

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19890

研究課題名（和文）細胞の「構造と力」の記憶と崩壊のスイッチング

研究課題名（英文）Study on the switching mechanism of structural and tensional memory of cells

研究代表者

長山 和亮（Nagayama, Kazuaki）

茨城大学・理工学研究科（工学野）・教授

研究者番号：10359763

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）：本研究は、細胞の構造と力の再現メカニズムとその生理学的意義を探ることを目的とし、細胞構造を支える要素としてアクチン細胞骨格に注目して研究を進めてきた。継代培養を繰り返して脱分化・老化を進めた細胞を準備し、アクチン細胞骨格の分布様態、細胞張力、細胞の運動特性の違いを詳しく調べた。細胞の脱分化・老化が進むと細胞張力が減少して向きがバラバラになり、細胞の運動能も低下した。レーザー技術でアクチン細胞骨格を切断して、収縮挙動と構造・力の再現力を調べたところ、脱分化・老化が進むと細胞骨格の再生能は高まるが、発揮する力の再現性が低くなった。細胞の張力や構造の記憶特性が細胞老化に深く関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞の脱分化・老化が進むと細胞張力の減少と運動能の低下が見られること、個々のアクチン細胞骨格の再生能力は高まるが、張力の大きさは元に戻りにくくなることを明らかにした。さらに、細胞が自身の力学構造の再現と崩壊を巧みに切り換える機能を持っており、その機能は細胞老化と密接に関わることが示唆された。本研究は、このような1つ1つの細胞に備わる「構造と力の再現能力」が、様々な外乱に対する組織全体の恒常性を維持する重要因子となっている可能性を世界で初めて得た研究であり、得られた知見は、疾患や創傷の早期治療手法の開発などへの応用展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism of a structural and tensional memory of cells with consideration for cell aging. We used vascular smooth muscle cells and found that cell aging increased cell projected area while it reduced intracellular tension and migration ability. We further found that tensional memory of actin stress fibers in vascular smooth muscle cells tended to decrease with cell aging. These results indicate that cell aging not only affects cell morphology and biochemical functions but also mechanical properties of cells involving in cellular mechanotransduction.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞バイオメカニクス メカノバイオロジー 細胞骨格 細胞形態 恒常性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管や骨などの生体組織は、周囲の力学環境の変化に応じて組織構造を再構築する。この再構築を支える細胞内要素として、アクチンストレスファイバが着目されている。我々は、最近、ストレスファイバには、一旦バラバラになっても自己の線維構造や配向、さらに発生する力も効率良く再現させる「構造と力の記憶」が備わる可能性に気付いた。このような個々の細胞骨格分子の記憶特性は、外乱に対する組織全体の恒常性を保つ基盤原理となっている可能性が高い。しかし、ストレスファイバが、どのようにして自己の分子構造や張力を記憶しているのか、そして、力学的恒常性の維持と再構築をどのように切り替えているのか明らかとなっていない。また、このようなアクチン細胞骨格の力と構造の記憶力が、細胞の脱分化や老化などによってどのように変化するのか全く不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、アクチン細胞骨格に着目し、特に細胞老化の観点から、細胞が発生する張力や細胞運動がどのように変化するのか詳しく調べることを目的とした。さらに、生化学的・物理的外乱を加え分解させた後、その分子構造や張力が再現する過程を詳しく調べた。そして、細胞の構造と力の記憶メカニズムを探るとともに、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料細胞には購入時の継代数が3のブタ胸大動脈由来血管平滑筋細胞 (PSMC010, コスモバイオ株式会社) を用いた。これらを10%のウシ胎児血清を含むDMEM培地中で37°C, 5%CO₂-95%Airの環境で増殖させて培養し、細胞がセミコンフルエントに達した時点で1:4の比率で継代した。本研究では繰り返し継代することで細胞の老化を促進させ、継代数で老化の進行度を、若い細胞 (継代数4-6: Early), 中程度の細胞 (継代数7-11: Middle), 老化が進んだ細胞 (継代数15以上: Late) と分類して使用した。なお、老化により面積が増加する核小体の形態を計測したところ、継代数4の細胞と比較して継代数17の細胞では核小体の面積が有意に増加したため、このように定義した。

