

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760107

研究課題名(和文) 生理学的外力作用下での細胞内応力分布のダイナミクス

研究課題名(英文) Intracellular dynamics of traction forces under physiological mechanical stimulations

研究代表者

塚本 哲 (Tsukamoto, Akira)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工・応用科学群・助教)

研究者番号：90511460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：生体内外から生体に作用した力は疾患を誘発する。本研究はそれらの発症メカニズムの解明を目的とし、発症に関与すると指摘される細胞内で応力が分布する様子(細胞内応力分布)を生体内環境と同様の力学環境下での細胞について測定した。これを実現するために新規実験系を開発し、測定された細胞内応力分布ダイナミクスを支配する物理メカニズムとして細胞の物理構造を担う細胞骨格に着目した。その結果、細胞内応力分布が力学環境下で変化する様子はノイズの除去が急務であることが分かった。また、1つの細胞に着目した細胞内応力が力学環境下で変化する様子は十分に観察でき、細胞骨格の切断とともに複数の挙動が観察された。

研究成果の概要(英文)：Mechanical stresses induced on our body involve in multiple disorders. In this study, in order to understand how the mechanical stresses involve in those disorders, intracellular alterations of traction force were tried to be measured. For the measurement, measuring system was developed. Moreover, as a mechanism of the alterations, cytoskeletons were considered as a mechanical model. As a result, although alterations of intracellular traction forces remain indispensable noises for valid analysis, those of cellular traction forces were valid. In addition with alterations of cytoskeletons, it was indicated that ablation of cytoskeletons induced several types of alterations in cellular traction forces.

研究分野：機械材料・材料力学

科研費の分科・細目：生体力学

キーワード：細胞バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

生体の内外から生体に作用する力は細胞間基質を介し細胞に伝達され、伝達された力は細胞内のタンパク質を刺激することで生理応答を惹起する。刺激されるタンパク質は、細胞内の場所に依存して疾患を誘発すると指摘されているものの、詳細は未知である。それらタンパク質が細胞内で刺激される場所を明確に捕らえることが可能になれば、生体に作用した力が誘発する疾患の発症を解明することができる。

従来、細胞内で応力が分布する様子(細胞内応力分布)を実測した研究例がある(Biophys J 1999, PNAS 2001)。しかしながら、それらは生体内環境とは大きく異なり、静置環境での細胞について調べられたものである。疾患の発症を解明する目的からは生体内環境と同様に力が作用する細胞について調べる必要があり、従来の着想を超えた新規実験系が必要となる。

これまで筆者らは細胞に外力を負荷する技術を独自に開発し続けてきた。例えば、2台のステップモータを用いて細胞に単軸引張を加える技術(日本機械学会年次大会 2008)や、微細なピペットを精密に位置制御することで細胞膜に生理学的な変形を生じさせる技術(Cell Calcium 2010)などである。これらの技術は細胞単体に力を作用させるために発案されたものであるが、生体に近い弾性体材料と併用することで、細胞を含めた測定系全体に力を作用させて生体内の力学環境を模擬した細胞について、細胞内応力分布を測定することが可能になると考えた。

2. 研究の目的

生体内外から生体に作用した力は疾患を誘発する。本研究はそれらの発症メカニズムの解明を目的とし、発症に關与すると指摘される細胞内で応力が分布する様子(細胞内応力分布)を生体内環境と同様の力学環境下での細胞について測定した。これを実現するために新規実験系を開発し、測定された細胞内応力分布ダイナミクスを支配する物理メカニズムとして細胞の物理構造を担う細胞骨格に着目した。

3. 研究の方法

(1) PDMS 引張チャンバ作製

PDMS (Sylgard184, 東レダウコーニング)の主剤と硬化剤を 10:1 の比率で混合し、脱気による気泡除去を経て、アクリル製の型枠に流し込んだ。さらに、80 で 1 時間静置し、PDMS を硬化させた。

(2) ゼラチンゲル作製

ゼラチン粉末を純水に 10%(w/v)で混合

させ、60 に昇温させることで溶解させた。フェノールレッドを指示薬として pH 調整(おおよそ pH=7)をした後、PDMS 引張チャンバ上に流し込み、室温、もしくは 37、いずれかの条件下にて固化させた。ゼラチンの架橋剤として、トランスグルタミナーゼを用いた。

(3) ポリアクリルアミドゲル作製

アクリルアミドと N,N'-メチレンビスを特定の比率で混合し、過硫酸アンモニウムならびに TEMED を添加することで固化させた。アクリルアミドと N,N'-メチレンビスの比率は必要とするポリアクリルアミドゲル弾性率に応じて変化させた。

