

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19360089
 研究課題名 (和文) 疑似血管デバイスを用いた内皮細胞と流れによる刺激との相互作用の解明
 研究課題名 (英文) Experimental Investigation of Response of Endothelial Cells by Fluid Shear Stress Exposure Using Blood Vessel Model

研究代表者
 杉井 康彦 (SUGII YASUHIKO)
 工学院大学・総合研究所・准教授
 研究者番号：90345108

研究成果の概要：

動脈硬化や脳梗塞，心筋梗塞などといった循環器系疾患の原因解明のために，マイクロ流路内で血管の表面の細胞である内皮細胞の培養方法を検討し，血流による刺激としてせん断応力を負荷しながら培養する方法を確立した．特に，内皮細胞の流路壁面への接着性の向上や培養液の還流方法を検討した．せん断応力とマイクロ流路内で培養した内皮細胞の形状や流れに対する向きなどの配向性の関係を詳細に調べた．

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：バイオ流体力学，マイクロ流体，血管内皮細胞，せん断応力，循環器病

1. 研究開始当初の背景

現代社会において，大幅な生活様式の変化と急速な高齢化に伴い，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の有病率が高まっている．血液循環に重篤な障害を与える循環器系疾患は，動脈硬化や血栓，閉塞などと密接に関連しているが，これらの発症と進展には，血液の流体力学因子が大きな影響を及ぼしている．心臓と血管から構成される循環器の基本的な役割は，血液を循環させることによって体の各臓器・組織を形作る細胞の生命維持・活動に必要な酸素や脂肪，糖分，ミネラル，ビタミンなどの栄養素を供給し，そこで生産された代謝産物や老廃物を排出することである．また，化学伝達

物質であるホルモンを体内の各所に運び，相互の連絡をはかる役割も担っている．生命維持のためには，この循環器の役割が正常に機能することが非常に重要である．そこで，動脈硬化，心筋梗塞，脳梗塞など血管の疾患の原因解明や予防のため，血管の内側を覆っている血管内皮細胞と血流による刺激との関係が *in vivo* や *in vitro* の実験により調べられている．血管内皮細胞は，血流と接触する部分をただ1層からなり，核の存在する最も厚いところで 2-3 μm 程度とであり，敷石のように覆われている．

これまでに，*in vivo* の実験により，流体によるせん断応力と NO 産生量などに相関があることやせん断応力による細胞の配向性

などが調べられているが、そのメカニズムは不明な点が多い。メカニズムの解明のために、マイクロ加工技術を用いて作成したマイクロデバイス内で血管内皮細胞を培養し、疑似血管マイクロデバイスが開発され、内皮細胞への白血球の付着性について調べられている。また、層流の理論解より求めた壁面せん断速度より、動物実験によって求めた速度場から求めたせん断速度が、小さくなっていることが報告されている。一方、数値計算を用いて計測した内皮細胞の周り流れを求め、推定されたせん断応力の分布が、円管のせん断応力の理論値より小さくなることが示されている。

2. 研究の目的

動脈硬化や脳梗塞、心筋梗塞などといった循環器系疾患の原因解明のために、マイクロ流路内で血管の表面の細胞である内皮細胞を培養し、せん断応力などの流れによる刺激と内皮細胞の応答との関係を調べるため、疑似血管デバイスを用いて内皮細胞と流れによる刺激との相互作用の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) マイクロデバイス作成方法

Fig.1 に作成した幅 400 μ m、深さ 75 μ m、長さ 2cm の直線流路から成る PDMS (polydimethylsiloxane) 製マイクロデバイスを示す。スピンコートを用いてガラス基板にフォトレジスト剤 (SU-8) を塗布し、ホットプレートで焼き固め、マスクアライナを用いてフォトマスクに描画したマイクロ流路の図面をレジスト剤に露光した。露光した後、再びホットプレートで焼き、現像液で現像して型を作成し、その上に PDMS を流し込みオーブンで焼き固めた後、引き剥がした。酸素プラズマをチップ表面に照射して表面処理を行って流路を親水性にした後、厚さ 0.17mm のガラスに貼り付けて溶液導入用の内径 0.3mm、外径 0.5mm のチューブを取り付けた。なお、PDMS は酸素透過性で、無色透明である。

