

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12872

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングと独自アッセイ技術に基づく細胞収縮能回復薬の発見

研究課題名(英文) Drug screening using a newly developed cell assay

研究代表者

出口 真次 (Deguchi, Shinji)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：30379713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は自ら発生する内因性収縮力の大きさに応じて機能調節を行う。しかしながら、細胞内因性収縮力と機能調節の関係を網羅的に調べる方法はなく、特に細胞機能調節に関わる細胞内シグナルや薬剤の評価は限定的なものに留まっていた。そこで収縮力を高いハイスループットで定量評価することができるマルチウェルプレートシステムを開発した。これを遺伝子や化合物のライブラリーに適用して、収縮力制御化合物のスクリーニングができることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の「収縮」に関する研究と言えばこれまで主に筋肉(骨格筋、心筋、平滑筋)に関するものが主なものでした。しかし昨今、「非筋」細胞における微小な収縮が、広範な細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされています。本研究では非筋細胞の収縮の程度を高い実験効率で評価できる新しい装置の開発を行いました。この装置を用いた実験により、非筋細胞の収縮を制御する薬剤の同定を行いました。これにより非筋細胞内の収縮能の調節およびそれに依存した諸機能の分子機構の解明につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：Cells regulate their function according to the contractile force that the individual cells generate. However, it remains unclear regarding the detailed relationship between the cell functions and contractile force because of the lack of methodologies allowing comprehensive analysis on the relationship. Here, we have developed a new method that allows us to quantitatively evaluate the cellular contractile force with a high-throughput analysis capability. We demonstrated with the new system that some molecular regulators are found to be effective for modulating the cellular contractile force.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞バイオメカニクス 細胞収縮力 メカニクス ドラッグリポジショニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

創薬分野では、既存化合物から新たな医薬品を創成するドラッグ・リポジショニング（DR）と呼ばれる概念が注目されている。また、生物学分野では細胞の収縮力が多様な機能を果たしていることが分かり、注目されている。しかしながら、細胞の収縮力と機能調節の関係を網羅的に調べる方法はなく、特に細胞機能調節に関わる細胞内シグナルや薬剤の評価は限定的なものに留まっていた。

2. 研究の目的

本代表研究者が最近開発した、「個々の細胞が発生する微小な収縮力を簡便かつ高感度で定量評価できる新しい測定技術」を DR のためのアッセイ技術として利用し、疾患細胞の収縮力の回復を導く薬剤を新たにスクリーニングすることを目的とする。さらに、希少疾患の原因遺伝子の変異・欠損と、多様な機能を有する細胞収縮力の関係性を網羅的に調べる、新しい技術として発展させるための基礎を築く。

3. 研究の方法

独自のマルチウェルプレートを作製して細胞内因性の張力依存性を調べることができるシステムを開発する。具体的には、プラズマ処理を行った細胞培養用基板を作製し、細胞が収縮力を発生した際の基板の変形を読み取り、収縮力へと換算できるシステムを構築する。これをマルチウェルプレートで実施することにより、ハードウェアの観点からスループットを向上させる。また、ソフトウェアの観点からもスループットと正確性を上げるために、高速フーリエ変換解析と機械学習（ディープラーニング）をそれぞれ取り入れて比較を行う。

4. 研究成果

細胞形態が十分に基板上で広がっているときは高速フーリエ変換解析を用いて精度よく計測を行うことができるが（図1）、特に細胞の形態が十分に広がっていない場合は精度が落ち、一方、ディープラーニングによる計測では人間の認識と同程度に基板変形を読み取ることができた。これらの研究により、取得画像から細胞収縮性の定量化までをほぼ全自動にすることができた。このシステムを特定のタンパク質ファミリー（図2）や遺伝子変異（図3）、また化合物ライブラリーなどに適用して、個々の化合物の細胞収縮制御の程度について、従来法よりも遙かに高いスループットにより評価できることを実証した。以上より、本質的な点について当初期待通りの成果を得ることができた。

