

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420101

研究課題名(和文) P-セレクチン上での好中球のローリング特性に与える接触力の影響に関する実験的研究

研究課題名(英文) Influence of contact force on rolling characteristics of neutrophils on P-selectin

研究代表者

白井 敦 (SHIRAI, Atsushi)

東北大学・流体科学研究所・准教授

研究者番号：20302226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：好中球のローリングには、血管壁表面のセレクチンと、血球表面のリガンドとの結合・離脱が重要な役割を果たすことが知られているが、本研究課題では、これに加えて、赤血球との衝突による血球の血管壁への押しつけが血球の挙動に与える影響を明らかにすることを目的とする。種々の濃度のP-セレクチンを塗布したガラス平板上を用意し、独自に開発した傾斜遠心顕微鏡を用いて、P-セレクチンの濃度と平板への押しつけ力が、ガラス平板上における好中球様細胞に分化したHL-60細胞の挙動に与える影響を解析した。その結果、これらはそれぞれHL-60細胞の減速に寄与するが、その影響は互いに独立であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Rolling of neutrophils is known to be mediated by bindings of selectins on the endothelial surface and their ligands on the cell surface. The aim of this study is elucidation of correlative effects of the ligand/receptor binding and pressing of the cells onto the endothelium by collision with erythrocytes on the rolling characteristics. We prepared flat glass substrates which were coated by several concentrations of P-selectin. We then experimentally investigated rolling of neutrophil-like HL-60 cells on these substrates under a variety of the press forces to the substrates using a homemade inclined centrifuge microscope system. Consequently, it was found that either of them decelerates the rolling velocity, but their contribution to the deceleration is independent each other.

研究分野：流体工学

キーワード：HL-60細胞 ローリング P-セレクチン 押しつけ力 傾斜遠心顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

後毛細血管細静脈における好中球のローリング挙動において、血球と血管壁表面とのセレクチン/リガンド結合が重要な役割を果たすことはよく知られている。しかし、従来の実験系では、血管内で発生する赤血球と好中球との衝突の影響は考慮されてこなかった。好中球は、赤血球との衝突により血管壁に押しつけられるため、この押しつけ力に起因する血球の変形により、上記の結合が充進すると考えられる。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、所属研究室で独自に開発した傾斜遠心顕微鏡を用いて、ガラス平板に培養したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)上における、HL-60細胞の挙動を解析してきた。ここで、HUVEC表面の幾何形状と押しつけ力の関係を解析したが、HUVEC辺縁部に局在すると言われるP-セレクチンの影響を分離することが困難であった。

そこで、本研究課題では、ガラス平板に種々の濃度のP-セレクチンを塗布し、その上におけるHL-60細胞の挙動を解析する。ここで、P-セレクチン濃度に加えてHL-60細胞の平板への押しつけ力を変化させることで、これらが細胞の挙動に与える影響を定量的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、好中球のモデル細胞としてHL-60細胞を用いた。HL-60細胞は、20%FBS (HyClone)を含むRPMI-1640 medium (和光純薬)を培地として、CO₂濃度5%、湿度100%、37°Cで培養した。そして、HL-60細胞の分化には、all-trans レチノイン酸(ATRA; 和光純薬)を用いた。すなわち、ATRAを99.5%エタノールに溶解させた後、ATRAの最終濃度が1 μMとなるように培地に添加して5日間培養した。その後、NBT還元法で分化を確認したところ、80%以上の分化が確認された。なお、本細胞は、実験を行う直前にPBSで1回洗浄し、濃度が5×10⁵ cells/mlとなるように調整して新鮮なRPMI-1640に再懸濁した。

P-セレクチンは、Recombinant Human P-selectin (R&D Systems)を用いた。洗浄後に親水化処理したガラス平板は、0.01、0.1および1.0 μg/mlの濃度でP-セレクチンを溶解させた滅菌蒸留水に、4°Cで一晩浸漬することでコーティングした(以下、P-セレクチン基板と呼ぶ)。また、比較のために、タンパクに対する吸着ブロッキング剤として知られるBSA (和光純薬)をPBSに1 wt%で懸濁したものをコーティングしたガラス平板(以下、BSA基板と呼ぶ)も作成した。

実験計測には、傾斜遠心顕微鏡システムを用いた。本システムは、遠心分離機、1組の観察試料容器、CCDカメラを取り付けた顕微鏡および透過照明用のYAGレーザー光源から成る。試料容器の底面にガラス平板を設置し、

