

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0276

研究課題名（和文）マイクロ力学操作技術を用いた内皮細胞メカノトランスダクション機構の解明

研究課題名（英文）Study on mechanism of endothelial mechanotransduction by using micro-mechanical manipulation technique

研究代表者

大橋 俊朗（Ohashi, Toshiro）

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：30270812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞は周囲の力学環境に適応して形態および機能を変化させる。近年では細胞表面に突出する一次繊毛（Primary cilium）が力学刺激の感知に深く寄与していることが指摘されているが力学感知機構の全容は明らかではない。本申請課題では、磁気ナノビーズ技術を用いて流れ刺激に対する内皮細胞の力学伝達経路の推定を目的とした。磁気ナノビーズを細胞表面に付着させ磁場負荷により細胞応答を計測した結果、細胞は磁場の方向に伸長した。また、磁気ナノビーズ導入人工細胞を効率よく生成するためのマイクロフルイディクスシステムを構築した。さらに、Primary ciliumの力学特性計測という新しい研究展開も図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られる知見は内皮細胞の流れに対する力学応答の理解を一層深めるものであり、それはすなわち動脈硬化症など内皮細胞が関連した血管疾患の発生・発達の機序の解明そして診断技術の開発に貢献することが期待される。また、本申請内容は細胞の力学応答研究において新たな実験技術となり得る研究手法を提案・開発するため、細胞バイオメカニクスの新しい基盤技術として当該分野の発展に大きく資することができると思われる。将来的には引き続き共同研究体制を維持しながらより臨床に役立つ知見を提供すべく、細胞の力学刺激に対する応答能を亢進させる薬剤や生化学的因子を用いた研究に進めていきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Cells may change their morphology and function in response to surrounding mechanical environment. Recently, it has been pointed out that primary cilia protruding from the surface of cells contribute to the sensing mechanism of mechanical stimuli, however, the detail of the mechanosensing mechanism remains unclear. The objective of this project was to estimate the mechanotransduction pathway of endothelial cells in response to flow stimuli using magnetic nanobead technology. Cellular responses to an externally applied magnetic field after attaching magnetic nanobeads to the cell surface was measured. It was found that the cells elongated in the direction of the magnetic field. A microfluidics system was also constructed to efficiently generate magnetic nanobead-introduced artificial cells. Furthermore, a measurement of mechanical properties of primary cilia was newly designed and developed.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：内皮細胞 メカノトランスダクション 一次繊毛 磁気ナノビーズ 細胞間力

1. 研究開始当初の背景

血管壁の内面を一層に覆っている血管内皮細胞は、常に血流に曝されており形態や機能を変化させ、この変化はアテローム性動脈硬化症の発生に密接に関与していることが知られている。アテローム性動脈硬化症の好発部位は血管の曲がり部や分岐部に多く、このような部位の血流は血管の幾何学的形状から二次流れの発生や剥離などが起こり複雑な様相を呈している。つまり流れによるせん断応力が内皮細胞の形態・機能を変化させ病変の発生に結びついていくと考えられている。培養内皮細胞にせん断応力を負荷すると、瞬時に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が起こり、続いて細胞骨格成分の一つであるアクチンフィラメントの変化が生じ、24 時間後には流れの方向に伸長・配向するという一連の反応過程が報告されている (図 1)。アクチンフィラメントは細胞の形態維持に最も深く関与している細胞骨格成分であると考えられている上、外部から負荷された力学的刺激を細胞間接着部位、細胞—基質間接着部位や細胞核などへ伝達する情報伝達の媒体としての重要性も指摘されている。

流れせん断応力に対する内皮細胞の力学受容体候補として膜タンパク質、細胞骨格、細胞接着斑、細胞間接着部位などが挙げられてきた。研究代表者は、流れ負荷内皮細胞の硬さ計測や細胞牽引力計測など細胞内力学環境の変化からメカノトランスダクション機構の解明を進めてきた。近年では、内皮細胞表面に突出する一次繊毛 (Primary cilium) が力学刺激の感知に深く寄与していることが指摘されている (図 2、Hoey, *et al.*, J Biomech, 2012)。Primary cilium は細胞膜上に突き出した直径 0.2 μm 、長さ数 μm ~十数 μm 程度の線状の微小器官であり、Primary cilium の変形に伴って内皮細胞内でカルシウムイオン濃度が上昇することも知られている (Janmey and McCulloch, *Annal Rev Biomed Engng*, 2007)。このように、内皮細胞のアクチンフィラメント骨格像に、流れに対する力学受容体について様々な候補が提案されているが、その力学伝達経路については不明な点が多く残されている。これは“流れ”という細胞全体に負荷されるグローバルな力学刺激が実際に細胞のどの部位に力学刺激として伝達され、そこで生化学信号に変換されているのか、についての理解が不足しているためである。

