

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289028

研究課題名(和文) 高速共焦点マイクロ流動計測法を用いた血管内皮細胞分泌物の輸送現象の解明

研究課題名(英文) Investigation of mass transfer in vascular endothelial cells by utilizing high-speed confocal PIV technique

研究代表者

杉井 康彦 (SUGII, Yasuhiko)

東京工業大学・理工学研究科・産学官連携研究員

研究者番号：90345108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞表面を覆っているグリコカリックスと呼ばれる数百nmの厚みの細胞外高分子物質の機能の解明のため、高時空間分解可能を持つ流れ場計測法を開発し、グリコカリックス層近傍の3次元速度分布を計測した。細胞に粒子が付着する問題を解決するために粒径100 nmの微小な有機シリカ粒子にポリエチレングリコールコーティングを施した。また、超解像度顕微鏡を用いて、グリコカリックスの位置と形状を80nmの空間分解能で計測した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify Glycocalyx layer on vascular endothelial cells, a high resolution measurement technique for three-dimensional velocity distribution was developed by utilizing stealth fluorescent silica particles with a diameter of 100 nm coated with long chains of polyethylene glycol.. The developed technique was applied to endothelial cell cultured in a microfluidic device.

研究分野：流体力学

キーワード：バイオ流体 マイクロ流体 流体計測 共焦点マイクロPIV 血管内皮細胞 グリコカリックス

1. 研究開始当初の背景

現代社会において、心臓病・高血圧症・脳血管障害などに代表される循環器系疾患による我が国の死亡率が国民死亡原因の約30%となっており、これらの疾病対策は国家的課題となっている。循環器系の疾患の原因として、内分泌器官、免疫系および内臓実質臓器などの異常による血液のレオロジの変化とそれに伴う血流による力学的刺激の変化が考えられている。これまでに、血管の表面の細胞である血管内皮細胞が流れによるせん断応力に反応して流れ方向に配向し長細く変形することや、せん断応力が内皮細胞における Ca^{2+} や NO など細胞分泌物の産生量と関係があること、などが報告されている。

血管内皮細胞表面を覆っているグリコカリックスと呼ばれる数百 nm の厚みの細胞外高分子物質が、血流によるせん断応力を検知するセンサーや血流の調整機構や、血液と細胞との物質の交換などに大きな役割を果たしていると考えられている。特に、グリコカリックスの有無によって、細胞分泌物の産生量に有意な差があることや、血流の流動抵抗に大きく影響することが示されている。グリコカリックスは、高密度に内皮細胞表面を覆っているため、その内部の流れを多孔質内の流れによりモデル化がされている。しかしながら、その厚みが数百 nm と非常に薄いため、その内部の流れを計測する手法は未だ開発されておらず、不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、高時空間分解能を持つ流れ場計測法を開発することによって、図1に示すグリコカリックス層内部および近傍の流れ場を把握するとともに、せん断応力に応じたイオンチャネルの開閉やイオンポンプの活性化によって生じる細胞内外間の Ca^{2+} や NO など細胞分泌物の輸送現象を明らかにすることを着想した。

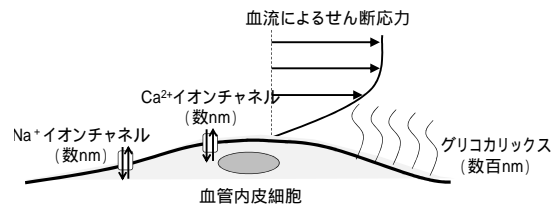


図1 血管内皮細胞近傍の流動・物質輸送

これまでに、GFP や蛍光染料を用いた血管内皮細胞分泌物の計測法が開発されているが、主として細胞内における細胞分泌物の増減の可視化計測にとどまっており、定量性も不十分である。また、イオンチャネルによる細胞内外間での物質輸送は、阻害剤の投与による細胞内物質の増減が示されているが、イオンチャネルにより輸送された分泌物の直接的な可視化計測法は未だ開発されていない。その原因として、内皮細胞表面近傍の分泌物の濃度分布を高い空間分解能と時間分解能で計測する手法が開発されていないためである。

以上のように、内皮細胞近傍の流れ場の高時空間分解能計測法が望まれている。

2. 研究の目的

心臓病・高血圧症・脳血管障害などの循環器系疾患の原因究明のため、血流と血管内皮細胞との相互作用の把握が望まれており、血管内皮細胞表面を覆っているグリコカリックスが血流の調整機構や血液と細胞との物質の交換などに大きな役割を果たしていると考えられている。

本研究では、グリコカリックスの機能の解明のため、

1. 血管内皮細胞表面近傍の流れ場の高時空間分解能を有する可視化計測する手法の開発
2. 細胞表面を覆っている数百 nm の厚みのグリコカリックス層内および近傍の流れ場の計測
3. 血管内皮細胞内外間の細胞分泌物の物