HL-60細胞の懸濁液で満たす。この観察試料容器を、遠心分離機のロータに、回転面に対して回転軸方向に角度θ傾けて取り付け、一定角速度ωで回転させると、遠心力FによりHL-60細胞は基板に接触する。その後、細胞は、Fの基板法線方向成分F_Nによって基板に押しつけられながら、接線方向成分F_Tによって駆動される。このときの挙動を、基板垂直方向からCCDカメラによって記録し、PTVソフトウェア(nexusPIVexpert2000, nexus)を用いて、各細胞の瞬間移動速度ベクトルを算出する。

実験計測は、F_T=20 pNで固定し、F_Nを15、30、47 pNと変化させて行った。各P-セレクチン濃度およびF_Nにおいて、同一の試料および基板を用いて4回の実験を1セットとし、これらを入れ替えて4セットの計測を行った。

4. 研究成果

図1に、P-セレクチンの蛍光顕微鏡画像を示す。図中の白い輝点が標識されたP-セレクチンで、黒の十字線は、PTV計測において画像位置のぶれを補正するために、ガラス平板にCrエッチングで描いたものである。この十字線はP-セレクチンを塗布した面と反対側に描いてあり、実際には十字線のある位置にもP-セレクチンは塗布されていると考えられる。

P-セレクチンの濃度の上昇とともに、HL-60細胞表面のPSGL-1との結合確立が増加し、それによって細胞の移動速度が減少すると考えられる。また、F_Nの増加によっても、細胞が変形し、転がり抵抗の増加によって移動速度が減少すると考えられる。そこで、図2に、各条件における、HL-60細胞のF_T方向平均移動速度Uを示す。図は、4セットの計測における平均値および標準偏差を示す。図より、F_Nの増加とともにUが減少するとともに、P-セレクチンの濃度の上昇によっても減少することが明らかである。

次に、図3に、各条件における、HL-60細胞の基板への付着率を示す。図より、F_Nの増加とともに、付着率が増加することがわかる。しかし、図2と異なり、P-セレクチンの濃度による差は見られず、各F_Nにおいて、コン

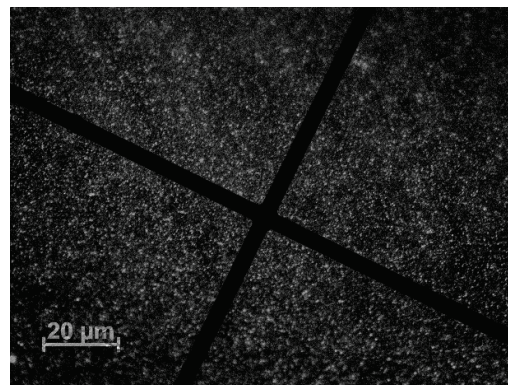


Fig. 1 Fluorescent microscopic image of P-selectin on glass substrate at 0.01 μg/ml.

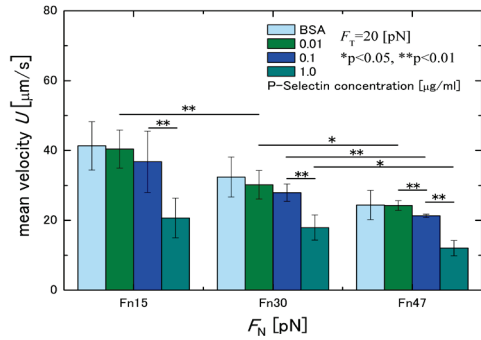


Fig. 2 Influence of P-selectin concentration and pressing force F_N on mean velocity of moving HL-60 cells.

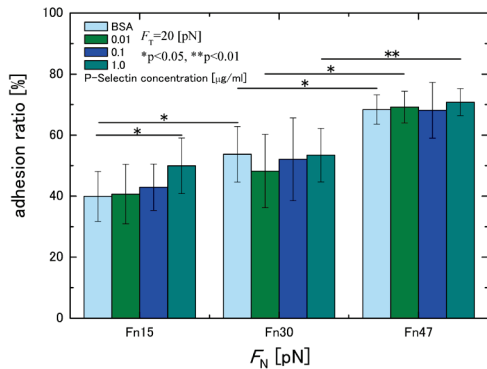


Fig. 3 Influence of P-selectin concentration and pressing force F_N on temporal ratio of non-moving state of HL-60 cells during their traverse.