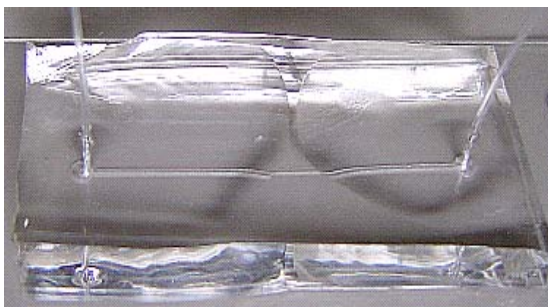


Fig. 1 PDMS microchannel

(2) 血管内皮細胞の培養方法

これまでに確立された培養ディッシュなどにおける細胞培養技術では、容器に細胞と栄養である培養液を入れ、インキュベータ内で静置することによって細胞の培養が可能であった。一方、マイクロ流路内での培養は、微小空間であるために培養液を充填しただけでは、細胞に対して培養液の量が少なく栄養や酸素が不足し、さらに老廃物が滞留するために、細胞が死滅する。しかし、新鮮な培養液を細胞に連続的に供給すると、気泡の混入やコンタミ、還流による細胞の剥がれなどの問題などが生じる。そのため、培養液を必要最小限の流量で還流させる手法が用いられている。その際の細胞に負荷されるせん断応力は、0.007Pa であった。なお、壁面せん断応力は、

$$\tau = \frac{6\mu Q}{a^2 b} \quad (1)$$

により求めた。ここで、 μ は粘度、 Q は流量、 a, b はそれぞれ流路の深さと幅である。

本研究では、大きなせん断応力を負荷しながら細胞を培養する方法を検討し、疑似血管マイクロデバイスを開発した。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) を用い、直径 35mm の細胞培養ディッシュに播種し継代した 4 代目の細胞を用いた。継代では、溶液 (HEPES-BSS, Trypsin/EDTA, TNS) にサブカルチャー用試薬セット (ReagentPack™) を加えたものを用いた。内皮細胞培地キット (EGM-2, Cambrex) を用いて、培養を行った。シリンジポンプを用いて吸引する方法により、溶液をマイクロ流路内に導入し、細胞懸濁液などの種々の溶液の交換の際の気泡の混入やコンタミを避けた。70%エタノールおよび紫外線で滅菌したマイクロ流路の壁面を、細胞外マトリックスの一つであるマトリゲルを用いてコーティングした。マトリゲルの濃度は、0.1 mg/ml であり、コーティング溶液を 5.0 μ l/min の流量で吸引し、5%の CO₂ インキュベータ内で 1 時間静置させた。静地後、無血清の D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) 溶液を流して洗浄した。細胞濃度が 10⁶ cells/ml の HUVECs の懸濁液を流量 5.0 μ l/min でシリンジポンプを用いた吸引により、作成したマイクロ流路内に導入した。マイクロチューブの両端をクリップで挟んで流れを止め、細胞の接着のため 3 時間、37.0°C、5.0%の CO₂ インキュベータ内に静置した。細胞のチャンネル壁面への接着を確認した後、37.0°C、5.0%の CO₂ インキュベータ内で、入口と出口の圧力差を利用して培養液を還流させ、培養中連続してせん断応力を細胞に負荷した。インキュベータ内が密閉空間であるために電

源を必要とするシリジポンプなどを使用することができず、長時間培地を還流する必要があるため、落差法を用いた。なお、流入口と流出口の水位差を与えてマイクロ流路内に純水を流し、電子天秤を用いて計測した質量から流量を求めることにより、検定を行った。

20倍(N.A.=0.40)の位相差対物レンズと1004×1002画素、14bitの高感度カメラを取り付けた倒立型位相差顕微鏡を用いて、マイクロ流路内の内皮細胞を撮影した。撮影領域は、402μm×401μmであり、流路下部のガラス面に焦点を合わせて、細胞画像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトImage Jを用いて、Shape Index および配向角を求めた。Shape Index(SI)は、