質輸送現象の解明
を行う。

3. 研究の方法

グリコカリックスの機能の解明のため、高速共焦点顕微鏡および超解像度法を用いて、血管内皮細胞表面近傍の速度分布および細胞分泌物の濃度分布を高時空間分解能で可視化計測する手法を開発し、マイクロ流路内で培養した血管内皮細胞表面近傍の流れ場を計測する。光学系および蛍光染料の濃度などの最適化を行い、光学的な限界以下の空間分解能と高い時間分解能を有する超解像度法を開発する。血管内皮細胞表面を覆っている数百 nm の厚みのグリコカリックス層内部の速度分布および細胞分泌物の濃度分布を計測し、細胞に負荷されるせん断応力や薬剤との関係を明らかにし、細胞内外間での細胞分泌物の輸送現象を明らかにする。

高速共焦点マイクロ PIV 法の高度化

血管内皮細胞近傍の速度場計測のため、高速共焦点スキャナ、高感度高速度カメラからなる高速共焦点マイクロ PIV 法の改良を行う。高 NA の水浸対物レンズを購入して被写界深度を $1\mu\text{m}$ 以下にするとともに、高速共焦点スキャナ制御ソフトを購入して、対物レンズに取り付けたピエゾアクチュエータを $0.5\mu\text{m}$ 以下の間隔で焦点位置を走査させる。また、蛍光粒子のブラウン運動の影響や計測精度の改善のため、PIV 解析における 2 枚の蛍光粒子画像の時間間隔を最適化する手法を検討する。これらにより、血管内皮細胞近傍の速度分布を $0.5\mu\text{m}$ 以下の空間分解能および 2msec 程度の時間分解能の実現を目指す。

グリコカリックスの位置・厚さの計測法および内部流れの速度分布計測法の開発

血管内皮細胞表面を覆っているグリコカリックス層は、厚みが数百 nm と薄いため、光学的に計測することが難しく、従来、細胞を固定化した後、電子顕微鏡を用いて観察されている。そのため、細胞の固定化法により、グリコカリックスの厚みに大きな差があらわれており、生細胞での計測法の開発が求められている。そこで、粒子径が $20\sim 100\text{nm}$ 程度の蛍光粒子を流し、内皮細胞近傍を $0.5\mu\text{m}$ 以下の間隔で焦点位置を走査させて撮影し、蛍光粒子の有無より流体と表面との境界面を求める。次に、薬剤を投与してグリコカリックスを除去し、同様に蛍光粒子画像を撮影し、流体と表面との境界面を求め、グリコカリックスの有無による境界面の差からグリコカリックスの位置・厚さを求める。また、グリコカリックスを蛍光染色して、断面蛍光画像を撮影し、開発した超解像度法を用いて、高解像度のグリコカリックス像の再構築を試みる。

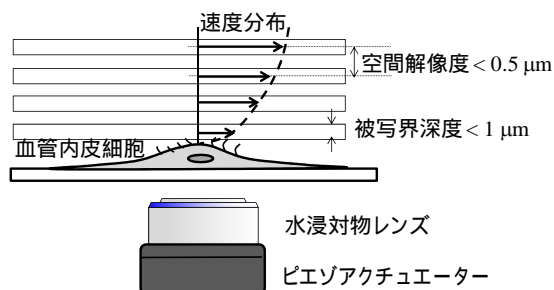


図 2 速度場の計測領域

グリコカリックス層内部の速度分布の計測

開発したグリコカリックスの位置・厚さの計測法を用いて、マイクロ流路底部に培養した血管内皮細胞のグリコカリックスの位置と厚みを計測する。マイクロ流路に流す培養液の流量によって負荷するせん断応力を変化させ、グリコカリックスの厚みとの関係を調べる。

また、高速共焦点マイクロ PIV 法を用いて、グリコカリックス近傍の速度場を計測

する。特に、グリコカリックスの厚さと速度場との関係を調べる。さらに、細胞に付加するせん断の応力の変化や、薬剤の投与や酵素によるグリコカリックスの除去の影響を調べる。

得られたグリコカリックスの位置と厚み、およびグリコカリックス近傍の速度場を用いて、その内部流れを数値計算により求める。また、厚みや位置などによるグリコカリックスの抵抗係数の分布の推定を行う。これらにより、グリコカリックスによる流動抵抗への影響の評価を行う。

4. 研究成果

グリコカリックス層の厚さを計測するためには超解像度顕微鏡 STED を用いた。励起光レーザと自然放出を抑制させるレーザの 2 種類を用いることにより蛍光部分の分解能は 80 nm を実現した。