(Janmey and McCulloch, *Annal Rev Biomed Engng*,

2007)。このよう

に、内皮細胞の

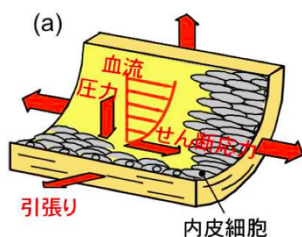


図 1 (a)血管内皮細胞と力学刺激。(b)流れ負荷前と(c)流れ負荷後の内皮細胞

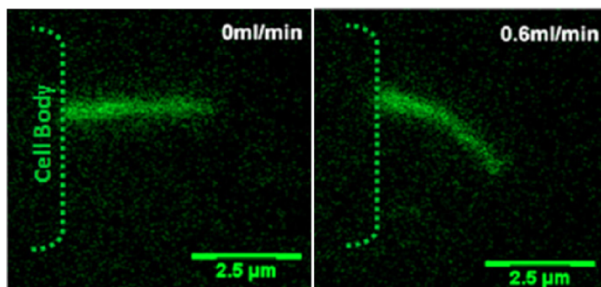
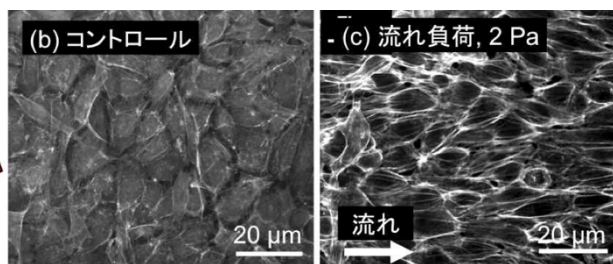


図 2 細胞表面より突出した Primary cilium。

2. 研究の目的

前述した通り、細胞は周囲の力学環境に適応して自らの形態および機能を変化させることが知られている。これは細胞が力学刺激を感知・伝達し生化学的信号に変換しているためであり、この機構はメカノトランスダクションと呼ばれる。細胞のメカノトランスダクションは生体の生理・病理に深く関わることからそのメカニズムを知ることは非常に重要であるが今なお未解明の部分が多い。例えば、内皮細胞の力学受容体として候補に挙げられている部位に Primary cilium (一次繊毛) があるが、その力学特性および機能は十分に解明されていない。さらに、血管内皮細胞は細胞同士が接触した密な状態でなければ血流に対して応答しないことから細胞間力の重要性が指摘されているが、その力学的役割は十分に理解されていない。そこで本申請課題では、磁気ナノビーズ技術を高度に駆使して流れ刺激に対する内皮細胞の力学伝達経路の推定および細胞間力の制御を新しい視点で探求することを目的とする。海外共同研究者として、Primary cilium の専門家である Assist. Prof. David Long (Wichita State University, USA)と Primary cilium のイメージング技術等について協働し、磁気ナノビーズの専門家である Prof. Ricardo Ibarra (University of Zaragoza, Spain)とマイクロ力学刺激負荷技術について主として協働する。

3. 研究の方法

(1) 磁気ナノビーズによる力学刺激負荷実験

磁気ナノビーズによる力学刺激をウシ大動脈由来内皮細胞の特定の部位に選択的に負荷する実験系を確立する。海外共同研究者 Prof. Ibarra より、水酸化鉄沈殿法により生成される数 nm~数 μm の蛍光標識磁気ナノビーズが供給される。

① 磁気ナノビーズによる Primary cilium 力学刺激負荷実験

Primary cilium に特異的に結合する小麦胚細胞凝集素 (b-WGA) とこれに特異的に結合するストレプトアビジン (streptavidin) コーティングによる磁気ナノビーズの表面修飾を行う。Prof.

