

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K01381

研究課題名(和文) 浸透圧負荷に対する血管内皮細胞の応答のバイオメカニクス

研究課題名(英文) Biomechanical studies of the response of vascular endothelial cells to osmotic stress

研究代表者

宮崎 浩 (Miyazaki, Hiroshi)

藍野大学・医療保健学部・教授

研究者番号：00263228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞が静置あるいは流れせん断応力(2 Pa)が作用した状態で浸透圧負荷に対して示す応答を、細胞の体積、F-アクチン/ストレスファイバー構造、力学的特性の観点から調べた。高張環境は血管内皮細胞の内部構造に大きな影響を与えなかった。低張環境は細胞を膨張させ、ストレスファイバーを減少させるとともに細胞の弾性率を低下させるが、流れせん断応力は弾性率低下の程度を軽減する傾向がみられた。細胞数密度が低い場合には低張環境が細胞の構造と力学的特性に及ぼす影響が大きいことが示唆された。今後、浸透圧負荷が細胞機能に及ぼす影響も調べていく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、血管内皮細胞の力学的負荷に対する応答に浸透圧の影響という新たな知見を加え、細胞バイオメカニクスの分野に貢献するものである。さらに、血液の浸透圧変化を伴うような疾患の治療法について有用な情報となる可能性があるという意義がある。

研究成果の概要(英文)：The response of vascular endothelial cells to osmotic stress under static or flow condition was investigated in terms of cell volume, F-actin/stress fiber structure, and mechanical properties. The hypertonic environment had no significant effect on the internal structure of vascular endothelial cells. Hypotonic environments expanded cells, reduced central stress fibers, and decreased cell elastic modulus, but flow shear stress tended to reduce the degree of elastic modulus reduction. The effect of the hypotonic environment on cell structure and mechanical properties was greater at low cell number densities. The effects of osmotic stress on cell function should also be investigated in the future.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：浸透圧 内皮細胞 バイオメカニクス アクチンフィラメント 力学的特性

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は血管内腔面を単層に覆い、血液凝固の抑制と血栓の溶解、血管壁の物質透過性や収縮弛緩の調節などに重要な役割を果たしている。血管壁には血圧、心拍に伴う脈動による周期的引張り応力、血流による内壁せん断応力が作用しており、内皮細胞は常にこれらの力学的負荷を受けながら機能を発揮している。さらに、疾患や輸液等によって血液成分の変化が起こると内皮細胞には浸透圧も負荷される。血管内皮細胞は、力学的負荷の変化に応答して形態や内部構造、機能を変化させることが知られている。例えば、内皮細胞に流れせん断応力を負荷すると、一酸化窒素の産生量の増加など様々な機能的変化が起こる。さらに、内皮細胞は流れの方向と平行に配向するとともに、アクチンフィラメント (F-actin) を再構築してストレスファイバーを発達させ、細胞のスティフネスを増加させるなど、力学的負荷は内皮細胞の形態や内部構造と力学的特性も変化させる。また、動脈硬化の発症しやすい部位の内皮細胞は比較的軟らかいこと、内皮細胞がストレスファイバーを発達させて硬くなると動脈硬化発症が抑制されることが示唆されている。このように、内皮細胞の力学的特性と内部構造、機能と疾患には密接な関係があるため、内皮細胞の機能や性質を理解するうえで、力学的負荷が内皮細胞の力学的特性に及ぼす影響を調べることは非常に重要である。

細胞内外に浸透圧差が存在すると、水の出入りが起こって細胞が収縮あるいは膨張を起こすが、時間が経つと容積が元に戻っていくことが知られている。低張液に細胞を浸すと細胞は急速に膨張する。しかし、細胞内のイオン濃度を低下させることにより細胞内外の浸透圧差を小さくして徐々に容積を減少させる (調節性容積減少)。一方、細胞を高張液中に浸すと、浸透圧性収縮を起こした後に水を流入させて容積を増加させる (調節性容積増加)。このような細胞の容積調節機能は細胞の生存と機能維持に不可欠である。