(4) 低弾性率 PDMS 作製

PDMS を作製するとき主剤と硬化剤の比率を 70:1 とすることで低弾性率 PDMS を作製した。

(5) 温度制御

当初の予定では、細胞に応力作用を与える環境温度として室温を予定指定していた。しかしながら、細胞に応力作用を与える環境温度として室温を用いた場合、その後得た知識に依れば、細胞の力学構造を担う細胞骨格が物理的な性質そのものを変化させてしまうことが分かった。室温は昼夜、季節による変動が大きく、再現性が高い実験結果を得ることに對して支障となることが予想された。そこで、環境温度として室温の代わりに生理的温度である 37 を用いることとした。具体的な方法として、小型細胞培養機に引張刺激負荷装置を組み込むなどした。

(6) 引張刺激負荷

チャックを介して PDMS 引張チャンバを 2 台のステップモータに接続した。それらステップモータを同時に操作することで PDMS 引張チャンバならびに PDMS 引張チャンバ上に播種された細胞に引張刺激を負荷した。

(7) ゼラチンゲルへの蛍光ビーズ塗布

固化したゼラチンゲル上にポリスチレン製蛍光ビーズ溶液を滴下し、余剰な蛍光ビーズを洗浄後、1 時間程度風乾させた。

(8) 細胞播種

培養された細胞をトリプシン溶液で剥離し、PDMS 引張チャンバ上に滴下することで播種した。

(9) 細胞内応力分布測定

蛍光顕微鏡を用いて蛍光ビーズ画像を取得した。画像取得について、引張刺激負荷前ならびに負荷後に実施した。さらに、気泡による剪断力にて細胞を剥離し、細胞が接着していない状態の画像も取得した。刺激負荷前後の画像に対し細胞が接着していない状態の画像を基準として PIV 解析にて蛍光ビーズ変位量を求め、さらに有限要素法にてその変位を与えるだろう応力の分布を計算し細胞内応力分

布とした。

4. 研究成果

(1) PDMS 引張チャンバに接着させるゲルの検討

PDMS 引張チャンバに接着させるゲルとして、始めにゼラチンゲルを検討した。ゼラチンゲルは PDMS 引張チャンバに再現性良く接着し、さらに弾性率の制御も可能であることが分かった。弾性率の制御について、ゼラチンを固化させるときの温度、湿度、時間が重要であることも分かった。ゼラチンゲル上に細胞を播種し、さらに実験を終了した後、細胞を剥離する必要がある。通常、細胞を剥離するためにトリプシン溶液が使用されることが多い。しかしながら、ゼラチンゲルはトリプシン溶液に侵食される可能性が十分に考えられたため、気泡による剪断力で細胞を剥離させた。しかしながら、この細胞を剥離させる操作には習熟を要し、さらに操作に時間も要することが分かった。

ゼラチンゲルを使用することによるそれら困難さは、研究を予定通り遂行させることに対しても支障となることが予想された。そこで、ゼラチンゲルの代わりにポリアクリルドゲルについて検討することとした。ポリアクリルドゲルは電気泳動で頻繁に用いられる素材であり、弾性率の制御も容易であった。しかしながら、PDMS とポリアクリルアミドゲルとの接着は困難であった。先行研究にてポリアクリルアミドゲルとガラスを再現性良く接着させる技術が知られていた。

始めに、この技術を PDMS とポリアクリルアミドゲルと接着させるために応用した。その方法とは、シランカップリング剤を用いた PDMS 表面の化学修飾であったが、その方法に関する様々なパラメータを検討したものの、再現性良く PDMS とポリアクリルアミドゲルを接着させることはできなかった。

次に、PDMS 内に透過している酸素に着目した。ポリアクリルアミドゲルはその界面に酸素が存在すると固化に影響が出ることが知られる。一方で、PDMS は酸素に対する透過性が高いことも知られる。そこで、PDMS 内に透過した酸素を除去した状態でポリアクリルアミドゲルを固化させることを考えた。具体的には、真空チャンバや窒素充填などにより PDMS 内に透過した酸素を除去した。しかしながら、それらの対策にも関わらず、ポリアクリルアミドゲルを再現性良く PDMS に接着するには至らなかった。

計画全体を達成するため、ポリアクリルアミドゲルに代わり、低弾性率 PDMS を PDMS に結合させる方法についても検討を行った。その結果、PDMS の配合率によってポリアクリルアミドゲルに近い低い弾

