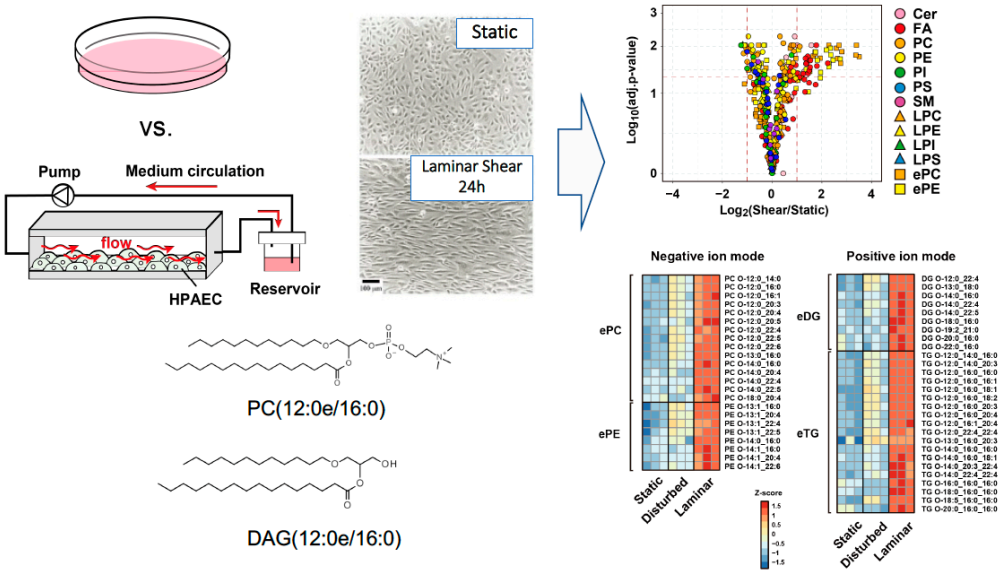
23　血管内皮shear stress応答に関わる脂質シグナルの解明	有田　誠

【目的】血管内皮細胞は血流に起因するずり応力（shear stress）に応答して、遺伝子発現や形態、機能を変化させる。一方で、粥状動脈硬化は血流が大きく変化する血管の湾曲部や分岐部に好発することが知られており、shear stress 環境の変化が内皮細胞の形質を変化させ、粥状硬化、動脈瘤、血管炎、など、血管病変の進展を左右すると考えられている。このような shear stress に応答する血管内皮ホメオスタシスの分子機序を明らかにすることは、血管病変に対する予防、治療の開発への道を開くと思われる。そこで本研究では、生化学的解析が可能なスケール（10^6オーダーの細胞数）で培養した血管内皮細胞に流体力学的に設計された流れ負荷装置で定量的な shear stress を作用させ、細胞内脂質代謝の変化や遺伝子発現制御を包括的に解析することで、shear stress に対する未知の細胞応答メカニズムを捉え、それらの血管病態における役割を解明することを目的とした。

【方法】ヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）を培養し、定常的な流れずり応力（shear stress）を細胞に負荷した。経時的に細胞を回収し、遺伝子発現パターンの変化について RNA-Seq 解析、および細胞内脂質代謝の変化について、質量分析システム（LC/QTOF-MS）とデータ解析ソフトウェア（MS-DIAL）を用いたノンターゲットリピドミクス解析を行った。

