

動脈硬化に関するマイクロナノバイオメカニクス

谷下 一夫

要 旨：動脈硬化病変は血流のせん断応力が低く、部位に局在することが知られており、血管内膜へのコレステロール輸送が血流のせん断応力によって制御されている可能性がある。内皮細胞への高分子取り込みや透過の実験的研究では、きわめて明確なせん断応力依存性が確認された。高分子物質は、低せん断応力では、内皮細胞への取り込みが多くなり、高せん断応力では低くなるという、低せん断応力説を裏付ける結果となった。(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 735–741)

Key words: atherosclerosis, hemodynamic hypothesis, endothelial cell, albumin uptake, albumin permeability

はじめに

動脈硬化をはじめとする血管の病変は、主に太い動脈の特定な部位に多発的に現われていることが知られている¹⁾。特に血管の分岐部(分岐の外側)や曲り部の内側などに局所的に発生することから、病変の成因と血液流との関連が早くから指摘された^{2,3)}。このような動脈硬化症発生の流体力学的因子に関するさまざまな仮説は血行力学説と呼ばれた。血行力学説の妥当性を立証するためには、動脈内流れを詳細に調べる必要があり、その後、多くの研究者によって動脈内流れの研究が行われるようになった。一方、動脈硬化病変の分子レベルのメカニズムも次第に明らかになり、動脈硬化病変が拡大するプロセスに血管内表面に対する血流からの力学的刺激が重要な役割を演じていることが明らかになり、内皮細胞を中心としたマイクロナノバイオメカニクスの現象に大きな関心が向けられている。そこで、本稿では、動脈内流れから内皮細胞レベルのマイクロナノバイオメカニクスに関して著者の研究室の知見を中心に概観する。

動脈硬化病変の局在性

動脈硬化は、医学的には粥状動脈硬化、細動脈硬化、中膜壊死の3種類に分類される⁴⁾。中でも粥状動脈硬化は太い動脈に多発し、虚血性心疾患や閉塞性動脈

病変を生ずるので、臨床医学的に関心が集まっている。分子レベルによる粥状動脈硬化の進行の様子を説明する有力な説は障害反応仮説と呼ばれ^{5,6)}、粥状動脈硬化の初期病変は、内皮細胞への血流刺激に対する応答として進行すると考えられている(**Fig. 1**)。ここで血流刺激として注目されているのは、壁面せん断応力である。せん断応力の刺激により、血管内皮細胞に機能変化が生ずる。すなわち、内皮細胞の表面に接着分子が発現し、単球やリンパ球が弱く接着して、表面をローリングする。さらに、内皮下に侵入して、分化してマクロファージとなる。一方、低密度リポタンパク(LDL)が内皮下に貯留し、それをマクロファージが貪食して泡沫化し、粥状動脈硬化病変を形成する。泡沫細胞の集合が脂肪線条である。これが、粥状動脈硬化の初期病変といわれるものである。同時に形質変換を起こした平滑筋細胞が内膜に遊走・増殖する。

壁面せん断応力が内皮細胞の機能変化の原因とする考え方は、70年初頭に現れた低せん断応力説⁷⁾と相反する高せん断応力説⁸⁾が有名である。それぞれの立場を裏付ける実験的および理論的研究が行われ、興味深い論争が展開された。高せん断応力説は、壁せん断応力が高いと、内膜の物質透過性が高まりアテロームが生ずるという考え方で、Fryらによる大動脈内のアルブミン透過性の実験や高脂質食投与のウサギによる実験結果が高せん断応力説を支持している。一方、ヒトの

