

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18041

研究課題名（和文）細胞張力計測に基づく細胞の曲面形状認識・応答挙動の解析

研究課題名（英文）Investigation of cellular curvature recognition and response mechanism based on cellular traction force measurement

研究代表者

山下 忠紘 (Yamashita, Tadahiro)

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・准教授

研究者番号：00827339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マイクロ曲面上に存在する細胞が接着面に及ぼす牽引力の評価手法を開発した。そして、培養面が持つ曲率が細胞集団の変形挙動や表現型に及ぼす影響を調査した。マイクロ曲面が細胞が発する牽引力の大きさに直接的には大きな影響を与えない一方で、細胞内小器官の変形を通じてアルファ平滑筋アクチンを含む表現型マーカーの発現量変化を促すことが明らかになった。これらの知見に基づき、曲面からなる細胞培養足場を設計・構築することで、これまでに無い形状入力に基づく細胞の振る舞いの操作が可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでに細胞の振る舞いに影響を与えないと考えられてきた培養面のわずかな曲率が、細胞の集団的な変形や表現型の変化に強い影響を与えることが明らかになった。凹状曲面上で細胞の変形挙動がシンプルな力学に従って剥離・凝集挙動を示す一方で、凸状曲面上に存在する細胞は細胞内小器官の変形をきっかけにその表現型を変えることを示唆する結果が得られた。本研究を通じて得られた成果は、組織工学や再生医療において、複雑な形状の足場を製作し、細胞の振る舞いを望み通りに誘導するための基盤的な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a new measurement technique of cellular traction force applied onto the cell adhering surface with a curvature of several hundred microns. We then investigated the influence of the substrate curvature onto the collective cellular deformation and phenotype change. The substrate curvature at several hundred microns did not have a considerable impact on the cellular traction force. On the other hand, such substrate curvature significantly changed the expression levels of cellular phenotype marker including alpha Smooth muscle actin. These findings will be of importance in designing scaffold material with curvatures that aim to control cellular complex behaviours in tissue engineering in the future.

研究分野：生体医工学

キーワード：血管平滑筋細胞 曲率 表現型

1. 研究開始当初の背景

20 世紀の分子生物学の発展により、生命活動の根幹が緻密に制御された生化学反応のネットワークであることが明らかになった。しかしながら近年、細胞の分化や発生あるいはガン化といったあらゆる生命現象に、生化学反応だけでは解釈できない力学的なメカニズムが介在していることが示され、その仕組みを究明する複合生物学領域がメカノバイオロジーとして急速に発展し、注目を集めている。すなわち、メカノバイオロジーの核心は「細胞は力や形状といった力学的な情報をどのようにして生化学反応と結びつけ、組織・生体の機能制御に用いているか」を理解することにある。研究代表者はこの領域において、単一細胞より数十倍以上スケールが大きく、従来細胞や組織の影響を与えることは無いと認識されてきた直径数百 μm ～数 mm の曲面が組織の形態形成に強い影響を与えることを発見し、細胞が立体的な組織を形成するプロセスを A. 接着面の曲率 B. 細胞が発する張力 C. 細胞の接着力からなる接着界面の力学バランスに基づいて説明する物理モデルを世界に先駆けて提唱した。今後このモデルを定量的に検証することで、「接着界面の力学バランスがどのような分子メカニズムを通じて細胞の形状認識能力や機能制御に影響を与えるか」を解明し、発生や癌化といった生体スケールの生命現象の理解や、組織工学的に細胞から複雑な組織や臓器を作り上げる際の設計指針の樹立を目指し、研究に取り組んでいる。以降、本報告書において、「単一細胞よりも大きい、曲率半径百 μm ～数 mm 程度の平滑な曲面」をマイクロ曲面と呼ぶ。

2016 年以降、マイクロ曲面上に存在する細胞が、平面上と全く異なる遊走挙動や伸展形態、さらには分化まで示すことが複数の研究グループから相次いで報告された。これらの報告は、細胞が接着面のわずかな曲率を何らかの力学的な仕組みを通じて認識し、内部の生化学反応系を制御するメカノセンシング機構の存在を強く示唆するものであるが、その実態は全く明らかになっていない。申請者らはこれまでに得られた研究結果と文献調査に基づき、「細胞骨格によって連結された細胞接着部と細胞核に加わる力のバランスが下流の細胞内シグナルの増減を決め、曲率に依存した細胞の応答を生み出すのではないか」という着想を得た。本研究はこの考えに基づき、細胞張力の測定技術を基軸に様々な実験手法を組み合わせることで、細胞の曲面感知に関わる細胞内小器官・分子複合体を見つけ出し、「細胞がどのような仕組みを通じて周辺の形状を解釈するか」を理解することを目指す。

2. 研究の目的

本研究はその目的を、細胞張力の曲面認識への寄与を定量的に解析し、細胞が接着面の曲率を認識する仕組みを明らかにすることと定め、研究対象を以下の 2 点に定めた。

【A. マイクロ曲面上における細胞張力の定量評価手法の開発】- 本研究はまず、曲面認識における細胞張力の寄与を検証するため、培養面の曲率を操作可能なマイクロデバイスを用いた新しい細胞張力計測法を開発し、従来手法では困難であった曲面上での細胞張力計測を実現する。そして、この技術を基盤に「細胞張力-培養面の曲率-細胞挙動の相関」を精査する。このような工学的手法に基づく定量的アプローチを通じ、力学をベースとした細胞の形状認識を司る分子メカニズムを初めて追求することが可能となる。