【結果】HPAEC に動脈の正常域の laminar shear stress（15 dynes/cm^2）を 24 時間負荷することにより、炭素数 12～14 の中鎖アシル側鎖を含有するエーテル型脂質（エーテル型ホスファチジルコリン（ePC）、エーテル型ホスファチジルエタノールアミン（ePE）、エーテル型ジアシルグリセロール（eDG）、エーテル型トリアシルグリセロール（eTG））が特徴的に増加することを見出した。細胞内でのエーテル型脂質の生合成および β 酸化による中鎖脂肪酸の生成は主にペルオキシソームで行われることから、laminar shear stress の負荷に応答してペルオキシソームの脂質代謝機能が制御されている可能性が示唆された。さらに、代謝前駆体である中鎖アルキルグリセロール（12-alkyl glycerol、12AG）を細胞に添加すると、中鎖アシル側鎖を含有するエーテル型脂質の増加に伴い、ホルボールエステル（PMA）刺激による接着因子 VCAM-1 の発現誘導が顕著に抑制された。同様の現象は正常な laminar shear stress に晒された血管内皮細胞でも見られ、今回見いだされた事象は細胞内の脂質リモデリングを介した新しい環境適応メカニズムであると考えられた。また、本研究で見いだされた中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の新機能からは、新しい機能性脂質として動脈硬化症や血管炎など血管病変の病態解明、および予防・治療に適用される可能性が示唆された。

血管内皮細胞の Laminar shear stress 応答に関わる細胞内脂質リモデリング



23. 血管内皮 shear stress 応答に関わる脂質シグナルの解明

有田　誠

慶應義塾大学 薬学部 代謝生理化学講座

Key words：脂質代謝，機能性脂質，リピドミクス，血管内皮細胞，流れずり応力

緒　言

生体を構成する細胞は、細胞内外の様々な機械的刺激にさらされている。感知された機械的刺激に応答し、細胞内シグナル情報へ変換することをメカノトランスダクションと呼び、細胞は多彩なシグナル伝達様式によりその機能や恒常性を維持している。例えば、血管内皮細胞は血流に起因するずり応力（shear stress）に応答して、遺伝子発現制御や細胞の形態・機能を変化させる。一方で、粥状動脈硬化は血流が大きく変化する血管の湾曲部や分岐部に好発することが知られており、shear stress 環境の変化が内皮細胞の形質を変化させ、粥状硬化、動脈瘤、血管炎など血管病変の進展を左右すると考えられている。このような shear stress に応答する血管内皮ホメオスタシスの分子機序を明らかにすることは、血管病変に対する予防、治療の開発への道を開くと思われる。

血管内皮細胞が shear stress を感知する上で、最外層に位置する細胞膜を構成する脂質や膜タンパク質の代謝・機能制御が重要な役割を果たしている。その中でも脂質は、その特性として単独の分子が生理活性を有するものと、分子集合体として「場」の制御に関わるものがあり、その分子情報が生体内でどのように認識・利用されているのかを分子レベルで理解することは、shear stress などの環境変化に適応するための生体情報システムを統合的に理解する上で重要である。一方で我々は、生命の脂質多様性を網羅的に捉えるためのオリジナルな系として、質量分析システム（LC/QTOF-MS）とデータ解析ソフトウェア（MS-DIAL）を用いた最先端のノンターゲットリピドミクス解析技術を開発した［2］。さらに、脂質分子の構造および定量情報を代謝マップに投影するプログラムを構築し、疾患やバイオロジーと相関を示す脂質代謝ネットワークの解明を進めている。このような最先端の解析技術を駆使することにより、多数の脂質分子や代謝ネットワークが見いだされ、メカニズム不明であった生命現象や病態に対して根本的な解を与えるなど、幅広い生命科学分野に大きなインパクトを与えている。

このような背景のもと、生化学的解析が可能なスケール（10^6オーダーの細胞数）で培養した血管内皮細胞に、流れ負荷装置で定量的な shear stress を作用させることで、細胞内脂質代謝の変化や遺伝子発現制御を包括的に解析した。その結果、動脈の正常域の laminar shear stress（15 dynes/cm^2）を 24 時間負荷することにより、中鎖脂肪酸を含有するエーテル型リン脂質が特徴的に増加することを見出した。さらに、代謝前駆体である中鎖アルキルグリセロールを血管内皮細胞に添加することにより、細胞内で中鎖脂肪酸含有エーテル型リン脂質を選択的に増加させることができ、この条件下でホルボールエステル（PMA）刺激による接着因子 VCAM-1 の発現誘導が顕著に抑制されることを見出した。今回見出された中鎖脂肪酸含有エーテル脂質は、正常な shear stress により内因性に誘導される細胞内脂質であり、この細胞内代謝応答が血管内皮ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たす可能性が示された［1］。

