

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650252

研究課題名（和文）流れ負荷と傾斜遠心力負荷による異なる力学刺激に対する内皮細胞の応答特性の解明

研究課題名（英文）Clarification of Endothelial Cells' Response to Flow Force and Inclined Centrifugal Force

研究代表者

早瀬 敏幸 (HAYASE TOSHIYUKI)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号：30135313

研究成果の概要（和文）：

血管内の血流に対する内皮細胞の応答機構の解明は、循環器系疾患の発生や進展の機序の解明、新しい治療法や予防法の開発に重要である。本研究は、血流による力学刺激に対する血管内皮細胞の応答機構を解明するための新しい実験方法を提案した。遠心力負荷実験装置により、遠心力負荷を与えた実験結果と、従来の流れ負荷実験を比較することにより、細胞内の力学刺激の検知部位について知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Mechanism of endothelial cells' response to blood flow is crucial for clarification of the mechanism of occurrence and development of circulatory diseases and development of new treatment and prevention methods. In this research we proposed a new experimental methodology to investigate the endothelial cells' response to mechanical stimulation. The cells' response to the centrifugal force was compared with those to the conventional flow force stimulation. The experimental results provide useful information on the location of shear stress sensing in endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、傾斜遠心顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化や動脈瘤などの循環器系疾患において、血管内皮細胞のリモデリングや遺伝子発現と疾病の発症・進展のメカニズムや、内皮細胞に作用するせん断応力や圧力の影響が詳しく調べられているが、流れの刺激が内皮細胞内で検知される機構は未知であり、その解明は循環器系疾患の発症の機序の解明や新しい治療法の開発につながる、バイオメカニクス分野における重要な問題である。

申請者は、傾斜遠心顕微鏡を開発し、血漿中でガラス板や内皮細胞上を移動する赤血

球の摩擦特性を明らかにしてきた (Kandori, Hayase ら、*J. Biomech. Eng.* 2008)。実験において、ベースとなる内皮細胞にも遠心力が作用していることから、傾斜遠心力下での応答を調べれば、内皮細胞の力学刺激に対する新たな知見が得られるのではないかと発想を得た。

2. 研究の目的

本研究課題においては、培養内皮細胞に対して、傾斜遠心顕微鏡により任意方向の傾斜遠心力負荷と、通常の流れ負荷実験によるせ

せん断負荷による力学刺激を与え、内皮細胞が力学刺激の方向に伸張して配列する「配向」現象を観察する。両者の実験は、内皮細胞内部に異なった応力分布を生じさせるので、異なる力学負荷に対する内皮細胞の配向を調べることにより、内皮細胞への力学刺激が細胞内のどの部分で検知されるのかを明らかにする。また、生体内での内皮細胞への力学刺激は、血圧変動と血液によるせん断応力であるが、後者は、特に毛細血管内の血流において、赤血球から受けるせん断応力が重要であると考えられる。そこで、傾斜遠心顕微鏡による赤血球の摩擦特性の実験と計算機による理論解析により、赤血球と内皮細胞の間の摩擦特性の発生機構に関する知見を得ることも本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

実験に用いる内皮細胞にはヒト臍帯静脈内皮細胞（凍結 HUVEC、KE-4109、クラボウ）を選定し、培養液としては基礎培地（HuMedia-EB2、KE-2350、クラボウ）と増殖添加剤（HuMedia-MvG 増殖剤セット、KE-6150、クラボウ）からなる微小血管内皮細胞増殖用低血清液体培地（HuMedia-MvG、KE-2550、クラボウ）を用いた。この細胞を、細胞接着因子をコーティングした面積 75cm^2 の細胞培養フラスコに播種し、温度 37°C 、 CO_2 5%に保たれたインキュベータ内で培養した。細胞が80~90%コンフルエントになり、フラスコ全体における増殖を確認した後、細胞全体をPBS(-)（Phosphate-Buffered Salines、20012-027、インビトロジェン）により2回洗浄し、トリプシン（trypsin-EDTA、Gibco）を用いて細胞を剥離させ、細胞接着因子をコーティングした新たなフラスコに接種密度 5000 cells/cm^2 程度で播種して継代を行った。実験に使用する各容器に細胞を播種する場合、容器自体はエチレンオキサイドガス滅菌を行い、容器底面に細胞接着因子をコーティングし、継代数が4-10代目の細胞を接種密度 10000 cells/cm^2 程度で播種した。実験において使用する内皮細胞の物性値のうち、細胞の大きさや密度に関しては、顕微鏡観察による平均値と沈降速度法による計測値の平均値をそれぞれ用いた。細胞の高さは、AFMによる計測値を用いた。また、培養液の粘度は回転粘度計（TVE-22LT、東機産業）により得られた計測値の平均値を用いた。