$$\text{Shape Index} = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (2)$$

で定義される。ここで、Aは細胞の面積、Pは細胞の周囲長である。配向角は、最適楕円の長軸と流れ方向のなす角とし、時計周りを正とした。

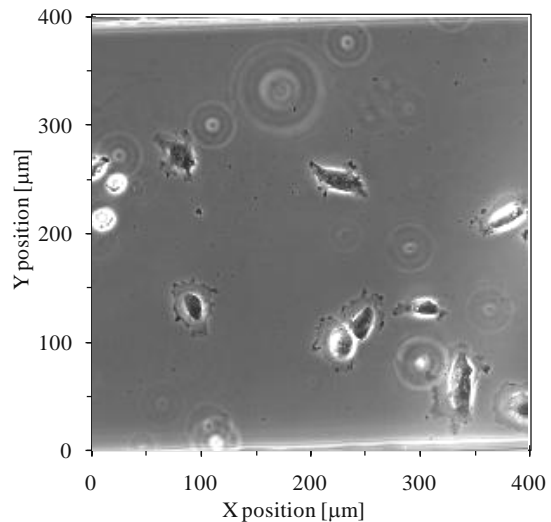
本研究では、細胞にフィッティングした最適楕円の面積および周囲長からSIを求めた。マイクロ流路内の各培養時間および静置培養の細胞画像から、流路壁面近傍の細胞と分裂中の細胞を除いた86から121個の細胞を抽出し解析を行った。得られたSIについて、スチューデントt検定を行った。

4. 研究成果

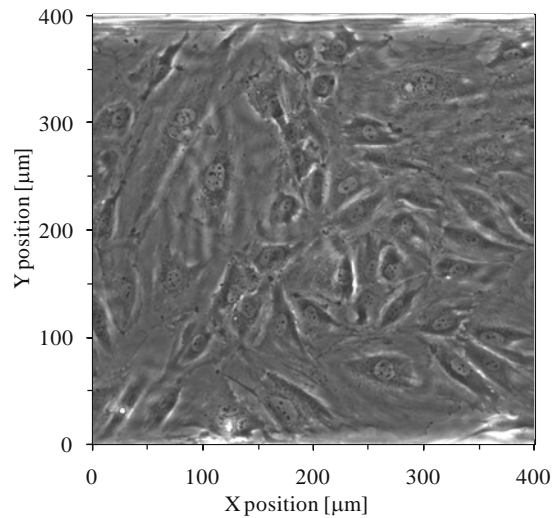
Fig.2(a)に細胞を導入後3時間の流路内の様子を示す。y=0と400μmが流路壁面であり、培地は落差法を用いて、細胞に0.1Paのせん断応力が負荷されるように、右から左へ流した。細胞が底面に接着しており、丸みを帯びて広がっている。大きさは40μm程度であり、導入直後と比較して2.5倍程度の大きさになっている。細胞密度は、 $0.46 \times 10^2 \text{ cells/mm}^2$ であった。細胞の接着率が低い原因として、流れにより細胞が剥がれたためと考えられる。Fig.2(b)に培養開始から154時間後の細胞画像を示す。細胞の大きさは、100-150μm程度の細長い形状や丸みを帯びた形状である。130時間後の細胞密度とほとんど変化が見られず、コンフルエントとなった。

Fig.3にマイクロ流路内でせん断応力を負荷しながら培養した内皮細胞の増殖曲線を示す。コントロールとして同様にマトリゲルでコーティングした直径35mmのディッシュにより静置培養した結果を用いた。0時間の値は、細胞を捲いた密度であり、3時間後から接着し増殖した細胞の密度である。0.1, 1.0Paのせん断応力の負荷をかけながらマイクロ流路内で培養した場合には、細胞の接着

率はそれぞれ46.8, 91.6%となった。0.1Paのせん断応力を負荷しながら培養した細胞では、154時間後に $2.07 \times 10^2 \text{ cells/mm}^2$ と、コンフルエントになった。1.0Paのせん断応力を負荷しながら培養した細胞では、64時間後に気泡の混入により細胞が死滅した。しかしながら、細胞の接着と増殖が確認できており、コンフルエントまで培養が可能と思われる。一方、静置培養した内皮細胞は、播種後116時間後にコンフルエントになり、細胞密度は $2.49 \times 10^2 \text{ cells/mm}^2$ と0.1Paのせん断応力を負荷したものより大きな細胞密度となった。



(a) 3 hours



(b) 154 hours

Fig.2 Endothelial cells cultured in microchannel

Fig.4に、式(2)の細胞のSIと面積を示す。細胞の接着直後は、せん断応力を負荷しておらず、SIは 0.98 ± 0.02 と円形に近い値を示し、面積も $0.84 \pm 0.45 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ と最小値を示した。培養が進むに連れて、SIが減少し、

