様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 １４ 日現在

機関番号：２２６０４
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｈ０３５２１

研究課題名（和文）細胞力学応答における細胞核力学場ダイナミクスの役割解明

研究課題名（英文）Study on the role of the mechanical dynamics in the nucleus in cellular mechanical responses

研究代表者

坂元　尚哉（SAKAMOTO, NAOYA）

東京都立大学・システムデザイン研究科・准教授

研究者番号：２０３６１１１５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では，力学環境における細胞応答メカニズムにおいて細胞核が力学的および構造的に果たす役割の解明を目的として，細胞核内力学特性評価および細胞核と細胞牽引力との関係を検討した．細胞核内局所の力学特性および接着基質伸展により細胞核内に生じるひずみ分布を評価した結果，細胞核内は不均質な力学特性分布を示し，その不均質性に対してDNA凝集状態とは異なる構造因子が重要な役割を持つことが示唆された．また，細胞核と細胞骨格との結合を阻害した実験結果から，細胞力学応答に深く関与する細胞骨格および細胞牽引力の細胞内分布に対して，細胞核の構造的関与も示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義
力学環境に対する細胞応答は身体の生理機能維持や病理に深く関与することが知られている．細胞の力学環境への応答メカニズムにおいて，細胞外部の力学環境情報の細胞核への伝達および細胞核の変形が重要な役割を担うとして注目されている．力学特性は変形に極めて密接にかかわる物性であり，本研究結果は，伝達された力が，細胞核内部で局所的に異なる変形を引き起こし，細胞核内部のDNA構造等を変化させることで細胞応答を導く可能性を示唆する．また細胞核の存在も，力の伝達に重要な細胞骨格構造に影響を与える相互作用を持つことを示し，細胞応答メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる．

研究成果の概要（英文）：The nuclear deformation and strain caused by the mechanical forces transmitted from outside of the cell to the nucleus via cytoskeletons can affect the accessibility of mechanosensitive transcription factors and ultimately gene expression. Thus, understanding nuclear mechanical properties and deformation against mechanical stimuli is the key to revealing how nuclear mechanics controls the biochemical activity. In this study, we explored intranuclear mechanical properties and the mechanical relationship between the nucleus and cellular traction forces. As a result, we found a heterogenous distribution of mechanical properties in the nucleus, which is thought to be determined by intranuclear structure components other than DNA condensation states. Our results also suggest that the nucleus play an important role in intracellular distributions of actin cytoskeletons and traction forces.

研究分野：細胞メカノバイオロジー

キーワード：細胞核　アクチン細胞骨格　クロマチン　不均質性　LINC複合体

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

我々の身体を構成する細胞は，外部からの力学刺激や基質の硬さなど周囲の力学環境を感知し，細胞内シグナル活性や遺伝子発現を変化させ，形態的・機能的応答（力学応答）を示す．力学応答は，発生過程における細胞分化・組織形成，生理機能の維持，さらに様々な病理にも重要な役割を担っており，そのメカニズム解明が求められている．

細胞外の力学環境によってもたらされる細胞内力学場は，力学的情報を直接感知するセンサー分子の活性や遺伝子発現に影響を与え，細胞力学応答に重要な役割を担うと考えられている．細胞内力学場に対して，力学環境に応じて動的に大きな変化を示す細胞骨格の構造や張力，基質との接着部位（焦点接着斑）分布など細胞質における構造体・力学特性の役割が主に注目されてきた．一方で，細胞外の力学的情報は細胞核にも伝達され，細胞核の構造・力学特性変化を引き起こすことが明らかになり，細胞核が細胞生物学的のみならず，力学的にも重要な役割を担うことが示唆され，細胞核の力学的役割について近年関心が極めて高まっている．しかし，細胞機能と細胞核の構造･力学特性との詳細な関係は明らかになっていない．このような背景において，我々はこれまでに力学刺激を負荷された細胞内において，細胞核力学特性が動的な変化を示し，さらに細胞核力学特性が細胞の形態応答に影響を及ぼすことを明らかにしている[1]．

