

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K12037

研究課題名(和文)力学刺激を負荷した培養血管内皮細胞における代謝変動の可視化

研究課題名(英文) Visualization of metabolic changes in cultured vascular endothelial cells subjected to mechanical stress

研究代表者

伊藤 一志 (Ito, Kazushi)

秋田県立大学・システム科学技術学部・准教授

研究者番号：30507116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、倒立蛍光顕微鏡を用いた蛍光観察とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法を組み合わせた手法を用いて、細胞リモデリング過程における培養血管内皮細胞の代謝変動の評価を目的とした。そのため、光透過性および導電性を有するサンプルプレートとして酸化インジウムスズおよびポリジメチルシロキサンを用いた複合フィルムを作製した。その後、作製した複合フィルム表面において細胞パターンングが可能であるとともに、その表面に培養した血管内皮細胞は流れに対する力学応答性を有することを示した。以上から、本研究において力学刺激環境下および形状制御した培養細胞に対する複合的な実験系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構築した実験系を用いて、血流環境を模擬した力学環境下における細胞応答を詳細に評価できる可能性があり、血管疾病および血管新生の機構解明に寄与できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate metabolic changes in cultured vascular endothelial cell remodeling using a combined technique of inverted fluorescence microscopy and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). For this purpose, a composite film with excellent light transmittance and conductivity was prepared, consisting of indium tin oxide (ITO) and poly (dimethyl siloxane) (PDMS). Cell patterning could be applied to the fabricated composite film surface. Furthermore, vascular endothelial cells (ECs) cultured on the composite film showed mechanical response to flow. It was also found that the composite film can be used as a sample plate for MALDI-TOF-MS. In summary, our group constructed a complex experimental system for the patterned ECs subjected to shear stress.

研究分野：生体力学

キーワード：ITO PDMS 細胞パターンング 培養血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の細胞は血流によるせん断応力や伸展刺激に応じて、その形状および生理機能を変化させることが知られている。その現象は細胞リモデリングと呼ばれ、生体の機能維持や個体発生のみならず動脈硬化症などの病理にも深く関与している。しかしながら、現在までに細胞リモデリングにおける機構の解明は限定的である。その機構の解明は、バイオメカニクスならびメカノバイオロジー、細胞生物学などの学術分野を発展のみならず、創薬や新規治療の開発にも繋がるため、社会的にも重要な意義がある。

2. 研究の目的

本研究では、倒立蛍光顕微鏡を用いた蛍光観察とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF MS) を組み合わせた手法を用いて、細胞リモデリングにおける培養血管内皮細胞の代謝変動の評価を目的とした。

3. 研究の方法

(1) PDMS/ITO フィルムの作製

倒立蛍光顕微鏡および MALDI TOF MS を組み合わせる手法においては、光透過性および導電性に優れたサンプルプレートが必要となる。そのため、本研究では、酸化インジウムスズ (ITO) フィルム上にポリジメチルシロキサン (PDMS) を付着させた複合フィルム (PDMS/ITO フィルム) の作製を試みた。PDMS/ITO フィルムの作製では、まず大気プラズマを照射した PDMS を ITO フィルムに圧着し、はく離した。その後、ITO フィルム表面に大気プラズマを照射して、未処理の PDMS をフィルム表面に圧着した。同様の工程を繰り返して ITO フィルム表面に PDMS を積層して、PDMS/ITO を作製した。本研究では、柔軟性の異なる PDMS およびその圧着回数を加工条件とした。

(2) PDMS/ITO フィルムにおける導電性および光透過性の評価

PDMS/ITO フィルム表面における導電性の評価には低抵抗率計を用いた。測定では PDMS/ITO 表面にプローブを 30 秒間接触させて表面抵抗率を計測した。

PDMS/ITO フィルムにおける光透過性は、カラーのイラストに各フィルムを設置した後、目視によりイラストを観察して、その鮮明さをもとに評価した。

(3) PDMS/ITO フィルム表面における細胞パターニング

PDMS/ITO フィルムに正方形のマイクロパターンが形成されたメッシュを載せ、大気プラズマを照射した。その後、フィルム表面をプルロニックおよびゼラチンにより処理して、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の細胞懸濁液を滴下した。その後、5%CO₂ インキュベータ内で 10 分間静置した後、培地を交換して 24 時間静置した。培養後の HUVECs は蛍光染色法および倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) MALDI-TOF-MS

