

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560207

研究課題名(和文)細胞核内外の力学環境操作による細胞機能制御の試み

研究課題名(英文)Biomechanical study for controlling cell functions by manipulating the nuclear mechanical environment.

研究代表者

長山 和亮(NAGAYAMA, KAZUAKI)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：10359763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞核の形や核に加わる力・ひずみを操作することで、核内DNAの分布・凝集状態を人工的に操作し、細胞の機能に変化を与えることができるかどうか明らかにすることを目的とした。独自開発した微細加工基板を用いて細胞内の核を変形・拘束する手法を考案した。この方法で細胞内の核を変形・拘束すると、正常組織由来の細胞の運動や増殖を顕著に抑制し、細胞にダメージを与えることなく細胞周期を一時的に停止させることができること世界で初めて見出した。このような核の変形による細胞の機能変化には、核膜を構成するラミンタンパク質の発現が深く関わっており、核膜によるメカノセンシング機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the mechanical deformation and trapping of the intracellular nucleus using the microfabricated substrates. We investigated the effects of nuclear deformation on the physiological functions of cells. We found that the mechanical trapping of the cell nuclei with the micropillars significantly inhibited cell migration and DNA synthesis. The cell proliferation was significantly inhibited in the micropillar substrates even though the cells did not reach the confluent state. A detailed image analysis with confocal microscopy revealed that expression of lamin A/C was significantly decreased in the region deforming along the pillar surfaces, and underlying DNA distribution became more heterogeneous. These results may indicate that lamin A/C has a role of mechanosensor to detect an excessive deformation of nucleus, and they switch the cell state from an "active phase" to a "resting phase".

研究分野：細胞バイオメカニクス、メカノバイロジ

キーワード：細胞バイオメカニクス メカノバイロジ 細胞核 DNA メカノトランスダクション 生体計測

1. 研究開始当初の背景

細胞は、与えられた力学環境の変化に応じ機能を变化させる。このような細胞の機能変化は、核と細胞質間でのゲノム DNA 情報の精密な制御によって調整されていると考えられている。一方、これまでに研究代表者は、血管などの組織内で生じている引張・圧縮などの力学環境の変化が、細胞形態や細胞の内部構造に与える影響を詳しく調べてきた。その過程で、核の形態変化や、核に加わる力の大きさや方向などの力学因子が、細胞の機能調整に密接に関与しているのではないかと考えた。例えば、血管平滑筋細胞は正常な力学環境下の動脈壁内では収縮要素に富んだ「収縮型」細胞であるが、静的無負荷状態の培養環境に曝すと、収縮機能を低下させ、増殖能、物質合成に富んだ「合成型」細胞へ脱分化する。この過程で核には著しい形態変化が見られ、核内部の DNA の分布にも大きな違いが生じる。また、多分化能を持つ幹細胞の核が、線維芽細胞などの核に比べ柔らかく、これが多分化能と関連しているとも考えられており(文献)，最近では、核の変形能が癌細胞の浸潤にも影響すると指摘され始めている(文献)。これらのことから、核の形態変化、核への力やひずみの変化が、細胞の機能調整に多大な影響を与えている可能性が極めて高い。しかし、核の形や核への力・ひずみが変化することで、核の中で物理的・生化学的にどのような変化が生じているのか不明な点が多く、外部から核の力学環境を操作することで、実際に細胞機能に変化を与えうるのが全く明らかとなっていない。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、細胞内の核の形態を操作したり、核内 DNA の局在や凝集状態を操作する手法を確立し、実際に核内外の力学環境を操作して、細胞の周期や増殖性、分化・脱分化の制御できるかどうか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料：試料には、研究代表者が力学特性などのデータを多く蓄積する血管平滑筋細胞や骨芽細胞を主に使用した。また比較のために、子宮頸がん由来細胞株である HeLa 細胞や骨肉腫由来細胞株の Saos2 細胞などを用いた。

(2) 核の拘束・変形負荷用の微細加工基板の作製：まず、核の形を変形させ、拘束するための微細加工基板を作製した。すなわち、フォトリソグラフィ法にて多数の微細なピラーが並んだフォトレジスト型を作製し、PDMS 原液 (Sylgard 184, Dow-Corning) と硬化剤を体積比 10 : 1 で混ぜ合わせて流し込

