

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282133

研究課題名(和文) 単一細胞バイオメカニクスと細胞核力学場の解明

研究課題名(英文) Single cell biomechanics and the investigation of mechanical field in cell nucleus

研究代表者

宮崎 浩 (MIYAZAKI, Hiroshi)

藍野大学・医療保健学部・教授

研究者番号：00263228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロピペット吸引試験により単一細胞において計測した弾性率は、細胞全体よりも単離細胞核の方が約4倍高かった。また、圧縮試験により単一細胞において計測した弾性率は、細胞全体よりも単離細胞核の方が約2倍高かった。圧縮試験から得た線維芽細胞の細胞核の弾性率と、F-アクチン/ストレスファイバー脱重合前後の細胞核の形態変化から、接着線維芽細胞の細胞核がストレスファイバーにより受けている圧縮応力は約0.8 kPaと推定された。

研究成果の概要(英文)：In the micropipette aspiration test of a single cell, elastic modulus of isolated nucleus was about 4 times higher than that of a whole cell. While, in the compressive test of a single cell, elastic modulus of isolated nucleus was about 2 times higher than that of a whole cell. From the averaged elastic modulus of the nuclei of fibroblasts and change in averaged height of nuclei in adherent fibroblasts before and after F-actin/stress fiber disruption, compressive stress imposed on nuclei by stress fibers in adherent fibroblasts was estimated to be about 0.8 kPa.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞 細胞核 ストレスファイバー 力学的特性 力学場

1. 研究開始当初の背景

力学的刺激が細胞の分化・機能発現を引き起こすメカニズムには不明の点が多く、特に外部から細胞表層に作用する力学的刺激が遺伝子発現の場である細胞核内にどのように伝達されるのか、すなわちメカノトランスダクションのメカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。細胞は、接着斑を形成しインテグリンを介して基板/細胞外マトリックスに接着し、細胞骨格の一種であるアクチンフィラメント (F-アクチン) / ストレスファイバーがインテグリン間を結ぶとともに、その一部は核膜にも連結されている。さらに、DNA/クロマチンは核膜を裏打ちする核ラミナの近傍に存在する。これらのことから、メカノトランスダクションには、インテグリンに作用する力が細胞骨格によって直接的に細胞核内に伝達され、それによる細胞核の変形がクロマチン/DNA の空間配置を変化させて発現する遺伝子の変化を引き起こす経路がある可能性が指摘されており、最近、細胞核のメカニクスと遺伝子発現調節との関係が注目されてきている。

細胞核の変形の大きさは、その力学的特性に依存し、力学的負荷を変形量で感知するためには細胞核が適度な変形性を有する必要がある。したがって、従来から計測されてきた細胞の力学的特性、すなわち表層部および細胞の力学的特性のみならず、細胞核の力学的特性も細胞の機能発現に重要であると考えられる。いくつかの報告により、細胞核のメカニクスは細胞の遺伝子発現や分化に影響を及ぼすことが明らかにされており、また、細胞質領域においては F-アクチンが細胞核への力学的負荷の伝達に主要な役割を担うことが明らかになっている。細胞の力学的特性には F-アクチンが大きな影響を及ぼすことが知られており、また、F-アクチン/ストレスファイバーは張力を発生して細胞内の力学場形成に寄与していることから、F-アクチンが細胞核のメカニクスに及ぼす影響や細胞核のおかれた力学場を調べることも重要である。細胞核の置かれている力学場は、細胞全体の力学的特性と、その同一の細胞個体の核の力学的特性をともに計測し、形態・内部構造とリンクさせて統合的に解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、細胞および細胞核の形態と構造の計測を行うとともに、力学試験によって一細胞個体において細胞と細胞核の力学的特性を詳細に計測し、細胞および細胞核の形態・構造と細胞核の力学的特性との関係を明らかにし、さらに、細胞核の置かれた力学場を定量的に明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