２．研究の目的

これまでの知見をもとに，本研究ではさらに伝達された力により細胞核内に生じる力学場の動的変化を明らかにし，細胞核と細胞質との力学的相互作用が細胞の力学応答に対する役割の検討を行った．

３．研究の方法

（１）細胞培養およびタンパク質発現抑制

試料として HeLa 細胞およびヒト皮膚線維芽細胞を用いた．遺伝子導入により，細胞骨格であるアクチンフィラメントと細胞核とを架橋するタンパク質 nesprin の架橋機能を消失させた DN-KASH を過剰発現させ，細胞核と細胞骨格の結合を阻害した細胞も実験に用いた．また，細胞核と細胞骨格を架橋するタンパク質に作用する力によって蛍光強度比が変化する FRET（Fluorescence resonance energy transfer）センサー分子を発現させた細胞を用い，細胞核へ作用する張力の変化を定性的に評価する実験も行った．

（２）細胞核内局所弾性特性評価

ガラスボトムディッシュに播種した細胞に対して，直径 0.2μm 蛍光マイクロビーズを細胞核内に導入（インジェクション）した．インジェクションには，先端外径 1 μm に加工したガラスキャピラリーを用いた．倒立型顕微鏡ステージ上で観察しながら，キャピラリー先端を細胞核内に刺入した後，インジェクション装置を用いてマイクロビーズを射出した．インジェクションのダメージから細胞を回復させるため，細胞をインキュベータ内で一晩静置した．その後，CCD カメラを取り付けた倒立型顕微鏡を用いて細胞核内の蛍光ビーズ像を撮影した．得られた画像から，ビーズの時間平均二乗変位を求め，一般化ストークス-アインシュタインの関係式によりビーズ周囲の力学特性を算出した．

（３）細胞核内ひずみ解析

顕微鏡ステージ上で観察視野に留めながら，伸展用チャンバ内に培養した細胞を伸展する装置を作製した．Hoechst33342 で予め細胞核の蛍光標識を施した細胞に対して，作製した装置を用い伸展率 10%のステップ状伸展を付与し，伸展前後での蛍光画像を取得した．得られた画像から画像相関法を用いて求めた細胞核内変位分布から，各方向のひずみ，またひずみの大きさの指標として相当ひずみをそれぞれ算出した．

（４）牽引力顕微鏡法

アクリルアミドとビスアクリルアミドの混合比を変えることで異なる力学特性を持つポリアクリルアミドゲルを作製し，細胞接着基質として使用した．原子間力顕微鏡を用いてゲルの弾性率を予め測定した．基質変位マーカとして直径 0.2μm ポリスチレン蛍光ビーズを用いた．ゲル上に細胞を播種して 1 日後，観察を行った．剥離前後で細胞の微分干渉画像及び細胞下の蛍光ビーズ画像をそれぞれ撮影した．得られた 2 組の蛍光ビーズ画像から基質変位場及び応力場を求めた．牽引応力の逆解析には深さ展開モデルを用いた逆解析法を使用した．

４．研究成果

（１）細胞核内局所弾性特性評価

インジェクション実施後，一晩静置培養した細胞の微分干渉観察像と Hoechst 染色像を図１に示す．細胞核内にビーズが内包されており，細胞形状や細胞核の形状には正常な細胞と比べ顕著

な違いは見られなかった． ビーズの変位は約 150 μm 四方程度の領域内で生じていることが確認できた（図２）．また平均二乗変位，動的弾性率は両対数グラフでそれぞれ線形増加の傾向を示した．ビーズの平均二乗変位から算出した貯蔵弾性率 G’ (ω)，損失弾性率 G“(ω)は ω = 1 [1/s]においてそれぞれ G’ = 0.1~16 Pa，G” = 0.1~6 Pa の範囲の値であった．蛍光ビーズの細胞核内位置を細胞核重心から細胞核辺縁部までの距離で規格化した結果，細胞核の中心部から辺縁部に向かうに従い G’，G”がそれぞれ増加する傾向が得られた．また，DNA 染色蛍光輝度を基に評価したビーズ周囲の DNA 凝集密度と力学特性との相関が得られた．
さらに無処理の細胞で得られた細胞核中心部から辺縁部への力学特性の増加傾向がクロマチンの脱凝集を引き起こす Tricostatin A（TSA）処理により消失した．これらの結果から，細胞核の局所的な力学特性は細胞核内の DNA 凝集密度分布を反映することが示唆された．一方で，TSA 処理により力学特性の値そのもの増加傾向が見られた．これは TSA 処理脱凝集によって辺縁部のヘテロクロマチン領域が膨張し，細胞核内部全体が圧迫され，力学特性の増加や均質化が生じた可能性が考えられた．