面積が増加した。これは、細胞が細長く伸長し、薄く広がったためと考えられる。60時間付近でSIが最小で面積が最大となり、その後SIは増加し、面積は減少した。コンフルエント時では、SIが 0.81 ± 0.15 、面積が $2.37 \pm 1.37 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ となった。

Fig.5に細胞の配向角を示す。接着直後は、 -0.41 ± 50.3 度と平均値がほぼ0度であり、標準偏差が大きい。培養が進むに連れて、標準偏差が減少しFig.4と同様に60時間程度で 3.75 ± 21.9 度と最小となり、その後再び増加した。培養開始後60時間までは、細胞が流れ方向に配向し、細胞が増加するに連れて、流れ方向への配向が解消されたことがわかった。

Fig.6に0.1Paのせん断応力を負荷して培養したコンフルエントになった場合と静置培養した場合との比較を示す。静置培養およびせん断応力を負荷して培養した細胞のSIは、それぞれ 0.85 ± 0.11 、 0.81 ± 0.15 であり、せん断応力を負荷して培養した細胞が有意に($p < 0.05$)伸長している。また、静置培養およびせん断応力を負荷して培養した細胞の面積は、それぞれ $1.43 \pm 0.53 \times 10^3$ 、 $2.36 \pm 1.37 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ と、せん断応力を負荷して培養した細胞が有意に($p < 0.05$)広がっている。

マイクロ流路内で血管内皮細胞の培養方法を検討し、流れによるせん断応力を負荷しながらコンフルエントにまで培養が可能となった。細胞密度が小さい増殖期では、細胞の伸長と配向が見られた。細胞密度が増加するにつれて、伸長が減少し配向が解消された。

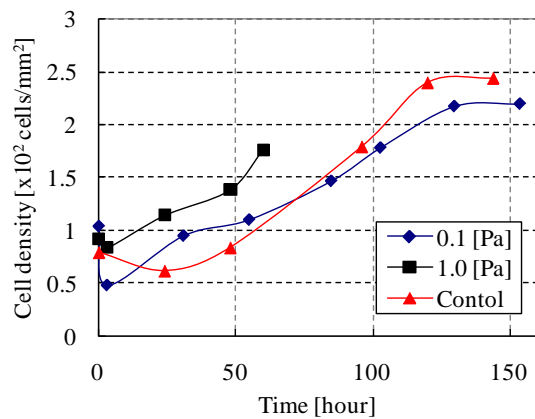


Fig. 3 Growth curves of ECs cultured in microchannel

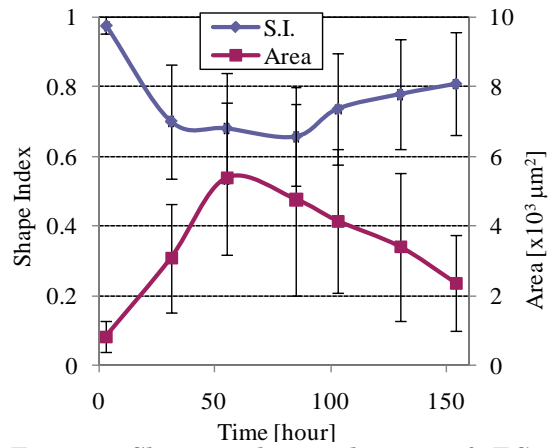


Fig. 4 Shape index and area of ECs cultured in microchannel with shear stress 0.1 Pa