(2) 細胞老化に伴う細胞張力の変化を調べるため、微細加工技術にて作製したシリコンラバー (Polydimethylsiloxane, PDMS (SYLGARDTM 184 Silicone Elastomer Kit)) 製のマイクロピラー基板を用いた。弾性マイクロピラーの直径は3 μm, 高さは9 μmとし、ピラー同士の付着を防ぐため、ピラーの中心間距離は9 μmとした。細胞接着タンパク質であるフィブロネクチン溶液をPDMSシート上に滴下し、クリーンベンチ内で乾燥させた。PDMSシートのフィブロネクチン面を、マイクロピラー基板の表面に軽く押し付けて、フィブロネクチンをピラー先端面のみ転写した。その後、血管平滑筋細胞を播種し、インキュベータ内で5時間以上培養して、細胞が十分に広がっていることを確認した。これらの細胞試料を生きた状態で倒立顕微鏡のステージ上に設置し、培養環境を制御しながら、電子増倍型デジタルCCDカメラで細胞とピラー先端の画像を撮影した。そして、細胞が接着しているピラーを選択し、画像解析ソフトウェアImageJを用いて、輝点追跡用のプラグイン (Track Mate) でピラー先端の輝点を自動追跡し、x方向、y方向のピラーの変位を精密に計測した。計測されたピラーの変位量に、ピラーのバネ定数を乗ずることで、各ピラーの張力を求め、細胞全体の張力ベクトルを評価した。

(3) 倒立型蛍光顕微鏡に、波長355 nm, パルス幅約400 psのレーザユニットを組み込み、顕微鏡観察しながら細胞骨格を切断できるレーザアブレーションシステムを構築した。ディッシュ上で培養した細胞試料を顕微鏡に設置し、顕微鏡焦点に位置するアクチン細胞骨格に対して、高倍率対物レンズで焦点を1 μm未満に絞ったレーザ光を照射して切断することに成功した。細胞の端から端まで横切るようなストレスファイバ (アクチン細胞骨格とミオシタンパク質を主体とする太い線維束) を対象とし、その中央付近を切断して、細胞骨格の収縮挙動ならびに復帰過程を電子増倍型デジタルCCDカメラで連続的に撮影した。一連の実験は、顕微鏡ステージ設置型CO₂インキュベータを使って細胞培養環境を維持しながら行った。

4. 研究成果

継代数が異なる3群の血管平滑筋細胞 (Early, Middle, Late) の増殖能を調べたところ、細胞増殖能はMiddle群で最も高くなり、継代培養によって細胞の脱分化が促進されたと考えられる。さらに継代培養を続けたLate群では、Middle群に比べて核小体が肥大化したことから、脱分化だけでなく、細胞老化が認められた。

次に、Early, Middle, Late群の細胞をマイクロピラー基板上で培養し、細胞張力を計測した。細胞接着部位でのピラーの変位量から、個々の細胞の全体張力 F_{all} を算出してみると、脱分化が進むにつれて細胞の張力が徐々に低下していく傾向がみられた (図1)。すなわち、十分に脱分

化が進行し、細胞の老化の影響が現れ始めた Late 群では、他群と比べて張力が有意に低くなり、Early 群の細胞張力の半分ほどの値になった (図 1D)。また、細胞の張力ベクトルの向きを詳しく分析したところ、Early 群では細胞の長手方向に力が揃っている (図 1E) 傾向があるのに対し、脱分化老化が進むと、張力の方向が不規則になることが分かった (図 1F, G)。

最後に、継代数が異なる 3 群の細胞に対し、細胞内部のストレスファイバを切断して、その収縮挙動を詳細に観察した (図 2)。いずれの群でも切断されたストレスファイバは直ちに細胞両端に向かって収縮し、徐々にその収縮速度を低下させ、1 次遅れの収縮挙動を見せた。特に Early 群では収縮量が大きく、切断から 1 分ほどで急速に収縮し、5 分後には半分以下の長さになった。得られた収縮データから、収縮率 α と時定数 τ を算出したところ、収縮率 α は Early 群で最も高く初期長さの 60% 程度まで収縮することが分かった。一方、Middle 群や Late 群では 30% 程度の収縮率に留まった。時定数 τ も老化が進むほど徐々に小さくなる傾向があり、Early 群に比べて Late 群では有意に小さく、より早く収縮が完了することが分かった。さらに、それぞれの群

について、切断後のストレスファイバの挙動を長時間撮影したところ、一部の細胞で、収縮過程の途中で、構造を復帰させる様子が確認された。特に老化が進んだ細胞では、周囲の細かいアクチン線維と融合しながら、即座に新たな線維構造が再生される傾向があったが、その初期の配向特性や張力の再現性は失われるといった興味深いデータが得られた。