み、100°C で 1 時間処理して PDMS を硬化させた。そして、フォトレジスト型から PDMS を剥がし、微細な孔を有する PDMS 製の鋳型を得た。鋳型は微細加工業者に試作依頼した。この鋳型に、さらに前述の PDMS を流し込み、100°C で 1 時間処理して硬化させ、鋳型から剥離してマイクロピラー基板を得た。細胞の高さと核の大きさを考慮して、ピラーの直径を 3 μm 、高さを 9 μm 、ピラーの中心間距離を 6 μm および 9 μm とした(図 1)。

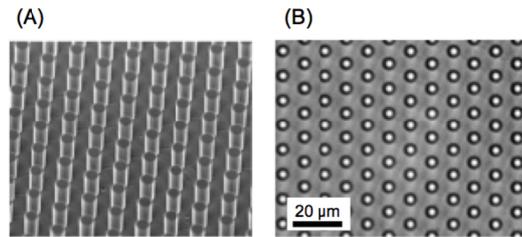


図 1：作製したシリコンラバー製のマイクロピラー基板の電子顕微鏡画像(ピラーの直径 3 μm 、高さ 9 μm 、ピラーの中心間距離 9 μm の例)。

(3) マイクロピラー基板への細胞の播種と核の機械的拘束：前述のマイクロピラー基板および、同じ材質の平坦な基板に対して、基板表面をプラズマ処理して親水化した。引き続き、細胞接着タンパク質のフィブロネクチンを基板上に滴下し、乾燥させた。その後、試料細胞を、両方の基板の上に播種し、10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地を用いて培養した。培養後、細胞がピラー基板の底面まで落ち込んでいることを確認して、細胞の増殖率の変化、細胞内のアクチン細胞骨格、核内 DNA および核膜裏打ちタンパク質 (Lamin A/C) の 3 次元的な分布様態の変化を評価した。

(4) 細胞核の力学特性の評価：核そのものの力学特性の差異も、細胞応答に影響を与える可能性がある。そこで、原子間力顕微鏡 (AFM) による微小押し込み試験によって正常組織由来の血管平滑筋細胞および骨芽細胞、さらに腫瘍系の HeLa 細胞や Saos2 細胞の核の力学特性を評価した。すなわち、それぞれの細胞に対して、細胞骨格を予め脱重合した状態で、核の中心付近の表面に対し AFM のカンチレバーを押し付け、力と押し込み量との関係 (フォースカーブ) を得た。得られたフォースカーブについて、ヘルツの接触論のモデル式を適用し、核表面の弾性率を求めて評価した。

4. 研究成果

正常組織由来細胞と腫瘍系細胞について、平坦な基板上では、核が楕円形で滑らかな表面形態をしていたが、マイクロピラー基板上

では、核がピラー間に挟まれ大きく変形していた(図2)。特に腫瘍系細胞では、核が、より顕著に変形しており、ピラーに沿って多数の凹みが生じていた。そこで、AFMによる微小押し込み試験から、核表面の力学特性を計測して比較した。正常組織由来の細胞と腫瘍系細胞の核の弾性率は、それぞれ約23 kPa、約6 kPaであった(図3)。すなわち、腫瘍系細胞の核は正常組織由来の細胞の核に比べ1/3以下の硬さであることが分かった。また、核膜裏打ちタンパク質のLamin A/Cの発現量も、正常組織由来細胞の核に比べ、腫瘍系細胞では半分程度であった。これらのことから、腫瘍系細胞では、正常組織由来の細胞に比べ、核膜構造が未発達であり、核がより軟らかいことが分かった。