(2) 実験条件

異なるせん断応力分布に対する内皮細胞の形態変化を比較するために、流れ負荷実験と遠心負荷実験で以下の実験条件を一致させた。

せん断応力分布の違いを比較するため、両者の実験で細胞の底面に発生するせん断応

力を一致させて基準とした。基準となるせん断応力は、ヒトの毛細血管における文献値を参考に 2 Pa とした。従って、流れ負荷実験の流量は 71.63 ml/min 、遠心負荷実験の回転数は 5983 rpm となる。負荷時間は Sokabe らの実験を参考に、内皮細胞が十分に配向する24時間に設定した。培養液による細胞の形態変化の影響を取り除くため、実験に用いる培養液には細胞培養で用いたものと同じ培養液を使用した。実験環境は、静置培養と同じ条件を考え、温度は 37°C に保ち、Air 95% + CO_2 5%の混合ガスを吹送して培養液の pH を一定の範囲（7.4~7.8）に保った。

(3) 流れ負荷実験

流れ負荷実験に用いた実験装置と実験方法について、詳細に説明する。

実験に使用した流れ負荷実験装置の外観を図 3.1 に示す。この実験装置は、流れ負荷実験容器、ダンピングチャンバ、リザーバ、ローラーポンプ、チューブ、恒温槽、ホットプレートからなる。

実験に先立ち、流れ負荷実験容器はエチレンオキサイドガス滅菌、ダンピングチャンバ、リザーバ、チューブは高压蒸気滅菌（ 121°C 、20分）を行い、複数の流れ負荷実験容器の容器部底面に細胞接着因子をコーティングして内皮細胞を播種しておく。実験は、培養した細胞が100%コンフルエントになった状態で開始し、実験に使用しない流れ負荷実験容器でコントロール実験を行う。

(4) 遠心負荷実験

遠心負荷実験に用いる実験装置と実験方法について、詳細に説明する。

遠心負荷実験装置の外観を図 3.2 に示す。この実験装置は、遠心負荷実験容器と遠心分離機から成る。実験中の内部の模式図を図 3.3 に示す。

実験に先立ち、遠心負荷実験容器はエチレンオキサイドガス滅菌を行い、複数の遠心負荷実験容器の底面に細胞接着因子をコーティングして内皮細胞を播種しておく。実験は、培養した細胞が100%コンフルエントになった状態で開始し、実験に使用しない遠心負荷実験容器を用いてコントロール実験を行う。

予備実験においては静水圧の影響を考慮していなかったため、その影響について調べる。遠心力により、せん断応力 2 Pa が加わるように、実験時は 5980 rpm で回転させている。この時の遠心力の加速度は重力加速度に換算すると $2400g$ である。培地の表面の圧力を大気圧の 1 atm とすると、試料入れは半径方向に 15 mm の深さを持つので、試料入れ内の静水圧は、培地表面 1 atm から深くなるほど大きくなり、深さ 15 mm で約 4.5 atm なる。これまでは十字線付近[深さ 9 mm : 2.1 atm]の画像を観察していたが、静水圧 1 atm から 4.5 atm の範囲での画像を観察し、静水圧の影響を見

