

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19902

研究課題名(和文)細胞核への力学刺激によるDNAの分散誘導とこれを用いた細胞機能制御の試み

研究課題名(英文) Induction of DNA dispersion by mechanical stimulation of the nucleus and its possible application to cell function control

研究代表者

松本 健郎 (Matsumoto, Takeo)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：30209639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を幅10 μm 、長さ100 μm の狭隘部を有するマイクロ流路に通し細胞核を圧縮した。流路通過で核内DNA凝集塊の数が減ったが総体積は変わらず、凝集塊同士が融合した可能性が考えられた。また、流路通過で細胞増殖率が低下した。S期の細胞核に振幅1 μm 、周波数800Hzの動的圧縮を5分間加えると、凝集塊の数が有意に低下、細胞核の投影面積は変化なかった。非S期の場合は、凝集塊数が増加、投影面積も有意に増加した。S期では複製のためにDNAが緩むため外力で凝集塊が減少し、また緩んだDNAが核膜を内側から押すことにより核内圧が上昇し、核が潰れにくくなった可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞核を圧縮することでクロマチン凝集体の個数や総体積が変化することは判っていたが、細胞周期の影響があることが確認できた点、また、その影響がS期と非S期のクロマチンの凝集状態の違いから説明できそうであることが判った点が第1の成果である。またこれまでは凝集体の個数や体積の変化の理解に留まっていたが、マイクロ流路を通すことにより、増殖能にも変化が現れることが判った点が第2の成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast-like cells MC3T3-E1 were passed through a microchannel having a narrow portion of 10 μm in width and 100 μm in length to compress the cell nuclei. The number of intranuclear DNA aggregates decreased after passage through the channel, but the total volume did not change, suggesting the possibility that the aggregates fused together. In addition, the cell proliferation rate decreased after passage through the channel. When dynamic compression with an amplitude of 1 μm and a frequency of 800 Hz was applied to the S-phase nuclei for 5 min, the number of aggregates decreased and the projected area did not change significantly. In the non-S phase, the number of aggregates and the projected area increased significantly. The DNA become loosened due to replication in the S phase. This may disassemble the aggregates easily. In addition, the loosened DNA may push the nuclear membrane from the inside and it may make the nucleus less likely to collapse.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：メカノバイオロジー 細胞核 クロマチン DNA 力学刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞核内の DNA の物理的な分布の違いが、細胞の機能発現に影響を与えることが認識され始めている。例えば、血管壁内の平滑筋細胞は増殖やタンパク合成は殆ど行わず、収縮能に富んだ『収縮型』というタイプの細胞であり、核内部では高濃度の DNA (正確には DNA とタンパク質の複合体であるクロマチン) が核膜付近に集中しており、核中央部の DNA 濃度は低い。一方、これを数週間培養すると収縮能は失われる代わりに増殖が盛んな『合成型』に変化し、この際は DNA が核内に緩やかに満遍なく広がった状態になっている。タンパク質の合成には DNA の 2 重らせんがほどこけ、mRNA への転写が起こることが必要であるが、収縮型の細胞では、エメリンなどのタンパク質により DNA が核膜に固定されているためにこのような反応が起こらず、後者では、DNA の 2 重らせんが緩みやすいため mRNA の合成が生じやすく、結果としてタンパクの合成、更には増殖が活発になるのではないかと考えられている。一方、我々は、核内の DNA 分布が核の変形で容易に変化することを見出した。即ち、細胞に外部から圧縮力を加えることにより、核膜に曲げや伸展などの変形が生じ、これにより核膜に留められていた DNA が外れて核内に分散し、転写が盛んになる可能性が考えられている。

