

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12781

研究課題名(和文) 可逆的に変調可能なしわ基板を用いた筋管形成の動的制御技術の開拓

研究課題名(英文) Development of a technique to dynamically control myotube formation using wrinkle substrates with reversibly switchable topography

研究代表者

鈴木 量 (Suzuki, Ryo)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：10768071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：疾患や発生の過程における細胞外基質の動的変化に対する細胞応答は、細胞組織の恒常性という観点から見て重要である。本研究では筋管形成に着目し、トポグラフィを変えられるしわ基板を用いて筋管形成能の獲得・喪失を定量解析し、筋管形成の動的制御技術を開拓した。研究成果として、しわ基板上で野生株の筋管形成能が促進されることを細胞集団の形状と方向秩序変数を用いて定量的に明らかにし、分化できないPIEZ01欠損細胞を筋管形成へと導くことに成功した。また、様々な時点でしわ方向を90度変化させた結果、筋管形成初期では新しいしわの方向に筋管形成できるが、後期ではトポグラフィ変化の影響を受けないことを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外基質による細胞制御は細胞接触誘導と呼ばれ、様々な凹凸構造基板を用いた細胞応答の研究は数多く報告されてきた。しかし、多くは凹凸構造の方向や波長を変えられない静的な基板を用いたものに限られており、組織における機能と微小環境構造変化の関係性の本質に切り込めていなかった。そのため、本研究で得られた成果は学術的に非常に重要である。また社会的意義として、本研究で扱った既存のトポグラフィを改めて変えるといった本来自然界で行われている環境構造の動的変化は発生や疾患の過程で生じる細胞外基質の動的な変化に対する細胞応答の理解にも展開可能であり、筋管形成に限らず様々な系の動的制御技術に応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：How cells respond to dynamical changes of the extracellular cellular matrix is important for the homeostasis of cellular tissues. Using wrinkle substrates where surface topography can be modified, we studied the influence of topography on myotube formation by quantitative analysis of gain/loss of myotube formation capability and developed a technique to dynamically regulate myotube formation.

Here, we found that on wrinkle substrates (1) myotube formation capability was enhanced for wild-type cells, via quantitative analysis of physical readouts such as shape and directional order parameter of cell populations and (2) PIEZ01 knock-out cells, that typically do not form myotubes, could form myotubes. Also, dynamically changing the wrinkle direction during the myotube formation process, we discovered that in the early phases of myotube formation, cells created myotubes in the new wrinkle direction while in the latter stages, cells did not respond to the change in wrinkle direction.

研究分野：生物物理

キーワード：筋管形成 細胞接着誘導 方向秩序

## 1. 研究開始当初の背景

生物のもつ重要な性質のひとつである細胞組織の恒常性は、細胞同士あるいは細胞と細胞外基質の相互作用によって維持されている。なかでも、細胞外基質による細胞制御は“contact guidance” (細胞接触誘導) と呼ばれ、細胞外基質を転写した基板を用いた組織修復や胚発生の研究は90年代より行われてきた。

一方、人工基板材料を用いた contact guidance 研究は、マイクロコンタクトプリンティングを用いて作成した細胞外基質のマイクロパターンや、リソグラフィを用いて作成した溝と畝のような凹凸パターンをもつ基板を使って様々な細胞を対象に広く研究が行われてきた。しかしながら、これらの研究は一度基板にできた凹凸構造の方向や波長を変えられない「静的」な基板を用いたものに限られており、大多数はこれら静的凹凸構造に細胞が応答し終えた状態での形状や配向の定性的観測に留まっていた。そのため、発生や疾患の過程で生じる細胞外基質の動的な変化に対する細胞応答の本質には切り込めていない。

## 2. 研究の目的

細胞外基質のもつ非対称的な構造や機能に対して細胞の形状や運動が影響を受けるが、すでに細胞がある構造に適応している状況から別の構造に変えるという「動的」トポグラフィ変化に対する細胞・細胞群の応答を観測・解析することは今まで不可能であった。そこで本研究では筋芽細胞が筋管へと分化する過程に着目し、異方性をもった基板(しわ基板)のトポグラフィの動的変化といった力学的刺激が筋管へ分化するメカニズムに与える影響を明らかにするだけでなく、筋管形成の動的制御技術も開拓する。