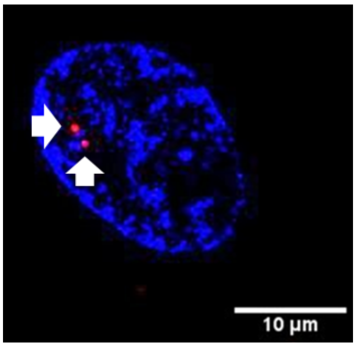

図１　細胞核（青）および導入した蛍光ビーズ（赤）の蛍光顕微鏡画像

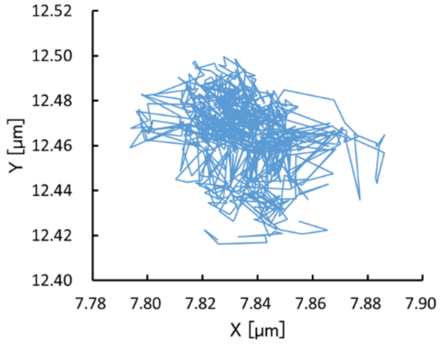

図２　細胞核内に導入した蛍光ビーズの軌跡例

（２）細胞核内ひずみ分布の不均質性
細胞接着基質の伸展に伴い，細胞核には主に伸展方向への引張ひずみ，伸展に対して直交方向に圧縮ひずみがそれぞれ生じていたが，細胞核内分布は不均質であった．相当ひずみ分布も一様ではなくは細胞核中心部で最も高く，また辺縁部でも高くなる傾向が得られた（図３）．DNA 構造の脱凝集を引き起こす Trichostatin A で細胞を処理した結果，細胞核全体のひずみは大きくなったものの，細胞核内の不均質なひずみ分布には変化が見られなかった．また細胞接着基質伸展を細胞核へと伝達すると考えられているアクチンフィラメントを Cytochalasin D で分解した場合も，同様に細胞核内ひずみ分布の不均質性に影響は認められなかった．これらの結果は，細胞核の変形において重要な役割を持つと考えられているアクチンフィラメント構造およびクロマチン凝集状態は，核内ひずみの不均質性には影響を与えず，これらとは異なる細胞内および細胞核内構造因子によってもたらされる細胞核内力学特性の不均質性が重要な役割を持つことを示唆する．
細胞および細胞核の有限要素モデルを作成し，細胞核内の力学特性の推定を行った．細胞に対して接着基質伸展を加えた際に生じる細胞核内ひずみを有限要素モデルを用いて求めた．その際，細胞核内弾性率の相対的分布を変化させ，解析結果を実験で得られたひずみ分布と一致させた．その結果，細胞核内の相対的弾性率は一様にならず，細胞核辺縁部部で低くなった．Trichostatin A 処理のひずみと解析結果を一致させた結果，細胞核全体の弾性率は 2 倍程度まで低くなった．この弾性率変化は Trichostatin A 処理の実験結果と一致する傾向であった．しかし，相対弾性率の細胞核内分布傾向には無処理のものと比べ変化は見られなかった．この結果は，実験結果から示唆された細胞内および細胞核内構造因子による細胞核内力学特性不均質性を支持

