H1224, 2007
- 6) 岡 小天 : 物理科学選書 7, レオロジー—生物レオロジー—, 第 1 版, pp 1-58, 裳華房, 東京, 1974
- 7) Bülbiring E : Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle. *J Physiol London* 128 : 200-221, 1955
- 8) Bülbiring E, Kuriyama H : The effect of adrenaline on the smooth muscle of guinea-pig taenia coli in relation to the degree of stretch. *J Physiol London* 169 : 198-212, 1963
- 9) Azuma T, Ohhashi T, Sakaguchi M : Microvibration : Capable of inducing spontaneous contractions in smooth muscles. *Proc Soc Exp Biol Med* 151 : 484-486, 1976
- 10) Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC : Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 117 : 109-159, 1971
- 11) Nerem RM, Mosberg AT, Schwerin WD : Transendothelial transport of <sup>131</sup>I-albumin. *Biorheology* 13 : 71-77, 1976
- 12) 城下 尚, 大根田玄寿 : 動脈内圧上昇による動脈壁傷害とその修復に関する実験病理学的研究, 血圧変化と壁周張力変動を中心として. *動脈硬化* 2 : 73-79, 1974
- 13) Siegel JM, Markou CP, Ku DN, Hanson SR : A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis. *J Biomech Eng* 116 : 446-451, 1994
- 14) Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK, Hellumus JD : Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. *Thromb Haemost* 74 : 1329-1334, 1995
- 15) Ross R, Glomset JA : Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell : Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of lesions of atherosclerosis. *Science* 180 : 1332-1339, 1973
- 16) Ross R, Harker L : Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 193 : 1094-1100, 1976
- 17) Gessner FB : Hemodynamic theories of atherogenesis. *Circ Res* 33 : 259-266, 1973
- 18) Azuma T, Fukushima T : Disturbance of blood flow as a factor of thrombus formation. *Thrombosis Res* 8 : 375-380, 1976
- 19) Azuma T, Fukushima T : Flow patterns in stenotic blood vessel models. *Biorheology* 13 : 337-355, 1976
- 20) Grabowski EF : Platelet aggregation in flowing blood at a site of injury to an endothelial cell monolayer : quantitation and real-time imaging with the TAB monoclonal antibody. *Blood* 75 : 390-398, 1990
- 21) Ohhashi T, Azuma T, Sakaguchi M : Active and passive mechanical characteristics of bovine mesenteric lymphatics. *Am J Physiol* 239 : H88-H95, 1980
- 22) Fukaya Y, Ohhashi T : Acetylcholine- and flow-induced production and release of nitric oxide in arterial and venous endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 270 : H99-H106, 1996
- 23) Tsunemoto H, Ikomi F, Ohhashi T : Flow-mediated release of nitric oxide from lymphatic endothelial cells of pressurized canine thoracic duct. *Jpn J Physiol* 53 : 157-163, 2003
- 24) Shirasawa Y, Ikomi F, Ohhashi T : Physiological roles of endogenous nitric oxide in lymphatic pump activity of rat mesentery in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278 : G551-556, 2000
- 25) Ohhashi T, Yokoyama S : Nitric oxide and the lymphatic system. *Jpn J Physiol* 44 : 327-342, 1994
- 26) Ohhashi T, Mizuno R, Ikomi F, Kawai Y : Current topics of physiology and pharmacology in the lymphatic system. *Pharm Ther* 105 : 165-188, 2005
- 27) Furchgott RF, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373-376, 1980
- 28) Kuchan MJ, Frangos J : Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 266 : C628-C636, 1994
- 29) McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA : Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and



- diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211 : 24-32, 1996
- 30) Nojiri H, Ohhashi T : Immunolocalization of nitric oxide synthase and VEGF receptors in cultured lymphatic endothelial cells. *Microcirculation* 6 : 75-78, 1999
  - 31) Arai F, Mizuno R, Ohhashi T : Effects of VEGF on  $Ca^{2+}$ -transient in culture lymphatic endothelial cells and mechanical activity of isolated lymph vessels. *Jpn J Physiol* 50 : 343-355, 2000
  - 32) Yokoyama S, Ohhashi T : Effects of acetylcholine on spontaneous contractions in isolated bovine mesenteric lymphatics. *Am J Physiol* 264 : H1460-1464, 1993
  - 33) Ando J, Ohtsuka A, Korenaga R, Kamiya A : Effect of extracellular ATP level on flow-induced  $Ca^{++}$  response in cultured vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 1192-1199, 1991
  - 34) Schnittler HJ, Püschel B, Drenkhahn D : Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *Am J Physiol* 273 : H2396-H2405, 1997
  - 35) Hoyer J, Distler A, Haase W, Göggolein H :  $Ca^{2+}$  influx through stretch-activated cation channels activates maxi  $K^{+}$  channels in porcine endocardial endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 2367-2371, 1994
  - 36) Ando J, Korenaga R, Kamiya A : Flow-induced endothelial gene regulation. In : Lalkers PI (ed), *Mechanical Forces and Endothelium*, pp 111-126, Harwood academic, London, 1999
  - 37) Kawai Y, Yokoyama Y, Kaidoh M, Ohhashi T : Shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* 298 : C647-C655, 2010
  - 38) Jain RK : Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Microcirculation* 4 : 1-23, 1997
  - 39) Fukumura D, Jain RK : Tumor microvasculature and microenvironment : Targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res* 74 : 72-84, 2007
  - 40) Song JW, Muun LL : Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci* 108 : 15342-15347, 2011
  - 41) Kawai Y, Ajima K, Nagai T, Kaidoh M, Ohhashi T : Real-time imaging of the lymphatic channels and sentinel lymph nodes of the stomach using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in a porcine model. *Cancer Sci* 102 : 2073-2081, 2011
  - 42) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T : Pivotal roles of shear stress in the microenvironmental changes that occur within sentinel lymph nodes. *Cancer Sci* 103 : 1245-1252, 2012
  - 43) Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J : Fluid shear stress activates  $Ca^{2+}$  influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res* 87 : 385-391, 2000
  - 44) Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Kumagaya S, Taketani Y, Kamiya A, Ando J : Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 : H1646-H1653, 2007
  - 45) Tsuprun VL, Orlova EV, Mesyanzhinova IV : Structure of the ATP-synthase studied by electron microscopy and image processing. *FEBS Lett* 244 : 279-282, 1989
  - 46) Kawai Y, Yoshida K, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T : Shear stress-mediated  $F_1/F_0$  ATP synthase-dependent  $CO_2$  gas excretion from human pulmonary arteriolar endothelial cells. *J Cell Physiol* 227 : 2059-2068, 2012
  - 47) Klocke R : Carbon dioxide transport. In : Fishman AP, Farhe LE, Tenney SM, Geiger SR (eds), *Handbook of Physiology, Section 3: The respiratory System, Vol. IV, Gas exchange*. pp 173-197, American Physiological Society. Bethesda, MD, USA, 1987
  - 48) Crandall ED, O'Brasky JE : Direct evidence of participation of rat lung carbonic anhydrase in  $CO_2$  reactions. *J Clin Invest* 62 : 618-622, 1978
  - 49) Glader B : Anemia : General considerations. In : Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B (eds), *Wintrobe's Clinical Hematology*. pp 947-978, Lipponcott Williams and Wilkins. Philadelphia, PH, USA, 2003

(H 25. 2. 4 受稿)