具体的には、(A)「静的」しわ基板上でトポグラフィが筋管形成に与える影響を細胞集団の形状(アスペクト比)や方向秩序変数といった物理的指標を用いて定量解析する。また、一見分化できない遺伝子変異株を筋管形成へと導くことができるかを探索する。さらに、(B)しわ基板のトポグラフィの「動的」変化と筋管形成能の関係性を野生株と筋管形成できない遺伝子変異株で定量的に探ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 「静的」しわ基板における筋管形成

まず初めに、筋管が形成されるまでの間、しわ基板上で細胞実験できるように基板を最適化するのに加えて、細胞が基板のトポグラフィの情報を読み取れるしわ波長範囲を決定する。ここで得られた結果を基に、最適化したしわ波長を用いて contact guidance による細胞集団の挙動を形状(アスペクト比)としわ方向に対しての方向秩序変数といった物理的指標を用いて定量解析することにより、微小環境の構造によって野生株における筋管形成の手助け・促進のみならず、一見分化できない PIEZO1 欠損細胞を筋管形成へと導くことができるかを探索する。それらをしわのない平面基板の結果と比較する。

### (2) トポグラフィと表層アクチン構造の関係性

筋管形成を行うためには、単に細胞同士が結合し合うだけでは不十分であり、細胞の方向的秩序を作り出すのに加えて、コントロールされた細胞結合を可能とし、異常な合胞体の形成を防ぐために表層のアクチン構造の形成が必要であることから細胞骨格構造としわ基板の関係性を各細胞種で調べる。

### (3) 「動的」しわ基板を用いた筋管形成能の制御

ここでは筋管形成能とトポグラフィ変化の関係性を定量的に探るため、分化開始培地を細胞に加えてから筋管が形成されるまでの所要時間を用い、その間の様々な時点でしわ方向を90度変化させる。特に筋管形成の初期や後期において、トポグラフィ変化後の新しいしわ方向に対して筋管形成できるかどうかなどといった筋管形成のポテンシャル・ランドスケープを得ることにより、機能の獲得・喪失をトポグラフィ変化によって制御できるようになる。また、筋管形成できない遺伝子変異株で同じ実験を行うことで筋管形成における内部因子(遺伝子変異)と外部因子(しわの動的な変化)の競争・相関を解明する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 「静的」しわ基板における筋管形成

ここではまずしわ基板の作成工程の最適化により、従来数時間しか安定でなかった基板が筋管形成に要する 72 時間の間溶液中で安定している基板の作成に成功した。さらに、しわ基板は波長を 1-10 ミクロンの間で自在に制御でき、その範囲の中でも 2-6 ミクロンの間が一番細胞応答および基板安定性の高い範囲であることがわかった。

ここで得られた波長条件を用いて、しわ基板のトポグラフィが野生株における筋管形成の手助け・促進のみならず、一見分化できない PIEZO1 欠損細胞を筋管形成へと導くことができるかを探索した (図 1)。

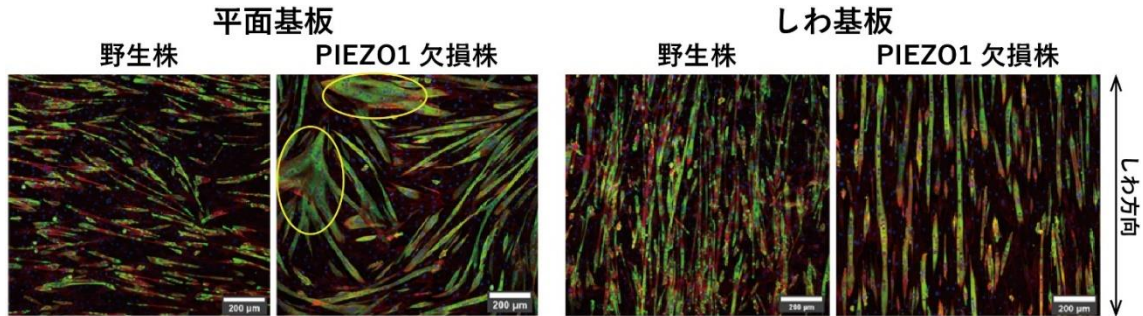


図 1 : 野生株と PIEZO1 欠損株の筋管形成能の比較。筋管形成能のない PIEZO1 欠損細胞は、平面基板では異常な合胞体を形成する (黄枠) がしわ基板上では筋管形成する。緑 (ミオシン重鎖)、赤 (アクチン)、青 (核)。スケールバー : 200 $\mu$ m。