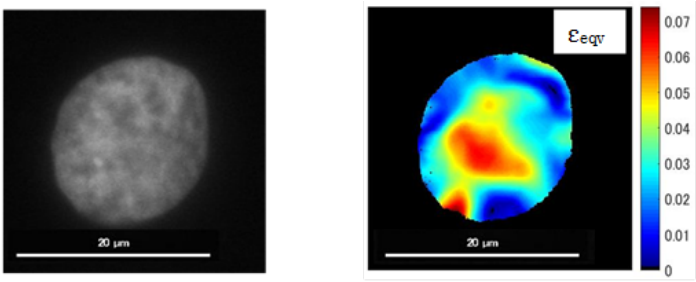

図３　細胞核蛍光顕微鏡画像（左）および基質伸展により細胞核内に生じた相当ひずみ解析結果例（右）

するものであった．

（３）細胞牽引力に対する細胞核の力学的役割

5，15 または 48kPa の異なる弾性率を持つポリアクリルアミドゲル上でヒト線維芽細胞を培養した結果，牽引応力は 15kPa 基質で最も高くなり，5kPa と 48kPa 基質上では差は見られなかった（図４）．DN-KASH 導入細胞においても無処理細胞と同様の傾向が見られた．一方で，得られた牽引応力を最大および最小値で正規化し牽引応力相対頻度を求めた結果，無処理細胞においては細胞牽引応力分布が異なる弾性率基質上でも維持されたのに対し，DN-KASH 導入細胞では接着基質弾性率の増加とともに細胞牽引応力分布が変化した．さらに，分布の変化が顕著な 48kPa 上の細胞のアクチンフィラメント構造を観察した結果，無処理細胞では細胞辺縁部に発達した構造が顕著であったのに対し，DN-KASH 導入細胞ではアクチンフィラメントが辺縁部に加え中央部でも見られた．このことから，細胞核－細胞骨格結合は異なる弾性基質上における細胞骨格および細胞牽引応力の細胞内分布維持に役割を持つと考えられた．

同様に，FRET センサー分子を発現させた細胞を，異なる弾性率を有するポリアクリルアミドゲル上に培養し，細胞核へ作用する張力を評価した．15kPa 基質上では 5kPa および 48kPa 基質上の細胞に比べ FRET 効率が減少した．これは細胞核に作用する張力の増加を意味する．従来，細胞牽引力増加にともなって細胞核へ伝達される力も増加すると考えられてきた．しかし，本研究により基質弾性率変化による細胞牽引応力と細胞核へ作用する張力には逆相関関係が存在することが明らかになった．逆相関変化をもたらすメカニズムは不明であるものの，細胞内張力調節において細胞核も細胞牽引力とは異なる機構で関与している可能性が考えられた．

さらに，細胞牽引力および細胞核へ伝達される力に対して，細胞骨格の一つである中間径フィラメントの役割を検討した．中間径フィラメント分解よりにより，細胞牽引力の増加が確認された．一方で，細胞核へ作用する張力に変化は見られなかった．さらに蛍光タンパク質標識した中間径フィラメントを発現した細胞を用いて，細胞牽引力変化時の中間径フィラメント構造変化の生細胞イメージングを行った．試薬処理により牽引力を抑制した際に，中間径フィラメントが圧縮から解放される挙動が認められた．これらの結果から，中間径フィラメントは細胞内張力バランスにおいて圧縮要素として働き，アクチンフィラメント張力による細胞外基質の変位を抑制している可能性が考えられた．