方　法

1. Shear stress 実験

ゼラチンコートしたガラス板上で培養されたヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）を平行平板型流れ負荷装置にセットし、ペリスタポンプで培地を灌流させることで laminar shear stress（15 dynes/cm^2）を負荷した。比較対象としては、静置培養した HPAEC、および disturbed flow に晒した HPAEC を用いた。また laminar shear stress による炎症刺激

への影響を検討するため、laminar shear stress を 20 時間負荷後、灌流している培地に phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）を添加し、さらに laminar shear stress を 4 時間負荷した。

2. ノンターゲットリピドミクス解析

細胞ペレットを 200 μL のメタノールで懸濁後、クロロホルム 100 μL を加えて 1 時間室温でインキュベートした。その後 ultrapure water を 20 μL 加えて 10 分間室温でインキュベートし、遠心後の上清を回収した。回収液の一部を使い、常法に従いリン量を定量した。その後、残りの溶出液を窒素ガスで蒸発させ、リン量が 1 mM となるようにクロロホルム：メタノール=1：2 混合液で再溶解した。ノンターゲット解析は、高速液体クロマトグラフィー/四重極飛行時間型質量分析計（LC/QTOF-MS）（Waters/Sciex）による Information Dependent Acquisition（IDA）モードで行い、ネガティブイオンモードとポジティブイオンモードで測定を行った。取得したデータは、MS-DIAL を用いて解析を行った。

3. RNA Seq 解析

培養後の HPAEC から RNeasy Plus Mini Kit（QIAGEN）を用いてマニュアルに従い RNA を抽出した。RNA-seq のライブラリは NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina（New England Biolabs）を用い、マニュアルに従い調製した。NextSeq（Illumina）で測定後、ヒトゲノム配列（hg19）にマッピングし、得られたカウント値から群間での変動遺伝子を検出した。

4. イムノブロット解析

培養後の細胞をリシスバッファー（75 mM NaCl, 3% SDS, Complete Mini EDTA-free protease inhibitors（Roche）, and Halt phosphatase inhibitor cocktail（Thermo Scientific）in 50 mM HEPES, pH 8.5）で溶解し、加熱と超音波処理を行った。遠心後の上清にサンプルバッファーを等量加えて煮沸し、4～20% TGx-Gel（Bio-RAD）に泳動した。その後、定法に従い PVDF 膜への転写、一次抗体反応、二次抗体反応後に化学発光法で目的タンパク質を検出した。一次抗体は beta-actin（13E5）mAb（Cell Signaling）と VCAM-1（E1E8X）mAb（Cell Signaling）を、二次抗体は ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab（GE Healthcare）を用いた。

5. アルキルグリセロール添加実験

HPAEC の培地に終濃度 10 μM となるよう、エーテル結合しているアルキル鎖長が 12、16、18 の 3 種類のアルキルグリセロール 1-O-dodecyl-rac-glycerol（12AG）、1-O-hexadecyl-rac-glycerol（16AG）、1-O-octadecyl-rac-glycerol（18AG）をそれぞれ添加して 72 時間培養した。培養後の細胞は shear stress 実験と同様、リピドミクス解析、RNA-seq 解析、イムノブロット解析に供した。