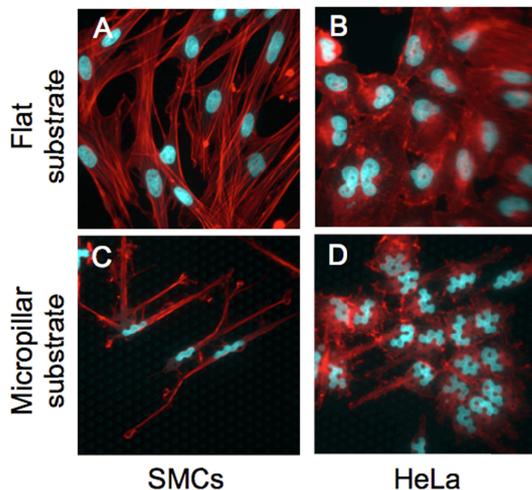


図2：平坦な通常基板上的細胞(上)とマイクロピラー基板で核が変形・拘束された細胞(下)。正常組織由来の血管平滑筋細胞(左)と腫瘍系のHeLa細胞(右)の例。

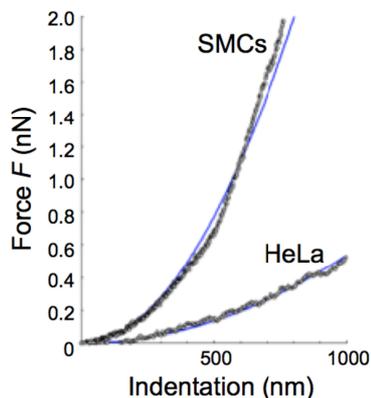


図3：原子間力顕微鏡を用いた細胞核の微小押し込み試験のデータ。正常組織由来の血管平滑筋細胞(SMC)と腫瘍系のHeLa細胞(HeLa)の例。

引き続き、マイクロピラーで核を挟み込んだ状態で細胞の培養を続けると、正常組織由来細胞では、平らな基板上に比べ細胞増殖が著しく抑えられた。しかし、腫瘍系細胞では、核が顕著に変形しているのにも関わらず、増殖性に変化が見られなかった(図4)。

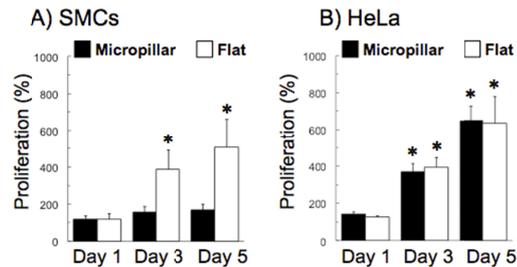


図4：細胞の増殖率の変化。平坦な通常基板上的細胞(白棒グラフ)とマイクロピラー基板で核が変形・拘束された細胞(黒棒グラフ)。正常組織由来の血管平滑筋細胞(A)と腫瘍系のHeLa細胞(B)の例。

この要因を突きとめるために、平坦な基板とマイクロピラー基板上で培養した細胞の核について核内のDNAの凝集状態を調べた。DNA凝集の指標として核内DNAの蛍光輝度を計測した結果、平坦な基板上的細胞の核に比べ、マイクロピラーで挟まれた核では、DNAの輝度が有意に増加していた(図5)。特に正常組織由来細胞では、DNAの輝度の上昇が顕著であり、ピラーで挟まれて核が変形することで、DNAの凝集が促進されていることが示唆された。

近年では、DNAが物理的に凝集することが、遺伝子の転写を抑制する効果があると考えられ始めている(文献)。また、核内のDNAは、核膜裏打ち構造を担うラミタンパク質と結合することで安定化され、その凝集が促進される可能性が指摘されている(文献)。これらの報告と本研究の結果を照らし合わせると、正常組織由来の平滑筋細胞の核では、核膜裏打ちタンパク質(Lamin A/C)が発達し、核膜とDNAとの結合が強く、核が比較的硬い特性を有している。このような硬い核が大きく変形した場合、核膜を介して内部のDNAが圧縮されて凝集し、細胞増殖に関わる遺伝子の転写が抑制されている可能性がある。一方で、核膜構造が未発達で軟らかい腫瘍系細胞の核では、核が大きく変形しても、核膜とDNAとの結合がゆるく、核内のDNAが比較的自由に動けるため、転写が抑制されにくい可能性がある。

以上のように、本研究では、核を機械的に拘束し顕著な変形を加えることで、細胞の増殖が抑制されることを世界で初めて見出した。これらの効果は、核そのものの構造と力学特性に大きく依存し、細胞種や細胞の由来