浸透圧が細胞に及ぼす影響についての研究はいくつか行われており、例えば、Ehrlich ascites tumor cell を高張液 (600 mOsm) に浸すと F-アクチンの量が増加し、低張液 (160 mOsm) に浸すと F-アクチンの量が減少したと報告されている。さらに、関節軟骨細胞を低張液に浸すと細胞の粘性が有意に減少するが、高張液では有意な変化はみられなかったと報告されている。このように、細胞外液の浸透圧変化は細胞骨格や細胞の力学的特性に影響を及ぼすが、浸透圧負荷が血管内皮細胞の内部構造や力学的特性に及ぼす影響についてはほとんど調べられていない。しかし、内皮細胞が傷害を受けると様々な重大な疾患に結びつく。また、浸透圧負荷に対する細胞の容積調節には時間を要し、細胞の内部構造、力学的特性と機能との間には密接な関係があるため、この間に内皮細胞に生じる構造的、力学的変化を把握することは、バイオメカニクスの観点からのみならず、疾患の予防や疾患に対する対処の観点からも重要である。

2. 研究の目的

本研究は、高張液・低張液による浸透圧負荷が、血管内皮細胞の F-アクチン/ストレスファイバー構造および力学的特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 低張液・高張液が培養内皮細胞の F-アクチンに及ぼす影響

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) をガラスベースディッシュ上で 24 時間静置培養し、細胞核を蛍光染色した。ディッシュ内の培地を等張 (290 mOsmol/kg) のハックス平衡塩類溶液 (HBSS)、高張 HBSS (350 mOsmol/kg)、または低張 HBSS (230 mOsmol/kg) と入れ替えて 0~60 分間 37°C に保温した。細胞をホルマリン固定した後に F-アクチンを蛍光染色して共焦点レーザ顕微鏡で観察した。さらに、細胞を高密度培養した場合 (コンフルエント状態) と低密度培養した場合について、低張 HBSS (210 mOsmol/kg) に曝した HUVECs の F-アクチンの挙動を観察した。

(2) 低張液・高張液による流れ負荷が培養内皮細胞の F-アクチンに及ぼす影響

まず、培養細胞に流れせん断応力を負荷することのできる平行平板型流れ負荷装置を作製した。フローチャンバー、ローラーポンプ、リザーバー、チューブ回路等からなり、フローチャンバーを顕微鏡ステージ上に設置して流れ負荷中の細胞の観察が可能である。HUVECs を培地中で 24 時間静置培養した後に、作製した流れ負荷装置を用いて、この細胞に 37°C の等張液、高張液 (350 mOsmol/kg)、または低張液 (230 mOsmol/kg) によって 4 時間の流れ負荷 (せん断応力 = 2 Pa) を作用させた。その後、F-アクチンを蛍光染色してその状態を共焦点レーザ顕微鏡で観察した。

(3) 低張液・高張液が培養内皮細胞の力学的特性に及ぼす影響

24 時間静置培養した HUVECs に、等張液、高張液、または低張液を 30 分間作用させた後、培養ディッシュから細胞を剥がし、等張液、高張液、または低張液中で細胞のマикроピペット吸引試験を行った。吸引圧と細胞の一部がピペット内に吸引された長さ (吸引長) から細胞の粘弾性を求めた。

(4) 低張液による流れ負荷が培養内皮細胞の力学的特性に及ぼす影響

平行平板型流れ負荷装置を用いて、24時間静置培養した HUVECs に等張液 (290 mOsm/kg) または低張液 (210 mOsm/kg) によって4時間の流れ負荷 (せん断応力 = 2 Pa) を作用させた。その後、流路中央部の細胞を剥がして細胞のマイクロピペット吸引試験を行った。

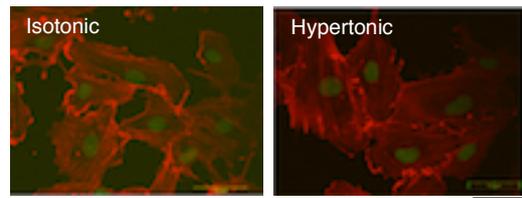
(5) 低張液が培養内皮細胞の体積に及ぼす影響

HUVECs を 24 時間静置培養した後に剥離させて回収し、単一の細胞を瞬時に低張液 (210 mOsm/kg) に移した。顕微鏡下で細胞を観察して記録した画像から、細胞が球形であると仮定して細胞の体積を求め、その変化を単一細胞で経時的に調べた。