結　果

1.　Shear stress 負荷による細胞内エーテル脂質の変動

HPAEC に laminar shear stress を負荷し、経時的な遺伝子発現の変動を RNA-Seq で調べた結果、KLF2、KLF4、NRF2、HMOX1、NQO1、GCLM、FTH1、eNOS、THBD、ASS1、NPPC、PTGS2 などが特徴的に誘導されるなど、既報でも言われているように全体的に atheroprotective な遺伝子発現の上昇トレンドが認められた。この条件下の細胞を用いてノンターゲットリピドミクス解析を実施したところ、トータルで 761 個の脂質分子種がアノテートされ、その中でも laminar shear stress を 24 時間負荷することで静置培養に比べて 198 分子の脂質が有意に変動することが確認された。laminar shear stress 刺激による特徴的な変化としては、炭素鎖 12 から 14 の中鎖脂肪酸をエーテル側鎖として持つエーテル脂質（エーテル型ホスファチジルコリン（ePC）、エーテル型ホスファチジルエタノールアミン（ePE）、エーテル型ジアシルグリセロール（eDG）、エーテル型トリアシルグリセロール（eTG））の一群が増加していることが明らかとなった（図 1）。一方で極長鎖脂肪酸を含むより長い脂肪酸をエーテル結合として有する eTG は laminar shear stress によって減少する傾向が確認できた。これらの脂質変動は disturbed flow では認められず、血管内皮細胞が laminar flow を選択的に感知して生じる変化であると考えられた。

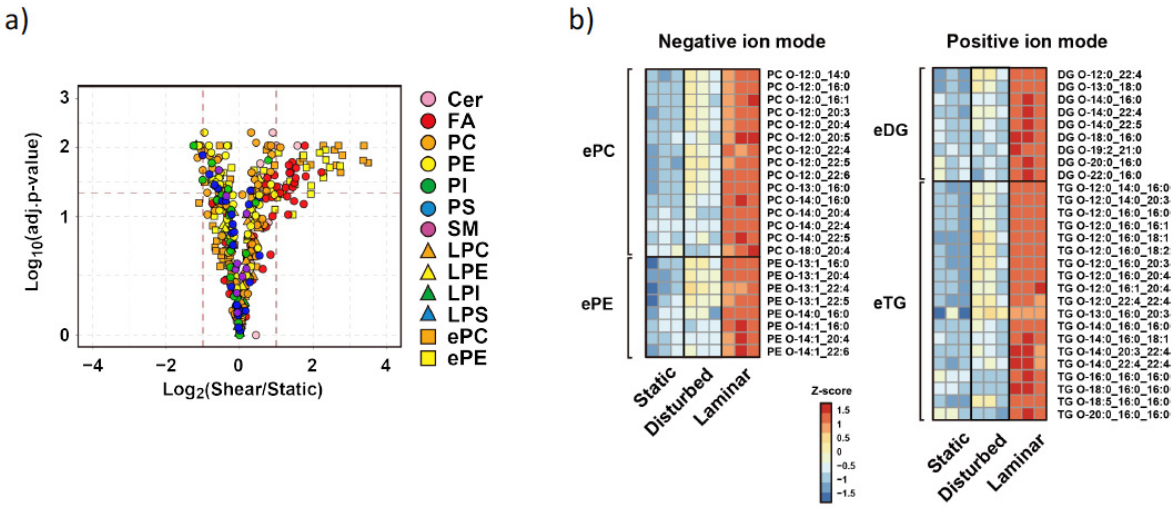


図 1. Laminar Shear Stress による中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の変動

a) Laminar shear stress 24 時間負荷した HPAEC のノンターゲットリピドミクス解析結果。Volcano plot の X 軸は対数変換した fold-change（閾値 2 または 0.5）、Y 軸は対数変換した adjusted p-value（閾値 0.05）を示す。

b) Laminar flow condition において中鎖脂肪酸を含有するエーテル型脂質（エーテル型ホスファチジルコリン（ePC）、エーテル型ホスファチジルエタノールアミン（ePE）、エーテル型ジアシルグリセロール（eDG）、エーテル型トリアシルグリセロール（eTG））が特徴的に増加し、この変化は disturbed flow condition では認められなかった。