によって大きく異なる可能性が示唆された。

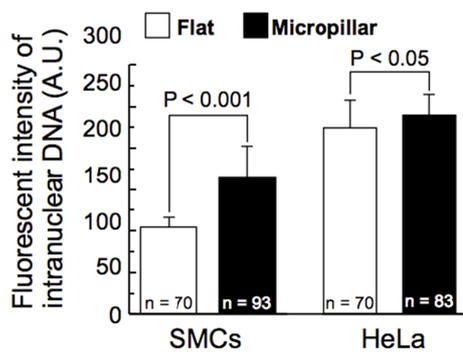


図5：核内のDNAの蛍光輝度の変化（核内でのDNAの密度の指標）。細胞の増殖率の変化。平坦な通常基板上の細胞（白棒グラフ）とマイクロピラー基板上で核が変形・拘束された細胞（黒棒グラフ）。正常組織由来の血管平滑筋細胞（左）と腫瘍系のHeLa細胞（右）の例。

<引用文献>

- Pajerowski JD, et al., Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(40): 15619-24. 2007.
- Mak M, et al., *Lab Chip*. 13(3): 340-8. 2013.
- Trojer P et al., *Mol Cell*, 28: 1–13, 2007.
- Margalit A et al., *Trends Cell Biol*, 17: 202–208, 2007

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16件）

- Matsumoto T, Sugita S, Nagayama K: Chapter 6.4 Tensile Properties of Smooth Muscle Cells, Elastin and Collagen Fibers, *Vascular Engineering* (Tanishita K and Yamamoto K, eds), ISBN: 978-4-431-54800-3 (Print) 978-4-431-54801-0 (Online), Springer (2016) 【依頼総説, 査読あり】
- Nagayama K, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: Mechanical trapping of the nucleus on micropillared surfaces inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells but not cervical cancer HeLa cells, *Journal of Biomechanics*, 48(10), 1796–1803, (2015) 【査読あり】
- Nagayama K, Saito S, Matsumoto T: Multiphasic stress relaxation response of freshly isolated and cultured vascular smooth muscle cells measured by quasi-in situ tensile test, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 25(3), 299-312, (2015) 【査読あり】

あり】

- 長山和亮: 弾性マイクロピラー基板を用いた細胞張力の定量解析と細胞内の核に加わる力の推定, *日本機械学会論文集*, 81(824), 14-00692, (2015) 【査読あり】
- 長山和亮, 松本健郎: 組織再生に向けた細胞のメカノトランスダクションの理解とその制御, *ファルマシア*, 51(11) 1066-1068, (2015) 【依頼解説, 査読あり】
- Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T: Estimation of the mechanical connection between apical stress fibers and the nucleus in vascular smooth muscle cells cultured on a substrate, *Journal of Biomechanics*, 47, 1422-1429, (2014) 【査読あり】
- 長山和亮: 細胞骨格・核のメカノトランスダクションとその解析技法: □アクチンストレスファイバーから核への力の伝達, *細胞工学* 33 (9), 922-927, (2014) 【依頼解説, 査読あり】
- Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T: Apical and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of the nucleus in smooth muscle cells cultured on a substrate, *Cellular and Molecular Bioengineering* 6-4, 473-481, (2013) 【査読あり】
- Hara Y, Nagayama K, Yamamoto TS, Matsumoto T, Suzuki M, Ueno N: Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation, *Developmental Biology* 382-2, 482-495, (2013) 【査読あり】
- Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, Kawakami K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T: Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21, *Nature Communications* 4, 1978, (2013) 【査読あり】
- Hirano T, Kobayashi A, Nakaza T, Kitagawa Shinya, Ohtani K, Nagayama K, Matsumoto T: Low-flow-resistance Methacrylate-based Polymer Monolithic Column Prepared by Low-conversion Ultraviolet Photopolymerization at Low Temperature, *Analytical Sciences* 29-2, 205-211, (2013) 【査読あり】
- Nagayama K, Kimura Y, Makino N, Matsumoto T: Strain waveform dependence of stress fiber reorientation in cyclically stretched osteoblastic cells: Effects of viscoelastic compression of stress fibers,