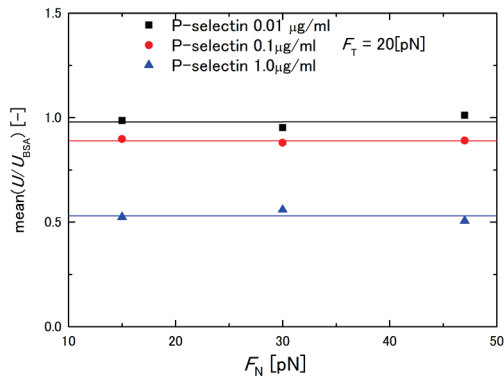


Fig. 4 Normalized U in Fig. 2 by that on BSA-coated substrate.

トロールである BSA 基板上における結果と比較した場合、 $F_N = 15$ pN における $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以外では、有意な差は見られなかった。

F_N および P-セレクチン濃度が平均移動速度 U の現象に与える影響を分離するため、図 2 において、各 F_N で P-セレクチン基板上における U を BSA 基板上における U で無次元化した。図より、無次元化した U は、 F_N に関わらずほぼ一定であることがわかる。このことから、好中球のローリングに与える P-セレクチンとの結合および血管壁への押しつけ力の影響は、互いに独立であると示唆される。

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)

1. 白井敦, 海本隆志, 接触力を考慮した好中球の rolling 特性解析—傾斜遠心顕微鏡を用いた in vitro 計測—, 可視化情報, 34-134 巻, 2014 年, 22-27.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvs/34/13/4/34_22/_pdf

[学会発表] (計 1 1 件)

1. 荒井俊貴, 白井敦, Jean-Paul Rieu, 凹凸を有する PDMS 基板への P-selectin および BSA のコーティングのための基礎的検討, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19 日, ウィンクあいち(愛知県).
2. Shirai, A., Rieu, J.-P., Sugimoto, R., Yoshino, D., Influence of pressing force on rolling characteristics of HL-60 cell line on a bumpy substrate mimicking the endothelium topography, The 16th Int. Conf. Biomed. Eng. (ICBME2016), 2016 年 12 月 7 日, シンガポール(シンガポール).
3. Shirai, A., Rieu, J.-P., Sugimoto, R., Yoshino, D., Rolling characteristics of neutrophils on PDMS surface mimicking the endothelial topography: PTV analysis of the cells motion on regular hexagonal pattern, 13th Int. Conf. Flow Dynamics (ICFD2016), 2016 年 10 月 12 日, 仙台国際センター(宮城県).
4. Sugimoto, R., Shirai, A., Yoshino, D., Rieu, J.-P., Correlative effect of normal force and P-selectin concentration on Rolling behavior of neutrophils, 13th Int. Conf. Flow Dynamics (ICFD2016), 2016 年 10 月 11 日, 仙台国際センター(宮城県).
5. 白井敦, 杉本涼太, Jean-Paul Rieu, 吉野大輔, 血管内皮表面を模擬した PDMS 基板上における H-60 細胞の挙動解析, 日本流体力学会年会 2016, 2016 年 9 月 28 日, 名古屋工業大学(愛知県).
6. Shirai, A., Rieu, J.-P., Rolling characteristics of neutrophils on PDMS surface mimicking the endothelial topography, The 15th Int. Symp. Adv. Fluid Info. (AFI-2015), 2015 年 10 月 28 日, 仙台国際センター(宮城県).
7. 白井敦, 押しつけ力作用下における好中球のローリング特性・伝統中国医学の科学的検証, 2015 年 10 月 22 日, 東北大学流体力学研究所(宮城県). (招待講演)
8. 白井敦, 傾斜遠心力場における血球の挙動解析, 日本機械学会 2015 年度年次大会, 2015 年 9 月 14 日, 北海道大学(北海道). (招待講演)
9. Rieu, J.-P., Shirai, A., Rolling characteristics of neutrophils on PDMS surface mimicking the endothelium topography, 2015 Annual

ELyT Workshop, 2015年2月20日, 松島センチュリーホテル(宮城県).

10. 白井敦, 傾斜遠心力作用下における好中球様細胞の挙動解析, 日本機械学会第8回高度物理刺激と生体応答に関する研究分科会(P-SCC12), 2015年1月20日, 九州大学(福岡県). (招待講演)
11. 杉本涼太, 白井敦, Jean-Paul Rieu, 吉野大輔, 押しつけ力がP-selectin上でのHL-60の移動特性に与える影響, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9日, 新潟コンベンションセンター(新潟県).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

白井 敦 (SHIRAI, Atsushi)
東北大学・流体科学研究所・准教授
研究者番号: 20302226

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

RIEU Jean-Paul (RIEU, Jean-Paul)
Université Claude Bernard Lyon 1・Institut