

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：92506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24604001

研究課題名(和文)細胞と細胞外マトリクスとの動的な力学相互作用モデルと組織硬化を伴う疾患のメカニズム

研究課題名(英文) Analysis of dynamical behavior of cell-ECM interaction related to tissue sclerosises diseases

研究代表者

原田 伊知郎 (Harada, Ichiro)

社会医療法人社団蛸水会名戸ヶ谷病院(ロコモティブシンドローム研究所メカノメディス・メカノメディスン部門・主任研究員)

研究者番号：00361759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞がおかれた周辺環境の物性変化にตอบสนองして長期にわたり徐々に機能を変化させるメカノトランスダクションを解析することである。これまでに機械的な力の刺激に即時的にตอบสนองする分子機構は示されつつあるが、何故、その即時的な機械刺激反応が長期にわたり徐々に細胞の性質を変化させるのかという問題は不明である。本研究では足場物性に依存した長期的なシグナルプロファイルの変化の解析を可能にし、組織の硬化が関与する疾患との関連性について考察を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, a number of studies suggested stiffness of tissue affect many of the diseases such as malignant alteration of cancer and heart remodeling. Most of the cells adhere to the extracellular matrices effected by its elasticity and those sensing process has been focused as a new type of mechanotransduction. Because many of similarities can be concerned between this mechanotransduction and stimuli of mechanical stress via external forces, similar molecular mechanisms have been proposed as mechanosensing. However, those approaches are shown as transient and immediate molecular processes that how cellular functions or signaling profiles altered in longer-term on soft or stiff substrate is still open question. In this study, we focused on cellular signaling profile which varies in longer-term and propose mechanism a key function involves in sclerosis diseases.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：細胞外マトリクス メカノトランスダクション 弾性材料 物性評価

1. 研究開始当初の背景

生体内において、ほとんど全ての細胞が足場となる細胞外マトリクス (ECM) と呼ばれる巨大なタンパク質群に接着することで、はじめて機能の制御・維持が出来ることが知られている。近年、細胞は接着している ECM の種類だけを認識しているのではなく、力学特性が異なると細胞はその差異を認識して足場の物性に応じて分化・増殖誘導、機能発現、極性誘導、指向的走化性などを示すことが明らかにされてきた。細胞が足場の力学特性に応答するメカノトランスダクションシステムは、形態形成や創傷治癒など組織のリモデリングに加え、腫瘍の悪性化や心リモデリングなどの疾患にも関与する生体システムであり、医療分野においてもその解明は期待されている。

細胞が足場の硬さを認識する機構は細胞が足場に加える力に対する反作用を検出していると考えられている。すなわち、足場弾性体が柔らかければ基質は大きく歪み細胞の力は緩和する。一方、足場が細胞の力に対して十分に硬い場合は足場の基質が歪まず細胞の力は緊張下状態になる。このような細胞の発する力の状態に着目して細胞と足場の接着点に力を加えた実験などから、細胞が足場の物性を認識する分子機構が示されつつある。しかし、これまで即時的な「外力」に対するメカノトランスダクション機構分子については詳細に調べられているものの、長期的な細胞の変化については言及できていない。特に、硬化した組織における細胞の振る舞いは周辺物性に応答し続けた結果であると考えられ、即時的に力を加えた現象とは区別される機構も想像される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌組織の悪性化や心リモデリングのような組織硬化をとまなう疾患に対して、周辺環境の物性変化に細胞が応答し、その感受性が長期にわたり徐々に機能変化を生じてしまうメカノトランスダクションを解析することである。これまでに、機械的な刺激に一過的に応答する分子機構の存在は示されつつあるものの、その即時的な機械刺激反応が長期にわたり徐々に細胞や組織の性質を変化させるのかという問題は不明である。本研究では足場物性に依存した長期的なシグナルプロファイルの変化の解析を可能にすることで、細胞と足場との力学的相互作用が引き起こす細胞機能変化の幾序をを理解し、組織の硬化が関与する疾患との関連性について考察することを目的とした。特に、これまでに報告されていた外力に対して即時的に反応する分子群が、長期においてはどのように変

