

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560183

研究課題名(和文) 傾斜遠心顕微鏡を用いた血管表面の凹凸が好中球の挙動に与える影響に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental observation of surface morphology of endothelium on motion of neutrophils using inclined centrifuge microscope

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、傾斜遠心顕微鏡を用いて、一定押し付け力の下でガラス平板に培養したHUVEC上を移動する好中球様細胞に分化したHL60の挙動を解析した。HL60は、押し付け力によって核のある中央が膨らんだHUVECの辺縁部を通ることが確認された。Pセレクトリンは内皮細胞辺縁部に発現することから、血管内皮表面の凹凸は血球と内皮細胞の接着に寄与すると考えられる。また、剪断応力の負荷により配向したHUVEC上ではより直線的に移動するが、平均移動速度に有意な差は見られなかった。未分化のHL60を用いた場合には有意な速度の上昇が見られたことから、平均移動速度に関してはHUVECとの接着性が支配的であると言える。

研究成果の概要(英文)：Motion of neutrophil-like HL60 cells under a pressing force on HUVECs cultured on a flat glass plate was observed using the inclined centrifuge microscope. It was observed that the cells move along marginal regions of convex HUVECs. This suggests that the surface morphology of endothelium enhances possibility of adhesion between neutrophils and the endothelium because P-selectin which is necessary for neutrophils' rolling is extensively expressed on the marginal region of the endothelial cells. The HL60 cells move more straight on oriented HUVECs which had been exposed to a shear stress than on non-oriented HUVECs, but their mean velocity was not changed with the orientation. Since the mean velocity of undifferentiated HL60 cells increased on the oriented HUVECs, adhesivity of the differentiated HL60 cells to the HUVECs is considered to be a dominant factor to regulate the mean velocity.

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：HL-60 傾斜遠心顕微鏡 MPCポリマー HUVEC ローリング

1. 研究開始当初の背景

白血球は赤血球と対照的に血管壁に付着しやすいという特徴をもつ。とくに、細静脈において、赤血球が血管中央に凝集して流れる集軸効果のために、白血球は血管壁方向に押し出される。これまで白血球と血管壁との相互作用に関する研究は、血球と血管内皮細胞との接着分子に着目したものがほとんどで、力学的作用が与える影響は考慮されてこなかった。内皮細胞は核を有するために血管内腔表面は凹凸があると考えられる。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、白血球の中で最も主要な細胞である好中球を例に採り、申請者所属研究室で独自に開発した傾斜遠心顕微鏡を用いて、ガラス平板上に培養した血管内皮細胞の凹凸および配向が血球の挙動に与える影響を解析してきた。しかし、これまでの結果では、内皮細胞の凹凸の影響と接着分子の影響を完全に分離することができなかった。そこで、本研究では、これらの影響を分離し、力学的作用の影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

申請者のこれまでの実験では、好中球様細胞に分化していない未分化の状態の HL60 を用いてきた。これは、好中球と比較して機械的特性や表面性状が異なるため、まず、HL60 の分化がその挙動に与える影響を明らかにする必要がある。そのため、ATRA で分化した HL60 と未分化の細胞を用い、ガラス平板上における挙動を比較する。ここで、タンパクや細胞の粘着の阻害効果をもつ MPC ポリマーをガラス平板に塗布し、未処理のガラス平板上における挙動との比較から接着分子の影響とその他を分離した基本的特性を得る。なお、ここではガラス平板に対する付着率、細胞の平均移動速度に加えて、個々の細胞の挙動を比較する。

次に、ガラス平板に正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を培養し、その上における HL60 の挙動を解析する。ここで、生体内において、血管内皮細胞は血流による剪断応力刺激に曝されており、流れ方向に配向することが知られている。そこで、HUVEC に 24 時間 2Pa の剪断応力負荷を与えて配向させた HUVEC と配向していない HUVEC を用い、その上における HL60 の挙動を解析する。なお、ここでは、HUVEC に対する付着率、細胞の平均移動速度に加えて、個々の細胞の瞬間移動速度ベクトルの分布を比較する。

以上の計測を行うにあたり、過去の研究を参考に HL60 の各種基板に対する押し付け力 F_N を 47pN で固定し、駆動力 F_T を 10~50pN で変化させた。なお、 F_N は、細静脈において軸集中した赤血球からの血管壁への押し付け力に対応する。

4. 研究成果

傾斜遠心顕微鏡を用いて HL60 のローリング特性に与える分化の影響を解析するにあたり、まず、未処理のガラス平板と MPC ポリマーをコーティングしたガラス平板を用い、基板への付着率および平均移動速度を計測した。その結果、HL60 の分化は主に付着率に影響し、移動速度には大きな影響を与えないことが明らかになった。また、未処理のガラス平板上では所謂 stick-slip 運動 (Fig. 1) が確認され、分化した HL-60 の方が stick 状態の頻度が高いことから、免疫反応における血管内皮細胞上での HL60 の減速は stick 状態の頻度上昇に起因すると推察された。

