

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06140

研究課題名(和文)血管内皮の表面幾何形状が好中球のローリング挙動に与える影響に関する実験的研究

研究課題名(英文) Influence of topography of vessel endothelium on rolling characteristics of neutrophils

研究代表者

白井 敦 (Shirai, Atsushi)

近畿大学・工学部・教授

研究者番号：20302226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、赤血球による血管壁への押しつけと血管内皮の表面幾何形状の相互作用が好中球のローリング挙動に与える影響を明らかにすることを目的とする。本研究では、血管内腔の表面幾何形状を千鳥状に並んだ短い六角形柱で近似し、PDMS樹脂でパターンを作成した。そして、傾斜遠心顕微鏡を用いて、種々の押しつけ力の下でのHL-60細胞の挙動を観察した。正六角形と伸長・配向した六角形のパターンで比較した結果から、好中球が血管内皮細胞辺縁部を通過する割合は血管内皮細胞の形状には関係なく押しつけ力の大きさのみに依存すること、伸長した血管内皮細胞は細胞形状によるローリングの減速効果が小さいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果は、好中球のローリング挙動には、従来から知られている血管内皮細胞表面のセレクチンと血球のリガンドとの結合・離脱に加えて、赤血球との衝突や血管内皮表面の幾何形状も重要な影響を与えることを示している。本結果から、生体内において、炎症が発生すると血管が拡張して赤血球の軸集中が起こるので、これによって血管壁に押しつけられた好中球は、セレクチンが局在する血管内皮細胞の辺縁部を選択的に通ることで効率的にセレクチンと結合すると考えられる。そして、これによって血球は更に活性化され、血管外遊走の次のステップへ短時間に移動できると推察される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is elucidation of correlative effects of pressing of neutrophils onto endothelium by collision with erythrocytes and surface topography of the endothelium on the neutrophils' rolling behavior. In this study, the surface topography was modeled by staggered short hexagonal poles to make the model endothelium by PDMS. Behaviors of HL-60 cells on regular and elongated hexagonal patterns of the model endothelium were compared under a variety of pressing force using the inclined centrifuge microscope system. Consequently, it can be said that probability of neutrophils' passage through periphery of endothelial cells does not dependent on the endothelial cell shape but on the pressing force. Elongation of the endothelial cells, however, less affects deceleration of the rolling due to their slim shape.

研究分野：流体力学

キーワード：HL-60 Rolling Surface topography Pressing force Endothelium

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

白血球の中で最も多数を占める好中球は、急性感染の場合に急激に数が増加するとともに、炎症病巣に遊走して細菌等を貪食処理する特性をもつ。この炎症病巣への遊走に際して、好中球は、まず血管内皮細胞上を転がるローリングという挙動を示す。このローリングにおいて、血球と血管内皮細胞とのセレクトイン/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、従来の研究では、血管内で軸集中した赤血球によって好中球が血管壁に押しつけられる力の影響は考慮されてこなかった。血管内皮細胞は有核細胞であるため血管内腔は凹凸があると考えられる。また、血球接着分子であるセレクトインは内皮細胞辺縁部に局在することが知られている。そのため、赤血球によって血管壁に押しつけられた好中球は、血管内皮細胞辺縁部を選択的に通過することでセレクトインと効率的に結合すると考えられる。

### 2. 研究の目的

申請者は、好中球のローリング挙動は、赤血球からの押しつけによる血球変形、各血管内皮上に発現した P-セレクトインの密度、血管内皮表面の幾何形状、P-セレクトイン発現の空間分布の 4 つの要因の相互作用によって特徴付けられると考えている。申請者は過去の研究において、所属研究室で独自に開発した傾斜遠心顕微鏡を用いて、P-セレクトインを塗布したガラス平板上における好中球のモデル細胞 (HL-60 細胞) の挙動観察から、と の相互作用を明らかにした。本研究課題は、血管内腔の表面幾何形状がローリング挙動に与える影響、すなわち、と の相互作用について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広く用いられる HL-60 細胞 (from blood of 36 y.o. female, acute promyelocytic leukemia) を使用した。過去の研究では、P-セレクトインとの接着を考慮するために all-trans レチノイン酸 (ATRA) を用いて好中球様細胞に分化したが、本研究では、非特異的な接着を起こさないように未分化の状態を用いた。HL-60 細胞は、20vol% FBS (HyClone) を含む RPMI-1640 (和光純薬) を培地として CO<sub>2</sub> 濃度 5%、湿度 100%、37°C で培養し、実験では、新鮮な RPMI-1640 に  $5 \times 10^5$  cells/ml となるように調整して再懸濁して使用した。