血管内皮細胞近傍の速度場計測のため、図 3 に示す高速共焦点スキャナ、高感度高速度カメラからなる高速共焦点マイクロ PIV 法の改良を行った。高 NA の水浸対物レンズなどの光学系の最適化および、細胞に粒子が付着する問題を解決するために粒径 100 nm の微小な有機シリカ粒子にポリエチレングリコール(PEG)コーティングを施した。PEG は、高い生体適合性を有しており、生体分子の非特異吸着を抑制することができる。粒子が細胞に吸着することを防ぐことができる。

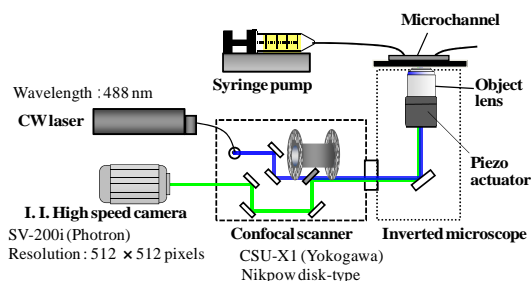


図 3 高速共焦点顕微鏡システム

生体内に近い環境の細胞に対し実験を実施するため、図 4 に示すマイクロ流体デバイスによる血管模倣環境で血管内皮細胞を培養した。デバイスは透明なシリコンゴムに流路パターンを造り込み、ガラス基板と張り合わせることで製作した。デバイス内のマイクロ流路は幅 400 μ m, 高さ 100 μ m, 長さ 20mm の直線流路形状である。流路内で培養した細胞のグリコカリックス層の厚さ計測とグリコカリックス層近傍の速度計測を行った。

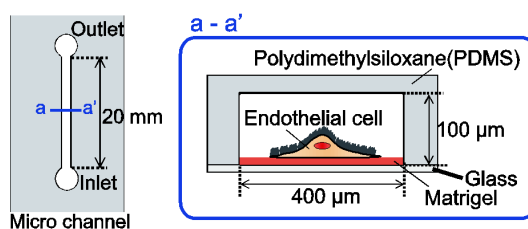


図 4 マイクロ流路内の血管内皮細胞

細胞の表面形状やグリコカリックス層の厚さ計測のため、蛍光物質を付加した Wheat Germ Agglutinin(WGA)を用いてグリコカリックスを染色した。WGA はグリコカリックス内の糖タンパクに選択的に結合するため、グリコカリックスを蛍光染色することができる。染色したグリコカリックスを、Stimulated emission depletion (STED) microscopy と呼ばれる超解像度顕微鏡を用いて可視化した。この顕微鏡は、従来の蛍光顕微鏡で用いる励起光に加えて誘導放出用のレーザ光を観察対象に照射することにより回折限界を超える分解能を実現できる。図 5 に STED の概略を示す。

図 6 に血管内皮細胞近傍の 3 次元速度分布を示す。

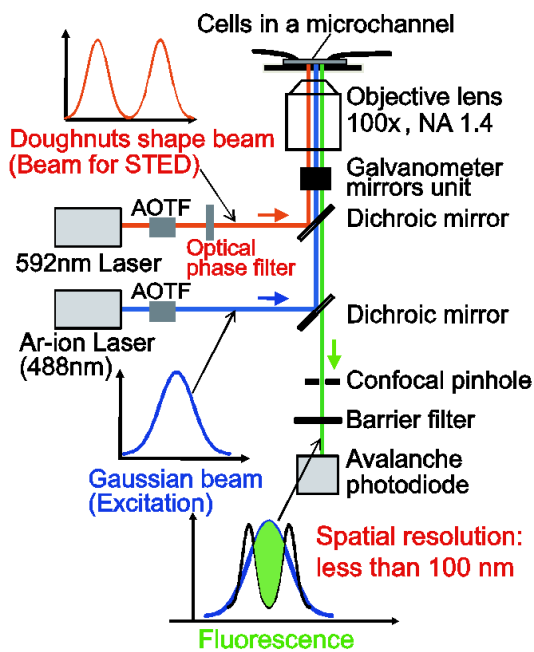


図5 超解像度顕微鏡

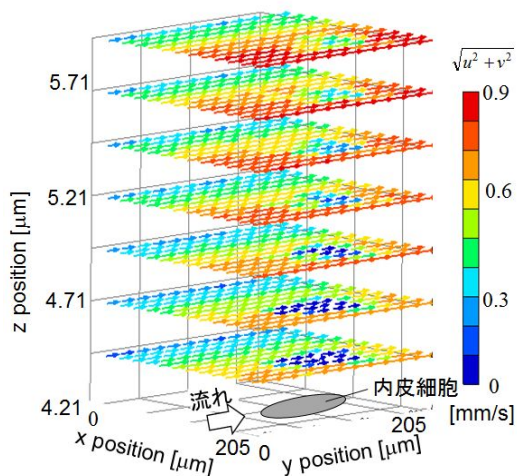


図6 血管内皮細胞近傍の3次元速度分布

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

茂木 克雄, 兼高 紀香, 杉井 康彦, 菱田 公二, 超解像度 LIF 法を用いた血管内皮細胞表面近傍の物質濃度分布計測, 日本機械学会論文集, 査読あり, 82(833), 15-00404, 2016.1. DOI: <http://doi.org/10.1299/transjsme.15-00404>