Ibarra の協力により予め作製しておいたハルバツハ配列磁石により磁気ナノビーズを駆動させ、Primary cilium に力学刺激を負荷し、アクチン構造変化等の細胞の力学応答を観察する。

② 磁気ナノビーズによる細胞膜表面力学刺激負荷実験

細胞膜表面に選択的に磁気ナノビーズを接着させるため、RGD (Arg-Gly-Asp)リガンド (Hu, et al., Am J Physiol Cell Physiol, 2004) による磁気ナノビーズの表面修飾を行う。RGD 配列をもつリガンド蛋白質は細胞表面に存在するインテグリンに特異的に結合する。ハルバツハ配列磁石を用いて、細胞膜表面に力学刺激を負荷し細胞の力学応答を観察する。

③ 磁気ナノビーズによる細胞内部力学刺激負荷実験

細胞内に選択的に磁気ナノビーズを取り込ませる。Prof. Ibarra の報告において、磁気ナノビーズは細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれることを確認している (Riggio, et al., Nanomed Nanotech Biol Med, 2014)。ハルバツハ配列磁石を用いて、細胞内部に力学刺激を負荷し細胞の力学応答を観察する。

(2) 細胞間力のアクティブ制御技術の開発：

磁気ナノビーズを封入した人工細胞を内皮細胞層内に予め導入し、外部磁場を負荷することで細胞間力をアクティブに制御する技術を確認する。人工細胞はフルオロカーボンオイルをカドヘリンで表面を修飾したビオチン化膜で封入した液滴であり (Campas et al., Nature Methods, 2014)、この人工細胞を予め内皮細胞層内に導入すると、人工細胞は周囲の細胞と細胞間接着部位を形成し細胞-細胞間力による変形を受ける。人工細胞の受ける細胞間力は蛍光像により取得した変形量から数値解析的に推定する。人工細胞内に磁気ナノビーズを封入、人工細胞膜に磁気ナノ粒子を埋入した後、傾斜外部磁場を負荷して人工細胞をアクティブに任意の方向に動かすことで周囲細胞との細胞-細胞間力を制御する技術とするものである。

4. 研究成果

(1) 磁気ビーズを用いた血管内皮細胞に対する力学刺激負荷

試料として、ウシ大動脈内皮細胞 (Bovine Aortic Endothelial Cells : BAECs) (Cell Application, Inc. USA) を用い、10%のFBSを添加したDMEM培地の下、37°C、5%CO₂の環境下で培養した。

本研究では、細胞に取り込ませた磁気ビーズに磁力を負荷するためハルバツハ配列を構築した (図3)。使用する磁石は縦、横、高さが全て30mmで、表面磁束密度521mTのネオジウム磁石 (マグファイン、日本) を10個用いた。5個の磁石で1つのハルバツハ配列を組み、2つの配列の間のギャップに磁場が集中するように向かい合わせた。このギャップの中心に培養した細胞を設置するため、固定台を製作した。固定台には磁性を考慮し、アルミニウム合金A5052を用いた。ギャップの距離は、実験で35mmのディッシュ (BD Falcon, USA) を用いたため、蓋の大きさを考慮し41mmとした。インキュベータに入れる際ディッシュが中心から動かないようにピン止めするため直径5mm、深さ10mmの穴を開けた。

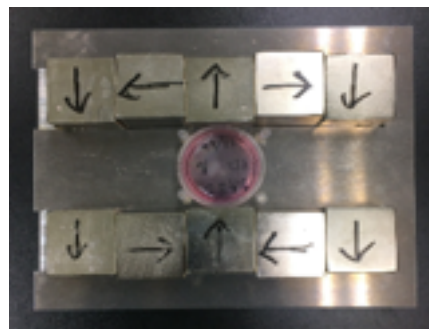


図3 ハルバツハ配列磁石。

ピン止めには約20mmにカットしたシリコンチューブを用いた。

本実験で使用した磁気ビーズは、直径が約25nmのFe₃O₄粒子の集合体であり、単位質量あたりの磁気モーメントは51Am²kg⁻¹である。磁気ビーズの表面はポリエチレンイミンでコーティングされている。磁気ビーズに負荷される磁力は次の式で表される。

$$F = \rho V M_s (dB/dr) \quad (1)$$

この時、磁気ビーズの密度を ρ [gm⁻³]、磁気ビーズの体積を V [m³]、単位質量あたりの磁気モーメントを M_s [Am²kg⁻¹]、磁場勾配を dB/dr [T/m] で表す。