る。

(5) 内皮細胞と赤血球との摩擦特性

傾斜遠心顕微鏡による内皮細胞と赤血球との摩擦特性の計測結果を説明するため、赤血球周りの血漿流れ場の3次元流動数値解析を行った。



図 3.1 流れ負荷実験装置

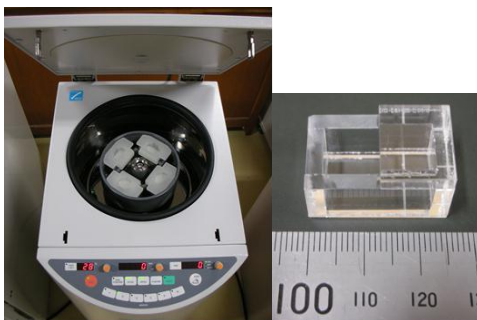


図 3.2 遠心負荷実験装置

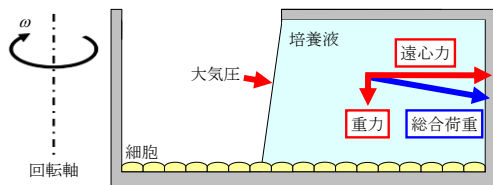


図 3.3 遠心負荷実験容器内の模式図

4. 研究成果

(1) 流れ負荷実験と遠心負荷実験の比較

最初に、流れ負荷実験と遠心負荷実験のそれぞれにより得られた予備的実験の結果を示し、垂直方向分布を有するせん断応力が負荷された内皮細胞の形態の変化について考察する。具体的には、各実験において記録した観察画像について、コントロール実験と比較して考察する。なお、これ以降に示す細胞

の観察画像における力の負荷の方向は、画像の左から右に向かう方向である。コントロール実験では、容器の方向を各実験と一致させて比較を行った。同じ実験においては、基準となる十字線に基づいて、ほぼ同位置の観察を行った。

流れ負荷実験と遠心負荷実験における実験条件および観察方法は前に述べた通りである。以下に、流れ負荷実験および遠心負荷実験と各実験で用いる実験容器に細胞の静置培養を行ったコントロール実験において得られた実験前と実験後の細胞の位相差顕微鏡による観察画像を示す。

流れ負荷実験に対するコントロール実験の24時間後の結果を図4.1(a)に示す。実験前と実験後の細胞を比較すると、細胞が移動や成長しており、若干の違いが見られた。しかし、細胞の長軸方向には大きな変化が見られず、全体的に、細胞はランダムな方向を向いている。細胞数においても実験前後で大きな変化はなく、細胞の増殖や遊走といった現象は確認できなかった。遠心負荷実験に対するコントロール実験においても同様の現象が見られ、容器形状の違いによる細胞への影響はなかった。

流れ負荷実験の結果を図4.1(b)に示す。実験前の内皮細胞は、コントロール実験と同様に、ランダムな方向を向いていた。流れを24時間負荷した実験後では、細胞は明らかに流れ方向に伸長して配向している。実験前に細胞数の少なかった部分では細胞数が増加し、細胞が剥離した部分では、周辺の細胞が増殖および遊走している現象が観察された。また、実験前後で変化はあるが、流れ方向に配向しない細胞が一部で確認された。

遠心負荷実験の結果を図4.1(c)に示す。実験前の内皮細胞は、コントロール実験と同様に、ランダムな方向を向いていた。遠心力を24時間負荷した実験後の内皮細胞は、全体的に一定の方向を向いているが、遠心力方向とは完全に一致しておらず、細胞が伸長したとは断定できなかった。細胞数の増加や、剥離した部分へ周辺の細胞が増殖および遊走する現象は、流れ負荷実験と同様に確認された。また、乾燥により死滅した細胞付近では、上記の形態変化は確認できなかった。

(2) 実験環境と静水圧の影響

実験環境を検討の上、遠心負荷実験を6回行った。代表的な結果を図4.2に示す。実験開始前(0h)の内皮細胞培養状態のばらつきについて検討した。遠心負荷実験の6回の実験において、実験開始前(0h)の細胞培養状況が最も良かったのは図4.2に示した実験であった。その他の実験における培養状況は、コンフルエントにまで増殖しないことが多かった。また、正常な内皮細胞は類円形で敷石状に増殖すると言われているが、細長い形

状などが多い状況も多かった。

遠心分離機内での pH 調整について、遠心分離機内には 5%CO₂ を供給しているが、培地の色が赤色に近いことから、ガス交換が行われていない可能性が高い。ただ、実験後の生死判定結果から細胞が死んでいないことを確認している。