次に、HUVEC を静置培養したガラス平板と HUVEC を配向させたガラス平板を用いてその上を移動する HL60 の瞬間移動速度ベクトルの角度の分散を比較した。その結果、配向した基板の方が分散が小さいが、両基板において、分化した HL60 の方が分散が大きいことが確認された。これは、未分化の HL60 の方がより直線的に移動することを表している。また、未分化の HL60 では配向によって平均移動速度が有意に変化するのに対し、分化した細胞では配向による差は見られなかった。HL60 は F_N の寄与によって HUVEC 間の谷間を移動するうえに (Fig. 2)、好中球のローリングに寄与する内皮細胞上の P セレクチンは細胞辺縁部に発現することから、分化した HL60 の平均移動速度に対しては HUVEC との接着性

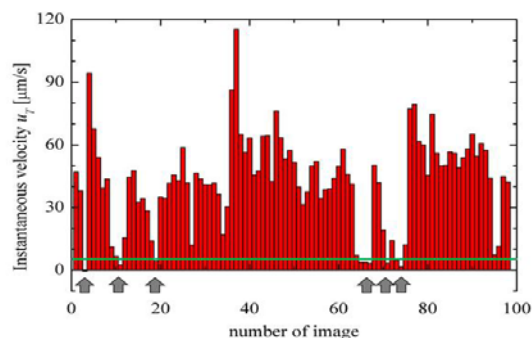


Fig. 1 Stick-slip motion of a HL60 cell on a flat glass plate.

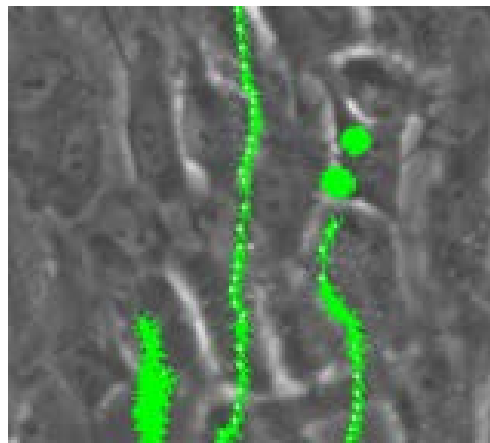


Fig. 2 Trajectories of HL60 cells on HUVEC cultured on a glass plate.

が支配的要因となるといえる。また、配向に伴う HUVEC 表面形状に起因する抵抗の減少と、HL60 の分化に伴う HUVEC との接着能の増加に起因する抵抗の増加がほぼ同程度であるといえる。ただし、未分化の HL60 でも付着率が 90%以上と著しく高く、接着能の変化を定量的に評価するには至らなかった。

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 2 件)

1. Shirai, A., Masuda, S., Numerical simulation of passage of neutrophil through a rectangular channel with a moderate constriction, PLoS ONE, 査読有, Vol. 8, 2013 年, e59416.
DOI: 10.1371/journal.pone.0059416
2. Shirai, A., Sato, H., Hayase, T., Motion of fMLP-stimulated HL60 cells on HUVEC cultured on a flat glass plate, Surface Modification Technologies, 査読有, Vol. 26, 2013 年, pp. 83-91.

[学会発表] (計 12 件)

1. Shirai, A., Sugiyama, Y., Fundamental characteristics of motion of neutrophil-like HL-60 cells on glass plate, 2014 ElyT lab Workshop, 2014 年 2 月 20 日, フランス Frejus
2. 白井敦, 傾斜遠心顕微鏡を用いた血球と固体壁との力学的相互作用の計測, 第 98 回岡山県医用工学研究会, 招待講演, 2014 年 2 月 12 日, 岡山大学
3. 杉山佳郎, 白井敦, HL-60 の分化がガラス基板への付着性に与える影響, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 2014 年 1 月 12 日, 東北大学
4. Sugiyama, Y., Shirai, A., Influence of differentiation of HL-60 cells on their motion on a flat glass plate, 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013 年 12 月 6 日, シンガポール National University of Singapore
5. 白井敦, 微小血管における好中球の挙動, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 招待講演, 2013 年 9 月 11 日, 岡山大学
6. 杉山佳郎, 白井敦, 早瀬敏幸, ガラス平板上における HL60 の挙動に与える分化の影響に関する傾斜遠心顕微鏡を用いた実験的研究, 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 2013 年 1 月 10 日, 産業技術総合研究所つくばセンター
7. Shirai, A., Uranuma, H., Hayase, T., Influence of pressing force on motion of HL60 cells on HUVEC substrates, 18th

Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2012), 2012 年 7 月 4 日, ポルトガル, リスボン工科大学, S41

8. Shirai, A., Sato, H., Hayase, T., Motion of fMLP-stimulated HL60 cells on HUVEC cultured on a flat glass plate, Surface Modification Technologies XXVI (SMT26), 2012 年 6 月 20 日, フランス Lyon
9. Shirai, A., Uranuma, H., Hayase, T., Behavior of HL60 cells on a HUVEC substrate under inclined centrifugal forces, 2012 Annual ElyT Workshop, 2012 年 3 月 12 日, フランス Presqu' ile de Giens
10. 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の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, 2012 年 1 月 8 日, 大阪大学
11. 白井敦, 浦沼晴香, 早瀬敏幸, HUVEC 基板上を移動する HL60 に対する押し付け力の影響, 日本機械学会第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012 年 1 月 8 日, 大阪大学
12. 佐藤博紀, 白井敦, 早瀬敏幸, ガラス平板上における HL60 の挙動に与える fMLP 刺激の影響に関する傾斜遠心顕微鏡を用いた実験的研究, 日本機械学会第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012 年 1 月 8 日, 大阪大学

[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：