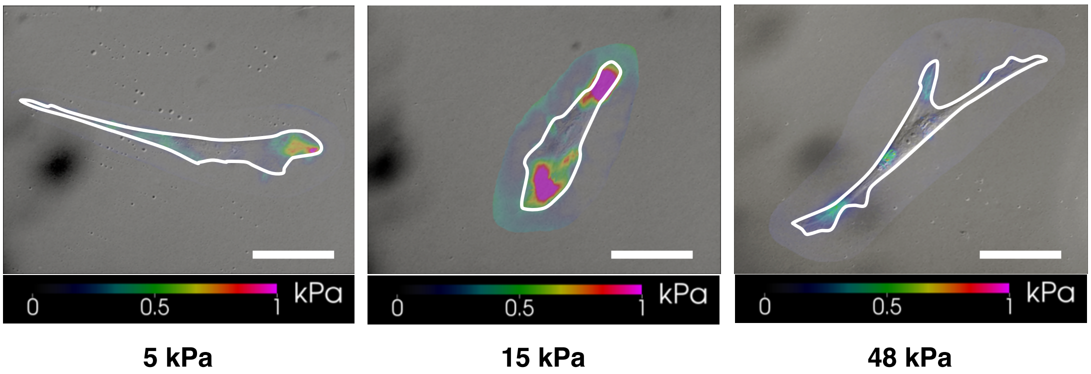

図４　異なる弾性率を有する基質上の細胞牽引力測定結果．
値は基質に生じた牽引応力の大きさ

（４）細胞核弾性特性と転写活性との関係検討

繰り返し伸展刺激にさらされた細胞核の力学特性と転写活性変化との関係を調べる実験として，ヒストンの一つヒストン３のメチル化を免疫蛍光観察した．その結果，伸展刺激負荷１時間後に細胞核中心部のみに蛍光輝度の上昇蛍光が見られ，２４時間後には細胞核全体で蛍光輝度が上昇した．原子間力顕微鏡を用いた押し込み試験結果において細胞核力学特性にも同様な傾向が見られ，力学刺激に対する細胞核の力学特性変化と転写活性との相関が示唆された．

＜引用文献＞

[1] N. Sakamoto, et al, Mechanical role of nesprin-1-mediated nucleus-actin filament binding in cyclic stretch-induced fibroblast elongation. ***Cell Mol Bioeng***, Vol. 10 (4), pp. 327-338, 2017

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Tsukamoto Shingo、Asakawa Takumi、Kimura Shun、Takesue Naoyuki、Mofrad Mohammad R.K.、Sakamoto Naoya	４．巻 119
２．論文標題 Intranuclear strain in living cells subjected to substrate stretching: A combined experimental and computational study	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Biomechanics	６．最初と最後の頁 110292～110292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiomech.2021.110292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

１．著者名 Pauty Joris、Nakano Shizuka、Usuba Ryo、Nakajima Tadaaki、Johmura Yoshikazu、Omori Satotaka、Sakamoto Naoya、Kikuchi Akihiko、Nakanishi Makoto、Matsunaga Yukiko T.	４．巻 9
２．論文標題 A 3D tissue model-on-a-chip for studying the effects of human senescent fibroblasts on blood vessels	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Biomaterials Science	６．最初と最後の頁 199～211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0BM01297A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計21件（うち招待講演　1件／うち国際学会　9件）

１．発表者名 T. Miyano, A. Suzuki, N. Sakamoto
２．発表標題 Effects of the hyperosmolarity-induced cytoskeletal changes of tubule epithelial cells on renal fibrosis
３．学会等名 TMU International Symposium: Multi-scale biomechanics, nano-to macro-scale（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 伊藤佳祐，伊井仁志，Daniel　Conway，坂元尚哉
２．発表標題 接着基質力学特性の違いによって引き起こされる細胞内張力の変化
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 大山侑樹，中村匡徳，木村直行，川人宏次，山崎雅史，藤江裕道，坂元尚哉
2．発表標題 圧縮コラーゲン組織を用いた共培養モデルに対する高壁せん断応力の影響
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 舘林耕平　三好洋美　山崎雅史　坂元尚哉
2．発表標題 間葉系幹細胞の内皮細胞分化効率向上を目指した組合せ力学環境の検討
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 S. Tukamoto, S. Kimura, N. Takesue, N. Sakamoto
2．発表標題 Heterogeneous strain distribution within the nucleus under substrate stretching is caused by chromatin condensation
3．学会等名 2019 BMES Annual Meeting（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 N. Sakamoto, K. Kashima, M. Takeuchi, N. Kataoka
2．発表標題 Roles of nuclear membrane proteins in cyclic stretch-induced changes of nuclear elasticity of fibroblasts
3．学会等名 2019 BMES Annual Meeting（国際学会）
4．発表年 2019年

１．発表者名
S. Ii, K. Ito, N. Takakusaki, N. Sakamoto

２．発表標題
Inverse Estimation of 3-D Traction Stress Field of Adhered Cell based on Optimal Control Technique using Image Intensities

３．学会等名
International Conference on Biomehanics and Medical Engineering（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
松下 晃次郎, 坂元 尚哉, 伊井 仁志, 三好 洋美