性率可以实现できること、低弾性率 PDMS を PDMS に特定の厚さだけ重層させるようにして結合ができること、この重層によって底面の PDMS が形状を崩さないこと、低弾性率 PDMS 表面のみに蛍光ビーズを局在させることが可能なことなど、ポリアクリルアミドゲルに代わって低弾性率 PDMS を採用することが可能なことが分かった。

(2) 引張刺激された細胞における細胞内応力分布測定

上で述べたように PDMS 引張チャンバに接着させるゲルを検討する一方、ポリアクリルアミドゲルや低弾性率 PDMS を検討する以前に採用していたゼラチンゲルによる実験結果の解析を進めた。まず、引張刺激された細胞における細胞内応力分布について算出したところ、図 1 のような細胞内分布が取得された。細胞はゼラチンゲルと接着斑を介して接着していると考えられるが、取得された細胞内分布では接着斑以外においても細胞内応力の変化が認められた。それらは細胞内応力分布を算出する過程で生じたアーチファクトであると考えられる。それらアーチファクトを除去する必要がある。例えば、変位から応力を算出する過程でどの程度ノイズが発生するのか、そのノイズをどのように除去できるのか、今後検討していく必要がある。

(3) 引張刺激された細胞における細胞内応力測定

細胞内応力分布について算出したところ、上で述べたような課題が判明した。一方で、一つの細胞全体で細胞内応力を算出することを考えた。細胞全体の細胞内応力では、細胞内応力分布で観察されたノイズが互いに相殺され、結果としての平均値は比較的信用できると考えたためである。実際に、そのようにして求めた細胞内応力は引張刺激していない静置状態にあっては 300nN 程度であり、過去の結果と同等であった。細胞内応力について、静置状態と引張刺激を与えた状態でどのように変化するのか調べた。その結果、培養細胞を複数回にわたり引張刺激した場合、1 度目の引張刺激における応力上昇と 2 度目のそれによる応力上昇とでは、1 度目の応力上昇は 2 度目のそれよりも総じて低いことが分かった(図 2)。細胞骨格を GFP-actin で可視化して検証したところ、上述した結果には細胞骨格の切断が関与することが示唆された。また、1 度目の引張刺激において細胞骨格が切断したとして、それにも関わらず 2 度目の引張刺激において細胞内応力が上昇した理由として、1 度目の引張刺激において切断を免れた細胞骨格が 2 度目の引張刺激では(1 度目の引張刺激とは違い)中心的に細胞内応力の上昇に貢献

したと考察した。これらの結果や考察については、生体内などのように繰り返し引張を負荷される細胞でも生じているとすれば、力学的な再配置に関する新しいモデルになる可能性がある。当然ながらこの仮説を示すために必要な実験は不足している状態であり、今後検討していくことが求められる。

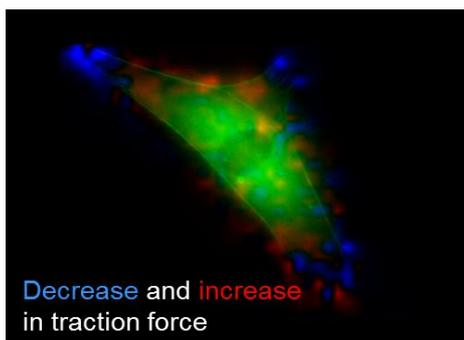


図1 引張刺激された細胞における細胞内応力分布

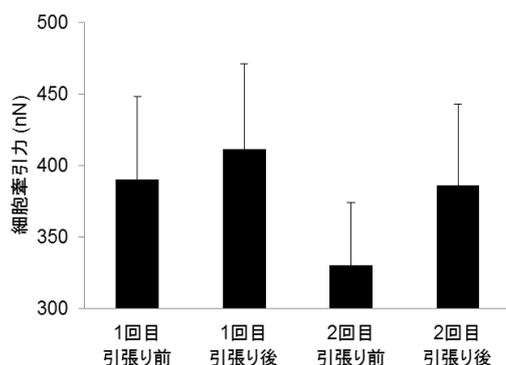


図2 複数回にわたり引張刺激した場合の細胞内応力変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ryo Tachikawa, Akira Tsukamoto, Keiichi Nakagawa, Tatsuhiko Arafune, Hongen Liao, Etsuko Kobayashi, Takashi Ushida, Ichiro Sakuma, "Development of an expansion wave generator for shock wave therapy", *Advanced Biomedical Engineering* 1 (2012) 68-73.