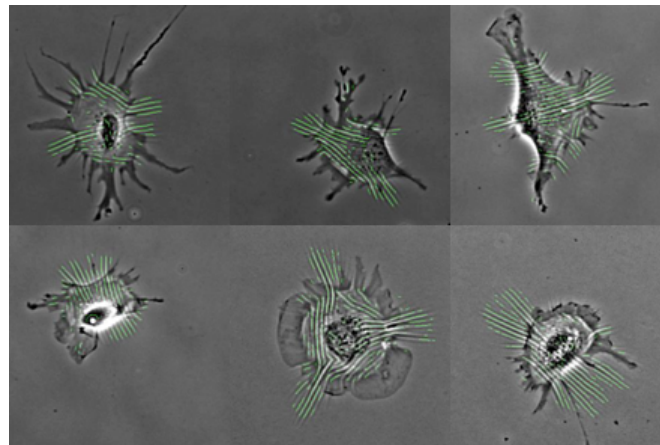


図1 細胞（6例）と基板変形の様子（Ichikawa et al., 2017）

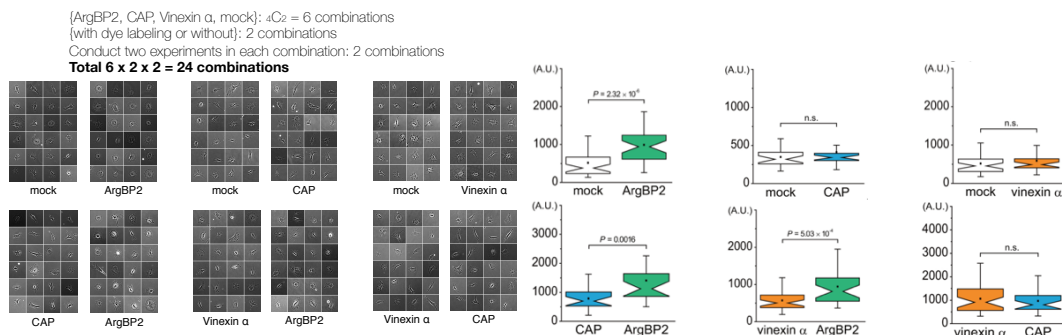


図2 特定のタンパク質ファミリーに関する収縮力評価（Ichikawa et al., 2017）

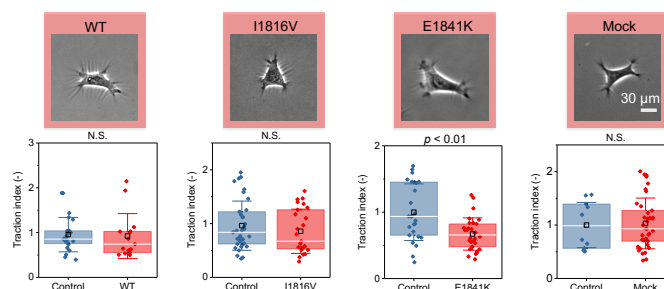


図3 (Fukuda et al., 2017)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ①Fujiwara, S., Matsui, T.S., Ohashi, K., Mizuno, K., Deguchi, S., Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction. *Genes to Cells*, 24(5), 390-402, 2019. (査読有り)
<https://doi.org/10.1111/gtc.12682>
- ②Matsui, T.S., Deguchi, S., Spatially selective MRLC regulation is absent in dedifferentiated vascular smooth muscle cells but is partially induced by fibronectin and Klf4. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 316(4), C509-521, 2019. (査読有り)
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00251.2017>
- ③Matsui, T.S., Ishikawa, A., Deguchi, S., Transgelin-1 (SM22 α) interacts with actin stress fibers and podosomes in smooth muscle cells without using its actin binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(3), 879-884, 2018. (査読有り)
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.176>
- ④Matsui, T.S., Wu, H., Deguchi, S., Deformable 96-well cell culture plate compatible with high-throughput screening platforms. *PLOS ONE*, 13(9), e0203448, 2018. (査読有り)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203448>
- ⑤Fujiwara, S., Matsui, T.S., Ohashi, K., Deguchi, S., Mizuno, K., Solo, a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor, is critical for hemidesmosome formation and acinar development in epithelial cells. *PLOS ONE*, 13(4), e0195124, 2018. (査読有り)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195124>
- ⑥Ichikawa, T., Kita, M., Matsui, T.S., Ichikawa-Nagasato, A., Araki, T., Chiang, S.H., Sezaki, T., Kimura, Y., Ueda, K., Deguchi, S., Saltiel, A.R., Kioka, N., Vinexin family (SORBS) proteins play different roles in stiffness-sensing and contractile force generation. *Journal of Cell Science*, 130, 3517-3531, 2017. (査読有り)
