

平成 2009 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18300174

研究課題名（和文）

超音波照射による血管内皮細胞および白血球の細胞接着分子の発現に関する研究

研究課題名（英文）

Effect of sonocation for the expression of the adhesion molecules in the HUVEC

研究代表者

藤井 康友 (FUJII YASUTOMO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00337338

研究成果の概要：

超音波照射が血管内皮細胞(HUVEC)の細胞接着分子発現に及ぼす影響について研究を行った。本研究において、超音波造影剤を添加して超音波エネルギー照射した場合、照射を行わなかった場合や超音波造影剤を添加しないで超音波エネルギーを照射した場合と比較して HUVEC における接着分子発現の若干の増加を認めたことから、超音波造影剤を添加しての超音波エネルギー照射は局所炎症を惹起する可能性があると考えられた。しかしその程度は有意差をもって認めるものではなく、現時点での使用法では臨床的な有害事象が発生する可能性は少ないものと考えられた。本邦においてこれら超音波造影剤の適応は、現時点では肝腫瘍の診断に限られたものであり炎症性病態への使用経験が少ないものと予想される。今後、これら超音波造影剤の使用適応が炎症性疾患に広げる際、病態の悪化を惹起する可能性があることを念頭において、その使用量や投与方法および超音波照射方法（パワー、照射時間など）について考慮する必要があると考えられた。

超音波造影剤であるレボピストまたはソナゾイドを併用し超音波を照射したときのみに HUVEC における接着分子発現は若干の増加を認めたが、レボピストとソナゾイドによる違いは認められなかった。レボピストは超音波照射で壊れやすい超音波造影剤である一方で、ソナゾイドは壊れにくい造影剤であることから、バブルの崩壊は接着分子の発現に大きな影響を与えていないことが示唆された。今後の検討課題としては、超音波照射方法の変化における超音波造影剤（バブル）のふるまいの変化とそれにとまなう細胞接着分子の発現量の変化それぞれについて詳細な検討が必要であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	8,400,000	2,520,000	10,920,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用システム

キーワード：超音波 細胞接着分子、血管内皮細胞、

## 1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子は、細胞膜表面に発現し、細胞と細胞または細胞外マトリックスとの接着に関与する分子群の総称である。接着分子は構造と機能はきわめて複雑多岐にわたり、生体内の基本的な機能全般において中心的役割を担う。また接着分子は単に細胞の糊としてのみならず、細胞間および細胞内情報伝達にも関与し、その重要な役割は、①多細胞体の発生、分化、組織の支持構築、②白血球等の血管内から組織内への遊出に代表される細胞の移動、③組織内における細胞の認識と情報伝達などが挙げられ、炎症やがん細胞転移など種々の病態に関与していることが明らかとなった。

局所炎症の発症メカニズムは、1. 細菌の進入などによる刺激が血管内皮細胞と白血球の細胞接着分子の発現を促す、2. 血流に乗って流れていた白血球は、細胞接着分子を介して血管内皮と接着し血管外へと移動し、細菌を取り込む、3. 腫脹や発熱がおこる、4. 細菌（刺激）の除去とともに消退する、といった起承転結の流れであり、細胞接着分子は、血管内を流れている白血球などの免疫系の細胞を病変局所へと動員し、生体を防御する役割を果たしている。

血管内皮細胞は白血球遊走因子を分泌し、その細胞表面に接着分子を発現し単球や白血球の内皮接着・透過を制御している。一方でクローン病や慢性関節リウマチでは、罹患臓器における血管内皮細胞の細胞接着分子（p-selectin, mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)）が慢性的かつ過剰に発現しているために白血球の血管外移動が過度に行われており、このことが慢性炎症の一因と考えられるようにな

った。そこで白血球や血管内皮細胞の細胞接着分子を標的とした治療法が注目されており、白血球側の細胞接着分子である $\alpha_4$ インテグリンに対するモノクローナル抗体natalizumabがクローン病治療薬として登場するまでに至っている。血管内皮細胞の細胞接着分子は、ずり応力などのメカニカルストレスに対してさまざまな発現様式を示すことがわかっており、メカニカルストレスの範疇にある超音波エネルギーが、その細胞接着分子の発現に何らかの影響を及ぼすことが期待される。