4. 研究成果

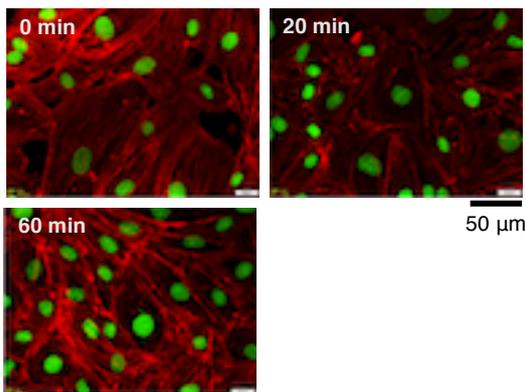
(1) 低張液・高張液が培養内皮細胞の F-アクチンに及ぼす影響

培養血管内皮細胞に等張液と高張液を作用させた場合には、F-アクチン/ストレスファイバー構造に大きな経時変化はみられず、また、F-アクチン/ストレスファイバーの様子には両者の間に大きな違いはみられなかった。一例として図 1 に 20 分後の様子を示す。低張液を作用させた場合、20 分後には細胞中央部の F-アクチン/ストレスファイバーが少ない傾向がみられたが、60 分後のストレスファイバーには回復傾向がみられた (図 2)。低密度培養された細胞では低張液に曝すと細胞中央部のストレスファイバーの量が少なくなる傾向がみられた。これに対して、コンフルエント状態に高密度培養された細胞では、ストレスファイバーの状態に低張環境に曝されたことによる大きな影響はみられなかった (図 3)。



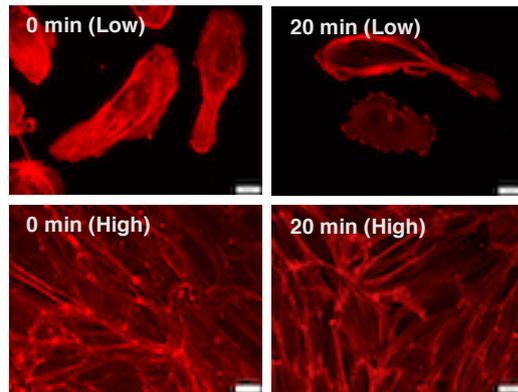
50 μm

図 1 等張液、高張液に 20 分間曝した HUVECs の F-アクチン (赤) と細胞核 (緑)



50 μm

図 2 低張液に 0, 20, 60 分間曝した HUVECs の F-アクチン (赤) と細胞核 (緑)

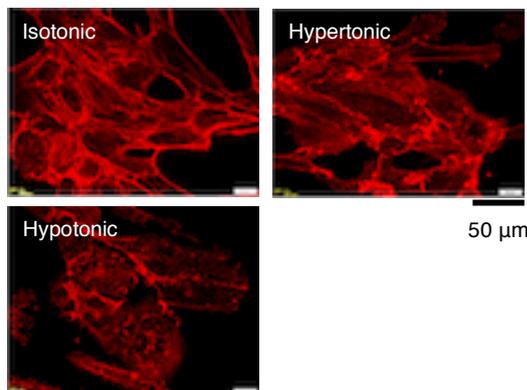


50 μm

図 3 低張液に 0, 20 分間曝した HUVECs の F-アクチン (細胞培養密度の影響)

(2) 低張液・高張液による流れ負荷が培養内皮細胞の F-アクチンに及ぼす影響

高張液による流れ (せん断応力 = 2 Pa) を 4 時間作用させた場合には、等張液の場合と同様にほとんどの細胞に明瞭なストレスファイバーが観察された。しかし、低張液を作用させた場合にはストレスファイバーが減少している細胞がみられた。また、細胞数密度により流れからストレスファイバーが受ける影響に違いが現れる可能性があることが示唆された (図 4)。