動するのかを調べることを目標とした。

3. 研究の方法

これまで、細胞が接着している足場の力学的特性の効果は様々な培養ゲル基板を用いて示されてきている。細胞の足場とする培養基板には A) 培養中に物性変動や化学特性の変化が起こりにくいこと、B) 細胞の様子を観察が容易なこと、が要求されてきた。これらを満たすものとして、電気泳動に用いるアクリルアミドゲルを基板として表面修飾する方法が多く用いられている。アクリルアミドゲル基板は表面の水溶性から細胞外マトリクスが培養シャーレの場合のように吸着しないことからそのままでは細胞は接着しない。そこで、ゲル表面にコラーゲン等の細胞外マトリクスを架橋するが、これまで多く用いられてきた架橋剤は紫外線照射によって反応する sulfo-SANPAH という化合物であった。しかし、その方法は容易であるという利点の反面、表面状の細胞外マトリクスの密度の調整が難しいことや、長期的に安定していないという問題点もあった。特に本研究では、長期的に培養した際の細胞の変化を捉える研究であるため、不向きである。そこで、本研究ではまず、長期的な培養に耐える新しい培養基板ゲルを作製した。

次に、これまでの研究報告では単純に硬さの異なる培養基板上での細胞の振る舞いの差異を検証するものであったが、本研究では、硬さの異なる培養基板へ移すことによって差異を検証し、長期的な周辺環境の差異が細胞に与える影響について検討した (図 1)。

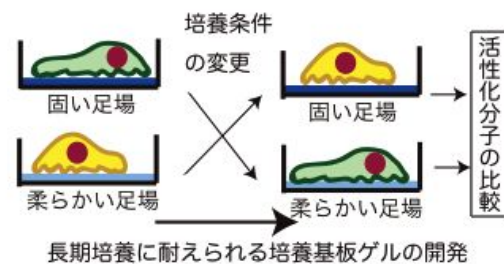


図 1 研究コンセプト。長期に特定の硬さの培養基板に培養しておいて物性の異なる培養基板へと条件を変更し、活性化分子の履歴や差異を比較分析。そのために、長期培養に耐える培養基板ゲルを開発した。

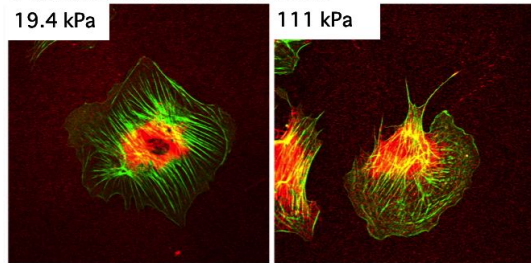
4. 研究成果

培養基板ゲルの開発

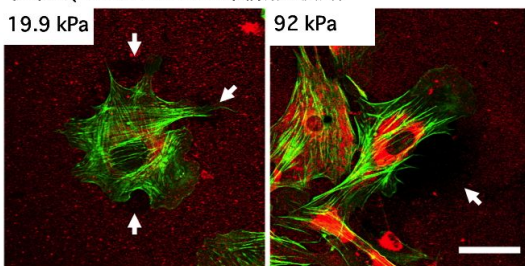
本研究において開発してきたゲルは従来法と比較して表面に固定化された細胞外マトリクスが安定的かつ均一であることが実証された。従来法である sulfo-SANPAH をマトリクスとゲルとの架

橋剤にする方法では細胞の力によって細胞外マトリクスが引きはがされる現象が観察されたのに対して、本研究で作製したゲルではそのようなことも生じないほど安定であることが確認された(図2)。本ゲル培養基板を用いて、細胞が足場に加える応力と足場の歪みとの詳細な解析

本研究課題にて作成したゲル培養基板



従来法(sulfo-SANPAHを架橋剤に使用)



が可能になった。

図2 本研究にて開発した培養基板は安定的にECMが固定されており長期培養に耐えることができる。上図は本研究にて作製したゲル。下図は従来法であるsulfo-SANPAHをゲルとECMの架橋剤に使用したもの。下図矢印の部分では固定化しはずのコラーゲンが細胞の力で引きはがされている様子が観察された。本研究にて開発したゲルではコラーゲンは均一に固定化されたままであった。赤：コラーゲンを染色。緑：細胞のアクチンフィラメントの染色。

長期培養した細胞の解析方法の確立

次に、長期的な細胞の動的挙動を解析するために長時間顕微鏡下で細胞を培養しつつその動的挙動を観察する方法にも着手した。開発した顕微鏡下培養方法では72時間以上、通常の培養孵卵器と同様のコンディションで培養することが出来ることが示された。さらに、個別の細胞の走化性の解析や移動に伴う細胞の形態の変化をも解析できることも分かった。