超音波は、疾患の画像診断的手法としてほぼ確立された技術であるが、放射線と比べて治療分野への応用は未だ十分に行われていないとはいえない。治療への応用・研究は十分に行われているとはいえず、解明されていない点が多い。これまでの超音波エネルギーの治療応用は、骨折および神経細胞の修復や悪性腫瘍がその対象であったが、その中で、癌細胞におけるアポトーシス誘導および破骨細胞における生理活性物質分泌能の活性化への応用が報告されている。血管内皮細胞または白血球における細胞接着分子の発現異常を薬物によって制御しようとする研究はin vitroでは散見されるものの、薬物の全身投与に伴う副作用が臨床応用を困難としている。一方で超音波は局所へのエネルギー照射が可能なことから、これまでに骨折および神経細胞の修復や悪性固形腫瘍の治療への応用がin vivoで報告されており、罹患部位のみをターゲットとする安全な治療法となりうるものと考えられる。さらに本研究によって得られる成果は、超音波エネルギーの治療応用のみならず、超音波エネルギーの安全性に関する示唆に富む知見となりうるものと考えられる。

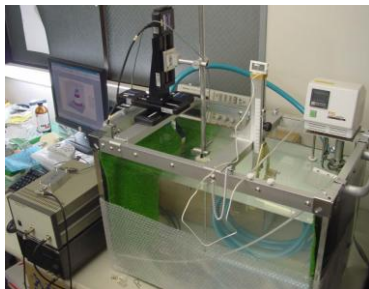
## 2. 研究の目的

本研究の目的は、超音波エネルギーが血管内皮細胞および白血球の細胞接着分子の発現に及ぼす影響を明らかにし、クローン病や慢性関節リウマチといった細胞接着分子の慢性かつ過剰な発現が病因である疾患に対する新しい治療法開発への基礎的知見を得ることである。培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* の実験を行い、これらの接着分子発現を制御できる超音波照射の至適条件に関する検討を行った。さらに超音波造影剤との併用効果についても検討を行った。

## 3. 研究の方法

①超音波照射システムの改良：超音波エネルギーが脂肪細胞の生理活性物質分泌能に及ぼす影響に関する研究に使用する目的で超音波照射システムを開発した。このシステムを用いて、T-25 フラスコ入りヒト血管内皮細胞 (HUVEC) に超音波を照射する場合、その探触子の大きさからフラスコの底面に接着した細胞に均一に超音波を照射することが困難であった。この問題を解決するためのシステム改良を行った。つまり、一定の時間ごとに探触子が自動的に移動し均等に超音波照射を行うシステムの作成をおこなった。

超音波照射システムの外観を下に示す。



- ・探触子：1MHz,  $\Phi$ 28mm 円形振動子
- ・パワーアンプ：T142-4749A (THAMWAY)+整

## 合器

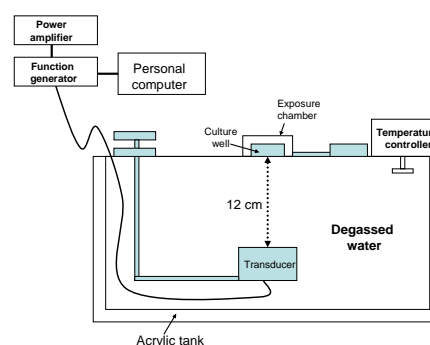
- ・送信波発生器：33220A (アジレントテクノロジー)
- ・XYZ ステージ+ 探触子保持アームセット
- ・オシロスコープ：TDS-2024 (Tektronix)
- ・水槽：15mm 厚 透明アクリル樹脂製、内容積 670×370×470 mm
- ・恒温器：F-002DN (東京硝子器械株式会社)
- ・パーソナルコンピュータ

②疾患モデルの作成：Kurabo 社より購入した T-25 フラスコ入り正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を対象とした。それぞれのフラスコには 2 次培養のさい帯静脈、または 4 次培養の大動脈、肺動脈由来の血管内皮細胞が約  $4 \times 10^5$  個含まれていた。到着した HUVEC は、一晚インキュベータ内 (室温 37 度、二酸化炭素濃度約 20%) に静置し、血管内皮細胞増殖用培地 (HuMedia-EG2) を用いて培養した。その翌日 confluence になったことを倒立顕微鏡で確認した後、accutase™ (CHEMICON 社) を用いて HUVEC を剥離した。剥離した HUVEC をチェンバースライド (4 チャンバー) に蒔いた後、HuMedia-EG2 および TNF  $\alpha$  を添加し、一晚インキュベータ内に静置した。TNF  $\alpha$  は、培養液中濃度が 20  $\mu$ g/ml となるように調節して添加した。HUVEC における細胞接着分子 (p-selectin、VCAM-1、MAdCAM-1) 発現の評価は、蛍光染色法による形態学的方法にて評価した。蛍光染色にはあらかじめ FITC で標識してある細胞接着分子 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) を抗体として用いた。ブロッキングには、immunoblock™ (DSP 社) を、マウンティング封入剤には Vectashield with Hard Dapi™ (VECTOR 社) を用いた。染色の手順は以下の通りである。i. チャンバースライドを取り出す。ii. PBS で 2 回洗浄する。iii. 10%ホル