【B. 曲率検知を司るメカノシグナリング経路の解明】- 次に本研究は、細胞張力を発するアクチン細胞骨格と連結した構造体であり、近年メカノセンサーとしての役割が急速に解明されている焦点接着斑と細胞核に着目し、これらの活性と、培養面の曲率および細胞張力の相関を定量的に解析する。そして、細胞の曲面認識へのこれらの構造体の寄与を精査し、関連分子が細胞の曲面応答を制御する仕組みを明らかにしていく。

3. 研究の方法

本研究はまず、空気圧の制御により曲率半径数百 μm のマイクロ曲面を作り出すことができる空圧制御マイクロデバイスを作成した。直径 2 μm 、高さ 6 μm のマイクロピラーを多数持つポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロピラーアレイシートを作製し、これを空気圧を用いて曲面基板に接合した。この作業を通じて、曲率半径 500 μm の凸曲面上に多数のマイクロピラーが作り込まれたマイクロ曲面ピラーアレイを製作した。この表面に細胞接着性タンパク質を塗布し、ヒト大動脈血管平滑筋細胞(HASMC)を播種して培養した。培養後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてマイクロ曲面ピラーアレイの様子を観察し、各ピラーのたわみから HASMC が培養面に及ぼす牽引力を算出した。この牽引力の大きさを、平面上と曲面上で比較し、培養面の曲率が、細胞が培養面に及ぼす牽引力に及ぼす影響を評価した。

本研究は次に、曲面上に存在する細胞集団の変形挙動のモデル化に取り組んだ。一細胞を一粒子に近似する粒子ベース力学モデルを作成し、細胞集団が凹状マイクロ曲面から剥離する様子を、数値シミュレーションを通じて再現した。同様の形状を持つ基板上で HASMC を培養し、そ

の形態を観察することで、力学モデルの妥当性を検証した。

本研究はさらに、曲率半径 50~500 μm の球状曲面を持つ PDMS 製マイクロ加工基板を作製し、HASMC を培養した。そして、細胞が持つ表現型マーカーであるアルファ平滑筋アクチン(αSMA)、カルポニンなどの発現量を評価した。

4. 研究成果

マイクロ曲面ピラーアレイを用いる実験から、曲面・平面とも細胞が 1 ピラーあたり 6nN 程度の牽引力を発揮していることが明らかになった。この値は、HASMC の牽引力発生を増強することが知られる TGF- β の存在下では 1.5 倍程度に増加した。TGF- β の添加によって明確に細胞の牽引力発生が増加したのに対し、曲面と平面の間で細胞が発する牽引力の大きさに明確な差は見られなかった。この結果から、培養面が持つ曲率半径数百 μm 程度の曲面構造は、細胞が発する力の大きさそのものには影響を与えないことが明らかになった。

新規に作成した粒子ベース力学モデルによって細胞集団の変形挙動を予測したところ、培養面の曲率が大きくなるに従って、細胞集団が凹状マイクロ曲面から剥離する様子が得られた。この曲率依存的な細胞集団の剥離挙動は、細胞張力の増加と現象に伴って、それぞれ促進あるいは抑制されることが示唆された。実験的に培養された HASMC はシミュレーション結果と同様の振る舞いを示し、マイクロ曲面上における細胞集団の変形挙動が、比較的シンプルな力学に従うことが示された。さらに、シミュレーション結果の詳細な解析を通じて、細胞集団の剥離現象が、細胞牽引力の局所的な集中、細胞-基板接着の部分的な破断、細胞集団の大変形のサイクルによって加速度的に進行することが明らかになった。本モデルを利用することで、様々な形状を持つ立体的な基板上で細胞集団の剥離・変形挙動を予測することができるようになった。

凸状マイクロ曲面上で培養された HASMC において、培養面の曲率半径が 50 μm から 500 μm へと増大するにつれ、収縮型表現型マーカー αSMA とカルポニンの発現量の増加が見られた。一方で、増殖型表現型マーカーであるオステオポンチンと S100 α には、培養面の曲率の変化に対して単調な増減の傾向が見られなかった。アクチン細胞骨格と細胞核の結合を仲介する Nesprin をロックダウンした HASMC を曲面上で培養したところ、曲率依存的な細胞の表現型変化が抑制された。一方で、この細胞に対して、培養面に押し付けるような圧力を加えたところ、HASMC の αSMA 発現が促された。この結果は、細胞核の変形が、細胞が足場の形状を検知するためのセンサーとなっていることを示唆する。また、曲面上で培養された血管平滑筋細胞内における、転写因子 MRTF および YAP の局在を調査した。曲面及び平面で培養された血管平滑筋細胞内で MRTF の局在に違いが見られなかった一方で、YAP は曲面上でより顕著に細胞質内に局在した。これまでに、細胞核の圧縮が YAP の細胞核内移行を促すことが知られているが、血管平滑筋細胞は逆の傾向を示した。このことは、血管平滑筋細胞が他の細胞とは異なる機械応答を示す可能性を示唆している。