図 2 にはトポグラフィによる細胞集団の挙動の定量解析結果を示す。ここでは筋管形成能を定量的に調べるために合胞体のアスペクト比とネマチック秩序変数を計算した。アスペクト比について、本来筋管が形成される過程では細胞同士が単に結合し合うだけでは不十分であり、細胞の方向的秩序を作り出し結合するため細長い構造を見せる、即ちアスペクト比が増加する。また、筋管同士が連結してより大きな秩序構造を形成するためには筋管の方向的秩序も作り出す必要がある。これをネマチック秩序変数  $S = \cos(2\alpha_i)$  によってどの程度筋管同士が同じ方向を向いているかを定量化した。ここで  $\alpha_i$  は  $i$  番目の筋管・合胞体を楕円でフィッティングした時の長軸としわ方向のなす角で、すべて同じ方向を向く場合  $S = 1$  となる。

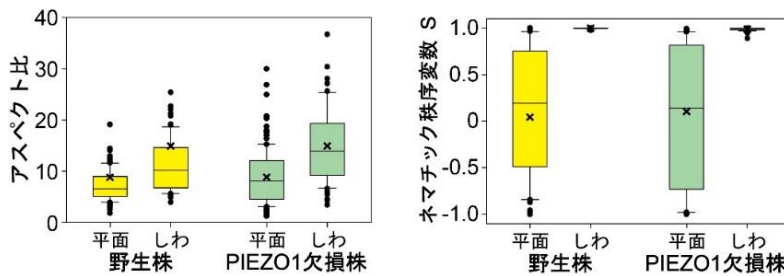


図 2 : トポグラフィによる細胞集団の挙動の定量解析。合胞体の (左) アスペクト比、(右) ネマチック秩序変数  $S$ 。

顕微鏡画像に加えて定量解析を行うことにより、野生株においては基板に関わらず筋管形成するがしわ基板上では細胞の方向的秩序がより促進されたことを明らかにした。一方で PIEZO1 欠損株については、平面基板上では細胞の方向的秩序が不十分であることにより異常な合胞体を形成するが、しわ基板上では野生

株と同様に筋管が形成されることを突き止めた。筋管形成能のない細胞集団が微小環境の構造によって筋管形成能力を獲得したという今回の結果はトポグラフィの重要性を示している、筋管のみならず他の細胞系にも応用できることが期待される。

##### (2) トポグラフィと表層アクチン構造の関係性

筋管が形成される過程では伸びた合胞体の端同士が連結し伸長していくが、これを可能としているのが合胞体の両端以外の表層アクチン構造 (図 3 左) の存在であり、あらゆる方向に結合することを防ぐ。PIEZO1 欠損細胞ではこの表層アクチン構造が形成されないため、全方位から合胞体同士が結合しシート状の異常な合胞体を作り出される。そこで、しわ基板上では筋管形成が可能な PIEZO1 欠損細胞の表層アクチン構造に着目した結果、平面基板では形成できなかったものの、しわ基板上では形成することを明らかにした (図 3 右)。

本来 PIEZO1 による  $Ca^{2+}$  流入が RhoA/ROCK 依存的なアクチン・ミオシン構造形成を促進することにも関わらず、しわ基板上では PIEZO1 欠損株でも表層アクチン構造および筋管を形成すること

から野生株を用いてROCKを阻害する実験も行った。平面基板上では阻害剤を使用することで表層アクチン構造を見せる細胞が減り、筋管に見られる秩序構造を失うことを見出した。しかし、しわ基板上だと阻害剤の影響はなく、筋管が形成されることもわかり、トポグラフィがシグナル経路のより上流に作用していることを示唆する結果が得られた。

