2236 流れ負荷による内皮細胞の形態と細胞表面のせん断応力の変化

Changes in Endothelial Cell Shape and Shear Stress on the Cell Surface during Flow Exposure

○正 福島 修一郎 (慶大理工院)
正 谷下 一夫 (慶大理工)

正 藤岡 秀樹 (英インペリアルカレッジ)

Shuichiro FUKUSHIMA, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama
Hideki FUJIOKA, Imperial College, UK.
Kazuo TANISHITA, Keio University

Key Words: Endothelial Cell, Cell Morphology, Shear Stress

1. はじめに

内皮細胞は負荷される流れによって形態を変化させる機能を有している。in vivo の形状は血流に依存して血管の部位により異なっており、血流の変化に対応した形態変化も起こる。in vitro でも類円形の培養細胞が流れ負荷により伸長して流れ方向に配向することが確認されている。細胞の3次元形状を考慮した細胞近傍の微視的流れ場の解析結果⁽¹⁻⁴⁾は、このような形態変化が細胞表面に負荷されるせん断応力を減少させる適応反応であること示唆している。しかし、形態変化過程で微視的流れ場がどのように変化し、最終的な適応の形状を実現しているかは明らかになっていない。特に、個々の細胞ごとにみた場合の形態変化や応力分布が不均一であることが適応メカニズムの解釈を困難にしている。そこで本研究では、形態変化過程の培養細胞の3次元形状を測定し、その形状をもとに数値計算で細胞近傍の微視的流れ場を求めて細胞表面のせん断応力分布がどのように変化するかを個々の細胞レベルで明らかにした。

2. 方法

2.1 細胞形状測定

ウシ大動脈由来の内皮細胞(Cell Systems)を10%ウシ胎児血清(FBS, JRH Biosciences)と抗生物質(Antibiotic-Antimycotic, GIBCO)を含む培養液(DMEM, GIBCO)で培養した。平行平板流路に播種してコンフルエントになった細胞(継代数 5~9)に細胞層を平坦とみなした場合に1.5 Paのせん断応力となる定常流を72時間まで負荷し、1時間おきに細胞の位相差像を記録して同一細胞集団を追跡した。

形態変化が顕著だった流れ負荷開始後24, 30, 36時間の3時刻で共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の3次元形状を測定した⁽⁴⁾。細胞断層像は、1 mg/ml Fluorescein isothiocyanate Dextran (FITC-Dextran, 2000 kDa; SIGMA)を含む培養液を還流した状態で、共焦点レーザー顕微鏡(MRC-600; Bio-Rad Laboratories)を用いて0.3 μm 間隔で記録した。断層像の輪郭を抽出して等高線図を作成し、等間隔の格子点上で細胞の高さを補間して細胞表面形状を立体再構築した。

2.2 流れ場の数値計算

支配方程式は3次元非圧縮性ニュートン流体のNavier-Stokes式を用いた。計算は、代表長さを計算領域の高さ、代表速度を上面における一定速度とした無次元量で行った。このときのレイノルズ数は5.1となる。計算領域内(Fig. 1)でクエット流を実現し、底面が平坦なときに壁せん断応力が1.5 Paとなるように流入面で線形な速度分布を与えた。底面には形状を測定した60から70の細胞を配置し、細胞表面で滑りなし条件を適用した。上面では線形な速度勾配から求めた流速を与えた。側面では対称条件を適用した。細胞層の周囲には平面を確保したため、流入面、流出面、側面の流れ場

に対する影響はなかった。計算領域の高さは底面の壁せん断応力が領域高さに依存しなくなる50 μm とした。計算格子は境界適合座標系のスタガード格子(240 $\times$ 160 $\times$ 60)を用いた。細胞表面の格子点間隔は1.25 μm で、高さ方向には細胞表面に近いほど格子点が密になるようにした。計算アルゴリズムはSIMPLER法を用いた。せん断応力は細胞表面に1番近い圧力格子点上に流速を補間して線形な速度勾配から計算した。

Fig. 1 Computational Domain

3. 結果および考察

細胞形状は流れ負荷前は類円形で方向性がなかったが、流れ負荷後24時間以降で伸長が顕著となり、30時間以降で配向角(巨視的流れ方向と細胞長軸がなす角度)の分布が変化した。48時間以降では大部分の細胞が巨視的流れ方向に配向して72時間まで細胞形状に大きな変化はなかった。Fig. 2に流れ負荷後24, 30, 36時間の等高線図を示す。位相差像から各時刻で同一細胞を同定してラベルをつけた。13個の細胞の高さの平均値は24, 30, 36時間でそれぞれ $3.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$, $3.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $3.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ であった。30時間では高さが減少する細胞と増加する細胞はほぼ同数であるが、36時間では減少する細胞の割合が増えて、平均値の増加量が大きい細胞は1個(Cell#7)のみだった。

細胞表面のせん断応力ベクトルをFig. 3に示す。13個の細胞全体のせん断応力の平均値は24時間, 30時間, 36時間でそれぞれ 1.07 ± 0.31 , 1.02 ± 0.33 , 1.01 ± 0.34 となり、最大値は2.06, 1.94, 2.21となった。時間経過とともに1以下の低せん断応力が負荷されている領域の割合が増加した。せん断応力の大きさは細胞の高さに依存しており、最高点では巨視的なせん断応力の2倍以上になる細胞もあった。同じ高さで比較すると細胞側面のほうが上流と下流側よりせん断応力は大きかった。細胞頂上付近でせん断応力が最大となるが、必ずしも高さの最高点で応力が最大となるわけではなかった。せん断応力の向きは、細胞の核付近の高い部分を回り込

むような流れに対応しており、巨視的な流れ方向となす角度は最大で 60° になるところもあった。

細胞ごとにみるとせん断応力が減少する細胞の数が時間経過とともに増加した。個々の細胞が時々刻々のせん断応力を受容して適応的な形態変化をすることを考えることもできるが、全ての細胞でせん断応力が減少するわけではなく(30h-Cell#1,3,4,5,6, 36h-Cell#3,6,7,8,9), 36時間のほうが24時間よりも大きい細胞もあった(Cell#3,4,6,7)。せん断応力が増加する形態変化をする細胞もあるにもかかわらず、せん断応力が減少する細胞数が時間経過とともに増加して細胞層全体の平均値が減少する要因として、細胞が移動するときの方向性が挙げられる。流れ負荷後は単純に流れによって下流に移動するわけではなくランダムに移動するが、30時間以降は

下流側への移動量大きくなり、その方向に伸長する場合が多かった。細胞が伸伸長すると上流側の細胞表面の傾きが小さくなってせん断応力は減少する傾向がある。周囲の細胞との相互作用で移動方向が流れ方向に限定された結果として流れ方向に配向した形態になると考えられる。

参考文献

1. Satcher, R.L. et al., *J. Biomech. Eng.*, **114**, pp.309-316 (1992).
2. Barbee, K.A. et al., *Am. J. Physiol.*, **268**, pp.H1765-1772 (1995).
3. Yamaguchi, T. et al., *J. Biomech.*, **33**, pp.115-126 (2000).
4. Fukushima, S. et al., *JSME Int. J. C*, **44**, pp. 972-981 (2001)

(a) 24 h

(b) 30 h

(c) 36 h

Fig. 2 Contour Map of Endothelial Cells
(line Interval: 0.5 μm)

(a) 24 h

(b) 30 h

(c) 36 h

Fig. 3 Wall Shear Stress Vector