２．発表標題
ヒト間葉系幹細胞の骨分化過程における細胞核内局所粘弾性の定量評価

３．学会等名
日本機械学会2019年度年次大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
N. Sakamoto, Y. Oyama, Y. Horie, M. Nakamura, N. Kimura

２．発表標題
Matrix metalloproteinase production of vascular endothelial cells under extremely high wall shear stress condition. The International Society of Biorheology

３．学会等名
The International Society of Biorheology（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
N. Sakamoto, M. Ogawa, K. Sadamoto, M. Takeuchi, N. Kataoka

２．発表標題
Mechanical conditions of nesprin-mediated nucleus-actin filament bindings affect polarized elongation of fibroblasts induced by cyclic stretching

３．学会等名
8th World Congress of Biomechanics（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
木村　俊，三好　洋美，伊井　仁志，坂元　尚哉

２．発表標題
パーティクルトラッキング法による細胞核内局所力学特性の評価

３．学会等名
日本機械学会第29回バイオフロンティア講演会

４．発表年
2018年

１．発表者名
堀江悠太，大山侑樹，中村匡徳，木村直行，川人宏次，坂元尚哉

２．発表標題
血管内皮細胞の遊走および剥離に対する衝突流れ場の影響

３．学会等名
日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会

４．発表年
2018年

１．発表者名
香嶋　謙志郎，竹内　雅貴，片岡　則之，坂元　尚哉

２．発表標題
繰り返し伸展刺激による繊維芽細胞核の弾性特性変化における核膜タンパク質の役割

３．学会等名
日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会

４．発表年
2018年

１．発表者名
S. Tsukamoto, S., Kimura, N. Takesue, N. Sakamoto

２．発表標題
Condensation Level of Chromatin Affects Local Strain within the Nucleus under Mechanical Stimuli

３．学会等名
3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名 宮野貴士，鈴木敦詞，坂元尚哉
２．発表標題 高浸透圧刺激による尿細管細胞の細胞骨格構造の変化が腎線維化に与える影響
３．学会等名 第59回日本生体医工学会大会
４．発表年 2020年

１．発表者名 K. Matsushita, N. Sakamoto, S. Ii, H. Miyoshi
２．発表標題 Quantitative analysis of nuclear local viscoelastic changes in human Mesenchymal Stem Cells during osteoblast differentiation
３．学会等名 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference 2020（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 S. Tsukamoto, S. Kimura, T. Asakawa, N. Takesue, M.R.K. Mofrad, N. Sakamoto
２．発表標題 Intranuclear mechanics under cell substrate stretching: AN experimental and computational study
３．学会等名 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference 2020（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 松下 晃次郎，坂元 尚哉，伊井 仁志，三好 洋美
２．発表標題 ヒト間葉系幹細胞の細胞核内粘弾性変化の骨芽細胞分化における役割
３．学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
４．発表年 2020年

１．発表者名 鈴木敦詞，宮野貴士，坂元尚哉
２．発表標題 高浸透圧条件下における尿細管細胞内カルシウムイオン濃度変化
３．学会等名 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会
４．発表年 2020年

１．発表者名 宮野貴士，鈴木敦詞，坂元尚哉
２．発表標題 高浸透圧刺激による尿細管細胞の細胞骨格構造の変化が腎線維化に与える影響
３．学会等名 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会
４．発表年 2020年

１．発表者名 塚本真悟，Keng-Hwee Chaim，武居直行，坂元尚哉
２．発表標題 細胞核変形の細胞外基質伸展方向との関係
３．学会等名 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Mechanobiology Laboratoryのホームページ
http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/mechanobio/index.html

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	三好　洋美 (MIYOSHI HIROMI) (50455367)	東京都立大学・システムデザイン研究科・准教授 (22604)	
研究分担者	伊井　仁志 (II SATOSHI) (50513016)	東京都立大学・システムデザイン研究科・准教授 (22604)	

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			
米国	Virginia Commonwealth University	University of California, Berkeley		
シンガポール	シンガポール科学技術研究庁バイオ情報研究所			