血管内皮の表面幾何形状は、千鳥状に配列した一辺 16  $\mu\text{m}$ 、高さ 2.3  $\mu\text{m}$  の正六角形柱でモデル化した。隣り合う六角形柱の間隔は実験に用いた HL-60 細胞の直径 (9~10  $\mu\text{m}$ ) を考慮し、12  $\mu\text{m}$  とした。これにより、1 つの血管内皮細胞を隣り合った六角形柱との中間点を結ぶ六角形領域と考えると、その投影面積は 1,366  $\mu\text{m}^2$  となり、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC の  $1,238 \pm 52 \mu\text{m}^2$  とよい一致を示す。また、血管内皮細胞は、流れによる剪断を負荷されると流れ方向に伸長、配向することが知られている。そこで、これを模擬するために、同面積の伸長した六角形柱のパターンも作成した。そして、これらの上における HL-60 細胞の挙動と比較するため、コントロールとして幅 12  $\mu\text{m}$ 、深さ 2.3  $\mu\text{m}$  の直線状の溝も作成した。

基板の作成には、まず、リヨン大学 NanoLyon の協力を得て、反応性イオンエッチングにより Si ウェハー上にモールドパターンを作成した。そして、この上に硬化剤を 10wt% 混和した PDMS 樹脂 (東レ・ダウコーニング SYLGARD<sup>®</sup> 184) を厚さ 1 mm になるように注ぎ、75°C で硬化させた。その後、パターンが転写された PDMS 樹脂を切り出し、1 min の空気プラズマ処理をした後にガラス平板に接着した。なお、実験に際して、直前に 70% エタノールによる超音波洗浄および 1 min の空気プラズマ処理を施した。

この基板上における HL-60 細胞の挙動観察には、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 レーザ光源から成る。試料容器底面に基板を設置し、細胞の懸濁液を封入し、この試料容器を遠心分離機のロータに回転面に対して角度  $\theta$  傾けて設置する。そして、一定の回転角速度  $\omega$  で回転させると、内部の細胞に遠心力  $F$  が作用して  $F$  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。この挙動を、基板垂直方向から CCD カメラで記録し、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。なお、本顕微鏡システムは断熱材で内張りしたジュラルミンケースに収められており、実験中の雰囲気は  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  に制御される。

実験では、 $F_T = 30 \text{ pN}$  で固定し、 $F_N$  を 23.5~70.5 pN で変化させた。また、以下のデータは、各基板および駆動条件において  $n \geq 7$  である。

### 4. 研究成果

図 1 に、 $F_N = 47 \text{ pN}$  の条件下で、PTV 計測により得られた瞬間移動速度ベクトルを用いて描いた HL-60 細胞の軌跡を示す。ここに、右側が正六角形パターン、左側が直線パターンである。図より、直線パターン上では、細胞は溝に沿って直線的に移動するのに対し、六角形パターン上では、六角形柱の間を通過していることがわかる。また、全体的に左方向に移動しているが、これは、基板が  $F_T$  方向に対してわずかに右に傾いていることに起因する。

図 2 に、 $F_N$  を変化させた場合の、正六角形および伸長した六角形パターン上における HL-60 細胞の  $F_T$  方向の平均移動速度  $U_R$  を示す。各データは、同時に計測した直線パターン上における細胞の平均移動速度で除した無次元値であり、 $U_R = 1.0$  は全ての細胞が直線的に移動することを意味する。図より、 $F_N$  が増加するに従って平均移動速度が減少することがわかる。また、図中の

破線は、全ての細胞がパターン谷間を通過したときの理論限界値であり、計測データはこれらに漸近している。さらに、同一の  $F_N$  において、伸長した六角形パターンの方が正六角形と比較して  $U_R$  が大きい。これは、伸長したパターンの方が細長く、 $F_T$  と平行な辺の長さが大きいため、正六角形と比較して軌跡がより直線的になることに起因する。以上の結果より、押しつけ力が増加するほど、より多くの細胞が六角形パターンの谷間を通過する、正六角形パターンの方がより大きな減速効果を得られることが示された。