そこで我々は PDMS 製の細溝付き基板に細胞を播き、基板を引張って細溝を広げて溝に細胞を落とし込み、基板を元に戻すことで細胞核を圧縮する系を作製し、マウス頭頂骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の核に対して繰返圧縮を負荷した際の核内クロマチン分布の変化を調べてみた。その結果、核を 1 回しか圧縮しない場合は、圧縮量が 17% であっても核内の DNA 凝集塊の個数にも体積分布にも顕著な変化は見られなかった。一方、5 回圧縮した場合は、圧縮量が 15%、30% の時、いずれも凝集塊の体積は小さくなり、凝集塊の個数は増加する場合と減少する場合があった。これより、核内 DNA 凝集塊の総体積は十分大きな圧縮刺激を受けると減少すること、圧縮刺激の強度には変形の大きさよりも変形の回数の方が利いている可能性があること、凝集塊の個数は、分裂して増加する場合、合体して減少する場合、小さくなり計測不能となるため減少する場合などが考えられ、変化は単純ではないことなどが明らかとなっていた。しかし、この系は繰返圧縮を効率よく加えるのは困難であり、また、核を圧縮された細胞がどのような機能変化を起こすのかは全く判って居なかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞核に外部から力を加えて定量的に変形させ、この力学刺激によって生じる核内の DNA 分布の変化ならびに細胞機能の変化を調べる系の確立を目的とした。特に効率的な刺激条件を探るためには刺激を加えた後の DNA 分布の変化をリアルタイムで観察することが必要と考え、刺激中ならびに刺激後の核内 DNA 分布の変化を観察できる力学刺激系の確立を目指した。また、クロマチンの凝集状態は細胞周期によって変わる可能性が考えられるため、細胞周期が動的圧縮刺激の効果に与える影響も検討することにした。ところで細胞の機能変化を調べるためには、十分な数の細胞が必要である。そこで、刺激中ならびに刺激後の核内 DNA 分布の変化を観察できる力学刺激系だけでなく、大量の細胞に一度に力学刺激を加え、その後の細胞の機能を調べることのできる系の確立も目指した。

3. 研究の方法

対象には、マウス頭頂骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を使用した。力学刺激には、力学負荷細胞を大量に得るためにマイクロ流路で細胞を扱く方法、ならびに高効率な DNA 分散法を探るため幅広い周波数で個々の細胞を圧縮する方法の 2 種類を用いることとした。具体的には以下の手順で研究を進めた。

1) マイクロ流路を用いた細胞核力学負荷実験と細胞機能評価

以前試作した顕微鏡ステージ上での細胞直接圧縮法では十分な量の細胞を得ることが困難であったので、マイクロ流路による変形負荷法を用いることにした。MC3T3-E1 細胞を細胞核程度かそれより幅の狭いマイクロ流路に通すことで、核を扱き、それにより核内クロマチンの分散状態を変化させることを目指した。これらの流路を通した細胞をシャーレに播種し、核内の DNA の分散状態、細胞の増殖能・形態などを調べた。

2) 細胞核の動的圧縮負荷系構築と細胞核形態の観察

顕微鏡ステージ上で、個々の細胞の核をマイクロピペットを加工して作製した圧子で押し込む装置を試作することにした。マイクロピペットを piezo 素子で駆動し、細胞核に動的圧縮刺激

を加える。血清飢餓培養で細胞周期を揃え、その後、通常培地に変更して細胞周期を S 期ならびに非 S 期の細胞に分けて動的圧縮刺激の効果を検討することにした。

4. 研究成果

実験にはまず、培養操作が容易であり当研究室での使用経験の豊富なマウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いることにした。そしてこの細胞を対象に、マイクロ流路を用いた細胞核力学負荷試験とマイクロピペットによる核の動的圧縮試験を行った。

1) マイクロ流路を用いた細胞核力学負荷と細胞機能評価

DNA を Hoechst33342 で蛍光染色した細胞を、様々な幅 W 、長さ L の狭隘部を有するマイクロ流路に通すこととし、PDMS 製の流路を試作した。流路深さは $40\sim 50\mu\text{m}$ 、非狭隘部の幅は $50\mu\text{m}$ 、狭隘部の W は $4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 17\mu\text{m}$ 、 L は $0, 20, 100\mu\text{m}$ とし、これらを組み合わせた流路を作製した。予備的検討から、このうち、 W が $8, 10\mu\text{m}$ 程度の流路が適当であることが判ったので、この幅で、長さは $0\sim 100\mu\text{m}$ の流路を使用することとした。これらの流路を通した細胞をシャーレに播種し、DNA 凝集塊の大きさや数の変化を調べた。その結果、狭隘部長さが増加するにつれ凝集塊の数が減ったが総体積は変わらず。狭隘部を通過させることにより、凝集塊同士が融合した可能性が考えられた。また、狭隘部を通した細胞を培養し、増殖率を調べたところ、狭隘部長さが長いほど、細胞増殖率が低下することが判った。