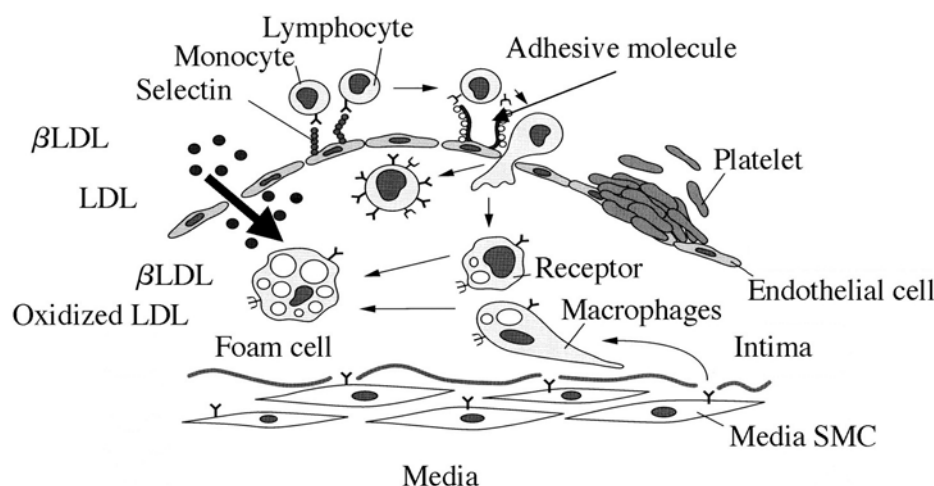


Figure 1 Molecular mechanism of development of atherosclerotic lesion proposed by Ross et al^{5,6)}.

動脈硬化病変は、低せん断応力の領域に多発していることが多く確認され、現在では低せん断応力説の考え方が有力である。

内膜肥厚と血流

動脈の一部の内膜では、脂質沈着のために内膜の厚みが増し、内膜肥厚が生じることが知られているが、特に動脈硬化病変の好発部位と、内膜肥厚の強い部位とが一致することから、内膜肥厚は、動脈硬化の初期病変とみられている。そこで、Kuら⁹⁾は、内膜肥厚と血流との関係に注目し、大変興味深い結果を得ている。頸動脈は動脈硬化病変が好発する部位であり、表皮直下に分布しているため、病変診断のモニター部位となっている。したがって、臨床医学の立場からは、患者の頸動脈内の流れを把握することがきわめて重要となっている。Kuら⁹⁾はヒトの総頸動脈の分岐部に生じた内膜肥厚を測定し、血管標本から作製したガラス管モデル内の流れより求めたせん断応力の時間的変動が内膜肥厚と相関があることを示した。特にせん断応力の方向が逆転する度合いを、次式で与えられるような振動せん断インデックスOSI(oscillatory shear index)によって表すと、内膜肥厚との相関が高いことが示されている。

$$OSI = \frac{\int_0^T |\tau^*| dt}{\int_0^T |\tau_w| dt}$$

ここで、分母は1周期中のせん断応力の絶対値の積

分であるが、分子は、せん断応力の方向が主流と逆向きになっている時のせん断応力の絶対値の積分である。もし、せん断応力の向きが逆にならなければ、OSIはゼロとなる。Fig. 2は、ヒトの頸動脈におけるOSIと内膜肥厚の度合いとの関係を示すが、きわめてよい相関を示している。内膜肥厚という生物学的変化と、せん断応力という物理的状態量との間に相関がある事実は、きわめて興味深く、その後の研究でOSIを用いた評価が多く試みられ、OSIは血管病変とよく相関していることが頸動脈以外でも示されている。したがって、低い壁面せん断応力のみならず、方向が変動するような壁面せん断応力も血管病変を誘引する重要な血流刺激と考えられている。

内皮細胞と血流

血流に直接触れている血管壁の細胞が内皮細胞であるため、内皮細胞の形態と機能が血流の影響を受けるのではないかとこれまで指摘されてきた。まず内皮細胞が血流の方向や流れの状態によってその形状が変化するかどうか、*in vivo*¹⁰⁾、*in vitro*実験¹¹⁾によって確かめられた。さらに最近細胞培養の手法が広く用いられるようになり、培養液中にせん断応力を加えて、培養内皮細胞の機能を詳しく調べることが可能となって、興味深い結果が報告されている¹²⁾。詳細は、これまでの多くの総説^{13, 14)}を参照されたい。

内皮細胞は、血液循環系の恒常性を維持するための多彩な機能をもっている。血流に起因するせん断応力

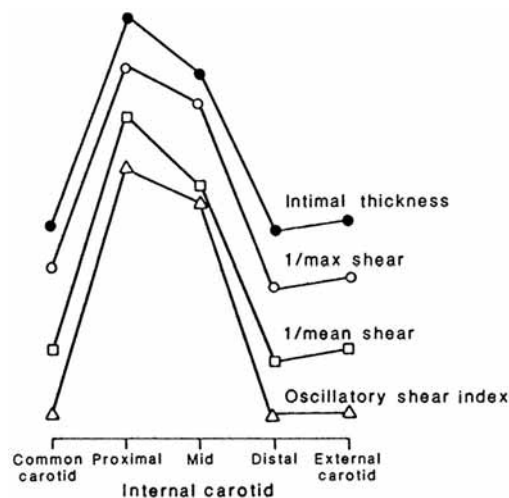


Figure 2 The relative changes in intimal thickness of the internal carotid artery along the outer wall of the carotid bifurcation compared with the relative changes in the hemodynamic variables of 1/maximum shear stress, 1/mean shear stress, and oscillatory shear index at the five levels of the section. ©2006 American Heart Association. All rights reserved. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK et al: Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*, 1985, 5: 293-302.