1) 細胞・細胞核用力学試験装置の改良

平成 27 年度から研究機関を移ったため、異動先における実験環境整備と研究機器の移設を行い、細胞・細胞核用力学試験装置の再構成と修理・調整を行うとともに改良を行った。本研究では、同一細胞個体において細胞と単離細胞核の力学試験を行い、その特性の違いを調べることを目指している。これを実現するために、顕微鏡ステージ上の試験チャンパー内に浮遊している力学試験後の細胞から、核単離液の灌流により細胞核を単離し、細胞核を捕捉しつつチャンパー内の溶液をハックス液 (HBSS) に置換した後に、単離細胞核の力学試験を行うまでのプロセスの確立を行った。光ピンセット装置と XY 自動ステージを顕微鏡に組み込み、また、溶液置換の際に生じる液流によって細胞核が光ピンセットのトラップから外れて流失する問題を解決するために、溶液交換用ポンプをマイクロチューブポンプから低流速の定常流を流せるシリジポンプに変更した。さらに、溶液置換の際の流入・流出口の位置と流量の最適化を行うとともに、単離細胞核捕捉用のマイクロピペットおよび細胞核単離補助用のマイクロニードルの導入を検討した。

2) 単一細胞における細胞および単離細胞核のマイクロピペット吸引試験

細胞およびその細胞個体から単離した細胞核のマイクロピペット吸引試験を行うために、顕微鏡へのマイクロピペット吸引試験装置の組み込みと調整を行った。試験装置全体は、防振台、倒立型顕微鏡、三次元電動マイクロマニピュレータ、水圧マニピュレータ、マイクロピペット吸引試験装置、PC、モニター等からなる。マイクロピペット吸引試験装置の水リザーバとマイクロピペットをチューブで接続し、リザーバの高さを変えることによって、試験チャンパー内に挿入したマイクロピペットの先端内に 500 Pa 程度までの吸引圧を発生させることができる。この試験システムを利用して、細胞とその細胞個体から単離した細胞核のマイクロピペット吸引試験を行った。

3T3-Swiss albino cell を試験チャンパー内の HBSS に浮遊させ、内径約 5 μm のマイクロピペットの先端を細胞に接触させて、細胞のマイクロピペット吸引試験を行った。チャンパー内の HBSS を核単離液に置換して細胞核を単離し、チャンパー内を HBSS に再置換した後に、単離細胞核の吸引試験を行った。試験中の画像はデジタルカメラを介して PC に保存して、細胞と細胞核の試験中の吸引長変化を計測した。得られたデータに 3 要素線形粘弾性モデルを適用して粘弾性パラメータを求めた。

3) 単一細胞における細胞および単離細胞核の圧縮試験

家兎膝蓋腱線維芽細胞を用いて細胞および単離細胞核の圧縮試験を行った。バネ定数

の異なる一対のガラス製のマイクロプレート（HBSS を入れた試験チャンバー内に対向させて挿入し、それらの間に浮遊させた細胞を挟んで、一方のマイクロプレートを電動マイクロマニピュレータで動かすことにより細胞の圧縮試験を行った（図1）。次に、核単離液を試験チャンバー内に灌流させて、試験を行った細胞個体から細胞核を単離した後、チャンバー内を再度 HBSS で満たして単離細胞核の圧縮試験を行った。CCD カメラを介して試験中の様子を記録した動画から、画像計測装置を用いて試料長とマイクロプレートのたわみ量を計測した。マイクロプレートのたわみ量にそのバネ定数を乗じて圧縮荷重を求めた。圧縮特性を定量的に評価するために、荷重-縮み関係に Hertz の接触理論を適用してみかけの弾性率を求めた。また、単一細胞における試験の他に、単離細胞核のみの圧縮試験も行い細胞核のみかけの弾性率のデータを得た。