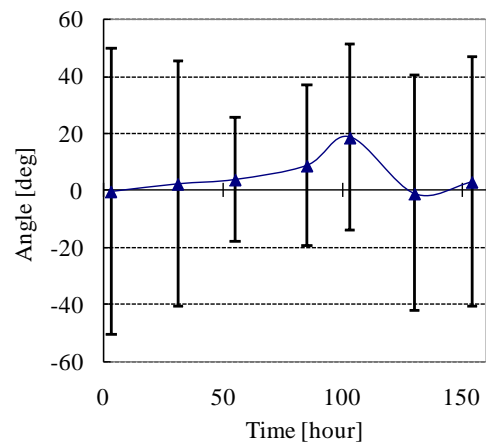
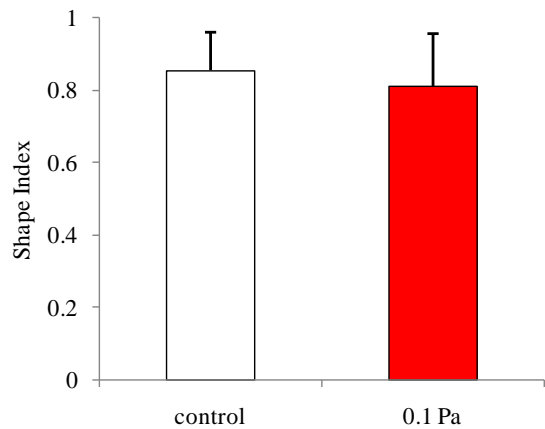
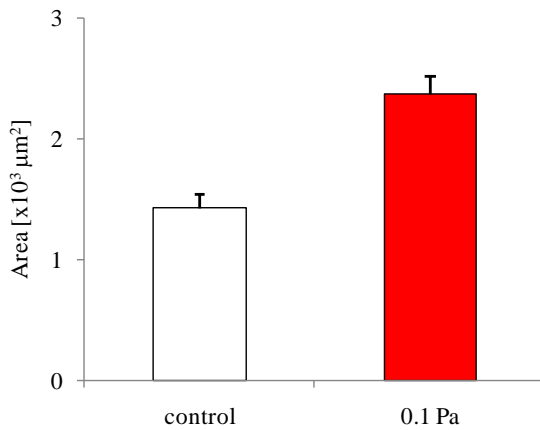


Fig. 5 Angle of ECs orientation cultured with shear stress 0.1 Pa and without shear stress



(a) Shape index



(b) Area

Fig. 6 Shape index and area of ECs cultured with shear stress 0.1 Pa and without shear stress

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 7 件)

(1)Tanaka Y, Kikukawa Y, Sato K, Sugii Y, Kitamori T, GLASS MICROCHIP-BASED BIOASSAY SYSTEM USING HUMAN ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS, The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, (micro-TAS2007), Paris, France, 2007, 査読有

(2)Segawa N, Sugii Y, In Vitro Experiments of Blood Flow in Microchip Cultured Endothelial Cells, Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, Tokyo, Japan, 2007, 査読有

(3)Segawa N, Sugii Y, Velocity Measurement of in Vitro Blood Flow in Microchip Cultured Endothelial Cells, The first ASME Micro/Nanoscale Heat Transfer International Conference (MNHT08), Tainan, Taiwan, MNHT2008-52250, 2008, 査読有

(4)Sugii Y, Segawa N, Measurement of Shear Stress on Surface of Endothelial Cells Cultured in Microchip, Proc. 14th Int. Symp. Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics, Lisbon, Portugal, 2008, 査読有

(5)杉井 康彦, 工学院大学 総合研究所年報, 第 15 号, 2008, 193-197, 査読無

(6)Sugii Y, Segawa N, Measurement of Morphological Responses of Endothelial Cells Cultured in Microchannel by Fluid Shear Stress, 4th Asian Pacific Conference on Biomechanics, Christchurch, New Zealand, 238-239, 2009, 査読有

(7)杉井 康彦, 工学院大学 総合研究所年

報, 第 16 号, 2009, 査読無

[学会発表] (計 4 件)

(1)田中 陽, 菊川 雄司, 佐藤 香枝, 杉井 康彦, 北森 武彦, ガラスマイクロチップを用いた血管内皮細胞のバイオアッセイ, 第 68 回分析化学討論会, F 1024, 2007, 宇都宮大学

(2)瀬川 直樹, 杉井 康彦, 内皮細胞を用いた疑似血管デバイス内の速度場計測, 可視化情報学会 全国講演会 (岐阜 2007), 2007, 岐阜大学

(3)瀬川 直樹, 杉井 康彦, マイクロ流路内で培養した内皮細胞の表面近傍の速度場計測, 日本機械学会第 20 回 バイオエンジニアリング講演会, 103, 2008, 芝浦工業大学

(4)杉井 康彦, マイクロ流路内で培養した内皮細胞周りの流動の可視化計測, 可視化情報学会 第 13 回マイクロフロービジュアルゼーション研究会, 2008, 那覇市

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉井 康彦

工学院大学・総合研究所・准教授

90345108

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し