

剥離流れ場における培養内皮細胞の高分子輸送制御

Control of Macromolecule Transport through Cultured Endothelial Cells in Separated Flow

研究代表者 芝浦工業大学工学部機械工学科 講師 工藤 奨
Department of Mechanical Engineering, Shibaura Institute of Technology
Susumu KUDO

The purpose of this study is to reveal the albumin uptake into endothelial cells in the separated flow area. After 24 hr of exposure to flow induced in a back step flow channel, the endothelial cells were incubated in 37°C for 60 minutes in PBS containing tetramethylrhodamine isothiocyanate conjugated albumin (TRITC-albumin). Thereafter, the albumin uptake were observed by a confocal laser scanning microscope (CLSM). In low-shear-stress and high-shear-stress gradient areas (reattachment areas), the amount of albumin uptake into the cells was the largest in all areas. These data indicate that shear stress and shear stress gradient affect the endothelial cell morphology and the albumin uptake into endothelial cells.

1. 研究目的

アテローム性動脈硬化症は、血管壁へ脂質等の高分子が沈着する事から進行する疾病であり、大動脈曲がり部内側や分岐部側壁に好発することが知られている。その様な部位では血流は二次流れや逆流が生じ複雑な流れとなっており、平均壁せん断応力(流体の壁面での摩擦力)は低い。血管内皮細胞は血管内面を覆い血液と血管壁との界面に存在している細胞であり、常に血流による壁せん断応力の影響を受け、血管調節や界面での物質輸送調節をおこなっていると考えられている。言い換えると、アテローム性動脈硬化症の進行には内皮細胞の機能変化が重要であり、特にアテローム性動脈硬化症が局在性(大動脈曲がり部内側や分岐部側壁)をもつことから、壁せん断応力と内皮細胞の物質輸送能との関係が重要であると考

えられる。

本研究では、実際の生体内の流れを反映する第一段階として2枚の平行平板の間に段差を設け、その間に流体を流し段差後流で剥離流れをつくり、この剥離流れの特徴的な領域(逆流域や再付着点)において内皮細胞の物質輸送能変化に関して調べることを目的とする。さらに、壁せん断応力がどのようなメカニズムで内皮細胞の物質輸送を制御しているかを把握し、内皮細胞がどのように壁せん断応力を感知し情報伝達するかを把握するため、壁せん断応力を負荷した際の培養内皮細胞内カルシウムイオン濃度の変化を調べることを目的とする。

2. 研究経過

2.1. 方法

2.1.1. 剥離流れ場での高分子取り込み

内皮細胞はウシ大動脈由来内皮細胞を

使用した。高分子取り込みの実験には継代数6から9代目までの細胞をカバーガラス (35×55 mm) 上に播種して用いた。実験の手順として、厚さ0.25 mmの段差を持つシリコンシート(全体の厚み0.55 mm)をポリカーボネート板とカバーガラス上に培養した内皮細胞とではさみ、その間にウシ胎児血清を10%添加した培養液 (Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), GIBCO)を24時間流した。流れは段差後流の十分下流で20 dyn/cm²となるように設定した。24時間せん断応力を負荷した細胞をTetramethylrhodamine conjugated albumin (Molecular Probes)を溶解したPBSで60分間インキュベートをおこなった後、それらをPBSで3回洗浄し、パラホルムアルデヒド(2%)で30分間固定した。その後、スぺーサを置いたスライドガラス上にPBSと共に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1000, Bio Rad) で観測した。測定点は流路の断面図に示す4領域(A: 淀み域, B: 逆流域, C: 再付着域, D: 発達域)で測定した(Fig. 1)。

2.1.2. 定常流における細胞内Ca²⁺の測定

内皮細胞はウシ大動脈由来内皮細胞(大日本製薬)を使用し、実験には継代数6から9代目までの細胞をφ 27のカバーガラス (IWAKI) 上に播種して用いた。真空ポンプで吸引するための溝を設けたポリカーボネート製フローチャンバとカバーガラス上に培養した内皮細胞とでシリコンシートをはさみ、その間にウシ胎児血清10%を添加した培養液 (Dulbeccos Modified