質量分析にはマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析機を用いた。固体レーザーは Nd-YAG レーザーを用いた。PDMS/ITO フィルム表面に HUVECs を培養した後、2,5-ジヒドロキシ安息香酸を塗布して Negative モードにより分析した。

(5) 流れ負荷システムの構築と流れ負荷実験

流れ負荷システムはローラーポンプならびにフローチャンバー、2 本の遠沈管から構成し、それらをシリコンチューブで接続した。フローチャンバーは、HUVECs を培養した PDMS/ITO フィルム表面に中央をくり抜いたガスケットを載せた後、I/O ユニットとシャーレで挟んだ構造とした。流れ負荷実験では、PDMS/ITO 表面においてコンフルエントになった HUVECs に 1.5Pa のせん断応力を 24 時間負荷した。

4. 研究成果

(1) PDMS/ITO フィルムにおける導電性および光透過性

図 1 に ITO および PDMS/ITO フィルム表面の表面抵抗率を示す。PDMS/ITO フィルムは PDMS の柔軟性や処理回数に関わらず ITO フィルムと同等であり、優れた導電性を有していることが分かった。したがって、PDMS/ITO フィルムは MALDI-TOF-MS に適用できることが分かった。また、PDMS/ITO フィルムにおいて ITO フィルムと同等の導電性が維持された理由として、PDMS 層が多孔質構造となっているためと考えられる。

図 2 に ITO および PDMS/ITO フィルムの光透過性を示す。ITO フィルムおよび PDMS/ITO フィルムを通して各イラストを明確に確認できており、両フィルムは光透過性に優れていることが分かる。また、PDMS/ITO フィルムの光透過性に対する加工条件の影響は見られなかった。したがって、PDMS/ITO フィルムが光透過性および導電性に優れていることを確認した。

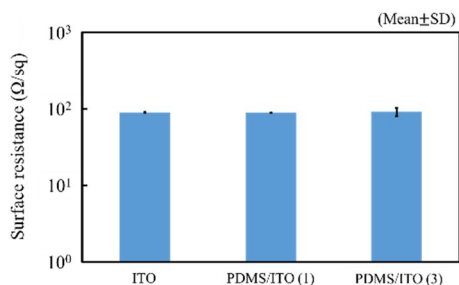
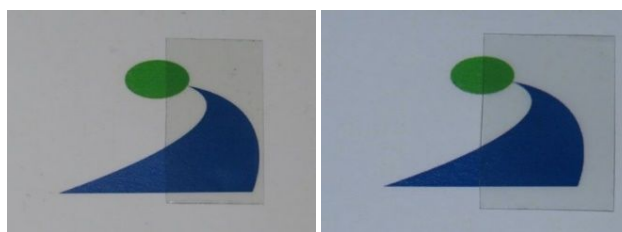


