

## 401 引張刺激を受ける血管内皮細胞における増殖因子受容体の役割

## The role of growth factor receptor on stretched endothelial cells

○学 小林 健介 (東京大学) 学 小泉 耕平 (東京大学)

正 古川 克子 (東京大学) ◎正 牛田 多加志 (東京大学)

Kensuke KOBAYASHI, Kohei KOIZUMI, Katsuko FURUKAWA, Takashi USHIDA

University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, TOKYO

Key words : Stretch, Human Umbilical Vein Endothelial Cell(HUVEC),  $Ca^{2+}$ , Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR), Fura-2

## 1. 背景

生体内の細胞や組織は、絶えず、何らかのメカニカルストレス（機械的刺激）を受けている。これらは生体の動作や重力などに起因し、適度な刺激は細胞や組織にとって重要かつ不可欠なものである。例えば血管内皮細胞は、血流による剪断応力や拍動による引張刺激が負荷されているが、これらの物理的刺激に血管内皮細胞は応答し、機能を維持することが知られている。

外部刺激を受けてから形態変化や遺伝子発現など長期的応答を示すまで、細胞内では各種タンパクの活性化がドミノ倒しの如く起こるが、各イベント間ではメッセンジャー（細胞内情報伝達物質）の動きがシグナルの役目を果たす。そのメッセンジャーとしてより重要視されているものに  $Ca^{2+}$  があり、生理活性物質やメカニカルストレスに対して、細胞がその内部で濃度を上昇させることが分かっている。

患者本人の細胞から組織や臓器を再構築させようという再生医療では、組織再生の確実性・迅速性が求められる。それには、極力生体内に近い環境での細胞培養が不可欠であり、前述のようなメカニカルストレスが必要であると考えられることから、細胞培養へのメカニカルストレスの適用が期待されている。しかしながら、細胞応答のメカニズムは勿論、細胞のメカニカルストレス感知機構の特定は未だ達成されていない。

細胞膜には EGF 受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) が存在する。EGFR は分子量 17 万のポリペプチド単鎖で、細胞外部位に EGF が結合すると、細胞内側のチロシンキナーゼ部位が活性化される。これが分化・増殖の制御にあたる ERK (Extracellular-signal Regulated protein Kinase) の活性化に繋がるとされる。その一方で、周期的引張刺激によって ERK が活性化されるとの報告があり<sup>1)</sup>、1 回 1 回の引張刺激に対し ERK 活性化の上流に位置する EGFR が活性化されている可能性があることから、本研究では EGFR に着目することとした。

## 2. 目的

血管内皮細胞に一軸の引張変位を負荷すると同時に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化のリアルタイム観察を行い、単発の引張刺激に対して EGFR が活性化されるかどうか検証する。

## 3. 実験方法

## 3.1 細胞の培養

細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC) を用い、専用培地 EGM-2 中において、5%  $CO_2$  存在下・37℃で培養した。継代は、70~90% コンフルエントになったフラスコ中の細胞を

0.05% Trypsin 溶液によって剥離させ、必要な細胞数だけ採取して新たなフラスコに播種することで行った。

## 3.2 シリコン容器製作・細胞の播種

2種類のシリコンラバー(5mm厚と50 $\mu$ m厚)をFig.1のような形状に加工、貼り合わせて製作した容器をオートクレーブ(高温高圧滅菌)した。乾燥後、細胞接着性タンパク質ラミニンで表面をコーティングし、一昼夜乾燥させた。更に培地で洗った後、HUVECを4万 cells/cm<sup>2</sup>播種した。

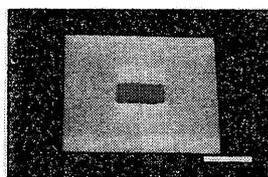


Fig.1 Silicone chamber

Cells were cultured in the square space, 1 cm on a side. (bar = 1 cm)