はこの内皮機能にさまざまな影響を及ぼすことが知られており^{15, 16)}、細胞の形態変化能はその一つである。細胞形態は血管の部位により異なる血流に依存し、血流の方向が一定の部位では内皮細胞は長円形でその長軸が血流方向に配列しているが、血流の方向が変化する部位や停滞する部位では類円形で方向性はない¹⁷⁾。血管の移植や狭窄モデルなどで血流が変化すると細胞形態も対応して変化することも観察されている。培養細胞に流れを負荷する実験でも同様の形態変化が起こることが確認されており、類円形で方向性がない培養細胞に流れを負荷すると伸長して流れ方向に配向する¹¹⁾。細胞スケールの微視的流れ場の解析結果¹⁸⁻²³⁾は、流れ負荷による形態変化が力学的環境に対する一種の適応反応であることを示唆している。従来は細胞表面を平坦とみなした血管系スケールのせん断応力で議論されてきたが、実際に細胞が受容しているせん断応力は細胞表面形状に依存する細胞近傍の微視的流れによって決まる。そのため、せん断応力は細胞表面形状に依存した分布となり、負荷されているせん断応力は細胞ごとに異なる。微視的せん断応力を考慮して静置培養

した類円形の細胞と流れを負荷して伸長・配向した細胞とを比較すると、流れを負荷した細胞の方がせん断応力の大きさや勾配が小さくなる^{19, 21)}。これは内皮細胞が負荷させられるせん断応力を受容してその大きさや勾配を減少させるように形態を変化させて適応した結果であると解釈できるが、その適応機能は明らかになっていない。

内皮細胞への高分子物質取り込みと動脈硬化

(1) アルブミン取り込み

前述のように、LDLが細胞内に取り込まれるプロセスが動脈硬化病変が進行するうえで、重要な段階となっており、LDLの取り込みがせん断依存性であることが予想される。そこで、工藤ら²³⁾はLDLの代わりに高分子物質であるアルブミンの取り込みがせん断依存性かどうかを実験的に調べた。コンフルエント状態に到達した内皮細胞を2つに分け、一方にはせん断応力の刺激を48時間加えてアルブミンを取り込ませ、もう一方の内皮細胞は静止状態で48時間経過させて、アルブミンを取り込ませた。アルブミンはTRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate)という蛍光色素で染めて、その分布を共焦点顕微鏡で観察するとFig. 3のようになった。図から明らかなように、静止状態の場合に比べて、1Paのせん断応力を負荷した場合にはアルブミンの取り込みが増大しているが、6Paのせん断応力を負荷した場合には、静止状態の場合より取り込みが低下している。そこで、取り込み量を蛍光強度で捉え、静止状態での取り込み量との比で表して、せん断依存性をみると、Fig. 4のようになった。すなわち、1Pa以下の比較的低いせん断応力では、静止状態と比較して取り込み量が約30%増大しているが、6Paのような比較的高いせん断応力では、静止状態での取り込み量の約40%に低下している。もしアルブミンの取り込みがLDLの取り込みと相似であるとする、この結果は、動脈硬化病変の低せん断応力説に一致しており、大変興味深い結果である。

さて、静止状態でのアルブミン取り込みのプロセスに関しては、詳細な研究が行われており、小胞による輸送プロセスが明らかにされている。すなわち、単純な拡散現象ではなく、内皮細胞がアルブミンを認識して、レセプターを発現させ、小胞に取り込まれて、細胞内へ輸送されているので、内皮細胞がエネルギーを