2. 代謝前駆体の投与による細胞内エーテル脂質の合成促進

Laminar shear stress によって増加したエーテル脂質の機能を解析するために、まず細胞内でエーテル脂質の合成促進を試みた。すなわちエーテル脂質の代謝前駆体である 3 種類のアルキルグリセロール（12AG、16AG、18AG）を HPAEC の培地に添加し、一定時間培養後にノンターゲットリピドミクス解析を行った。その結果、添加したアルキルグリセロールのエーテル側鎖長に応じた ePC、ePE、eDG、eTG の顕著な増加が確認され、laminar shear stress 負荷時に生じる中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の上昇と同様な状況を、細胞外から代謝前駆体である中鎖アルキルグリセロール（12AG など）を添加することで誘導できることが示された。

3. 中鎖アルキルグリセロール投与による抗炎症作用

血管内皮細胞に laminar shear stress を負荷した時と、中鎖アルキルグリセロールを添加して培養した時、いずれにおいても細胞内で中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の上昇が認められることから、双方に共通の形質について RNA-Seq による遺伝子発現変動の解析を行った。その結果、炎症刺激（PMA 添加）によって誘導される細胞接着分子 VCAM-1 の発現がいずれの条件下でも顕著に抑制されることが明らかとなった。12AG による VCAM-1 の発現抑制はタンパク質レベルでも確認され、その効果は培地に添加する 12AG の濃度依存的であった。また、12AG の作用は構造特異的であり、同濃度（10 μM）の構造異性体である 16AG、18AG、12-monoacylglycerol（12MG）を加えた場合には効果が認められなかった（図 2）。

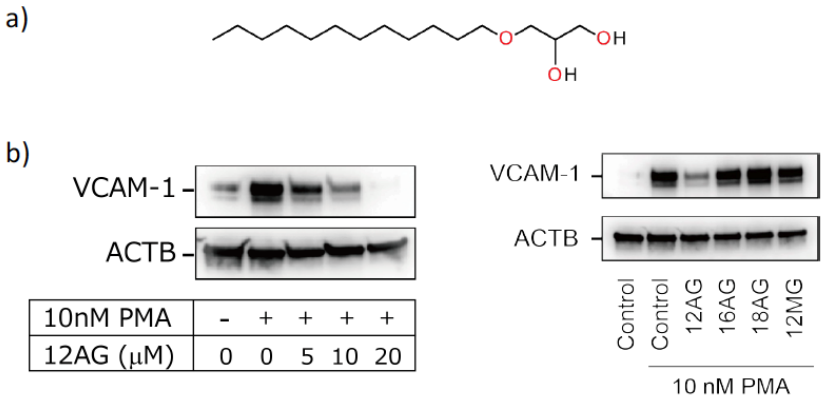


図 2. 中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の前駆体 12AG 投与による VCAM-1 の発現抑制

a) 12AG の構造式。

b) HPAEC において PMA 刺激による接着因子 VCAM-1 の発現誘導が、12AG の濃度依存的に抑制された。また、12AG の作用は構造特異的であり、同濃度（10 μM）の構造異性体（16AG、18AG、12MG）では効果が認められなかった。

考　察

本研究では、血管内皮細胞 HPAEC のノンターゲットリピドミクス解析から、動脈の正常域の laminar shear stress（15 dynes/cm^2）を負荷することによって細胞内で中鎖脂肪酸含有エーテル脂質が増加することを明らかにした。さらに中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の代謝前駆体であるアルキルグリセロールの添加実験により、PMA 刺激による細胞接着分子 VCAM-1 の誘導が 12AG の添加により用量依存的に抑制されることが示された。すなわち、血管内皮細胞で laminar shear stress 負荷によって細胞内脂質リモデリングが引き起こされ、その中でも中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の増加が VCAM-1 の抑制など抗炎症性に寄与することが示唆された。

