

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656175

研究課題名(和文) 衝撃圧力による細胞間接着タンパク質の発現低下が引き起こす組織崩壊のメカニズム解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of tissue disruption induced by decreased expression of cell-cell adhesion proteins

研究代表者

青村 茂 (AOMURA, Shigeru)

首都大学東京・システムデザイン研究科・教授

研究者番号：20281248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：頭部の強打により発症する脳挫傷では、頭蓋内の急激な圧力変動が出血原因の一つである。本研究では、衝撃圧力による脳毛細血管の細胞間結合力が低下し、その結果、液体保持機能が失われる過程を観察した。

培養血管内皮細胞をチューブ状に立体培養し、毛細血管床を模したチューブ網に衝撃圧力を負荷した結果、チューブ構造が崩壊し、時間依存的にチューブ網が減少した。また、細胞間結合の1つである密着結合の機能的変化を知るために、平面培養した内皮細胞に衝撃圧力を負荷し、径内皮電気抵抗値(TEER)を測定した。その結果、振幅がより大きく、持続時間がより短い圧力が血管内皮透過性をより亢進させることを示した。

研究成果の概要(英文)：Intracranial pressure changes during head impact cause brain injuries such as vasogenic edema and cerebral contusion. Human umbilical vein endothelial cells were subjected to positive and negative pressure, and the transendothelial electrical resistance (TEER) was measured between 15 min and 24 h after pressure loading for quantifying the formation of an integral monolayer of endothelial cells. TEER decreased considerably at 15 min and 6 h post-loading, with these changes being significant in positive pressure with larger amplitude and shorter duration and in all types of negative pressures compared to pre-loading. The changes in intracranial pressure during head impact impair endothelial barrier function by the disruption of the integrity of endothelial cell-cell junctions, and the degree of increase in endothelial permeability depends on the amplitude, duration, and direction (compressive and tensile) of the impulsive pressure.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：毛細血管 細胞間接着タンパク質 衝撃圧力 組織崩壊 脳内点状出血

## 1. 研究開始当初の背景

頭部の強打により発症する脳挫傷では、頭蓋内の急激な圧力変動が出血の原因であることが明らかにされているが、圧力変動により何故血管が損傷し、時間経過と共に出血の範囲が広がるのかは解明されていない。MRI による画像所見においては、頭部外傷の初期に毛細血管の破損により生じる微小出血（点状出血）が脳内全域に観察される。軽症例では微小出血に留まるが、重症例では点状出血の集合として広範囲の脳内血腫に至る。これまでに、毛細血管を構成する血管内皮細胞を培養し、衝撃圧力を負荷した結果、細胞間接着タンパク質の広範囲に渡る消失を観察した。本研究では、衝撃圧力による毛細血管の細胞間結合力が低下し、その結果、液体保持機能が失われる過程を観察し、脳挫傷における漏出性出血のメカニズム解明の手がかりとする。

## 2. 研究の目的

内皮細胞が直接損傷するよりも、より小さい衝撃圧力で細胞接着膜タンパク質の発現が低下して接着能力を失い、内皮細胞間の結合力が低下することで、細胞が血管組織を構成できなくなり血管の液体保持機能が失われる過程を、以下の2つの実験により立証する。

### 実験 1：毛細血管の組織崩壊

毛細血管は血管内皮細胞一層から構成され、内皮細胞同士の結合力が低下することにより毛細血管構造の崩壊を引き起こすと考えられる。チューブ状に立体培養した血管内皮細胞に衝撃圧力を負荷した際に、局部的にチューブ構造が破壊されるのではなく、チューブ網全体に渡り組織崩壊することを明らかにする。

### 実験 2：内皮細胞間結合力の低下

細胞間結合の1つである密着結合の機能的変化を知るために、平面培養した内皮細胞に衝撃圧力を負荷し、内皮細胞層の電気抵抗値を測定する。密着結合の強い細胞層は高い電気抵抗値を示すため、衝撃圧力により電気抵抗値が減少していることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 衝撃圧力負荷装置

本研究では、振幅や持続時間の異なる衝撃圧力を血管内皮細胞へ負荷するための装置を開発した(図1)。本装置は振り子を用いてピストンを駆動させ、シリンダー内に衝撃圧力を発生させる機構となっている。シリンダ

ー内に生じた衝撃圧力は水を伝搬することでチャンバー内に設置された細胞へと負荷される。この機構を用いることで細胞へのひずみ負荷を最小限に抑え、衝撃圧力負荷による影響を調査することが可能である。