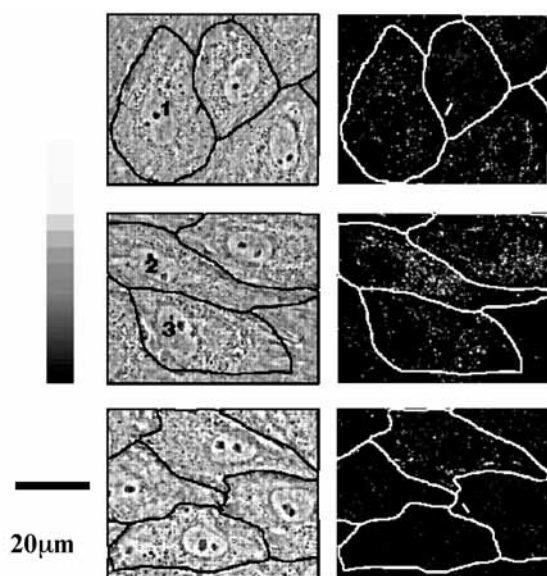


Figure 3 Albumin uptake in the endothelial cells depends on the shear stress imposed. The amount of albumin uptake is determined by the fluorescent intensity in the images. The albumin labeled by TRITC is detected by confocal laser scanning microscope²³⁾.

A: Without flow
B: Shear stress = 1 Pa
C: Shear stress = 6 Pa

消費して輸送していることになり、ミトコンドリアの関与が予想される。そこで、Kudoら²⁴⁾は、ミトコンドリアの膜電位の状態によって波長の異なる蛍光を発するJC-1という色素で染めて、せん断応力の刺激負荷によって膜電位の変化を共焦点レーザー顕微鏡で計測したところ、**Fig. 5**のような結果が得られた。1Paのせん断応力を負荷した場合は、高い膜電位の面積が静止状態よりも大きくなるが、6Paのせん断応力負荷では、低くなっている。さらに、細胞内ATP量を計測してみると、せん断応力を負荷した場合は、静止状態よりも約70%程度ATP量が増大していることが確認された。これらの結果より、内皮細胞がせん断応力を敏感に検知して、高分子物質取り込みを制御していることが明らかになった。

次の疑問はせん断応力負荷によって内皮細胞がどのように高分子物質の取り込みを制御しているかという点である。せん断応力によって内皮細胞が形態や機能を変化させるデータは多くの研究者によって得られており、その詳細は文献を参照されたい。ここでは、内

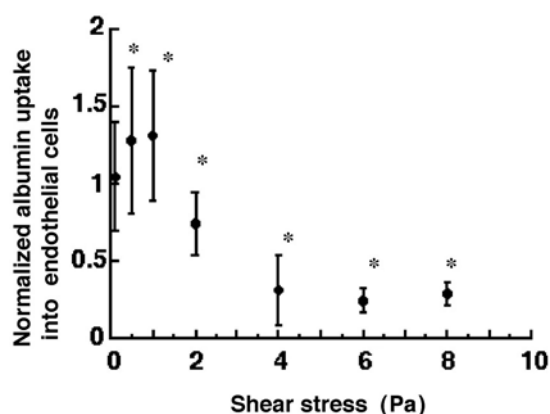


Figure 4 Normalized albumin uptake as a function of imposed shear stress²³⁾.

*: $p < 0.05$ vs control

皮細胞表面に分布している糖衣の影響について述べる。糖衣は、糖タンパク、糖脂質とプロテオグリカンから構成されており、厚みが $0.3 \sim 1 \mu\text{m}$ である。カルボキシル基と硫酸基を含み、強く負に荷電している。糖衣の厚みは血管の部位によって異なり、特に脂質が沈着している低せん断領域では、糖衣の厚みが薄くなっている。逆に高せん断領域では、糖衣が厚くなっている。したがって、内皮細胞表面に分布する糖衣が、高分子取り込みに影響を与えていると考えられる。そこで、Uedaら²⁵⁾は、血管内皮細胞のせん断応力に依存したアルブミンの取り込み量の変化と糖衣の関係について検討を行った。糖衣をルテニウムレッドで染めて、透過型電子顕微鏡を観察し、糖衣の厚みを計測した。その結果、3Pa以上のせん断応力では、静止状態の場合の厚みの74%増加していることがわかった。さらに、アルブミン表面は負に帯電しているため、糖衣の表面の電荷除去によるアルブミン取り込みの影響を調べたところ、電荷除去により有意にアルブミン取り込み量が増加した。この結果から、糖衣の存在は、内皮細胞機能にきわめて重要で、特に、せん断応力に敏感で、力学的刺激を受容して細胞機能を制御していることが明らかになった。