継代数12の内皮細胞をコンフルエント状態まで培養した。コントロール実験として、磁気ビーズの導入をせず磁場のみを負荷するため、細胞を固定台に設置し24時間インキュベートした。もう一方の実験群においては磁気ビーズを取り込ませるため、磁気ビーズ懸濁液を50 μ l 滴下してディッシュを数回ふって拡散させた後、インキュベータで24時間培養した。その後、固定台に設置し、24時間インキュベートした。2つのディッシュともインキュベータに入れる前後に位相差顕微鏡により写真を撮影した。

細胞の形態変化の計測には Shape Index と配向角を用いた。ImageJ (Version 1.44p, National Institutes of Health, USA) を用いて取得した細胞の写真を解析した。細胞の面積を A [μ m²]、周長を P [μ m] で表す時、Shape Index (SI) は次の式で表される。

$$SI = (4\pi A)/P^2 \quad (2)$$

SIは0から1の値を取り、0に近づくほど線状になり、1に近づくほど円形になる。こ配向角は

ディッシュ底面の切り込みと細胞の伸長方向がなす鋭角を計測した。

磁気ビーズを導入した細胞の実験前後の位相差顕微鏡画像を図4に示す。画像からは明確な細胞の配向は確認できなかった。磁気ビーズは写真の黒い点として、細胞に導入されていることが確認できるが、拡散されず細胞より大きいクラスターを形成しているところも多くみられる。磁気ビーズを導入せず磁場のみを負荷した場合（コントロール）、Shape Index は 0.60 ± 0.17 から 0.68 ± 0.17 となり少しだけ増加した。配向角は $42.2 \pm 26.7^\circ$ から $42.2 \pm 26.7^\circ$ となり変化は見られなかった。磁気ビーズを導入し磁場を負荷した場合、Shape Index は 0.60 ± 0.15 から 0.63 ± 0.15 となり少しだけ増加した。配向角は $46.7 \pm 27.6^\circ$ から $46.9 \pm 26.4^\circ$ となりほとんど変化は見られなかった。細胞に磁気ビーズを導入しなかった場合と比べても有意な変化は見られなかった。

数値解析により、磁気ビーズには 2.89 nN が負荷された。血管内皮細胞への流れ負荷実験によると、この磁力の大きさは細胞が形態変化を示すには十分な力の大きさであると考えられる。細胞の形態変化が明確に得られなかった原因として磁気ビーズが細胞に十分に導入されなかった可能性が考えられる。実験後トリプシンを加え浮遊させた細胞を観察したところ、磁気ビーズが取り込まれていない細胞が多く見つかった。そこで磁気ビーズが確実に取り込まれた細胞のみを目視にて選択して再び Shape Index および配向角を求めた。実験前の SI は 0.65 ± 0.18 、配向角は $51.6 \pm 28.4^\circ$ 、実験後の SI は 0.60 ± 0.16 、配向角は $38.8 \pm 26.5^\circ$ と求められた。実験前後で SI は 0.05 減少し、配向角は 12.8° 減少した。すなわち、磁気ビーズが取り込まれた細胞のみを選択した場合、SI および配向角の減少が確認されたことから、細胞へ確実に磁気ビーズを取り込ませることができれば、より有意な結果が得られる可能性があると考えられる。

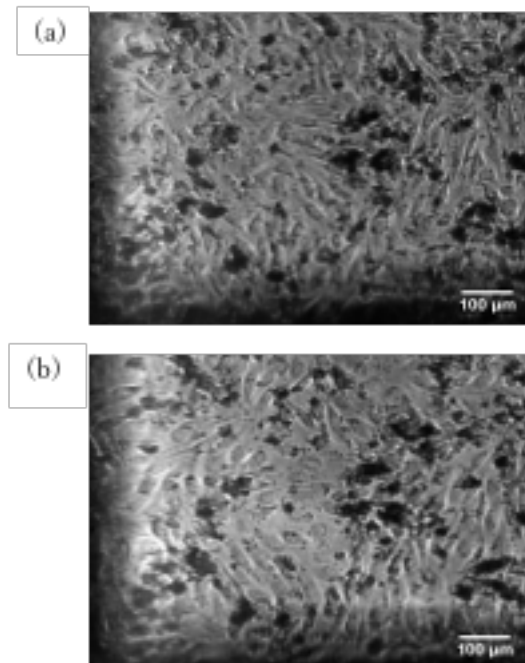


図4 磁場負荷前 a)および負荷後(b)における内皮細胞の形態。

(2) 人工細胞創出を目指したマイクロドロップレットの作製

界面活性剤として DSPE-PEG(2000)-biotin、界面活性剤の溶媒として超純水、オイルとして Fluorinert FC-70 を用いた。DSPE-PEG(2000)-biotin パウダーを 1 mg に対し、純水を 1.66 ml の割合で混合して 0.2 mol/ml の濃度の溶液を作製した。作成した DSPE-PEG(2000)-biotin 溶液(以降 DSPE-PEG 溶液)とシリンジフィルターによるろ過を済ませた FC-70 を $1:0.15$ の比率で混合した。