以上の一連の研究成果は、モデル細胞である HASMC が、培養面のわずかな曲率に対し、凹面においては力学的な応答を、凸面においては生物学的な応答を示し、それぞれ異なる振る舞いを示すことを明らかにした。特に、凸状の曲面が HASMC に与える表現型マーカー発現量の変化は、従来血管平滑筋細胞において知られる収縮型と合成型を行き来するような表現型変化とは異なる表現型調節を、HASMC が曲面上で行うことを示唆している。これらの知見は、組織工学分野において、望み通りの形状や機能を持つ組織を構築するための足場形状の製作において、重要な設計指針を供することが期待される。また今後、細胞が曲率依存的な振る舞いを示す分子機序の詳細を解明することで、細胞が持つ 2 次元および 3 次元環境に通底する形状認識機構が明らかになることが期待される。以上のように本研究は、細胞の張力発生に着目し、曲面上における特異な振る舞いを生み出す力学的・生物学的機序の一端を明らかにした。

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 Matsuzawa Ryosuke, Matsuo Akira, Fukamachi Shuya, Shimada Sho, Takeuchi Midori, Nishina Takuya, Kollmannsberger Philip, Sudo Ryo, Okuda Satoru, Yamashita Tadahiro	4. 巻 166
2. 論文標題 Multicellular dynamics on structured surfaces: Stress concentration is a key to controlling complex microtissue morphology on engineered scaffolds	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 301 ~ 316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2023.05.012	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12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山下忠紘, 松澤諒介, 松尾彬, 深町崇耶, 嶋田聖, 竹内翠, 仁科拓哉, Philip Kollmannsberger, 奥田覚, 須藤亮
2. 発表標題 立体面で培養された細胞シートの脱離・変形・破断を記述する粒子ベース力学モデル
3. 学会等名 第3回 細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸井櫻子, 須藤亮, 田中信行, 山下忠紘
2. 発表標題 画像解析による細胞識別と細胞形態分析を用いた高密度な細胞の遊走追跡方法の開発
3. 学会等名 第36回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 磯部勇雅, 山下忠紘, 須藤亮
2. 発表標題 YAP活性がマイクロ曲面上で培養された血管平滑筋細胞の表現型に及ぼす影響の調査
3. 学会等名 第36回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 丸井櫻子, 田中信行, 須藤亮, 山下忠紘
2. 発表標題 画像分割処理と細胞の形態分析に基づく高密度に培養された細胞の遊走軌跡の取得
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会 (ROBOMECH) 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nobuyuki Tanaka, Nobuko Fujita, Tadahiro Yamashita, Koichi Takahashi
2. 発表標題 Semantic segmentation using deep convolutional neural network towards trajectory tracking in dense cell population
3. 学会等名 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (JSB2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tadahiro Yamashita, Ryosuke Matsuzawa, Akira Matsuo, Shuya Fukamachi, Sho Shimada, Midori Takeuchi, Takuya Nishina, Philip Kollmannsberger, Ryo Sudo, Satoru Okuda
2. 発表標題 Particle-based cellular model to simulate microtissue deformation on structured surfaces
3. 学会等名 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (JSB2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryosuke Matsuzawa, Akira Matsuo, Shuya Fukamachi, Midori Takeuchi, Takuya Nishina, Philip Kollmannsberger, Ryo Sudo, Satoru Okuda, Tadahiro Yamashita
2. 発表標題 Particle-based modelling approach to understanding the detaching mechanism of microtissue from structured surfaces
3. 学会等名 CurvoBio 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下忠紘, 松澤 諒介, 松尾 瑛, 深町 崇耶, Philip Kollmannsberger, 須藤 亮, 奥田 覚
2. 発表標題 マイクロ構造体上での組織変形を記述する粒子ベース力学モデルの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadahiro Yamashita
2. 発表標題 Modelling multicellular dynamics for versatile prediction of microtissue morphology formed on 3D engineered scaffolds
3. 学会等名 Mechano-X BIO&CHEM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下忠紘
2. 発表標題 曲面上での血管平滑筋細胞の振る舞いを解析するマイクロデバイスの開発
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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内翠, 須藤 亮, 山下 忠紘
2. 発表標題 曲面培養面上の細胞張力計測手法の開発
3. 学会等名 日本機械学会 第32回 バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科 拓哉, 鈴木 駿太, 須藤 亮, 山下 忠紘
2. 発表標題 接着面の曲率が血管平滑筋細胞の表現型に及ぼす影響の調査
3. 学会等名 日本機械学会 第32回 バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ryosuke Matsuzawa, Midori Takeuchi, Takuya Nishina, Tadahiro Yamashita	4. 発行年 2022年
2. 出版社 The Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 26
3. 書名 Material-based Mechanobiology, Chapter 10 Curvature Mechanobiology	

〔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			
ドイツ	Heinrich Heine University Duesseldorf			
スイス	ETH Zurich			