マリンで固定する。iv. PBS で 3 回洗浄する。  
v. PBS で 50 倍に希釈した抗体を加え遮光のもと一晩常温で静置する。vi. 翌日 PBS で 3 回洗浄する。vii. 封入剤を用いてマウンティングする。

③フローサイトメトリ (FACS) 法を用いた細胞接着因子発現量の評価：超音波エネルギーが HUVEC における細胞接着因子発現に及ぼす影響について定量的に評価する。Kurabo 社より購入した T-25 フラスコ入り HUVEC を対象とした。到着した HUVEC は、TNF  $\alpha$  を添加後インキュベータ内 (室温 37 度、二酸化炭素濃度約 20%) に一晩静置し、血管内皮細胞増殖用培地 (HuMedia-EG2) を用いて培養した。到着翌日 confluence になったことを倒立顕微鏡で確認した後、培養液を交換し直ちに超音波照射を開始した。血管内皮細胞の培養液中に TNF  $\alpha$  を添加することにより、細胞接着因子が過剰発現している疾患モデルを作成した。BD Biosciences より購入した TNF  $\alpha$  は HuMedia-EG2 を用いて 20  $\mu$ g/ml の濃度に調整して使用した。超音波照射は、我々が開発した同一の超音波照射装置 (マイクロソニック社製) を用いて行った。周波数が 1 MHz で連続波およびパルス波を発生する平面探触子 (直径 28 mm) を水中に沈め、水面に設置した細胞入りのフラスコに対して超音波が垂直に照射されるように設定した。超音波の発生調節には、ファンクションジェネレータ (Model 33220A、アジェレントテクノロジー社) とパワーアンプ (Model T142-4749A、サムウェイ社) を用いた。HUVEC が入ったフラスコは超音波照射システムの試料固定チャンバー内に入れ、超音波探触子より 11 cm 離れた水面に固定し、超音波照射を行った。超音波照射は sham (negative)、30mV、60mV (それぞれ、0、0.50、2.1  $Wcm^{-2}$

のエネルギーに相応) の 3 種類のパワーについて行った。各フラスコに対して、初回照射後より 24 時間後および 48 時間後の計 3 回の超音波照射を行った。1 回の超音波照射時間は 15 分間とした。また、それぞれの超音波照射条件において、現在本邦で市販されている超音波造影剤レボビストおよびソナゾイドが、HUVEC の細胞接着因子発現における影響について検討した。それぞれの超音波造影剤は HuMedia-EG2 で希釈し、臨床で使用されている場合と同様の濃度で使用した。



FACS による細胞接着因子発現の評価は、1. Sigma の cell distortion solution non-enzymatic を用いて細胞を回収、2. 200g/rpm で 5 分間遠心し、上清を除去、3. Staining medium (SM: 3%FCS, 0.05% sodium azide, PBS) に再懸濁、4.  $1 \times 10^6$  個の細胞に分注、5. 200g/rpm で 5 分間遠心し、上清を除去、6. 細胞  $1 \times 10^6$  個あたり、原液 10  $\mu$ l の CD62P, VCAM-1、50 倍に希釈した MAdCAM-1 10  $\mu$ l を加え、7. 4°C、30 分間反応させ、8. 1ml の SM を加えて再懸濁した。9. 200g/rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。10. 1  $\mu$ g/ml の propidium isodide SM 300  $\mu$ l に懸濁し、FACS を用いて、細胞接着分子 (MAdCAM-1, VCAM-1, p-selectin) の定量的解析を行った。

④免疫染色法を用いた細胞接着因子発現量

の評価：超音波エネルギーが HUVEC における細胞接着因子発現に及ぼす影響について形態学的に評価した。Kurabo 社より購入した T-25 フラスコ入り正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を対象とした。到着した HUVEC は、一晚インキュベータ内 (室温 37 度、二酸化炭素濃度約 20%) に静置し、血管内皮細胞増殖用培地 (HuMedia-EG2) を用いて培養した。その翌日 confluence になったことを倒立顕微鏡で確認した後、accutase™ (CHEMICON 社) を用いて HUVEC を剥離した。剥離した HUVEC をチェンバースライド (4 チャンバー) に蒔いた後、HuMedia-EG2 および TNF  $\alpha$  を添加し、一晚インキュベータ内に静置した。TNF  $\alpha$  は、培養液中濃度が 20  $\mu\text{g/ml}$  となるように調節して添加した。超音波照射法は前述実験③と同じ設定で行った。細胞接着分子発現の評価は、前述実験②と同じ蛍光染色法による形態学的方法にて評価した。