doi: 10.1242/jcs.200691
- ⑦Fukuda, S.P., Matsui, T.S., Ichikawa, T., Furukawa, T., Kioka, N., Fukushima, S., Deguchi, S., Cellular force assay detects altered contractility caused by a nephritis-associated mutation in nonmuscle myosin IIA. *Development, Growth & Differentiation*, 59(5), 423-433, 2017. (査読有り)
doi: 10.1111/dgd.12379
- ⑧Deguchi, S., Saito, A.C., Matsui, T.S., Huang, W.J., Sato, M., The opposite mechano-response of paxillin phosphorylation between subcellular and whole-cell levels is explained by a minimal model of cell-substrate adhesions. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 12(2), 16-00670, 2017. (査読有り)
doi: 10.1299/jbse.16-00670
- ⑨Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., Microcontact peeling: a cell micropatterning technique for circumventing direct adsorption of proteins to hydrophobic PDMS. *Current Protocols in Cell Biology*, 75, 10.21.1-10.21.8, 2017. (査読有り)
doi: 10.1002/cpcb.22
- ⑩Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., New wrinkling substrate assay reveals traction force fields of leader and follower cells undergoing collective migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 975-979, 2017. [F1000Prime recommended by Faculty of 1000] (査読有り)
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.142
- ⑪Ohishi, T., Noda, H., Matsui, T.S., Jile, H., Deguchi, S., Tensile strength of oxygen plasma-created surface layer of PDMS. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 27, 015015, 2017. (査読有り)
doi: 10.1088/0960-1317/27/1/015015
- ⑫Sakane, Y., Yoshizawa, S., Nishimura, M., Tsuchiya, Y., Matsushita, N., Miyake, K., Horikawa, K., Imoto, I., Mizuguchi, C., Saito, H., Ueno, T., Matsushita, S., Haga, H., Deguchi, S., Mizuguchi, K., Yokota, H., Sasaki, T., Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides “law and order” in collective cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 27(20), 3095-3108, 2016. (査読有り)