微小流路デバイスはフォトリソグラフィおよびソフトリソグラフィ技術を用いて作製した。PDMS 微小流路は Side-flow 流体流入口が二つ、Center-flow 流体流入口、流出口、流れ助走区間流路、流体合流部によって構成される Co-flow 形式である。デバイスは Side-Inlet を介して DSPE-PEG 溶液と、Center-inlet を介して FC-70 とチューブ接続されている。流出口はチューブと接続し、排出液を容器に回収できるようにしている。Side-flow 流体流入口に接続されているチューブのうち2本を DSPE-PEG 溶液で、Center-flow 流体流入口に接続されているチューブ1本を FC-70 で満たし、2つのマイクロシリンジポンプにより流体を駆動させた。観察は倒立型電動リサーチ顕微鏡を用いて行い、パソコンに接続された CCD カメラを用いて、流体合流部でマイクロドロップレットが生成される様子を CCD カメラを用いて観察できるようにした。実験系の操作は2つのマイクロシリンジポンプの流量設定により行なった。Side-inlet 側流速を $U_c = 0.0014 \text{ m/s}$ 、Center-inlet 側流速を $U_d = 0.0007 \text{ m/s}$ とした。

微小流路デバイスを用いたマイクロドロップレット生成の様子を図5に示す。マイクロドロップレット生成の様子が確認されたがマイクロドロップレットの回収には至らなかった。これはマイクロドロップレットが生成後に自壊してしまった可能性が考えられる。DSPE-PEG 溶液の濃度として 0.2 mol/ml としたが、これは手動溶液混合によるマイクロドロップレット作製を想定した濃度である。溶液中のほとんどの

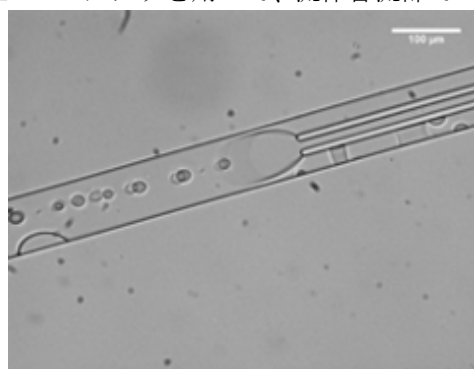


図5 微小流路デバイスによるマイクロドロップレット(人工細胞)の作製。

両親媒性分子が FC-70 と会合する機会が十分にある手動混合に対し、微小流路デバイスを用いた方法だと流れる試料中の FC-70 と接する時間や体積割合など条件が異なる。すなわち、微小流路デバイスによるマイクロドロップレット生成実験の場合、DSPE-PEG 濃度の条件出しが必要であると考えられた。

(3) マイクロ引張試験による細胞一次繊毛の力学特性計測

マイクロ引張試験装置は倒立型蛍光顕微鏡、3D マニピュレーター、ガラス針、一次繊毛、CCD カメラ、圧電素子、電圧制御機器を用いて構成した。試験部の写真を図 6 に示す。本実験ではウシ大動脈内皮細胞を用い、コンフルエント状態から二週間培養することで一次繊毛の一般的な発現を促した。一次繊毛の同定、光学顕微鏡下での観察を行うため一次繊毛に存在するアセチル化 α チューブリンを対象として一次繊毛の免疫蛍光染色を行った。一次抗体には Acetylated α tubulin 抗体 (sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, USA)、二次抗体には Alexa Fluor® 488 標識付き抗マウス IgG(H+L)抗体 (Goat Anti-Mouse IgG(H+L)、Human ads-Alexa Fluor® 488, SouthernBiotech, USA) を用いた。免疫蛍光染色された細胞を PBS とともに遠心管に移し、4°C で 10 分間 1000 x g で遠心分離を行い、PBS によって希釈された上清を 4°C で 30 分間 40000 x g で遠心分離し細胞片を回収することで細胞から単離された一次繊毛を観察することができた。細胞一次繊毛の力学特性を評価するためにマイクロ引張試験を行った。荷重計測を行うガラス針にはバネ定数が 0.89 nN/ μ m であるものを使用した。一次繊毛とガラス針の接着にはエポキシ系接着剤であるアラルダイトを使用し、接着が確認されたのち一次繊毛とガラス針の変形の様子を観察した。

