

AFM 探針による摩擦刺激が血管内皮細胞表面の構造および力学特性に与える影響

The effects of nano-friction stimulation on the interfacial structure and nanomechanical property of endothelial cells by using AFM.

東理大・工(学) *賀東 春人 東理大・院(非) 森田 智博 東理大・院(正) 佐藤 魁星

東理大・理工(正) 山下 直輝 東理大・工(正) 佐々木 信也

Haruto Gato*, Tomohiro Morita **, Kaisei Sato**, Naoki Yamashita*, Shinya Sasaki*

* Tokyo University of Science, **Graduate school of Tokyo University of Science

1. 緒言

血管内皮細胞(Endothelial Cells: EC)は、血管の最内腔を覆う一層の紡錘形の細胞である。ECは血管において抗血栓作用や血管の収縮拡張を調節するなど血管の健康を保つうえで重要な役割を果たしており、EC機能に障害が発生すると動脈硬化の発生、進展につながることが知られている¹⁾。

近年、このECの機能不全に物理的作用が影響していることが明らかになっている。生体内において、ECには、血流によるせん断応力や血管の拡張による引張応力が加わる。また、毛細血管の管内流れやカテーテル治療などにおいては、これらの応力のほかに、2物体の直接接触による摩擦刺激がECに対して加わる。先行研究では、血流によるせん断応力によって、細胞自身の形状や弾性率などの機械的特性に変化が生じたと報告されている²⁾。そのため、直接接触により摩擦刺激が作用した場合においても、ECに大きな押し込み変形が加わり、細胞表面組織が損傷を受けることで、ECの機械的特性が変化すると考えられる。一方で、内皮細胞の表面層には、グリコカリックス層と呼ばれる糖たんぱく質で構成された脆弱な糖鎖構造が存在しており、摩擦低減効果を示すことが知られている³⁾。微小な摩擦刺激が作用した場合、このグリコカリックス層の糖鎖構造が変化し、内皮細胞表面における摩擦特性や機械的特性が変化することが考えられる。

そこで本研究では、ECの機能不全に及ぼす摩擦刺激の影響を明らかにすることを目的に、原子間力顕微鏡(AFM)を用いてECに摩擦刺激を与え、EC表面の弾性率および摩擦特性の変化を測定した。

2. 実験方法

2.1 実験試料

本実験では、ウシ大動脈内皮細胞を用いた。Figure 1に光学顕微鏡で撮影した細胞の形状像を示す。培地の細胞密度が約90%のコンフルエントで使用した。Table 1に細胞培養および実験に使用した試料と試薬を示す。

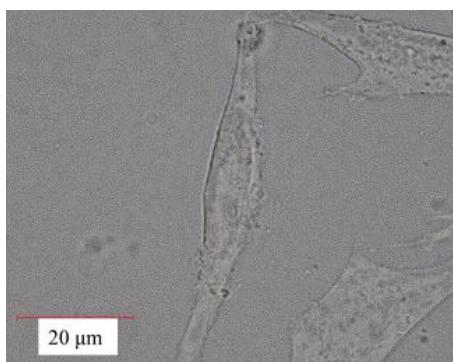


Fig.1 Optical image of a cell

Table 1. Details of the experimental samples

Cells	NM-1	JCRB Cell Bank
Culture dishes	Multi culture dish	VWR
Culture solution	DMEM	Thermo Fisher
FBS	Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher
Antibiotics	Antibiotic-Antimycotic	Thermo Fisher

2.2 AFM 測定

摩擦試験前の細胞に対して、摩擦刺激が細胞の表面形状ならびに弾性率に及ぼす影響を調査するため、培養液中の細胞表面に対してAFM(SPM-8100, SHIMADZU, JP)測定を行った。カンチレバーには、直径6 μmのポリスチレン球をチップレスカンチレバーの先端に取り付けた自作のコロイダルカンチレバー(ばね定数0.06 N/m)を使用した。細胞表面のフォースカーブマッピングを測定した後、コンタクトモードにて細胞に摩擦刺激を加え、再度フォースカーブマッピング測定を行った。Table 2にフォースマッピングの測定条件を、Table 3にコンタクトモードによる摩擦条件を示す。フォースカーブマッピング測定の結果をもとに、細胞の形状像および弾性率分布を取得した。弾性率は、JKR2点法を用いて算出した⁴⁾。

Table. 2 AFM observation conditions

Temperature	[°C]	37
Contact pressure	[kPa]	0.4
Scan range (Z×X×Y)	[μm]	1.5×30×30
Scan speed(Z)	[Hz]	20

Table. 3 Friction tests conditions

Temperature	[°C]	38
Cycle number	[-]	10
Scan speed	[Hz]	10
Contact pressure	[kPa]	0.4
Scan range (X×Y)	[μm]	30×30