(2)内皮細胞層のアルブミン透過

動脈硬化病変の進行においては、LDLが内皮細胞層を透過して、内膜内に貯留するので、内皮細胞への高分子物質取り込みと同時に透過も重要な要因となって

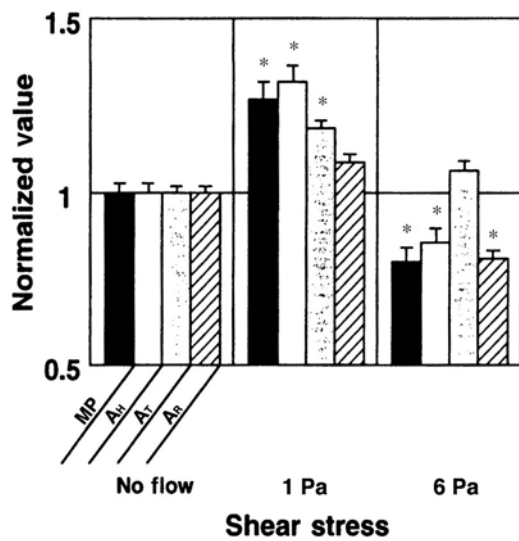


Figure 5 Fluorescence was detected by confocal laser scanning microscope.

MP: Mitochondrial membrane potential

AH: Area of higher membrane potential

AT: Total area of mitochondria

AR: AH/AT

*: $p < 0.05$ vs no flow

©2000 Academic Press. All rights reserved. Kudo S, Morigaki R, Saito J et al: Shear-stress effect on mitochondrial potential and albumin uptake in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270**: 616–621.

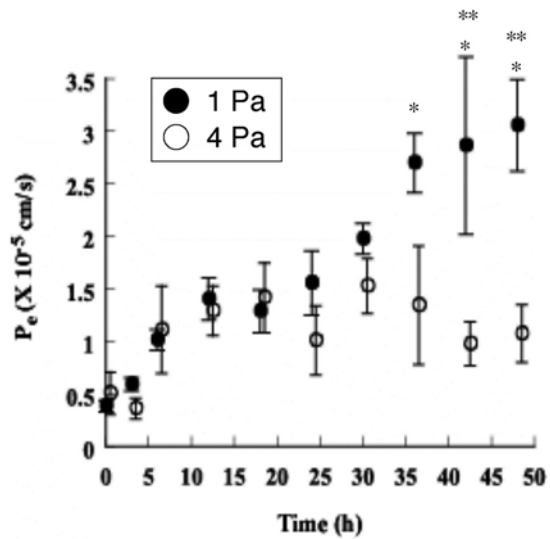


Figure 6 Albumin permeability across the endothelial cell layer as a function of elapsed time under the shear stress of 1 and 4 Pa.

*: $p < 0.05$ vs 0 h, **: $p < 0.05$ vs 4 Pa

©2005 The Japan Society of Mechanical Engineers. All rights reserved. Kudo S, Tsuzaka M, Ikeda M et al: Albumin permeability across endothelial monolayers under long-term shear stress. *JSME Int J Ser C*, 2005, **48**: 419–424.

いる。そこで、微孔性膜上に内皮細胞を播種して、コンフルエント状に増殖させ、その内皮細胞層にせん断応力を負荷した状態で、高分子物質の透過量を計測した²⁶⁾。その結果をFig. 6に示す。最初の25時間の間では、1Paと4Paではあまり差がみられない。しかし、25時間以降では、1Paでの透過率が著しく増加している。ところが、4Paの場合では、多少変動しているものの、あまり大きな変化がみられない。アルブミンの透過経路には、前述のような細胞内に取り込まれて通過するものと、細胞間を通過するという2つの経路が存在する。そこで、細胞間のみを通過することが知られている物質イヌリンの透過率を測定してみると、1Paのせん断応力を負荷した場合、10時間程度経過するとほとんど変化がみられない。1Paのせん断応力では、透過率が著しく増加しており、さらに取り込みも増加している。その辺を考慮すると、細胞間を通過するアルブミンは、せん断応力負荷に対しては、敏感に反応していないとも思われ、細胞内を通過するプロセスとは異なる性質を持つと思われる。