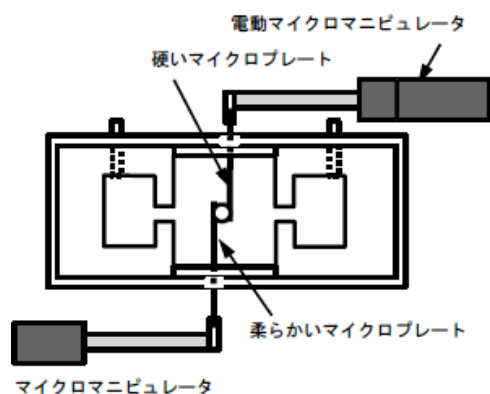


図1 細胞および細胞核の圧縮試験

4) F-アクチンの脱重合に伴う細胞核の形態変化の観察

遺伝子導入を行って F-アクチンと細胞核をそれぞれ蛍光標識した線維芽細胞をガラス基材上で培養して伸展させた。細胞に F-アクチンの脱重合剤 Cytochalasin D (CD) を投与する直前および投与後の細胞核の三次元形態を共焦点レーザ顕微鏡で経時的に観察した。記録した蛍光画像から、PC 上で画像処理によって細胞核の三次元再構築を行い、細胞核の形態変化を定量的に評価した。

4. 研究成果

1) 細胞・細胞核用力学試験装置の改良

溶液置換の際に生じる液流によって単離細胞核が流失する問題を解決するために、溶液交換用ポンプをシリンジポンプに変更するとともに、溶液置換の際の流入・流出口の位置と流量の最適化を行った。溶液置換に関わる部分の模式図を図2に、マイクロピペット吸引試験におけるセットアップを図3に示す。流入口・流出口ともに、それぞれ2本

の管をチャンバー端部に配置し、シリンジポンプと活栓操作により低流量の定常流で溶液置換が行えるようになり、光ピンセットも用いることによって単離細胞核を力学試験まで捕捉しておくことができた。また、細胞核単離補助用のマイクロニードルを導入してマイクロマニピュレータで操作し、核単離液注入後に細胞質を除去する補助を行うことにより、細胞核単離の時間を短縮することができた。

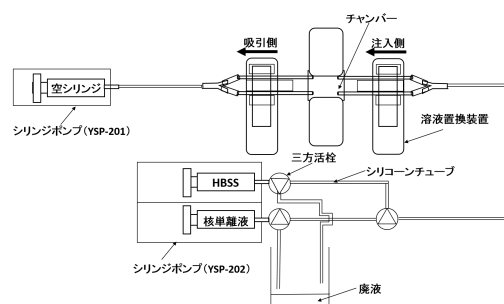


図2 溶液置換システム

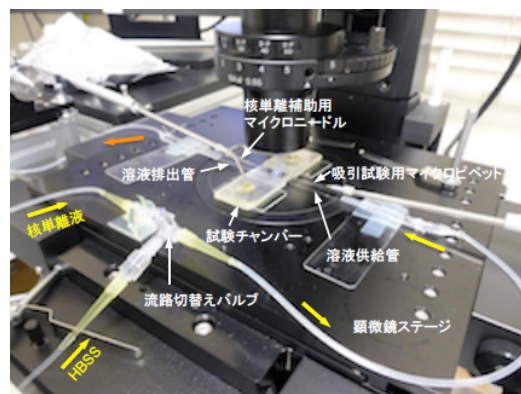


図3 マイクロピペット吸引試験時のセットアップ

2) 単一細胞における細胞および単離細胞核のマイクロピペット吸引試験

3T3-Swiss albino cell を使用して、細胞とその細胞個体から単離した細胞核のマイクロピペット吸引試験を行った。試験中の画像の例を図4に示す。単離細胞核は細胞よりも弾性率が約4倍、粘度が約3倍高かった。

3) 単一細胞における細胞および単離細胞核の圧縮試験

線維芽細胞および単離細胞核の圧縮試験を同一の細胞個体で行い、細胞と細胞核のみかけの弾性率を求めたところ、細胞全体では約 0.6 kPa、細胞核は約 1.2 kPa であった。細胞核は細胞全体よりも弾性率が約2倍大きかった。また、単離細胞核のみの圧縮試験では弾性率が平均約 2.6 kPa であった。