Keiichi Nakagawa, Akira Tsukamoto, Tatsuhiko Arafune, Hongen Liao, Etsuko Kobayashi, Takashi Ushida, Ichiro Sakuma, "A Miniaturized Shock-wave Device for Mounting on Forceps", *J. Biomed. Eng. Sci.* 8

(2013) 17-26.

〔学会発表〕(計 13 件)

塚本哲, 清水一篤, 牛田多加志, 多田茂, 「弾性ゲル上で培養した単一細胞の増殖」, 第 50 回日本生体医工学学会大会, 生体医工学, 49 (Suppl. 1), 164, 2011.4. (東京電機大学)

塚本哲, 満岡友祐, 牛田多加志, 多田茂, 「ソフトマテリアルに播種された細胞の伸展に対する適合性」, 日本機械学会 M&M2011 材料力学カンファレンス, M&M2011 材料力学カンファレンス要旨集 (CD-R), OS0907, 2011.7. (九州業大学)

塚本哲, 清水一篤, 多田茂, 「細胞分裂に必要な外力の実測」, 日本機械学会 2011 年度年次大会, 日本機械学会 2011 年度年次大会要旨集, 2011 (CD-ROM), S022012, 2011.9. (東京工業大学)

Akira Tsukamoto, Takashi Ushida, Shigeru Tada, "Subcellular distributions of traction forces in HUVECs under uniaxial stretch", *The American Society for Cell Biology 51th Annual Meeting, Mol Biol Cell* 22 (2011) 4705 (1950), 2011.12. (Denver, Colorado, USA)

塚本哲, 中川桂一, 荒船龍彦, 廖洪恩, 小林英津子, 佐久間一郎, 牛田多加志, 多田茂, 「医用衝撃波照射が惹起する細胞内 Ca^{2+} 濃度変化」, 第 51 回日本生体医工学学会大会, 生体医工学, 50 (Suppl. 1), 144, 2012.5. (福岡国際会議場)

塚本哲, 小原陽介, 牛田多加志, 多田茂, 「引張刺激が細胞集団で惹起する細胞内 Ca^{2+} 上昇の開始点観察」, 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 第 25 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 447-448, 2013.1. (産業技術総合研究所)

垣野内壮一郎, 塚本哲, 中川桂一, 太刀川遼, 荒船龍彦, 廖洪恩, 小林英津子, 佐久間一郎, 牛田多加志, 多田茂, 「医用衝撃波が細胞 3 次元培養体で惹起する細胞内 Ca^{2+} 上昇」, 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 第 25 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 89-90, 2013.1. (産業技術総合研究所)

塚本哲, 中川桂一, 太刀川遼, 荒船龍彦, 廖洪恩, 小林英津子, 多田茂, 牛田多加志, 佐久間一郎, 「衝撃波照射を受ける培養細胞の顕微鏡下リアルタイム観察」, 平成 24 年度衝撃波シンポジウム, 平成 24 年度衝撃波シンポジウム講演論文集, 291-292, 2013.3. (北九州国際会議場)

塚本哲, 多田茂, 牛田多加志, 「力学受容細胞と隣接細胞での Ca^{2+} 動態比較」, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 日本機械学会 2013 年度年次大会要旨集, 2013 (CD-ROM), S021014, 2013.9. (岡山大学)

塚本哲, 中川桂一, 太刀川遼, 廖洪恩, 小林英津子, 多田茂, 牛田多加志, 佐久間一郎, 「衝撃波照射による細胞骨格牽引力変化の観察」, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 37-38, 2014.1. (東北大学)

新村理, 塚本哲, 濱田剛, 牛田多加志, 多田茂, 「繰返し引張刺激を与えた血管内皮細胞におけるミトコンドリア形態変化」, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 131-132, 2014.1. (東北大学)

田中康裕, 塚本哲, 古川克子, 牛田多加志, 「低弾性率基質上で培養された血管内皮細胞の周期的引張刺激に対する形態変化」, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 153-154, 2014.1. (東北大学)

Aya Shinmura, Akira Tsukamoto, Takashi Ushida, Shigeru Tada, "High Efficient Time Lapse Imaging System for Cyclic Stretched Cells", 35th Annual International IEEE EMBS Conference, 2013 IEEE EMBC Short Papers No. 3390, 2013.7 (Osaka, Japan)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cmwww12.nda.ac.jp/cc/biomed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 哲 (防衛大学校)

研究者番号 : 90511460