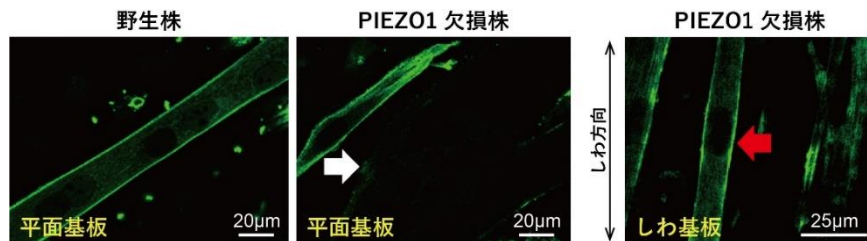


図3：(左) 平面基板上での野生株と PIEZO1 欠損株の表層アクチン構造の違い。PIEZO1 欠損細胞の合胞体では表層アクチン構造が見られない(白矢印)。*[Tsuchiya, ..., Suzuki, ..., Nat. Commun. 2018]*。(右) しわ基板上では PIEZO1 欠損株でも表層アクチン構造が形成される (赤矢印)。緑 (アクチン)。

### (3) 「動的」しわ基板を用いた筋管形成能の制御

ここでは分化開始培地を細胞に加えてから筋管が形成されるまでの所要時間を用い、その間の様々な時点でしわ方向を90度変化させる実験を行った。

図4左に示すように、野生株では分化開始から2日後にしわ方向を変化させた時と、3日後に変化させた時で分化した筋管のみならず、単細胞レベルでもトポグラフィの動的変化に対する

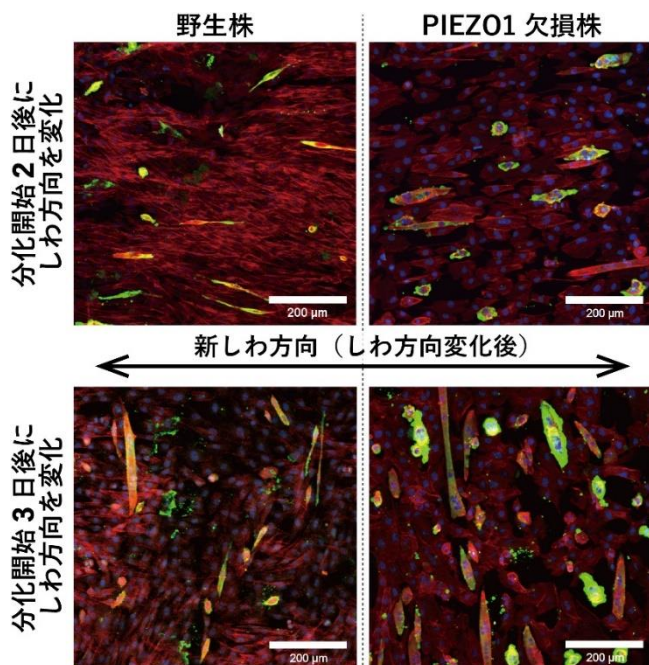


図4：トポグラフィの変化による筋管形成能の制御。緑 (ミオシン重鎖)、赤 (アクチン)、青 (核)。スケールバー：200µm。

応答が著く異なることを発見した。まず2日後にしわ方向を変化させた場合、すべての細胞が新しわ方向 (変化後の方向) と同じ方向に整列した。しかし3日後の場合、(ミオシン重鎖で示す) 筋管と単細胞の大半はトポグラフィ変化に対して応答を見せなかった。このことから筋管形成という機能の獲得・喪失をトポグラフィ変化によって制御できることがわかった。

さらに、筋管形成における内部因子 (遺伝子変異) と外部因子 (しわの動的な変化) の関係性を解明するため、PIEZO1 欠損細胞を用いてしわ方向を変化させる実験を行った。野生株と同様に、2日と3日の間で細胞集団の応答が変化した (図4右)。これらの結果によって、疾患や発生の過程で生じる細胞外基質の動的な変化に対する細胞応答の本質的理解に一步近づいただけでなく、機能をトポグラフィの動的変化でコントロールする技術開拓の第一歩となった。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiomi, A.; Nagao, K.; Yokota, N.; Tsuchiya, M.; Kato, U.; Juni, N.; Hara, Y.; Mori, M. X.; Mori, Y.; Ui-Tei, K.; Murate, M.; Kobayashi, T.; Nishino, Y.; Miyazawa, A.; Yamamoto, A.; Suzuki, R.; Kaufmann, S.; Tanaka, M.; Tatsumi, K.; Nakabe, K.; Shintaku, H.; Yesylevsky, S.; Bogdanov, M.; Umeda, M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Extreme deformability of insect cell membranes is governed by phospholipid scrambling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109219 ~ 109219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109219	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------