3. 実験結果・考察

Figure 2 に摩擦前後の細胞の形状像を示す。フォースカーブマッピングによって取得した細胞表面の形状像は、紡錘形状を示しており、これは一般的なウシ大動脈内皮細胞で知られているものと一致している。なお、摩擦前後において細胞形状には大きな変化は見られなかった。

Figure 3 に摩擦前後の弾性率の分布図を示す。摩擦前の細胞表面では、細胞中心部ならび周辺部において弾性率分布に大きな差異は確認されなかったが、摩擦後の細胞表面では、細胞中心部の弾性率が周辺部よりも高い値を示した。Figure 4 に示すように、摩擦刺激により細胞表面の弾性率は、細胞中心部においては 0.9 kPa から 1.8 kPa に、周辺部においては 0.48 kPa から 0.75 kPa に上昇した。

Figure 5 にコンタクトモード測定で取得した摩擦力の分布図を示す。摩擦力の平均値は細胞中心で 36.0 pN、周辺部で 25.5 pN となり、細胞周辺部より細胞中心部のほうが高い摩擦力を示した。

摩擦により、細胞表面の形状には大きな変化は見られなかった一方で、弾性率が上昇することが確認された。また、弾性率の上昇量は細胞中心部のほうが周辺部より大きく、摩擦力の分布も同様の傾向を示したことから、摩擦力の分布と弾性率の上昇量に相関があることが推察される。Delgadillo らの研究によれば、グリコカリックス層の弾性率は、細胞内部と比較して 1/100 程度の値であると報告されている⁵⁾。このことから、弾性率の上昇は、表面の柔らかいグリコカリックス層が摩擦刺激によって除去されたためと考えられる。

4. 結言

摩擦刺激による内皮細胞表面の機械特性への影響を調査するため、AFM を用いた摩擦試験および弾性率測定を行い、以下の知見を得た。

- (1) AFM フォースカーブマッピング測定より、EC 細胞は紡錘形状を示すことが確認された。これは、一般的なウシ大動脈内皮細胞の形状と一致しており、フォースカーブマッピングにより形状を取得できたと考えられる。
- (2) AFM コンタクトモードによる摩擦試験を行い、フォースカーブマッピング測定により摩擦前後の弾性率分布の変化を調べた結果、細胞表面の弾性率は摩擦により上昇することが判った。一方で、細胞の形状像には大きな変化は確認されなかった。
- (3) 摩擦刺激により、弾性率と摩擦力は、細胞中心部において顕著に上昇することが確認された。この原因是、細胞表面に存在する柔らかいグリコカリックス層が摩擦により除去されたためと推察される。

謝辞

本研究は、株式会社島津テクノリサーチの小暮亮雅氏にご協力を頂いた。謝意を表する。

文献

- 1) 出口克巳、白川茂、血管内皮細胞機能とその測定、血液と脈管、Vol. 19, No. 2 (1988), p111-121 A. B. Collin, C. Reynold & D. E. Fakie: In Situ Studies of Wear Process, ASME J. Tribology, 120, 3 (1995) 513.
- 2) Marta Targosz-Koreck et al, Morphological and Nanomechanical Changes in Mechanosensitive Endothelial Cells Induced by Colloidal AFM Probes, SCANNING VOL. 38, (2016), p654-664.
- 3) 射場敏明 グリコカリックス障害と臓器小循環 血栓止血誌, Vol. 30, No. 5 (2019), p726-735.
- 4) 中嶋健、劉浩、伊藤万喜子、藤波想 原子間力顕微鏡によるソフトマテリアルの弾性率定量評価法の開発 Journal of Vacuum Society of Japan, Vol. 56, No. 7 (2013).
- 5) Luis F. Delgadillo et al, Endothelial Glycocalyx Layer Properties and Its Ability to Limit Leukocyte Adhesion, Biophysical Journal 118 (2020), p1564-1.