また、本研究で作製した培養基板ゲルは顕微鏡下培養と同等のコンディションの細胞を生化学的に分析することも可能であることが分かった。すなわち、本培養ゲル基板は従来法と比較し安価に作製できることから、大きな培養基板とすることが可能であるため、生化学的な分析に耐えうるほどの大きな培養系にすることが可能であった。これによって、動的な細胞の走化性に合わせて、活性化する

分子について生化学的な分析をすることができた。

生化学的な分析

生化学的な分析の結果、足場の硬さに依存して、細胞外マトリクスとの接着点に局在する分子群が断片化することが分かった。また、その断片化した断片は直ちに分解されることなく数時間以上も細胞内にとどまっており、また細胞内の接着オルガネラにも局在することが分かった。次に本研究の方法である、細胞を軟らかいところから硬いところへ、硬いところから軟らかいところへと変化させる手法によって、足場物性依存的に断片化した分子の断片化量がどのように変化するかを調べた。その結果、軟らかいところで培養されたときに生じた断片化分子は、細胞が硬いところに移された場合でも1~2時間ほど残っていることが分かった。すなわち、細胞のなかに、過去の足場物性の履歴が残されることが示された。

最後に、分子生物学的手法によって断片化した分子のモデルを外来遺伝子として細胞に導入し、接着点に出来る接着斑オルガネラ構造(その分子の局在量)の時間変化について観察したところ、断片化分子の存在はオルガネラの生成・消滅の速度を変化させることが分かった。すなわち、細胞と足場の相互作用のターンオーバーを制御する機構に関与することが明らかになった(図3)。

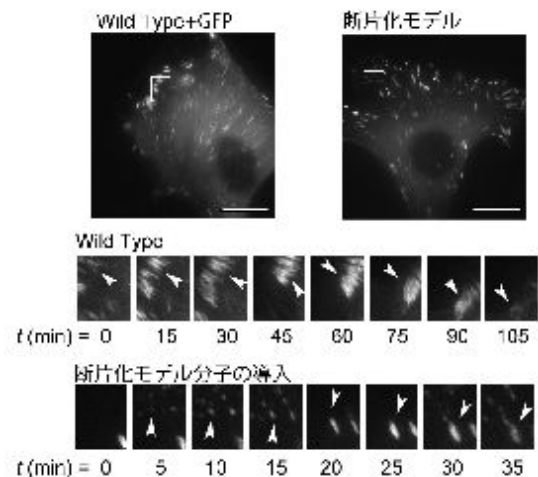


図3 断片化モデル分子に緑色蛍光分子(GFP)を付加した遺伝子発現細胞の接着斑生成消滅過程の観察。断片化モデル分子は生成、消滅ともに速くなることが分かった。

しかし、そのような足場の物性に依存したターンオーバーの変化と局在性分子の断片化機構の生理的な意義については不明なままであった。また、断片化はカルパインに依存していることは明らかにな

ったが、どのような幾序で、またそれら分子のどの部位が切断を受けているか詳細は明らかにならなかった。そのため、断片化に対して抵抗性のある分子の導入実験が出来なかった。今後は、足場の物性ないし細胞の発生させる力に対してどのように断片化が生じているのか、さらに断片化機構と接着ターンオーバー幾序が生理的にどのような意義があるのかについて検証する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Yip AK, Iwasaki K, Ursekar C, Machiyama H, Saxena M, Chen H, Harada I, Chiam K-H, Sawada Y. Cellular response to substrate rigidity is governed by either stress or strain. *Biophys J.* 104:19-29, (2013) (査読有)
2. Aratsu F, Harada I*, Yoshimura S, Cho CG, Akaike T, Tagawa Y. Dynamic chemotactic response of fibroblasts to local stimulation using EGF-immobilized microbeads *Biomaterials*, 35(8): 2471-6. (2014) (査読有)
3. 原田伊知郎、松井裕之、澤田泰宏：細胞外マトリクス-細胞間接着におけるメカノセンシングを介する細胞機能制御 *細胞工学* 13(9),999 (2012) (査読無)

[学会発表](計1件)

1. Yip AK, Iwasaki K, Ursekar C, Machiyama H, Saxena M, Chen H, Harada I, Chiam K-H, Sawada Y. 「Cellular response to substrate rigidity is governed by either stress or strain」第65回日本細胞生物学会大会 ウィンクあいち(愛知県産業労働センター) 2013年6月20日

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 伊知郎 (HARADA ICHIRO)

社会医療法人社団蛍水会名戸ヶ谷病院口
コモティブシンドローム研究所・メカノ
メディスン部門・主任研究員

研究者番号：00361759