VCAM-1 など血管内皮細胞に発現する細胞接着分子は、血管炎や動脈硬化の発生に関わる内皮機能変化における重要な分子である。VCAM-1 は粥状硬化巣をおおう血管内皮細胞に高発現しており、リンパ球や単球の表面に発現するインテグリン VLA-4 を認識してこれらの血管内皮への接着・浸潤に関与する。すなわち、血管内皮細胞における VCAM-1 の発現誘導は血管炎の惹起や動脈硬化の進展に関わると考えられており、一方で正常な laminar shear stress に晒されることでその発現が抑制されることが知られている。血管内皮細胞が shear stress 環境の変化を感知する上で、最外層に位置する細胞膜や膜タンパク質の機能制御が重要な役割を果たしていると考えられ、これまでにもイオンチャネルや膜ドメイン、細胞骨格系など多くのメカノセンシング機序が報告されている。一方で、今回新たに見出された中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の増加は、正常な laminar shear stress においてのみ内因性に誘導される脂質リモデリング機構であり、この細胞内代謝応答が血管内皮のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たす可能性が新たに示された。

細胞内でのエーテル含有脂質の生合成は、主にペルオキシソームで行われる。すなわち、shear stress に応答して中鎖脂肪酸含有エーテル型リン脂質が増加するメカニズムとして、血管内皮細胞のペルオキシソーム機能が何らかのかたちで変化している可能性が考えられた（図 3）。実際に shear stress に応答してペルオキシオーム増殖因子活性化受容体 PPAR が活性化することも報告されており、本研究により新たなメカノトランスダクションの分子メカニズムが明らかになることが期待される。また、今回のアルキルグリセロールによる VCAM-1 抑制において特に興味深い点は、VCAM-1 の抑制が 12AG のみで観察された点である。アルキルグリセロールは抗癌作用や放射線障害の緩和作用、造血作用など様々な作用が報告されており、その作用の強さとエーテル側鎖の長さの関係に着目した研究も実施されている。12AG 添加による VCAM-1 の発現抑制メカニズムを解明することで、ヒトの動脈硬化症や血管炎などに対する新しい予防・治療戦略や創薬標的に適用される可能性が期待される。

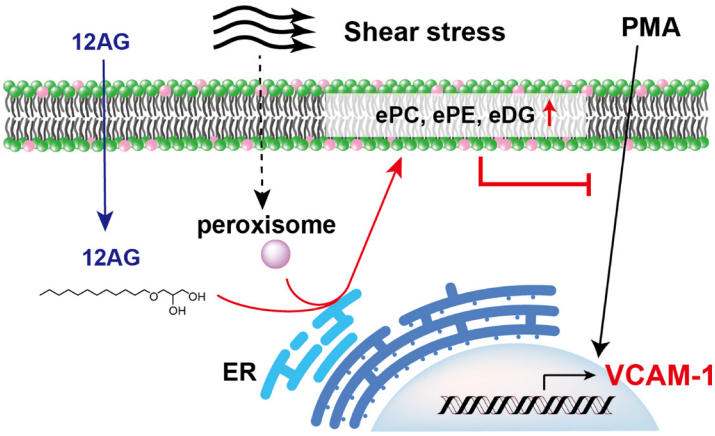


図 3. 血管内皮 shear stress 応答に関わる細胞内脂質リモデリング

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科生体工学講座の山本希美子准教授である。

文　献

1) Hirata T, Yamamoto K, Ikeda K, Arita M. Functional lipidomics of vascular endothelial cells in response to laminar shear stress. FASEB J. 2021 Feb;35(2): e21301. PMID: 33421194 DOI: 10.1096/fj.202002144R

2) Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H, Okahashi N, Yamada Y, Tada I, Bonini P, Higashi Y, Okazaki Y, Zhou Z, Zhu Z, Koelmel J, Cajka T, Fiehn O, Saito K, Arita M, Arita M. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. Nat. Biotechnol. 2020 Oct;38(10):1159-116. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32541957 DOI: 10.1038/s41587-020-0531-2