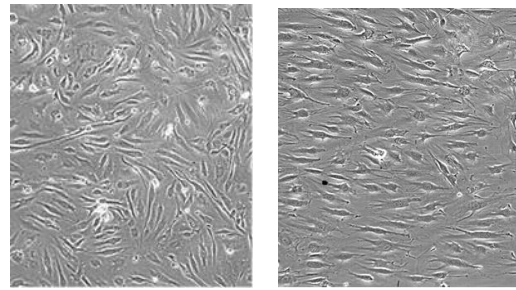
遠心負荷による影響について、実験開始前 (0h) の細胞培養状況にばらつきはあるものの、6 回の実験において、遠心負荷 (5980rpm、2P、2400g) により 24h 後に細胞は類円形の形状になる傾向が観察された。通常、無負荷培養で内皮細胞は類円形で敷石状になるので、正常に培養した細胞でどうなるか、今後実験を行いたい。また、流れ負荷実験では、流れ方向への配向に加え、細胞の高さ方向の変化は減少することが知られているので、高さ方向の変化も今後検討したい。

静水圧の影響について検討した結果を図 4.3 に示す。遠心負荷実験 (5980rpm) では、培地面を 1atm として、容器の最深部でおよそ 4.5atm の静水圧がかかっている。この静水圧分布が細胞に影響を及ぼしているかどうかについては、位相差観察による形状観察では、影響は見られなかった。今後、蛍光観察でアクチン、カドヘリン、核を観察し、影響があるか観察したい。

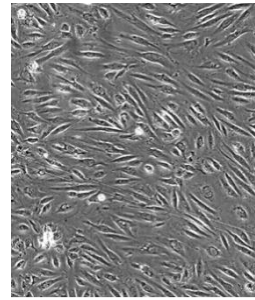
(3) 内皮細胞と赤血球との摩擦特性

内皮細胞を培養したガラス板、MPC・DLC をコーティングしたガラス板、およびコーティングなしのガラス板と赤血球との摩擦特性の実験結果を図 4.4 に示す。これらの結果によれば、内皮細胞上の摩擦力は、他の場合に比べて 2 倍程度大きな値を示しており、内皮細胞と赤血球との間の相互作用が重要であることを示している。

赤血球形状を底面が平坦な形状に仮定し、傾斜遠心力と流体力とがバランスする状態が実現するとのモデルにより、赤血球周りの 3 次元流動数値解析を行った。その結果、赤血球は迎角をもった状態で安定な運動状態が存在することが示された。計算より得られた安定な運動状態の摩擦力を実験結果と比較したものを図 4.5 に示す。計算結果と実験結果は定性的に一致しており、本モデルにより傾斜遠心顕微鏡上の赤血球の運動状態と、基板上のせん断応力の発生を定性的に説明できることが明らかとなった。