Eagle Medium (DMEM), GIBCO)を流した。培養液はローラーポンプによりヘッドタンクに送り、リザーバタンクとの静水圧差により内皮細胞に20 dyn/cm²の壁せん断応力を負荷した。また、回路中の培養液のpHを一定に保つため5% CO₂-95% Air Balanceの湿潤ガスをリザーバタンクおよびヘッドタンクに通気した。壁せん断応力を負荷する時間は0, 6, 24時間の3条件でおこなった。

Ca²⁺の測定にはCalcium Green-1/AM (Molecular Probes)を使用し、10%の血清を含むDMEMに4 mMで溶解した後、40分間インキュベートをおこなった。その後、HEPES buffered saline (HBS)で3回洗浄し、細胞内でCalcium Green-1/AM からAM体が切り離されるのを待ち、実験をおこなった。

細胞内のCa²⁺濃度の測定には、共焦点レーザー顕微鏡(MRC-1000, Bio-Rad)を使用した。3秒間隔で計100枚(5分間)の画像をコンピュータに取り込み、NIH-imageで解析をおこなった。

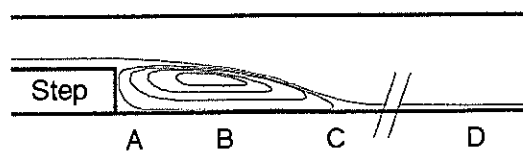


Fig. 1 Schema of experimental flow patterns in separated flow. A: stagnant flow region, B: reversal flow region, C: reattachment flow region, D: fully developed flow region

2.2. 結果および考察

2.2.1. 剥離流れ場での高分子取り込み

24時間せん断応力負荷後の各領域でのアルブミン取り込みを定量化した結果をFig. 2に示す。各値は領域Dの平均値を100として正規化した。各領域での平均値は領域A, B, C, D及び流れ無しの条件で、それぞれ142, 87, 175, 100, 124となり、領域Aと流れ無しの組み合わせ、及び領域Bと領域Dの組み合わせを除いた他の組み合わせすべてにおいて有意な差が見られた。平均

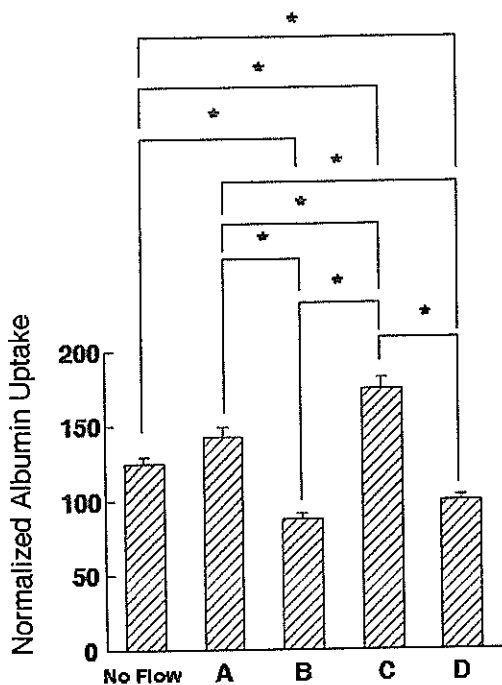


Fig. 2 Total albumin uptake into cultured endothelial cells in each area. Mean \pm S. E. (* $p < 0.05$)

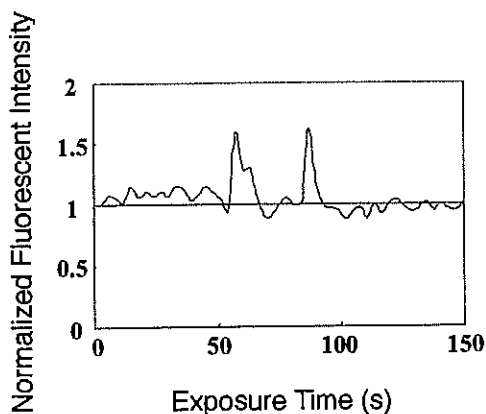


Fig. 3 Ca^{2+} Response in a endothelial cell subjected to shear stress

せん断応力が高い領域B, Dにおいては取り込みが少なく、平均せん断応力が低い領域A, Cでは取り込みが多かった。また、領域Aと比較してせん断応力勾配が高い領域Cで有意に取り込みが多かった。

