

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16387

研究課題名(和文) 分子張力センサーを用いた力学的刺激下でのメカノシグナル可視化技術の開発

研究課題名(英文) Molecular tension sensors visualize cell mechanical signal under mechanical stress

研究代表者

森松 賢順 (Morimatsu, Masatoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70580934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：長時間の還流、拍動の有無を人工的に再現可能なシステムを構築顕微鏡上に構築し、リアルタイムでの機械刺激に対する細胞のメカノシグナル観察を実施した。その結果、細胞接着斑分子が還流方向に平行に配向して局在することが分かった。また、メカノシグナルも細胞の還流方向移動と共に移動することが分かった。この結果は、細胞接着分子であるインテグリン分子がcatch-bondメカニズムに基づいて機能することを示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)： We developed the shear stress applying system on the microscope and visualized focal adhesions motion and mechanical signal on real time. Our system revealed that focal adhesions and high mechanical signal are aligned to the parallel direction of flow direction. These results suggest integrin molecules use catch bond system.

研究分野：生体医工

キーワード：メカノシグナル 分子張力センサー 機械刺激

1. 研究開始当初の背景

力学的刺激(メカノストレス)を受容し、応答することで我々の体は正常な生体機能を維持する。動脈硬化巣が血液の乱流部位に好発するといった病理的な報告からも、生理学並びに医用工学において、メカノストレスに応答する機械的シグナル(メカノシグナル)を考慮した研究が必須となってきた。近年 *in vitro* の実験下において、細胞外マトリクスの力学的環境変化により、幹細胞の分化制御が可能であることが報告された。この結果から、分子レベルでのメカノシグナル伝達機構の解明が今後の再生、医用工学に有用であることが示唆され、現在、国内外の研究機関のみならず、企業においてもメカノストレスによる細胞分化の研究開発が盛んに行われている。

細胞外マトリクスからのメカノシグナルを感受する重要な分子の一つがインテグリン分子である。インテグリン分子は細胞外マトリクスを構成する分子(fibronectin, collagen, laminin 等)と結合し細胞の足場となると同時に、細胞外マトリクスの状態を感受する機能を有する。また、多くの細胞生物学、分子生物学的知見から、インテグリンを介したシグナル伝達経路が細胞運動、細胞の生存、細胞分化(転写因子等)の制御にも関わることが知られている。

メカノストレス制御技術の研究は、従来の生物、工学、医学分野で現在までに盛んに研究されてきた。例えば、ゲル等を用いた細胞外マトリクスの剛性を直接的に変化させる技術、ずり応力の制御技術の知見を得ることは比較的容易である。さらには、細胞の培養技術の向上と共にメカノストレスの制御技術との融合によって、*in vitro* での再構成系計測技術が確立されつつある。しかしながら、メカノストレスの制御や再構成技術は飛躍的に進歩しているものの、分子レベルでのメカノシグナルの定量化が大きな技術的障壁となっており、メカノシグナル伝達機構の解明には至っていない。一般的には、細胞の力発生場の計測において、Traction Force Microscope が使用される。この技術は 1.0 μm 程度のビーズを含んだゲル等に細胞を培養し、細胞の運動に伴って動くビーズの変位を計測することで細胞の力分布を計測する。しかしながら、空間分解能の限界(サブ μm 程度)と解析の困難さが問題であるため、分子レベルでの定量には最適な技術ではない。最善策は分子レベルでの入力信号であるメカノシグナルをイメージングすることである。つまり力の可視化である。

2. 研究の目的

本研究では、分子レベルでのメカノシグナルの定量によるメカノシグナル伝達機構の解明を目標とし、メカノシグナルの定量イメージングシステムの開発と、得られた知見によるメカノバイオロジーを考慮したシグナル伝達機構のモデル構築を狙いとした。具体的には、メカノストレスに対する、分子張力センサーを用いたメカノシグナルの可視化定量技術の構築及び、従来までの知見を含めた新しいインテグリン関連シグナル伝達機構のモデルの提案を目的とする。現在までに、Shear Stress と血管内皮細胞のメカノシグナル感受分子の研究は国内外問わず盛んに研究されている。Shear Stress と細胞外マトリクス、細胞接着斑との相関は間接的に示唆されているものの、生きた細胞でかつ、分子レベルでの力分布と Shear Stress の同時定量は報告されておらず、本研究が独創的かつ、今後のメカノシグナル伝達機構の解明には必須であると申請者は理解した。