## 3.3 細胞の染色・引張変位負荷

2日または3日間培養すると80%コンフルエントとなる。この時点で  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 Fura-2 で染色した。染色は、適量の HEPES 緩衝溶液で洗浄後、有機溶媒 DMSO 30  $\mu$ l で希釈した 1.7  $\mu$ M Fura-2 溶液、界面活性剤 Pluronic, HEPES の混合液を加え室温で 20 分間放置することで行い、余剰な Fura-2 は HEPES で洗浄後、再び HEPES を加え 5%  $CO_2$  存在下 37℃・20 分間のインキュベーションで取り除いた。

そして、細胞が接着した容器の一端を引張ることで、細胞自身に引張変位を負荷した (Fig.2)。なお本研究では、ステップモータを用いて変位を制御し、一様に引張変位量を 20% とした。

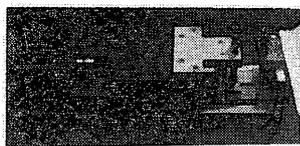


Fig.2 Cell-stretching apparatus

Stepping motor-controlled axial stretch was applied to cells cultured on silicone membrane.

3.4  $Ca^{2+}$  濃度解析

細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度変化をリアルタイムに計測する為、引張変位負荷と同時に波長 380nm と 360nm の励起光を HUVEC に照射して倒立型蛍光顕微鏡で観察を行い、得られた蛍光画像を高感度 ICCD カメラで捕捉した。次に、2つの励起光に対する蛍光強度の比 (以下 Ratio) を算出することで細胞内 Fura-2 濃度の違い、励起光源の照明ムラ、細胞の厚みなどによる誤差を補正し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に代わる指標とした。但し、 $Ca^{2+}$  濃度上昇に対して、380nm の励起光に対する蛍光の強度が減少する (360nm 励起光の場合は不変) ため、Ratio は低下する。これら一連のリアルタイムな  $Ca^{2+}$  イメージングには、蛍光画像解析システム「ARGUS-50」(浜松ホトニクス社)を使用した。

### 3.5 阻害剤

本研究では、細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答における EGFR の役割を検証するため、EGFR のチロシンリン酸化阻害剤 AG1478 in Solution (Calbiochem, CA; 当初は 10 mM) を HEPES もしくは HEPES(-)/EGTA (5 mM) (以下 EGTA) で 500 nM に希釈して細胞に加えた。

更に、 $\text{Ca}^{2+}$  応答に至るまでに EGFR の関与する経路を特定するため、EGTA, Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$  に希釈) を加えることで、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  のキレート、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストア (小胞体、ER) 内の枯渇をそれぞれ行った。

## 4. 結果と考察

### 4.1 EGFR 阻害下での引張刺激に対する細胞応答

AG1478 によって EGFR のチロシンリン酸化が阻害されると、ERK の活性化が抑制されることが報告されている<sup>2)</sup>。そこで、AG1478 を負荷した HUVEC に引張刺激を加えると同時に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を計測すると、Ratio は一過的に変化したものの (Fig.3)、全く阻害しない場合 (control) に比べて Ratio 変化率は大きく低下した (Fig.4)。ここで、Ratio 変化率は次のように定義する。引張刺激負荷直前の Ratio 値を R、引張刺激負荷後の Ratio 変化量の最大値 (但し、負荷直後の焦点のずれによる乱れを除く) を dR とするとき、

$$\text{Ratio 変化率} [\%] = \frac{dR}{R} \times 100$$

このことから、引張刺激に対する細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇要因のひとつとして、EGFR の関与する経路が存在することが示唆され、EGFR 阻害時の Ratio 変化率の減少分は、この経路を経た場合の  $\text{Ca}^{2+}$  導入分に相当すると考えられる。

また、EGF の結合による EGFR のチロシンリン酸化によって、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアから  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されるとの報告がある<sup>3)</sup>。しかしこの応答については、AG1478 により EGFR のチロシンリン酸化を阻害した場合でも、完全な抑制は観察されなかった。

したがって、引張刺激による EGFR 活性化から細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に至る細胞内シグナル伝達経路は、EGF 結合の場合のそれとは異なる可能性がある。