50 μm

図 4 等張液、高張液、低張液による流れせん断応力 (2 Pa) を 4 時間間負荷した HUVECs の F-アクチン

(3) 低張液・高張液が培養内皮細胞の力学的特性に及ぼす影響

一例として等張液を30分間作用させたHUVECのマイクロピペット吸引試験の様子を図5に示す。等張液、高張液(350 mOsm/kg)を作用させたHUVECsの弾性率は、それぞれ約100 Pa, 約180 Paで高張液を作用させた細胞の弾性率は高くなる傾向がみられた。低密度あるいは高密度状態に培養されたHUVECsに低張液(210 mOsm/kg)を20分間作用させた場合、細胞の強度が低くなる傾向がみられた。高密度培養された細胞の弾性率は約60 Paであったが、低密度培養した細胞は強度の低下が大きく計測が困難であった。

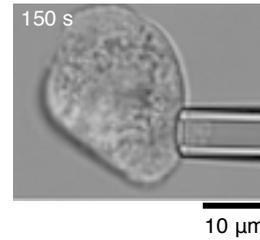


図5 マイクロピペット吸引試験
(等張液, 吸引圧 = 200 Pa)

(4) 低張液による流れ負荷が培養内皮細胞の力学的特性に及ぼす影響

低張液(210 mOsm/kg)中に4時間静置した細胞の弾性率は約43 Paであり、等張液(290 mOsm/kg)中に静置した細胞の約55%と小さくなる傾向にあった。せん断応力2 Paで低張液の流れを4時間負荷した場合の細胞の弾性率は約55 Paで、低張環境に曝された影響が流れ負荷により軽減される傾向がみられた。

(5) 低張液が培養内皮細胞の体積に及ぼす影響

低張液(210 mOsm/kg)に曝すと細胞の体積は急激に増大し、10~20分後にかけて125~150%程度まで徐々に体積を増やした後、徐々に体積を回復させる傾向がみられた(図6)。しかし、60分後でも元の体積には戻らず、また、細胞体積の増大、回復の程度には細胞個体間に差がみられた。

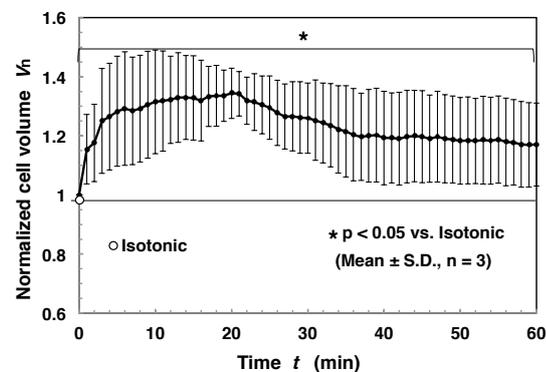


図6 低張液に曝したHUVECの体積の経時変化
(等張液中の体積で正規化)

(6) まとめ

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を高張液に曝した場合には、流れ負荷に関わりなくストレスファイバーの状態にほとんど変化はみられなかった。低張液に曝すと、10~20分後にかけて細胞が膨張するとともに、低密度培養された細胞では20分後にはF-アクチン/ストレスファイバーが減少する傾向がみられた。これに対して、コンフルエント状態に高密度培養された細胞ではストレスファイバーの状態に大きな影響はみられなかった。また、生体内で作用するせん断応力に近い2 Paの流れせん断応力を血管内皮細胞に作用させたところ、ストレスファイバーが減少している細胞がみられた。高張液、低張液中に静置した細胞の弾性率には、それぞれ上昇、低下する傾向がみられ、低張環境における弾性率の減少の程度は、低密度培養された細胞で大きかった。低張液中に静置した細胞の弾性率の低下は、流れを負荷するとその程度が軽減される傾向がみられた。これらのことから、高張環境は血管内皮細胞の構造に大きな影響を与えないが、低張環境は血管内皮細胞の構造と力学的特性に大きな影響を与え、とくに細胞数密度が低い場合には細胞の構造と力学的特性に及ぼす影響が大きいことが示唆された。今後、浸透圧負荷が細胞機能に及ぼす影響も調べていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎浩, 森下尚正, 山田紘瑛, 石本壯王, 山田莉子
2. 発表標題 低張・高張環境が血管内皮細胞のストレスファイバーに及ぼす影響
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------