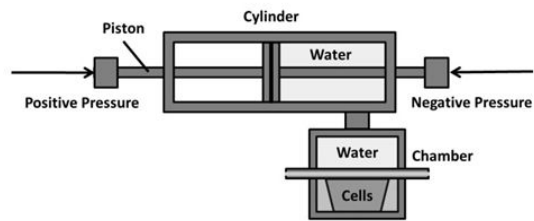


図1 衝撃圧力負荷装置

### 実験 1：衝撃圧力が毛細血管様構造に及ぼす影響

HUVEC(ヒト型臍帯静脈血管内皮細胞)を、基底膜基質であるマトリゲル上に播種し、チューブ構造を形成する。20,000cells/cm<sup>2</sup>で播種、24時間以内に図1に示す衝撃圧力(振幅200,300,400kPa,持続時間約15ms)を負荷し、負荷24時間後にカルセインAMで細胞を染色した。蛍光顕微鏡を用いて撮影を行い、画像内のチューブ網の面積割合(血管密度)を計算した。

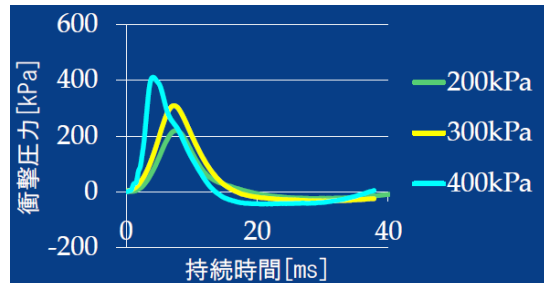


図2 衝撃圧力波形（実験1）

### 実験 2：衝撃圧力が経内皮電気抵抗値 (TEER) に及ぼす影響

TEER 値測定は衝撃圧力負荷前及び直後、負荷1,3,6,24,48時間後に行った。ラットのコラーゲンコーティングが施されたpore直径0.45μmの6wellセルカルチャーインサートにHUVECを4.4×10<sup>5</sup> cells/wellの密度で播種し、24時間以内に実験を行った。本実験では、6種類の波形A(振幅350kPa,持続時間20ms),B(70kPa,20ms),C(70kPa,40ms),D(-70kPa,40ms),E(-70kPa,100ms),F(-90kPa,100ms)を採用した(図2)。

## 4. 研究成果

実験 1：衝撃圧力負荷による毛細血管構造の経時的な崩壊

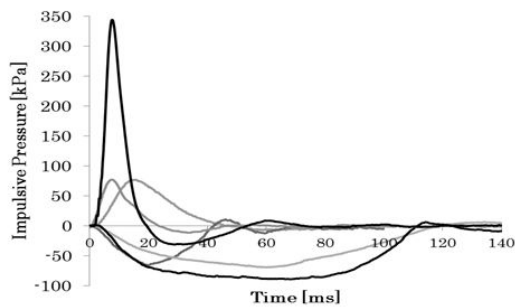


図 3 衝撃圧力波形（実験 2）

衝撃圧力負荷後、経時的に血管密度が減少した（図 4）。負荷 24 時間後では 300, 400 kPa においてコントロールと比較して有意に減少した（図 5, 6）。よって毛細血管が崩壊する閾値は 200–300 kPa に存在すると考えられる。