このように内皮細胞層を高分子物質が透過するプロセスには、細胞内を小胞輸送などで通過するものと、細胞間を通過する経路が考えられ、それぞれに着目した研究が行われている。LDLやアルブミン輸送の場合にはレセプターを介した輸送経路が重要となる。しかしながら、内皮細胞に負荷されたせん断応力の刺激がどのように伝達されて高分子物質の透過を制御するかに関しては、依然として不明な点が多い。内皮細胞へのアルブミンの取り込みがせん断応力に依存して著しく変化をみせているので、例えば内皮細胞表面に発現するレセプターの数などがせん断応力の刺激によって、大きく異なるであろうことが予想される。力学的な刺激による高分子物質の輸送の分子メカニズムの解明が今後の課題となる。

文 献

- Spain DM: Atherosclerosis. *Sci Am*, 1966, **215**: 48–56.
- Schettler GG, ed: Fluid dynamics as a localizing factor for atherosclerosis: the proceedings of a symposium held at Heidelberg, FRG, June 18–20, 1982. Springer-Verlag,

- Berlin, New York, 1983.
- 3) Nerem RM, Levesque MJ, Cornhill JF: Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng*, 1981, **103**: 172–176.
- 4) 横出正之, 北 徹: 動脈硬化の成り立ち. 血管生物学の新しい展開. クバプロ, 東京, 1995, 140–153.
- 5) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801–809.
- 6) Ross R: Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115–126.
- 7) Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC: Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1971, **177**: 109–159.
- 8) Fry DL: Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients. *Circ Res*, 1968, **22**: 165–197.
- 9) Ku DN, Giddens DP, Zarins CK et al: Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*, 1985, **5**: 293–302.
- 10) Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ et al: Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ Res*, 1972, **30**: 23–33.
- 11) Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr et al: The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng*, 1981, **103**: 177–185.
- 12) Sato M, Levesque MJ, Nerem RM: An application of the micropipette technique to the measurement of the mechanical properties of cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biomech Eng*, 1987, **109**: 27–34.
- 13) Nerem RM: Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis. *J Biomech Eng*, 1992, **114**: 274–282.
- 14) Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995, **75**: 519–560.
- 15) Nerem RM, Harrison DG, Taylor WR et al: Hemodynamics and vascular endothelial biology. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, **21**: S6–S10.
- 16) Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995, **75**: 519–560.
- 17) Langille BL, Adamson SL: Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ Res*, 1981, **48**: 481–488.
- 18) Satcher RL Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr et al: The distribution of fluid forces on model arterial endothelium using computational fluid dynamics. *J Biomech Eng*, 1992, **114**: 309–316.
- 19) Barbee KA, Mundel T, Lal R et al: Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers. *Am J Physiol*, 1995, **268**: H1765–H1772.
- 20) Yamaguchi T, Yamamoto Y, Liu H: Computational mechanical model studies on the spontaneous emergent morphogenesis of the cultured endothelial cells. *J Biomech*, 2000, **33**: 115–126.
- 21) Fukushima S, Nagatsu A, Kaibara M et al: Measurement of surface topography of endothelial cell and wall shear stress distribution on the cell. *JSME Int J Ser C*, 2001, **44**: 972–981.
- 22) Fukushima S, Deguchi T, Kaibara M et al: Microscopic velocimetry with a scaled-up model for evaluating a flow field over cultured endothelial cells. *J Biomech Eng*, 2002, **124**: 176–179.
- 23) 工藤 奨, 池澤憲治, 松村伸治 他: 培養内皮細胞の高分子物質取り込みに及ぼす壁せん断応力の影響. 日本機械学会論文集, 1998, **64**: 367–374.
- 24) Kudo S, Morigaki R, Saito J et al: Shear-stress effect on mitochondrial membrane potential and albumin uptake in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270**: 616–621.
- 25) Ueda A, Shimomura M, Ikeda M et al: Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287**: H2287–H2294.
- 26) Kudo S, Tsuzaka M, Ikeda M et al: Albumin permeability across endothelial monolayers under long-term shear stress. *JSME Int J Ser C*, 2005, **48**: 419–424.

Micro-nano Biomechanics for Atherosclerosis

Kazuo Tanishita

Department of System Design Engineering, Keio University, Tokyo, Japan

Key words: atherosclerosis, hemodynamic hypothesis, endothelial cell, albumin uptake, albumin permeability

In our studies, localization of atherosclerotic lesion occurred in the low shear stress region of arteries. Developmental process of atherosclerosis is strongly associated with macromolecule transport into endothelial cells. Our studies of macromolecule uptake into the cells revealed that the macromolecule uptake correlates with shear stress on the surface of endothelial cells. This molecular transport plays a major role in the generation of atherosclerosis.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 735–741)