図3に、 $F_N$  を変化させた場合の、両六角形パターン上における HL-60 細胞の瞬間移動速度ベクトルの  $F_T$  からの偏角の分散  $CV_R$  を示す。ここで、偏角の分散は以下で得られる。瞬間移動速度ベクトルデータ数が  $N$  の場合、各ベクトルデータの  $F_T$  からの偏角を  $\theta_j$  とすると、分散  $CV$  は以下で定義される。

$$CV = 1 - R$$

ただし、

$$Re^{i\theta} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i\theta_j}$$

である。すなわち、全ての速度ベクトルが一方向に向くと  $CV = 1$ 、 $360^\circ$  均等に分散すると  $CV = 0$  になる。図は、六角形パターン上における  $CV$  と直線パターン上における  $CV$  の差を表している。これは、傾斜遠心顕微鏡のロータの回転むらや PTV における計測誤差のために、 $F_T$  と直角方向(図1の左右方向)に発生する誤差を除去するためである。図より、 $F_N$  が増加するに従って  $CV$  が増加することがわかる。また、図中の破線は、全ての細胞がパターン谷間を通過したときの理論限界値であり、計測データはこれらに漸近している。以上の結果からも、押しつけ力が増加するほど、より多くの細胞が六角形パターンの谷間を通過することが示された。

さて、ある細胞がパターン谷間に沿って移動した六角形の数割合を  $x$  とする。すなわち、10個の六角形が  $F_T$  方向に並んだ状態で、ある細胞が5個の六角形に沿って移動した後に残りの5個の上を直進すると  $x = 0.5$  になる。このとき、 $x$  は  $U_R$  または  $CV_R$  を用いてそれぞれ以下の式で求めることができる。

$$x = \frac{(2a \cos \theta + b)(1 - U_R)}{2aU_R \left( \frac{1}{\cos \theta} - \cos \theta \right)}$$

$$x = \frac{(2a \cos \theta + b) \cos \theta \cdot CV_R}{2a(1 - \cos \theta) \{1 - CV_R(1 + \cos \theta)\}}$$

ここに、 $\theta = 60^\circ$ 、 $a$  および  $b$  は六角形柱の辺の長さで、正六角形の場合は  $a = b = 16 \mu\text{m}$ 、伸長した六角形の場合は  $a = 8.228 \mu\text{m}$ 、 $b = 42.557 \mu\text{m}$  である。

図4は、この式に図2および3で得られたデータを代入して求めた  $x$  を表している。ここで、図の縦軸の VPR が  $x$  に対応する。図より、 $U_R$  を用いた場合も  $CV_R$  を用いた場合も良い一致を示していることがわかる。また、六角形パターンの形状による差はほとんど無いことが示された。

以上の結果を纏めると、好中球が P-セレクチンの局在する血管内皮細胞辺縁部を移動するためには、軸集中した赤血球からの押しつけ力の大きさが重要であるが、血管内皮の表面幾何形状は影響しない。しかし、血管内皮細胞が伸長した場合、表面幾何形状によるローリングの減速への寄与が小さくなるといえる。

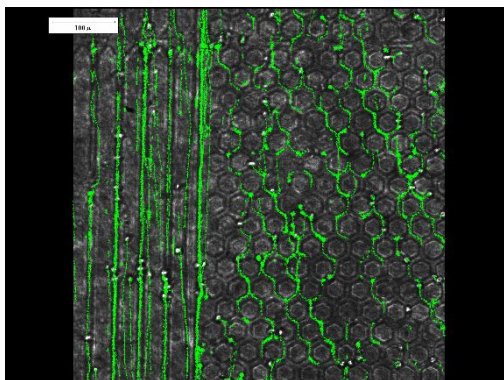


Fig. 1 Trajectories of HL-60 cells on PDMS substrate at  $F_N = 30 \text{ pN}$  and  $F_T = 30 \text{ pN}$ . Driving force,  $F_T$ , is applied from bottom to top of the figure and  $F_N$  is applied perpendicular to the figure. Most of the cells travel along valley of the substrate.