〔学会発表〕（計 16 件）

- ① MHS 2018 (International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science), Nagoya University, Dec. 9-12. T.S. Matsui, S. Deguchi, “A cellular contractility monitoring system allowing for high- throughput and long-term analysis”
- ② 2018 BMES Annual Meeting, Atlanta, Georgia, Oct. 17-20. T. Matsumoto, M. Ito, E. Maeda, J.F. Wang, T. Matsui, S. Deguchi, S. Sugita, “Changes in FRET Ratio Distribution along Single Isolated Stress Fibers Expressing FRET-based Actinin Tension Sensor during Stretch”
- ③ International Meeting of the German Society for Cell Biology, Leipzig, Germany, Sept. 17-19, 2018. S. Fujiwara, T.S. Matsui, K. Ohashi, T.M. Magin, K. Mizuno, S. Deguchi, “Rho-signaling organizes hemidesmosomal cell-substrate adhesion and acinar morphogenesis of epithelial cells through controlling mechanotransduction”
- ④ Emerging Technologies in Mechanical Engineering 2018, Jeju, Aug. 19-22. Deguchi, S., “High-throughput detection of cellular traction forces for screening of drugs and regulatory genes”
- ⑤ Seminar at Rudolf Peierls Centre for Theoretical Physics, University of Oxford, July 13. Shinji Deguchi, “Contractile properties of cells and subcellular components”
- ⑥ 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, July 8-12. S. Fujiwara, T. S. Matsui, K. Ohashi, K. Mizuno, S. Deguchi, “Hemidesmosomal cell-substrate adhesion and acinar morphogenesis of epithelial cells are organized by Rho-signaling through controlling mechanotransduction”
- ⑦ 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, July 8-12. S. Fujiwara, H. Abiko, T. S. Matsui, K. Ohashi, K. Mizuno, S. Deguchi, “Rho-signaling plays crucial roles for cellular mechanotransduction and regulates actin and intermediate filament cytoskeletal reorganization”[Outstanding Young Researcher Presentation]
- ⑧ 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, July 8-12. Deguchi, S., Matsui, T.S., “Stress fibers exhibit unique contractile properties distinct from those of myofibrils”
- ⑨ 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, July 8-12. Deguchi, S., “Isometric contractile properties of individual stress fibers”
- ⑩ AACR Annual Meeting 2018, Apr. 14-18, 2018. Masamitsu Konno, Kiminori Yanagisawa, Katsunori Matsushita, Ayumu Asai, Jun Koseki, Michiya Matsusaki, Shinji Deguchi, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hideshi Ishii, “Mechanosensor MYL9 regulates cancer cell malignancy in gastrointestinal tumors”
- ⑪ 5th Swiss-Japan Workshop on Biomechanics SJB 2017, Zermatt, Sept. 14-17. S. Deguchi, T. S. Matsui, T. Ohishi, “Biomechanical role of α -actinin-1 in forming focal adhesions”
- ⑫ 5th Swiss-Japan Workshop on Biomechanics SJB 2017, Zermatt, Sept. 14-17. S. Sugita, E. Mizutani, M. Hozaki, T. S. Matsui, S. Deguchi, T. Matsumoto, “Estimation of Cell Forces in Stress Fibers with Birefringence Measurement”
- ⑬ XXVI Congress of the International Society of Biomechanics 2017, 9th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Brisbane Convention & Exhibition Centre, July 23-27. Shinji Deguchi, Tsubasa S. Matsui, “Unique contractile properties of individual stress fibers may explain tension-induced immobilization of focal adhesions”
- ⑭ 2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference, Hapuna Beach Prince Hotel, USA, Jan. 3-7. Shinji Deguchi, Sho Yokoyama, Tsubasa S. Matsui, Taiki Ohishi, “Local geometry sensing by individual focal adhesions”
- ⑮ MHS 2016 (International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science), Nagoya University, Nov. 28-30. Tsubasa S. Matsui, Hige Jile, Shinji Deguchi, “A new engineering system for the study of cell mechanobiology”
- ⑯ International Conference on Flow Dynamics 2016, Sendai International Center, Oct. 11. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Ohishi, T., “New traction force microscopy suggests a mechanism of local geometry sensing by individual cell adhesions”

〔図書〕（計 5 件）

- ① 出口 真次, 松井 翼, 市川 尚文, 木岡 紀幸, 細胞収縮力アッセイ, 月刊「細胞」, 51(3), 39-42, 2019.
- ② 出口 真次, 松井 翼, 市川 尚文, 木岡 紀幸, 細胞収縮力のアッセイ - メカノバイオロジー研究のツール, Precision Medicine プレシジョンメディシンと創薬, 北隆館 ニューサイエンス社, 2018.
- ③ 出口 真次, 4.4 バイオテクノロジー・バイオインフォマティクス, 機械工学年鑑 2018
- ④ 出口 真次, 高度物理刺激と生体応答. 2.2.7 節 細胞の力学応答における張力ホメオスタシスの役割. 養賢堂, 2017.
- ⑤ 出口 真次, 細胞のマルチスケールメカノバイオロジー. 第 4 章 細胞接着のメカノバイオロジー: 細胞収縮性に依存した機能調節の仕組み. 森北出版, 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 1 件）

名称：接触物体が発生する力を可視化および／または定量化するための表面改質方法およびこれを用いたスクリーニング方法、ならびにこれら方法
発明者：出口真次、横山奨、松井翼
権利者：国立大学法人大阪大学
種類：特許通常
番号：特許第 6418446 号
取得年：2018
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
大阪大学・出口研究室 <http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松井翼
ローマ字氏名：Tsubasa S. Matsui

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。