⑤既存の超音波照射治療器を用いた細胞接着因子発現量の評価：疾患モデル血管内皮細胞に対して既存の超音波骨折治療器である SAFHS 2000 (TEIJIN 社) を用いて超音波を照射し、これらの接着分子の発現 (p-selectin, VCAM-1, MAdCAM-1) についてその程度を評価した。HUVEC の培養処置は、前述実験④と同じ方法で行った。超音波骨折治療器 SAFHS2000 の性能を以下に記す。

- ・周波数：1.5MHz
- ・パースト幅：200  $\mu$  秒
- ・繰り返し周期：1kHz (1000  $\mu$  秒)
- ・有効超音波放射面積：3.88 $\text{cm}^2$
- ・超音波出力 (時間平均)：117mW
- ・超音波出力 (空間平均-時間平均)：  
30mW/ $\text{cm}^2$



探触子に十分な量のゼリーを塗布しその上に HUVEC を蒔いたチェンバースライドを直接おき超音波を照射した。1 回の照射時間は 20 分間とした。照射後スライドをインキュベータ内で一晚静置した後、蛍光染色による形態学的方法 (前述実験②③④と同じ手法) にて接着分子の発現程度を評価した。

#### 4. 研究成果

①XYZ ステージは、ステッピングモーター駆動ステージを 3 つ組み合わせ 3 軸移動が可能な構成となっており、制御はパーソナルコンピュータから行う。表計算ソフト「Excel」を用いることにより、任意の時間間隔および移動距離の設定が可能となった。この改良により、T-25 フラスコ底面に対して、ほぼ均等に超音波照射が可能となった。

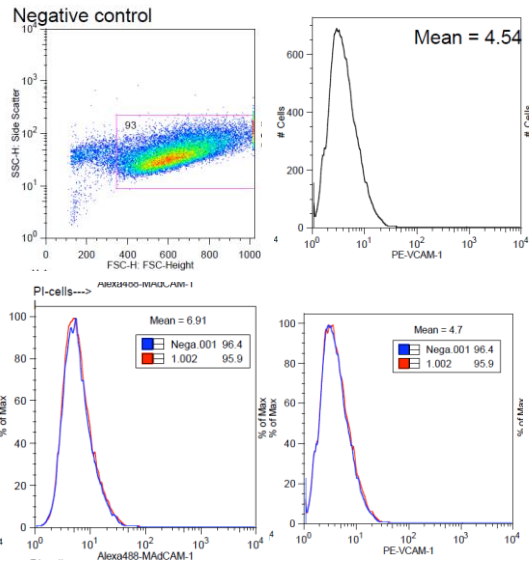
②すべての接着分子において、TNF  $\alpha$  を添加した場合でその発現が著しいものであった。



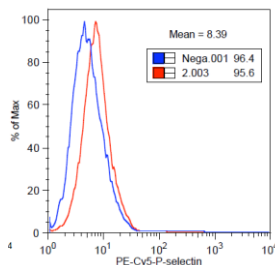
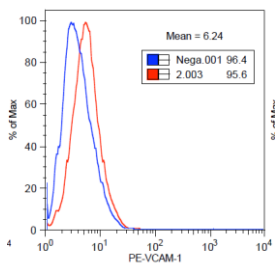
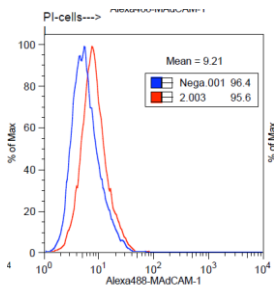
TNF  $\alpha$  (-)

TNF  $\alpha$  (+)

③超音波照射を行わない場合、超音波造影剤の添加の有無にかかわらず細胞接着分子発現の変化を認めなかった。また、超音波照射を行い、超音波造影剤が添加されていない場合、細胞接着分子発現に変化を認めなかった。



超音波照射を行い、超音波造影剤が添加された場合、統計学的な有意差を認めないものの、細胞接着分子発現は増加する傾向にあった。



その発現増加の程度において、ソナゾイドとレボビストで明らかな違いは認めなかった。

④超音波造影剤添加群において、いずれの接着分子も発現に若干の増加を認めた。以下にMAdCAM-1の発現を提示する。



30mV + ソナゾイド      60mV + レボビスト

その発現増加の程度において、ソナゾイドとレボビストで明らかな違いは認めなかった。

⑤すべての接着分子において、その発現の程度は超音波照射前後で明らかな変化を指摘しえなかった。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 康友  
自治医科大学 医学部 講師

### (2) 研究分担者

山田 俊幸  
自治医科大学 医学部 教授  
谷口 信行  
自治医科大学 医学部 教授

### (3) 連携研究者

入江 喬介  
マイクロソニック社