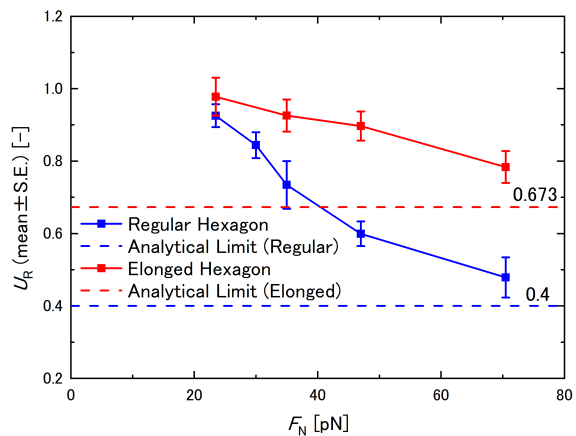


Fig. 2 Influence of pressing force,  $F_N$ , on mean cell velocity,  $U_R$ , in the direction of driving force,  $F_T$ , on regular and elongated hexagonal patterns normalized by that on straight pattern. Broken lines indicate analytical limit in the case that all the cells trace the valley of the pattern.

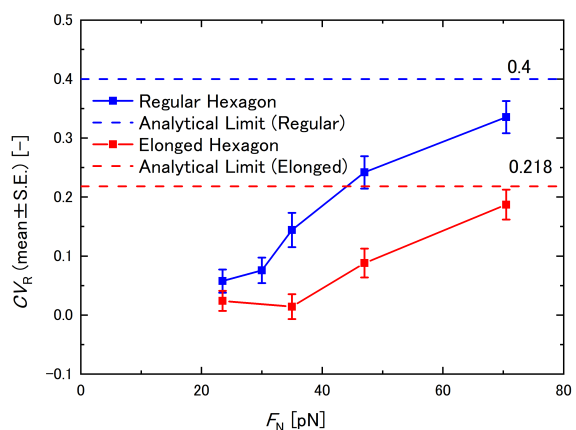


Fig. 3 Influence of pressing force,  $F_N$ , on angular variance of instantaneous cell velocity vectors,  $CV_R$ , from the direction of driving force,  $F_T$ , on regular and elongated hexagonal patterns from which the variance on the straight patterns were subtracted. Broken lines indicate analytical limit in the case that all the cells trace the valley of the pattern.

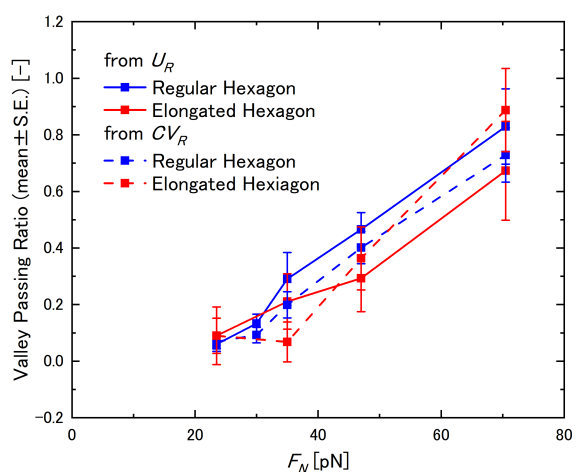


Fig. 4 Relationship between valley passing rate and pressing force,  $F_N$ , calculated from  $U_R$  and  $CV_R$ .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shirai Atsushi, Sugiyama Yoshiro, Rieu Jean-Paul	4. 巻 26
2. 論文標題 Differentiation of neutrophil-like HL-60 cells strongly impacts their rolling on surfaces with various adhesive properties under a pressing force	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Technology and Health Care	6. 最初と最後の頁 93 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/THC-171052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 白井敦
2. 発表標題 微小血管における白血球流動のモデリング
3. 学会等名 近畿大学工学部研究公開フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Shirai
2. 発表標題 Modeling of Alveolar Microcirculation for Passage of Neutrophils
3. 学会等名 The 15th International Conference on Flow Dynamics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirai, A., Rieu, J.-P.
2. 発表標題 Rolling characteristics of neutrophils on PDMS surface mimicking the endothelial topography: Influence of pressing force on cell trajectories
3. 学会等名 ELyT Workshop 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒井俊貴, 白井敦, Jean-Paul RIEU
2. 発表標題 血管内皮表面を模擬したPDMS基板におけるHL-60細胞の挙動解析 (P-セレクチンの塗布による影響)
3. 学会等名 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arai, T., Shirai, A., Rieu, J.-P.
2. 発表標題 Rolling experiment of HL-60 cells on patterned PDMS substrate coated by P-selectin
3. 学会等名 14th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2017) (国際学会)
4. 発表年 2017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