American Journal of Physiology - Cell Physiology 302, 1469-1478, (2012) 【査読あり】

Nagayama K, Adachi A, Matsumoto T: Dynamic Changes of Traction Force at Focal Adhesions during Macroscopic Cell Stretching Using an Elastic Micropillar Substrate: Tensional homeostasis of aortic smooth muscle cells, *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 7, 130-140, (2012) 【査読あり】

(ほか3件)

[学会発表](計35件)

長山和亮: 細胞核の変形の生理学的意義に関する実験的考察, 日本機械学会バイオエンジニアリング講演会, 東京, 2016. 1. 9-10.

長山和亮: 繰返引張ひずみ場での細胞組織の再配列原理の理解, 日本機械学会M&M2015 材料力学カンファレンス, 東京, 2015.11.21-22

Nagayama K: Nuclear-cytoskeletal Interactions in Vascular Smooth Muscle Cells: Possible Roles in the Regulation of Cell Differentiation, The International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics 2015 (ATEM'15), OS18-1, Toyohashi, 2015. 10. 4-8.

Nagayama K, Murakami Y, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: Nuclear mechanics and mechanotransduction, -the role of the nuclear deformability in cell proliferation-, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, GS1-1, Sapporo, 2015. 9. 16-19.

長山和亮, 濱路祐未, 佐藤祐次, 松本健郎: マイクロピラーによる細胞核の力学的拘束は正常細胞の増殖を抑制するが腫瘍細胞には影響しない, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢, 2015.9.13-15.

長山和亮: 微細加工基板を用いた細胞核の機械的拘束と細胞増殖性への影響, 第23回茨城講演会, 日立, 2015. 8. 28.

長山和亮: 細胞機能操作・診断ツールとしての磁気駆動MEMSデバイス開発, 第23回茨城講演会, 日立, 2015. 8. 28.

杉田修啓, 松川瞬, 長山和亮, 松本健郎: 2種のラット腹部大動脈瘤モデル間の弾性線維量と力学特性の差異, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015. 5. 7-9.

長山和亮: マイクロピラー基板を用いた細胞核の機械的拘束と細胞増殖性への影響, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015. 5. 7-9.

長山和亮, 岩田 誠, 松本健郎: アクチン

細胞骨格と核との力学的結合が血管平滑筋細胞の分化に与える影響, 日本生物物理学会第52回年会, 札幌, 2014. 9. 25-27. 王 軍鋒, 長山和亮, 松本健郎: 基板接着に伴う細胞内焦点接着斑の形態変化の観察, 日本機械学会2014年度年次大会, 東京, 2014. 9. 7-10.

長山和亮, 井上卓也, 松本健郎: 細胞の力学応答解析ツールとしての磁気駆動式マイクロピラー基板の開発, 日本機械学会2014茨城講演会, 日立, 2014. 9. 5.

Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T: Analysis of the Cytoskeleton-Nucleus Mechanotransduction Pathway: Direct Force Transmission from the Actin Stress Fibers to the Nucleus, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics Shima, Japan, 2014, 9. 1-4 【招待講演】

Nagayama K, Yahiro Y, Yamazaki S, Matsumoto T: Mechanical interaction between actin stress fibers and the nucleus: Direct force transmission from the whole-cell level to the nucleus, The 7th World Congress of Biomechanics (WBC2014), C31, Boston, USA, 2014. 7. 6-11 【招待講演】

Nagayama K, Iwata M, Hamaji Y, Matsumoto T: Changes in the mechanical environment of nucleus during the phenotypic changes of vascular smooth muscle cells, International Symposium on Mechanobiology 2014 (ISMB2014), Okayama, 2014. 5.20-23 .

(その他20件)

[その他]

ホームページ等

- ・ <http://biomech.web.nitech.ac.jp/top.html>
- ・ <https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/002641/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI)

茨城大学・大学院理工学研究科・教授

(旧所属: 名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授)

研究者番号: 10359763

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

松本 健郎 (MATSUMOTO TAKEO)

名古屋工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：30209639

杉田 修啓 (SUGITA SHUKEI)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：20532104