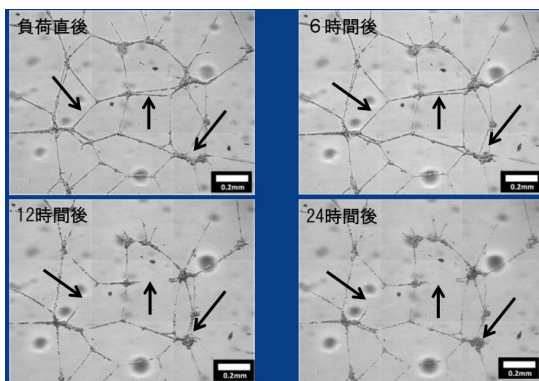


図 4 位相差顕微鏡観察による血管内皮チューブ網の経時的な崩壊

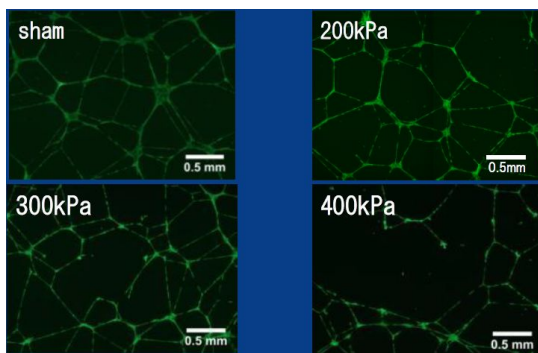


図 5 蛍光顕微鏡観察による衝撃圧力負荷 24 時間後の血管内皮チューブ網

実験 2：衝撃圧力負荷による血管内皮透過性の亢進

衝撃圧力負荷後のほぼ全ての測定時間において振幅の大きい A, F の TEER に最大 15% の減少が認められた。同じ振幅をもつ B と C および D と E では、持続時間が短い B および D において減少率が大きかった。振幅と持続時間が同様の C と D では、全ての測定時間において引張圧力 D の減少率が圧縮圧力 C より大きかった（図 7）。振幅がより大きく、持続時間がより短い圧力が血管内皮透過性をより亢進させることを示した。

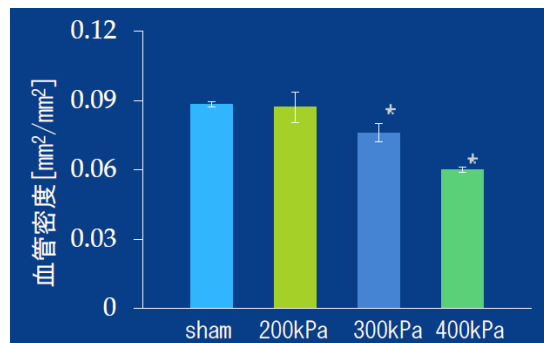


図 6 衝撃圧力負荷 24 時間後における血管密度の比較

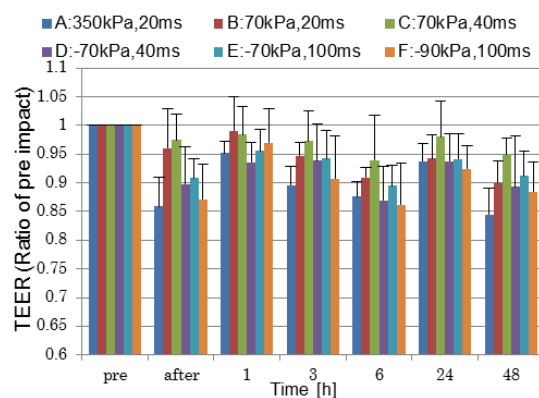


図 7 衝撃圧力負荷後の TEER の変化

## 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)

Nakadate, H., Inuzuka, K., Akanuma, S., Kakuta, A. and Aomura, S., Effect of amplitude and duration of impulsive pressure on endothelial permeability in in vitro fluid percussion trauma, BioMedical Engineering OnLine, Vol.13, No.1, 44(13pages), doi:10.1186/1475-925X-13-44, April 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

大津英理子, 青村茂, 中楯浩康, 角田陽, 衝撃圧力が管腔形成された血管内皮細胞に与える影響, 日本機械学会関東支部第 20 期総会・講演会, 2014 年 3 月 14 日, 東京農工大学

川股理紗, 青村茂, 中楯浩康, in vitro BBB モデルにおける衝撃圧力負荷後の経内皮電気抵抗値測定, 第 24 回バイオフロンティア講演会, 2013 年 11 月 1 日, 同志社大学

犬塚功士, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃圧力の振幅及び持続時間が血管内皮透過性に与える影響, 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 9 日, (独)産業技術総合研究所 つくばセンター, バイオエンジニアリング講演会講演論文集, Vol.25, pp.445-446.

Nakadate, H., Akanuma, S., Aomura, S., and Kakuta A., Impact pressure increases permeability of cultured human endothelial cells, ASME 2012 Summer Bioengineering Conference, SBC2012-80, 20-23 June 2012, Fajardo, Puerto Rico.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

青村 茂 (AOMURA SHIGERU)  
首都大学東京・システムデザイン研究科・教授  
研究者番号：20281248

(2)研究分担者

藤原 敏 (HUJIWARA SATOSHI)  
横浜市立大学・生体防御医学研究所・教授  
研究者番号：20173487

角田 陽 (KAKUTA AKIRA)  
東京工業高等専門学校・その他部局等・准教授  
研究者番号：60224359

中楯 浩康 (NAKADATE HIROMICHI)  
首都大学東京・システムデザイン研究科・助教  
研究者番号：22604991