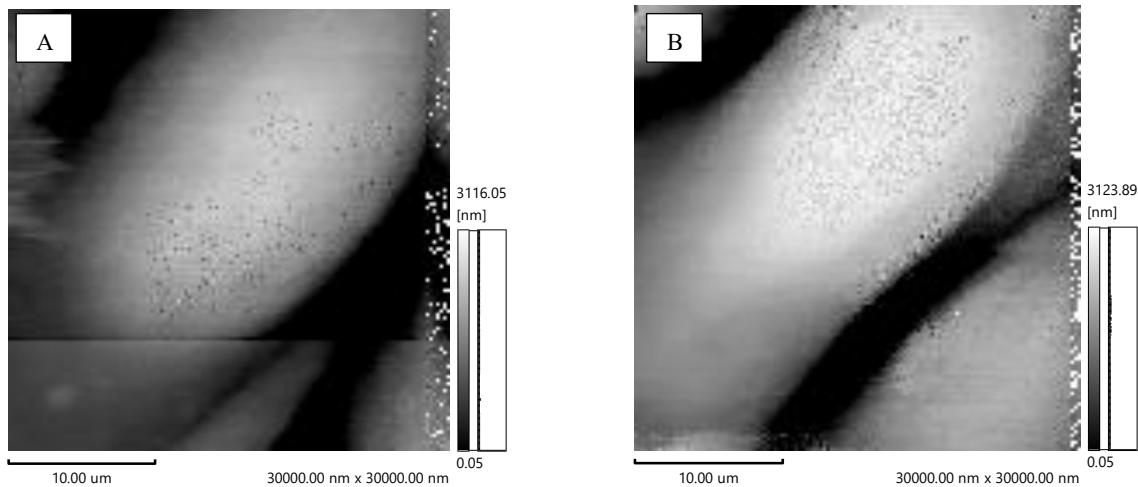


Fig. 2 AFM image for cells (A) before and (B) after the friction test

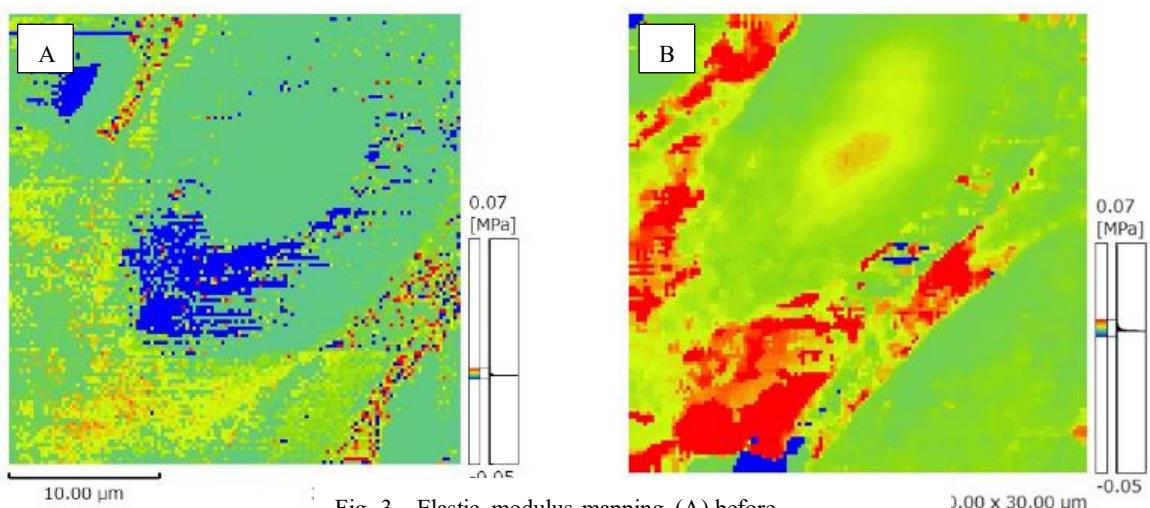


Fig. 3 Elastic modulus mapping (A) before and (B) after the friction test

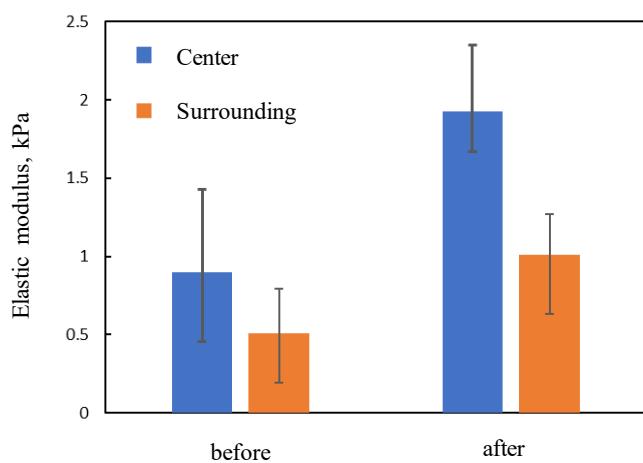


Fig.4 Elastic modulus of center and surrounding of the cell before and after the friction test

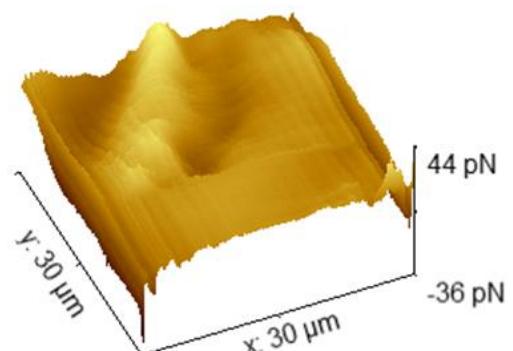


Fig. 5 Friction force mapping