3. 研究の方法

(1) Shear Stress 制御システムの構築

現在までに流量の可変可能なポンプを用いた Shear Stress の制御によって、細胞動態、細胞内の遺伝子やタンパク質発現量の変化等が報告されてきた。しかし、一般的に使用されるペレスターポンプには拍動の問題、正確な流量の制御や流れパターン制御の困難さが生じていた。また、前述の問題を克服するシリッジポンプではシリッジ内溶液の体積が制限されるため、長時間の還流には不適用であった。これらの問題を解決するため、複数のシリッジを同時に制御することを本研究計画内で申請者は提案する。このシステムでは長時間での Shear Stress の可変、流れパターンの制御が可能であり、循環器系における動脈、静脈(Shear Stress の強弱、拍動の有無等)での再構成が可能と考えた。

(2) Shear Stress の制御システムとメカノシグナルの定量イメージング技術の構築

前述のシリッジポンプシステムを顕微鏡に組み込んだ生細胞メカノシグナル定量イメージング計測の構築を実施した。

(3) 計測の実施

チャンバー内のカバーガラス上に分子張力センサーを固定し、血管内皮細胞を培養した後、Shear Stress に対する力分布の定量を実施した。特に、細胞が Shear Stress 方向への移動の際に生ずる力分布の時系列計測が可能となり、血管内皮細胞のメカノシグナルの可視化

と力感受機構の解明に繋がる。さらには、GFP等を使用した蛍光観察にて、細胞接着斑関連分子、インテグリン分子、細胞骨格、シグナル伝達関連分子の局在等を同時に定量した。この結果 Shear Stress と細胞外マトリクスでのメカノセンシング機構と機能発現の包括的理解が可能と考える。

4 . 研究成果

(1) Shear Stress 制御システムの構築

2本のシリンジポンプを用いて長時間の還流、拍動の有無を人工的に再現可能なシステムの構築に成功した。このシステムを顕微鏡下に構築し、細胞接着斑分子の計測を実施した。前述のシリンジポンプ系を用いて、Shear Stress (>10 dynes/cm²)下での24時間の還流培養した後、細胞を免疫染色した結果、細胞接着斑関連分子である Vinculin 分子は Shear Stress 方向に平行に配向して局在することが分かった。この結果は、Shear Stress が細胞接着斑関連分子の局在を制御していることを示唆し、Shear Stress が間接的にインテグリンによる高負荷部位との相関が高いと推測できた。

(2) 機械刺激下での高張力場の計測

Shear Stress 制御システムの下、高張力場の計測の結果、還流方向への細胞移動と共に高張力場の還流方向への移動が観察された。

(3) 分子張力センサーの改良

接着分子であるインテグリンとの結合部位の改変やバネ部位の硬さの変更を実施した。その結果、細胞外基質の一つである fibronectin に存在する synergy site が細胞接着力には大きく影響しないが、細胞剥離の阻害効果を持つことが示唆された。さらに、多くのインテグリン分子は 1~3 pN 程度の力しか生まないが、稀に 7 pN 程度の力を生むことが、高張力レンジの最適された張力センサーを用いて、1分子レベルでの計測で分かった。

(4) モデルの構築

機械刺激に応じて結合力を変える catch-bond メカニズムを利用して細胞内インテグリン分子が動作していることを本研究結果が示唆した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Chang AC, Mekhdjian AH, Morimatsu M, Denisin AK, Pruitt BL, Dunn AR. Single Molecule Force Measurements in Living Cells Reveal a Minimally Tensioned Integrin State. ACS Nano. 2016;10: 10745–10752. doi:10.1021/acsnano.6b03314(査読あり)

〔学会発表〕(計 6件)

1. 森松賢一 “高圧下での細胞動態イメージング” 40 回日本生体医工学会中国四国支部岡山理科大学 (2017.10.7)

2. Morimatsu, M. “Controlling and visualizing the force clarify the cellular mechanosensing mechanism.” 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure, Kyoto Japan (2017.08.24)

3. Morimatsu, M., Aya, K., Fujita, A., Nishiyama, M., Naruse, K., Direct observation of cell mechanics under high hydrostatic pressure. 2017 American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting (2017.12.5). Philadelphia, PA, USA

4. Morimatsu, M., Fujita, A., Takahashi, K., Naruse, K., Imaging of cell mechanics under high gravity by rotational microscope. Biophysical Society 61th Annual Meeting (2017.02.11~2.15). New Orleans, LA, USA

5. Morimatsu, M., Fujita, A., Takahashi, K., Naruse, K., High hydrostatic pressure induces cytoskeletal organization and signal transduction. 2016 American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting (2016/12/4). San Francisco, CA, USA

6. Morimatsu, M., Fujita, A., Takahashi, K., Naruse, K., Hydrostatic pressure induces the signal transduction of MAPK pathway. Mechanobiology of Disease (2016/9/28). Singapore

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森松 賢順 (MORIMATSU, Masatoshi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70580934

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()