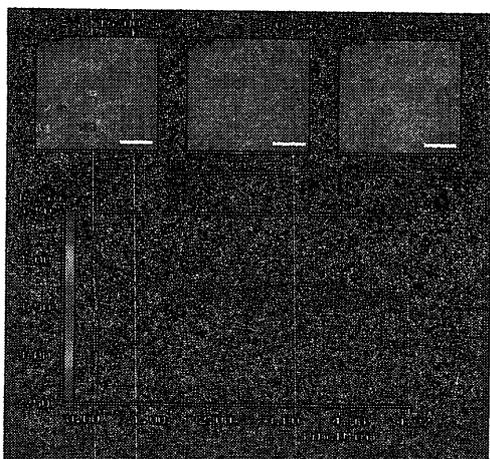


Fig.3 Time-course changes of Ratio

Tensile strain of 20 % was applied to HUVEC with EGFR inhibited, when arrowhead indicates.  
(bar = 500  $\mu\text{m}$ )

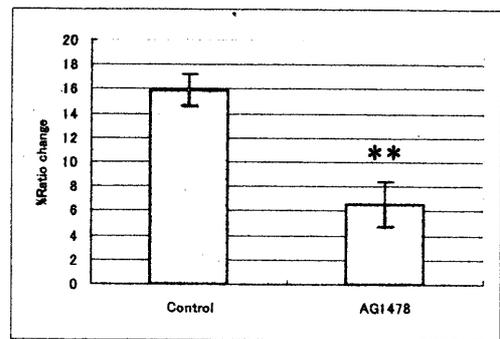


Fig.4 Decrease in Ratio when stretched

Mean  $\pm$  S.E., \*\*:  $p < 0.01$  vs control

### 4.2 EGFR の関与する $\text{Ca}^{2+}$ 応答メカニズム

EGTA で細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートした HUVEC に引張刺激を負荷した際の Ratio 変化率に、EGFR の阻害如何による差異が存在するか検証したところ、EGFR を阻害した場合の Ratio 変化率が、阻害しない場合に比べ小さくなった (Fig.5A)。

一方、Thapsigargin で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアを枯渇した場合にも同様の検証を行ったところ、EGFR の阻害による Ratio 変化率の差異は見られなかった (Fig.5B)。

したがって、引張刺激による EGFR 活性化に始まるシグナル伝達経路を経た細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度上昇は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの放出によるものであることが示唆される。

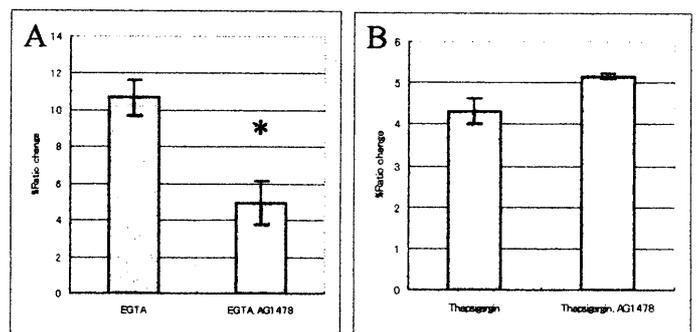


Fig.5 Effects of AG1478

A. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was chelated with EGTA.

B.  $\text{Ca}^{2+}$  in ER was reduced with Thapsigargin.

Mean  $\pm$  S.E., \*:  $p < 0.05$  vs only-EGTA treated cell

## 5. 結論

本研究により、以下の結論が得られた。

- ① 引張刺激を受けた際の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に、EGFR が関与していることが示唆された。
- ② 引張刺激による EGFR 活性化に始まる細胞内シグナル伝達によって、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が促進されることが示唆された。
- ③ 引張刺激と EGF による刺激で、EGFR のチロシンリン酸化阻害の効果に違いが見られた。

## 参考文献

- 1) Iwasaki, H *et al* *Am.J.Physiol.HeartCirc.Physiol.* 278: H521-H529, 2000
- 2) Tanimoto, T *et al* *Circ.Res.* April 30, 2004
- 3) Kermit L *et al* *J.Biol.Chem.* 266(14); May 15, 8899-8906, 1991