図1 ITO および PDMS/ITO フィルムの表面抵抗率

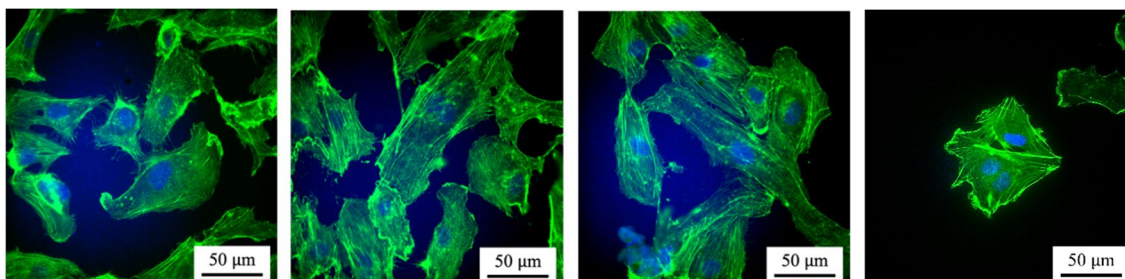


(a) ITO (b) PDMS/ITO

図2 ITO および PDMS/ITO フィルムの光透過性

(2) PDMS/ITO フィルム表面に培養した細胞パターンング

図3に ITO および PDMS/ITO フィルム表面に培養した HUVECs の蛍光画像を示す。図3(b) および (c) における PDMS/ITO フィルムは作製時における PDMS の圧着回数が 3, 5 回となっている。ITO および各 PDMS/ITO フィルム表面において培養した HUVECs は伸長およびアクチン骨格の発達が観察された(図3(a),(b),(c))。さらに, HUVECs の増殖性も良好であった。図3(d) に細胞パターンングを施した PDMS/ITO 表面における HUVECs の蛍光画像を示す。メッシュパターンを反映した領域に HUVECs の接着および伸長が観察されており, PDMS/ITO 表面に細胞パターンングを用いて細胞の形状を任意に制御できることが分かった。さらに, 細胞パターンングの精度に PDMS/ITO フィルムを作製する際, PDMS の圧着回数が影響することが分かった。



(a) ITO (b) PDMS(3)/ITO (c) PDMS(5)/ITO (d) 細胞パターンング

図3 ITO および PDMS/ITO フィルム表面における HUVECs の培養と細胞パターンング

(3) MALDI-TOF-MS

PDMS/ITO フィルム表面に培養した HUVECs における MS スペクトルを取得した結果, m/z 分子量 665.7321 にピークが検出された。従来の報告(Almstrand et al., *Anal. Biochem.*, 2015)から, このピークは細胞膜のリン脂質由来であると考えられる。したがって, PDMS/ITO をサンプルプレートとして細胞の質量分析が可能であることが示唆された。一方で, 細胞内部の MS スペクトルを取得するためには細胞膜の処理が必要であると考えられる。

(4) PDMS/ITO フィルム表面における HUVECs の力学応答性

構築した流れ負荷システムを用いて HUVECs にせん断応力を負荷した結果, HUVECs はせん断応力方向に伸長および配向する様子がみられた。一方, せん断応力を負荷する前では HUVECs の形状は丸みを帯びていた。したがって, PDMS/ITO フィルム表面に培養した HUVECs は力学応答性を消失していないことが明らかとなった。

以上から, 本研究では, ITO フィルムおよび PDMS を用いた光透過性および導電性に優れたサンプルプレートを提案し, その表面では MALDI-TOF-MS だけでなく, 細胞パターンング, 細胞への力学負荷実験が可能であった。一方, 細胞パターンングおよび力学負荷した HUVECs における MS スペクトルの取得は装置の不具合により実施できなかった。今後 MALDI-TOF-MS だけでなく, 光透過性および導電性を生かした細胞分析について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 建部一翔、常盤野哲生、伊藤一志
2. 発表標題 PDMS/ITOフィルム表面の濡れ性および細胞接着性に及ぼす加工条件の影響
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第57期秋季講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 考祐, 邱 建輝, 境 英一, 伊藤 一志
2. 発表標題 ITOフィルム表面における細胞パターンニング技術の構築
3. 学会等名 日本機械学会 2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 一志, 平岩 佑都, 邱 建輝, 境 英一
2. 発表標題 PLA複合材料に培養した血管内皮細胞の細胞 - 基質間接着性に及ぼすCNF充填量の影響
3. 学会等名 日本機械学会 2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岩 佑都, 吉田 郁弥, 伊藤 一志, 邱 建輝, 境 英一
2. 発表標題 射出成形したリグノセルロースナノファイバー/ポリ乳酸複合材料の機械的特性
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第54期秋季講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子 壮大, 野辺 理恵, 邱 建輝, 伊藤 一志, 境 英一
2. 発表標題 グラファイトおよびCNTを充填したPLA複合材料の導電性評価
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第54期秋季講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	きゅう 建輝 (Qiu Jianhui) (40244511)	秋田県立大学・システム科学技術学部・教授 (21401)	
研究分担者	常盤野 哲生 (Tokiwano Tetsuo) (50312343)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授 (21401)	
研究分担者	境 英一 (Sakai Eiichi) (70581289)	秋田県立大学・システム科学技術学部・准教授 (21401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------