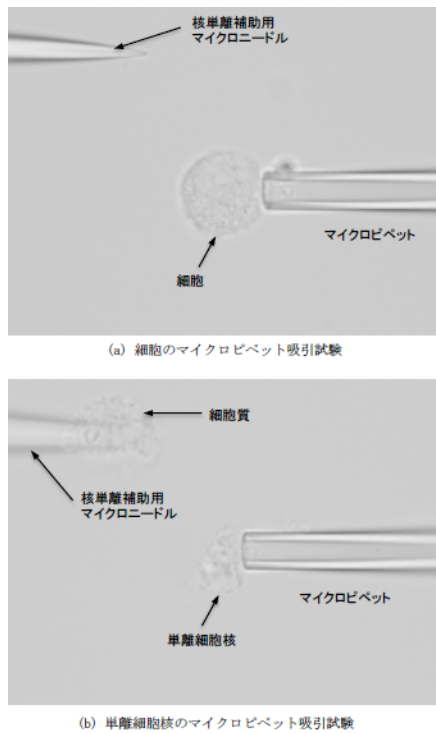


図4 同一細胞個体における細胞および細胞核のマイクロピペット吸引試験

4) F-アクチンの脱重合に伴う細胞核の形態変化の観察

F-アクチンの脱重合前および CD 投与から 60 分間経過した細胞核の蛍光画像を 3D 表示して側方からみた画像を図 5 に示す。F-アクチンの脱重合前には細胞核は扁平（高さは平均 $5.0 \mu\text{m}$ ）であったが、F-アクチンの脱重合によって細胞核の高さが増大した（高さの平均 $7.0 \mu\text{m}$ ）。F-アクチン/ストレスファイバーがほぼ完全に脱重合した 60 分後における細胞核の高さは CD 投与前の約 1.4 倍であった。この結果から、ストレスファイバーにより接着細胞の細胞核に生じている圧縮ひずみは約 0.3 と推定された。

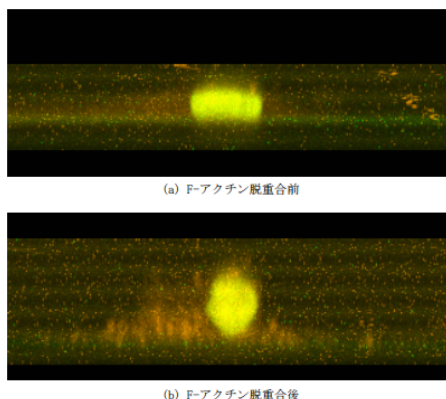


図5 F-アクチン脱重合前後の細胞核の蛍光画像

5) 試験結果の統合的解析： マイクロピペット吸引試験によって単一の 3T3-Swiss albino cell において計測した弾性率は、細胞核の方が細胞よりも約 4 倍高かった。これに対して、単一の家兎膝蓋腱線維芽細胞の圧縮試験によって求めた弾性率は、細胞核の方が細胞全体よりも約 2 倍高かった。これらの差は、細胞株と組織から単離した細胞と違い、および、局所的な特性（マイクロピペット吸引試験）と全体的な特性（圧縮試験）の違いによるものであると考えられる。線維芽細胞のデータを使用して接着細胞における細胞核の力学場を推定した。単離細胞核の圧縮試験では弾性率が約 2.6 kPa であった。また、F-アクチン/ストレスファイバー脱重合前後の細胞核の形態計測から、ストレスファイバーにより接着細胞の細胞核に生じている圧縮ひずみは約 0.3 と求められている。これらの結果から、細胞核がストレスファイバーから受けている圧縮応力は約 0.8 kPa と推定された。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Hiroshi Miyazaki, Assessment of nuclear strain imposed by actin filaments in adherent cells, International Symposium on Mechanobiology 2014, May 20-23, 2014, Okayama (Japan).
2. 宮崎 浩, 細胞核の力学的特性の計測と細胞核に作用する応力の推定, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19 日～20 日, 愛知県産業労働センター ウィンクあいち (愛知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 浩 (MIYAZAKI Hiroshi)
 藍野大学・医療保健学部・教授
 研究者番号：00263228