マイクロ引張試験の結果、圧電素子の変位に応じて一次繊毛およびガラス針が変形することが観察された (図 7)。試験中に得られた画像から計算された一次繊毛のひずみとその時にかかる荷重より一次繊毛のヤング率は約 40 kPa と計算された。一次繊毛は内部に 9 本の微小管が放射状に配列し周りを細胞膜に囲まれた構造を有している。今後は、ヤング率と構造との関係を詳細に検討する予定である。

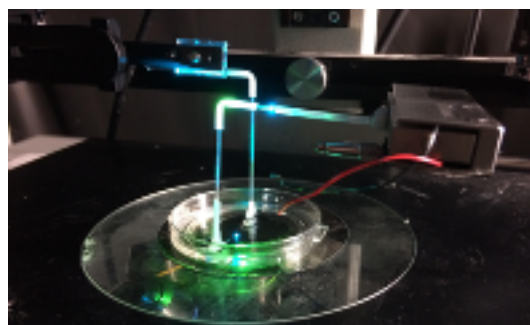


図 6 マイクロ引張試験装置。

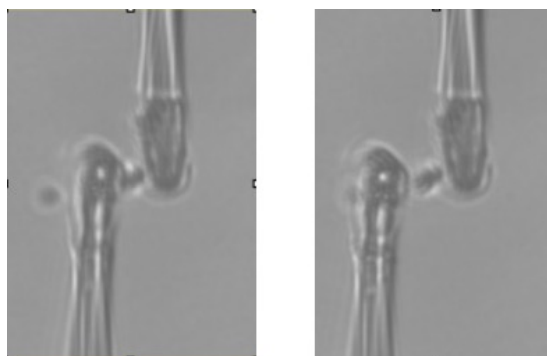


図 7 一次繊毛の引張試験の様子。(左)引張負荷前、(右)引張負荷後。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Tien Dung Do, Jimuro Katsuyoshi, Haonai Cai, Toshiro Ohashi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Mechanical properties of isolated primary cilia measured by micro-tensile test and atomic force microscopy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2021.753805 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Do Tien Dung、大橋 俊朗 |
| 2. 発表標題 細胞一次繊毛の力学特性とメカノセンシング機構 |
| 3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオエンジニアリング講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tien-Dung Do, Toshiro Ohashi |
| 2. 発表標題 Endothelial Primary Cilia Remodeling in Response to Cyclic Substrate Stretching |
| 3. 学会等名 18th International Conference on Flow Dynamics（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tien Dung Do, Toshiro Ohashi |
| 2. 発表標題 Remodeling of endothelial primary cilia in response to flow and cyclic substrate stretching |
| 3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toshiro Ohashi |
| 2. 発表標題 Mechanical characterization of collective cell migration in microchannels |
| 3. 学会等名 17th International Conference on Fluid Dynamics (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tien Dung Do, Katsuyoshi Jimuro, Toshiro Ohashi |
| 2. 発表標題 Measurement of mechanical properties of isolated primary cilia using micro-tensile tester |
| 3. 学会等名 第42回日本バイオレオロジー学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Li Jingyi, Ricardo Manuel Ibarra, Toshiro Ohashi |
| 2. 発表標題 Measurement of mechanical properties of endothelial glycocalyx by using magnetic beads |
| 3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tien Dung Do, Katsuyuki Jimuro, Cai Haonan, Satoshi Matsuo, Ricardo Manuel Ibarra, Toshiro Ohashi |
| 2. 発表標題 Mechanical Characterization of MDCK Primary Cilia and implications for internal structure |
| 3. 学会等名 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (招待講演) (国際学会) |
| 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 |
|-----------|---|-----------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 東藤 正浩 (Todoh Masahiro) (10314402) | 北海道大学・工学研究院・教授 (10101) | |
| 研究 分担者 | 山田 悟史 (Yamada Satoshi) (90730169) | 北海道大学・工学研究院・助教 (10101) | |

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 | | | |
|---------|--------------------------|--|--|--|
| スペイン | University of Zaragoza | | | |
| 米国 | Wichita State University | | | |