

光化学反応由来活性酸素による血管透過性障害のイメージング解析

Image Analysis of Endothelial Permeability Dysfunction Induced by Photochemically Activated Oxygen Radicals

バイオ・マテリアル学科 南谷 晴之 (Haruyuki MINAMITANI)

This study focused on the mechanism of endothelial cell dysfunction caused by reactive oxygen species generated from photochemical reaction (PR). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated in collagen dishes with ALA and were irradiated by LED light of 626 nm wavelength for 10 min. The cell viability maintained after PR however the tube formation of HUVECs changed to the capillary-like structures and increased in the endothelial permeability. Shrinkage of HUVECs lead to increase in the subendothelial area and F-actin formation into stress fibers after PR. This suggests that oxidative stress of PR strongly affects on the morphological change of HUVECs and increase in the endothelial permeability.

【背景及び目的】 光化学反応 (Photochemical reaction: PR) は光線力学的治療 (Photodynamic therapy: PDT) として表層性炎症の治療に利用されており、食道癌やアテローム性血栓など体内炎症組織への適用が期待される。その治療原理は光感受性物質を患部に蓄積させ、内視鏡を用いて局所的にレーザー光を照射することで光化学反応を引き起こし、高反応性活性酸素を発生させ選択的に悪性の患部を治療する方法である。活性酸素により悪性細胞や組織を壊死させる一方、副次的に正常組織へも傷害を与える可能性があるが、その傷害の一つに血管内膜過形成が上げられる。すなわち、光化学反応施行後に血管透過性が亢進し、その結果、内膜が過形成されることになる。本研究では光化学反応による血管透過性亢進現象に関して培養血管内皮細胞の *in vitro* 系で検討した。

【方法】 対象細胞にはヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) を用い、Transwell 内で血管透過性計測モデルを構築し PR を施行した。PR のための光感受性物質としてアミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA)、励起光源として高輝度 LED array (中心波長 626 nm) を用いた。PR 条件は、光強度 $10\text{mW}/\text{cm}^2$ 、光照射時間 10min、ALA 濃度 1mM、ALA 接触時間 4h とした。PR 施行 1 時間後の血管透過性を FITC dextran の透過量により計測した。また PR 施行後の細胞間隙の変化を観測するために接着斑 ($\beta 1$ integrin) を蛍光染色し、近接場全反射顕微鏡にて可視化解析した。さらに血管透過性変化に関与する細胞骨格タンパク (F-actin) および細胞間ジャンクション (ZO-1, VE-cadherin) を蛍光染色し共焦点顕微鏡にて可視化解析した。その上で細胞形態変化のシグナル伝達に関与すると考えられる単量体 G タンパク RhoA の活性化量を Western blot 法および Pull down 法を用いて検討した。

【結果及び考察】 PR 施行によって活性酸素が多量に産生され、そのために細胞傷害が起こり、Fig.1 に示すように FITCdextran の透過量が大幅に増加し、明らかな血管透過性亢進が認められた。透過性亢進の際に内皮細胞内のアクチンフィラメントの束 (stress fibers) が増加し、細胞短縮が起こり、また ZO-1 や VE-cadherin が細胞外縁から消失することで内皮細胞間隙が拡大していることも可視化解析から確認された。Fig.2 は PR 施行前後の内皮細胞の形態変化を観測した蛍光画像であり、PR 施行によって細胞全体が細長く短縮し、細胞間隙が増加していることがわかる。さらに PR 施行後、活性化 RhoA 量が上昇し、RhoA を阻害することで透過性亢進が抑制されることから、血管透過性亢進に関して RhoA が深く関与していることが示された。

以上より、PR 施行によって内皮細胞内の RhoA が活性化し、アクチンフィラメントが変異、ZO-1 や VE-cadherin が消失することで細胞間隙が拡がり、その結果、透過性が亢進し

たものと考えられる。このことより、PDTによる正常血管内皮細胞への傷害に関して、そのメカニズムの一端が解明できたとともに、副作用軽減の可能性を示すことができた。

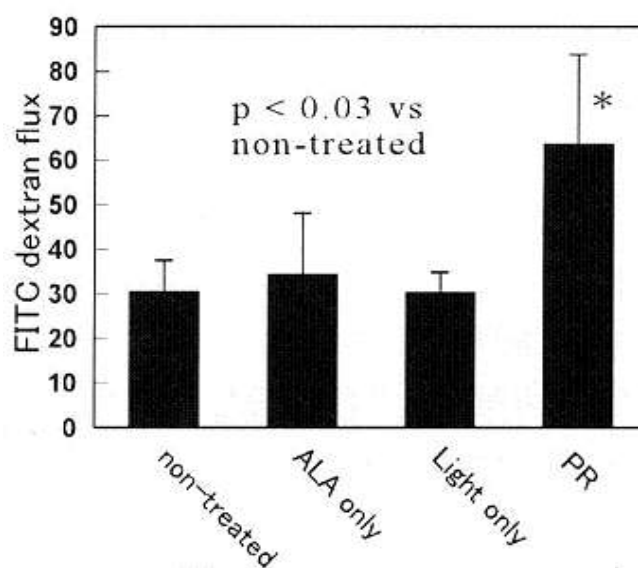


Fig.1 Increase in endothelial permeability induced by photochemical reaction. Remarkable increase of FITC dextran flux was observed after PR while individual ALA incubation and individual light stimulation were not affected on the cell permeability.

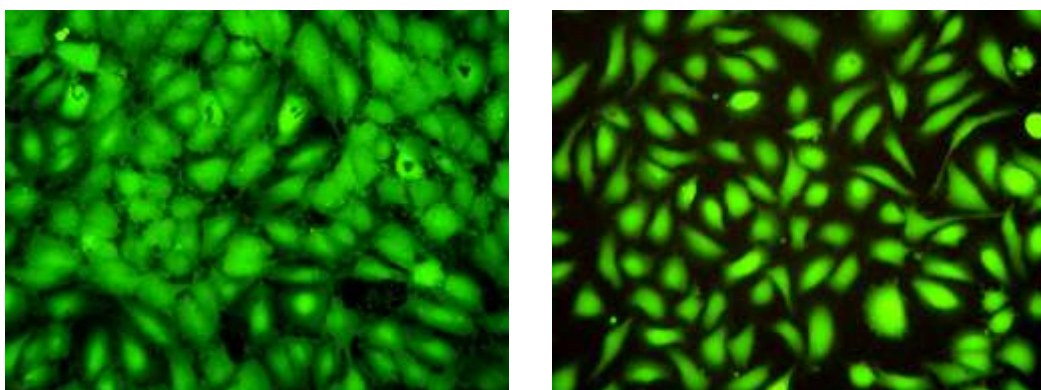


Fig.2 Transformation of endothelial cell structure occurred by exposure of reactive oxygen radicals. Left figure shows normal formation of HUVECs while right figure shows the HUVECs after PR. Shrinkage of the cells and spread of subendothelial area can be clearly observed.