2.2.2. 定常流における細胞内 Ca^{2+} 応答

Fig. 3に壁せん断応力を負荷した際の単一細胞内での Ca^{2+} 変動の一例を示した。5分間の Ca^{2+} の蛍光強度の平均値を1とし各時刻での蛍光強度を規格化した。内皮細胞は壁せん断応力が負荷されるとFig. 3に示すように急激な細胞内での Ca^{2+} 濃度上昇(Ca^{2+} Spike)が見られた。この様に Ca^{2+} 濃度上昇をおこした細胞数を計測した(Fig. 4)。壁せん断応力負荷した直後では内皮細胞は全体の細胞数の約30%が反応したが、時間経過とともにその反応数は減少し、24時間後では約5%まで減少し、細胞内の情報伝達が減少した。

3. 研究成果

本研究では剥離流れ場の発達域に比べ再付着域においてアルブミンの取り込みが多かった。このことは、アテローム性動脈硬化症の初期病変である血管壁内での高分子物質の沈着が流れが複雑な部分で発生することと関係があると考えられた。また、発達域においては細胞の情報伝達がせん断応力の負荷時間とともに減少していく結果を得た。しかし、再付着域においての計測はおこなえなかったために、剥離流れ場において内皮細胞が壁せん断応力をどの様に感知し、情報の伝達がおこなわれているのかに関する十分な検討はおこなえなかった。

4. 今後の課題と発展

今後は、剥離流れ場の再付着域と発達域において細胞情報伝達物質である Ca^{2+} 濃度変化を測定し、 Ca^{2+} 濃度変化が発達

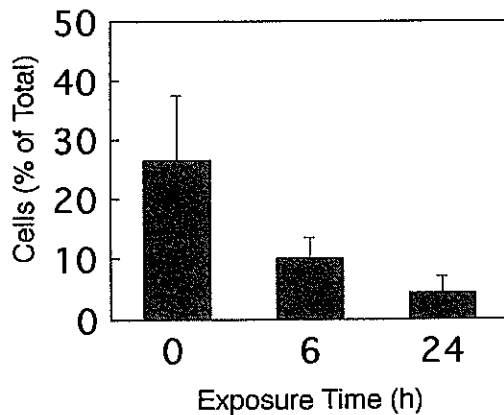


Fig. 4 Ca^{2+} Response in Cultured Endothelial Monolayers subjected to a 20 dyn/cm^2 steady shear stress

域と再付着域でどの様に異なっているかを把握する。次にミトコンドリアの膜電位と Ca^{2+} 濃度がどの様に関連しているかを発達域で測定する。ミトコンドリアの膜電位強度と Ca^{2+} 濃度は、共焦点レーザー顕微鏡の蛍光フィルタを組み合わせることで同時取得が可能であり、同一の細胞での情報伝達(Ca^{2+})とエネルギー生産(ミトコンドリア膜電位)との関係を把握することができる。最後に、剥離流れ場の再付着域および発達域でミトコンドリアの膜電位強度と Ca^{2+} 濃度を測定することで、剥離流れ場での細胞の情報伝達(Ca^{2+})とエネルギー生産(ミトコンドリア膜電位)との関係を把握し、エネルギー生産がどの様に変化するかを調べていく。

4. 発表論文リスト

1. Susumu Kudo, Ryuhei Yamaguchi, Masashi Sato, Kotaro Oka, and Kazuo Tanishita, Albumin Uptake into Endothelial Cells in Separated Flow, *ASME Winter Annual Meeting*, BED-Vol. 48, pp. 83-84 (2000).
2. 工藤奨, 白井英明, 細江薫, 山口隆平, 谷下一夫, 壁せん断応力負荷時における培養内皮細胞の Ca^{2+} 応答, 日本機械学会第13回バイオエンジニアリング講演会講演論文集No.00-35, pp.160-161(2001).
3. 佐藤正志, 大野研一, 瀬山茂樹, 工藤奨, 山口隆平, 剥離流れ場における培養内皮細胞の高分子取り込み, 日本機械学会第13回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 No.00-35, pp.186-187(2001).