2) 細胞核の動的圧縮負荷系構築と細胞核形態の観察

顕微鏡ステージ上で、個々の細胞の核をマイクロピペットを加工して作製した圧子で押し込む装置を試作した。DNA を蛍光染色した細胞をシャーレに播種し 1 日ほど静置した後、顕微鏡ステージに置き、マイクロマニピュレータを操作して適当な細胞の上面に圧子を接触させる。DNA の凝集状態を落射蛍光でリアルタイム観察しながら、シャーレに接続したピエゾ素子を動作させて振幅 $1\mu\text{m}$ 、周波数 $1\text{Hz}\sim 1\text{kHz}$ 程度の範囲でシャーレを上下させることで細胞を押し込み、細胞核に動的圧縮刺激を加える装置を試作した。血清飢餓培養で細胞周期を揃え、その後、通常培地に変更して細胞周期を S 期ならびに非 S 期の細胞に分けて動的圧縮刺激の効果を検討した。その結果、 800Hz の周波数で 5 分間刺激すると、S 期の場合は DNA 凝集塊の数が有意に低下したのに対し、非 S 期の場合は DNA 凝集塊が有意に増加する結果が得られた。一方、細胞核の投影面積については、S 期の細胞では変化なく、非 S 期の細胞では圧縮により有意に増加する結果が得られた。S 期では DNA 複製のために DNA が緩んだ状態になるため、外力により DNA 凝集塊が減少し、また、緩んだ DNA が核膜を内側から押すことにより各内圧が上昇し、核が潰れにくくなった可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maeda Eijiro, Kuroyanagi Kaname, Matsumoto Takeo	4. 巻 123
2. 論文標題 Microscopic characterisation of local strain field in healing tissue in the central third defect of mouse patellar tendon at early-phase of healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 104702 ~ 104702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2021.104702	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 -
1. 著者名 Maeda Eijiro, Ando Yoriko, Takeshita Kazuhiro, Matsumoto Takeo	4. 巻 12
2. 論文標題 Through the cleared aorta: three-dimensional characterization of mechanical behaviors of rat thoracic aorta under intraluminal pressurization using optical clearing method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12429-5	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 -
1. 著者名 Fan Yong, Wang Junfeng, Kim Jeonghyun, Maeda Eijiro, Matsumoto Takeo	4. 巻 133
2. 論文標題 Dependency of deformation of cell nucleus on stretch direction of tissue: Relation to anisotropic response of aortic media to hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 105326 ~ 105326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2022.105326	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 -
1. 著者名 Tamura Atsutaka, Saiki Mika, Hongu Jun-ichi, Matsumoto Takeo	4. 巻 26
2. 論文標題 Stiffness estimation of transversely anisotropic materials using a novel indentation tester with a rectangular hole	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 893 ~ 904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10255842.2022.2098015	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 -

1. 著者名 Nagayama Kazuaki, Kodama Fumiki, Wataya Naoki, Sato Akiko, Matsumoto Takeo	4. 巻 138
2. 論文標題 Changes in the intra- and extra-mechanical environment of the nucleus in Saos-2 osteoblastic cells during bone differentiation process: Nuclear shrinkage and stiffening in cell differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 105630 ~ 105630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2022.105630	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9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 王軍鋒, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 無負荷培養に伴う家兔胸大動脈壁内平滑筋細胞核とアクチンの形態変化の観察
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 Fan Y, Wang JF, Kim J, Maeda E, Matsumoto T
2. 発表標題 Microscopic deformation of the nucleus is different from that of adjacent actin filaments in the smooth muscle cells in the aortic media and is dependent on the stretch direction
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東海詠思, 王軍鋒, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 マイクロ流路を用いた細胞核への力学刺激とその応答に関する基礎研究
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城響一, 王軍鋒, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 動的圧縮刺激が核内DNA凝集状態に与える影響に関する研究
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 2022年

1. 発表者名 Matsumoto T
2. 発表標題 Microscopic Estimation of Mechanical Environment in Soft Biological Tissues to Elucidate Biological Response Driven by Force and Deformation
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王軍鋒, 込村有紀, 北口哲也, 前田英次郎, 横田秀夫, 松本健郎
2. 発表標題 FRET型張力センサ発現マウスの血管と腱の引張に伴うFRET変化
3. 学会等名 日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inagaki T, Kim J, Maeda E, Matsumoto T
2. 発表標題 3D Image Analysis for Nuclear Morphology in Osteocytic Spheroids with Optical Clearing Technique
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木秀一朗, 王軍鋒, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 繰返引張下の重層化したMC3T3-E1細胞の上下層で異なる配向の原因解明に関する研究
3. 学会等名 日本機械学会東海支部第54回学生会卒業研究発表講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 亀井竣平, 王軍鋒, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 細胞剥離方法がマイクロ流路を用いたMC3T3-E1細胞核への圧縮効果に与える影響に関する研究
3. 学会等名 日本機械学会東海支部第54回学生会卒業研究発表講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善プラネット	5. 総ページ数 221
3. 書名 最先端ナノライフシステム研究	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>バイオメカニクス研究室 http://bio.mech.nagoya-u.ac.jp/</p>

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	前田 英次郎 (Maeda Eijiro) (20581614)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	

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