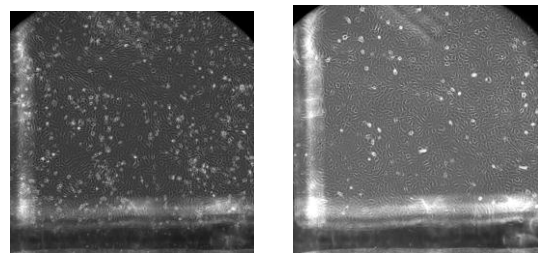


(a) コントロール実験 (b) 流れ負荷実験



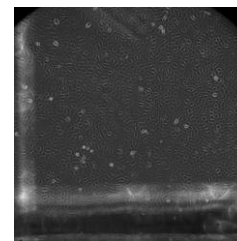
(c) 遠心負荷実験

図 4.1 24 時間後の観察結果



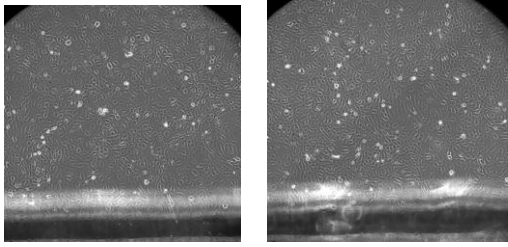
(a) 0 時間

(b) 14 時間後



(c) 24 時間後

図 4.2 改良遠心負荷実験による時間経過



(a) 静水圧小 (b) 静水圧大

図 4.3 静水圧の影響

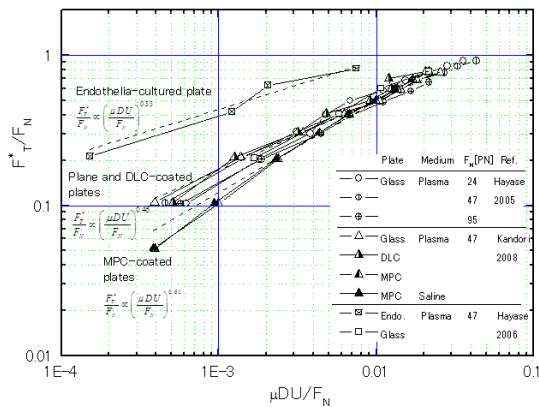


図 4.4 赤血球の摩擦特性の実験結果

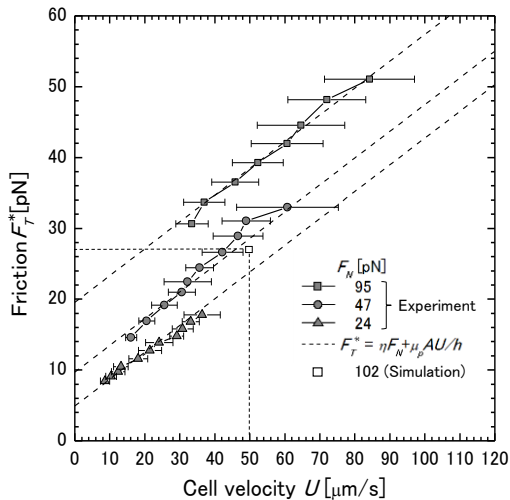


図 4.5 迎角を考慮した赤血球モデルと実験結果との比較

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 Toshiyuki Hayase, Kousuke Inoue,

Kenichi Funamoto, Atsushi Shirai, Frictional Characteristics of Erythrocytes on Endothelia-Cultured or Material-Coated Glass Plates Subject to Inclined Centrifugal Forces, Proceedings of 8th International Conference on Multiphase Flow ICMF 2013, Jeju, Korea, May 26 - 31, (2013), 1-8 CD-ROM (招待論文、査読なし) .

[学会発表] (計4件)

- ① Takashi OSHIBE, Toshiyuki HAYASE, Kenichi FUNAMOTO, Atsushi SHIRAI, Numerical Analysis of Levitation Mechanism of Red Blood Cell in Inclined Centrifuge Microscope - Effect of Asymmetric Cell Shape on the Motion, Proceedings of the 9th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2012), Sendai, (2012-9-20) 756-757.
- ② 押部峻, 早瀬敏幸, 船本健一, 白井敦, 傾斜遠心顕微鏡下での赤血球浮上機構に関する数値解析 第2報: 剛体赤血球モデルによる摩擦特性の再現性の検討, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, CD-ROM, No. 11-47, 豊中市, (2012-1-8) 8F24.
- ③ Takashi OSHIBE, Toshiyuki Hayase, Kenichi Funamoto, Atsushi SHIRAI, Numerical Analysis for the Effect of Angle of Attack on a Red Blood Cell Moving in an Inclined Centrifuge Microscope, 5th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, Singapore, (2011-12-13) 82-83.
- ④ 押部峻, 早瀬敏幸, 船本健一, 白井敦, 傾斜遠心顕微鏡下での赤血球浮上機構に関する数値解析, 日本機械学会第22回バイオフィロントニア講演会講演論文集, No. 11-14, 津市, (2011-10-7) 77-78.

[その他]

ホームページ:

http://www.ifs.tohoku.ac.jp/jpn/crfrd_isbel.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早瀬 敏幸 (HAYASE TOSHIYUKI)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号: 30135313

研究協力者

井上 浩介 (INOUE KOUSUKE)

東北大学・流体科学研究所・技術専門職員

押部 峻 (OSHIBE TAKASHI)

東北大学・大学院工学研究科・大学院生