[学会発表](計 14件)

Sugii Y, Mukoyama T, Hishida K, Measurement of Three-Dimensional Velocity upon Endothelial Cells Utilizing Confocal Micro-PIV, The 10th International Symposium on Particle Image Velocimetry, Delft, Netherlands, 2013.7.

N, Mukoyama T, Mogi K, Sugii Y, Hishida K, High Resolution Velocity Measurement around the Surface of Endothelial Cells by Confocal Particle Image Velocimetry, 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, Seoul, Korea, 2013.8.

Urushidani M, Mogi K, Sugii Y, Hishida K, Development of measurement technique for velocity field near endothelial glycocalyx layer by utilizing confocal micro-PIV and super-resolution microscopy, The 16th International Symposium on Flow Visualization (ISFV16), Okinawa, Japan, 2014.6.24-28.

Urushidani M, Sugii Y, Mogi K, Hishida K, Investigation of Near Surface Flow Field and Glycocalyx Dimension of Endothelial Cells by Confocal Micro-PIV and Super-Resolution Microscopy, Proc. 17th Int. Symp. Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics, Lisbon, Portugal, 2014.7.7-10.

Mogi K, Sugii Y, Visualization of Near Surface Flow of Endothelial Cells based on Confocal Micro-PIV and Super-resolution Microscopy, Proc. the 10th Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing, Naples, Italy, 2015.6.

Kanetaka N, Mogi K, Sugii Y, Hishida K, Development of concentration measurement technique for evaluation of

mass transfer in the glycocalyx layer, Proc. the 11th International Symposium on Particle Image Velocimetry, Santa Barbara, USA, 2015.9.

兼高 紀香, 向山 卓哉, 杉井 康彦, 菱田 公一, 共焦点マイクロ PIV/LIF 法を用いた血管内皮細胞, 周りの速度・濃度分布計測法の開発, 第 50 回日本伝熱シンポジウム, ウェスティンホテル仙台およびトラストシティカンファレンス・仙台 (宮城県・仙台市) 2013.5.

向山 卓哉, 杉井 康彦, 菱田 公一, 共焦点マイクロ PIV を用いた血管内皮細胞近傍の速度分布計測法の開発, 第 41 回可視化情報シンポジウム講演論文集, Vol. 33, Suppl. No.1, 工学院大学 (東京都), 2013.7.

杉井 康彦, 血管内皮細胞近傍の流動の高解像度計測法, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 岡山大学 (岡山県・岡山市), 2013.9.

漆谷 真帆, 杉井 康彦, 茂木 克雄, 菱田 公一, 共焦点マイクロ PIV と超解像度顕微鏡を用いた血管内皮細胞グリコカリックス層近傍の速度分布計測, 第 37 回日本バイオレオロジー学会年会, 大宮ソニックシティビル (埼玉県・さいたま市), 2014.6.5-6.

漆谷 真帆, 杉井 康彦, 茂木 克雄, 菱田 公一, 共焦点マイクロ PIV と超解像度顕微鏡の組み合わせによる血管内皮細胞グリコカリックス層近傍の速度分布計測, 日本機械学会 第 92 期流体工学部門講演会, 富山大学 (富山県・富山市), 2014.10.25-26.

茂木 克雄, 兼高 紀香, 杉井 康彦, 菱田 公一, 血管内皮細胞グリコカリックス層内の高分子の超解像度濃度分布計測法の開発, 第 43 回可視化情報シンポジウム, 工学院大学 (東京都) 2015.7.21-22.

杉井 康彦, 細胞における流体力学, 第 43 回可視化情報シンポジウム, 工学院大学 (東京都) 2015.7.21-22.

茂木 克雄, 兼高 紀香, 大萱 晃大, 杉井 康彦, 菱田 公一, 超解像度法を用いた血管内皮細胞近傍の物質濃度分布計測, 日本機械学会 第 93 期 流体工学部門 講演会, 東京理科大学 (東京都), 2015.11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉井 康彦 (SUGII Yasuhiko)
東京工業大学・理工学研究科・産学官連携
研究員
研究者番号: 90345108

(2) 研究分担者

茂木 克雄 (MOGI Katsuo)
東京工業大学・理工学研究科・助教
研究者番号: 20610950

菱田 公一 (HISHIDA Koichi)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 40156592