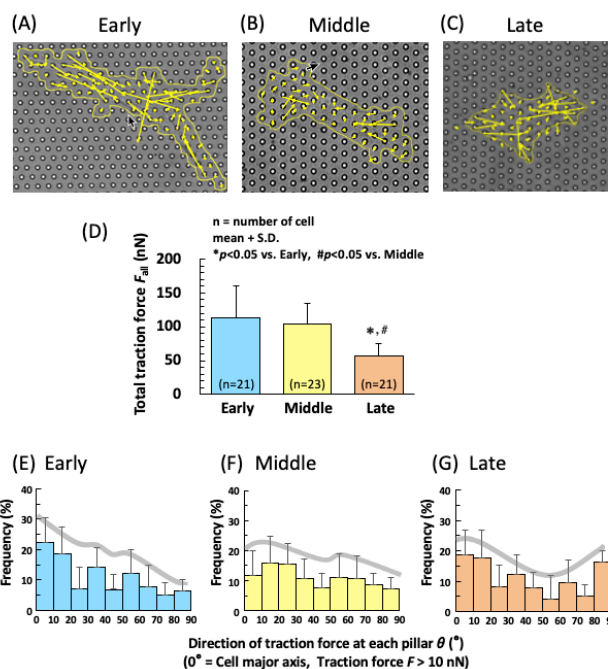


図 1. 弾性マイクロピラーによる細胞張力ベクトル解析

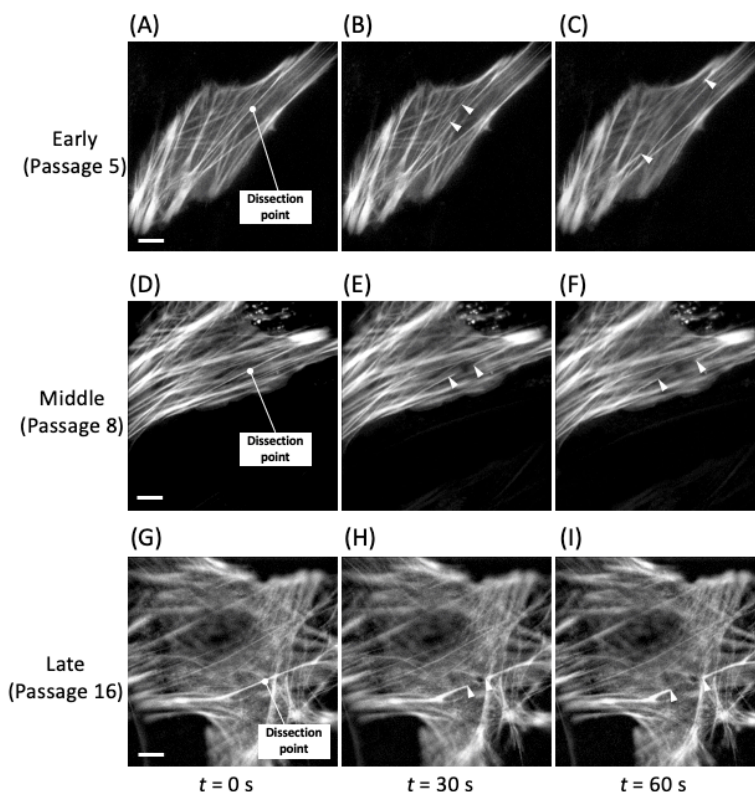


図 2. アクチン細胞骨格のレーザー切断後の収縮特性と再現性の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Katsuta Hiroki, Okuda Satoru, Nagayama Kazuaki, Machiyama Hiroaki, Kidoaki Satoru, Kato Masashi, Sokabe Masahiro, Miyata Takaki, Hirata Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Actin crosslinking by α -actinin averts viscous dissipation of myosin force transmission in stress fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106090 ~ 106090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106090	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 Nagayama Kazuaki, Hanzawa Tatsuya	4. 巻 33
2. 論文標題 Cell type-specific orientation and migration responses for a microgrooved surface with shallow grooves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 393 ~ 406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-211356	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 Sugita Shukei, Hozaki Masatoshi, Matsui Tsubasa S., Nagayama Kazuaki, Deguchi Shinji, Nakamura Masanori	4. 巻 620
2. 論文標題 Polarized light retardation analysis allows for the evaluation of tension in individual stress fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 49 ~ 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.06.066	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長山和亮, 綿谷直樹
2. 発表標題 微細溝基板を用いた動脈内力学環境の再現と細胞収縮機能の向上
3. 学会等名 2023年度精密工学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 綿谷直樹, 長山和亮
2. 発表標題 細溝凹部での細胞の力学的拘束が血管平滑筋細胞の核形態と分化に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagayama K
2. 発表標題 The Roles of Nuclear-cytoskeletal Interactions in Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (WCB2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長山和亮
2. 発表標題 細胞の力学応答・修復におけるアクチン細胞骨格の役割
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（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

茨城大学 研究者情報 長山和亮
<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html>
茨城大学 マイクロ・ナノバイオメカニクス研究室ホームページ 研究業績
<http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/achievements.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
--	---------------------------	-----------------------	----

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