

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01304

研究課題名(和文)細胞力学応答を制御する細胞核リモデリングの解明

研究課題名(英文)Study of the role of nuclear mechanical remodeling in cellular mechano-responses

研究代表者

坂元 尚哉 (SAKAMOTO, NAOYA)

首都大学東京・システムデザイン研究科・准教授

研究者番号：20361115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞核-アクチンフィラメント結合を架橋するタンパク質の一つ Nesprin-1を発現抑制した線維芽細胞の伸展刺激負荷に対する形態変化を調べた。その結果、繰り返し伸展刺激によって引き起こされる細胞伸長がNesprin-1を発現抑制により減少した。細胞核力学特性を低下させた際にも同様の傾向が見られ、細胞核力学特性が伸展刺激環境下における極性を有した細胞伸長において重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex has been suggested to be a mechanical link tethering the nucleus to cytoskeletons in a cell. In this study, we address the role of nesprin-1, which is a component of LINC complex and directly binds to actin cytoskeletons, -mediated nucleus-actin filament bindings in morphological changes of fibroblasts exposed to cyclic stretching. Fibroblasts were transfected with siRNA against nesprin-1 and used for cyclic stretching experiments. After exposure to cyclic stretching, siRNA-treated fibroblasts showed less elongated shapes compared to non-treated wild type cells. Treatment of Trichostatin A, which decreases nuclear stiffness, induced more rounded shapes than those of non-treated cells under both static and cyclic stretching conditions. These results suggest that nucleus-actin filaments bindings play an important mechanical role in formation of elongated shapes of fibroblasts under cyclic stretching condition.

研究分野：細胞バイオメカニクス・メカノバイオロジー

キーワード：生物・生体工学 細胞・組織 細胞核 架橋タンパク質 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

多くの細胞は外部からの力学刺激や接着基質（細胞外基質）の硬さなど周囲の力学環境を感知し、細胞内シグナル活性や遺伝子発現を変化させることで、最終的に形態的・機能的応答を示す。このような力学環境に対する細胞応答（力学応答）のメカニズムに関する研究では、細胞膜受容体や細胞-細胞外基質間の接着を架橋する焦点接着斑など、力学刺激が直接作用する細胞表面のタンパク質の役割が精力的に調べられてきた。一方で、細胞表面に作用した力学刺激は、LINC (Linker of Neucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体を介して細胞骨格と直接結合する細胞核へも伝達される（力学伝達）。筆者を含めたこれまでの研究により、LINC 複合体を介した細胞核-細胞骨格結合を阻害すると、細胞が力学刺激に対して形態応答を示さなくなることが明らかになっている（図1）。また筆者は細胞核-細胞骨格結合阻害により、細胞外基質の硬さに依存した細胞増殖能変化が消失することも発見している。従来の細胞膜タンパク質の役割だけではこのような細胞機能変化を説明できないため、細胞核への力学伝達が細胞力学応答において非常に重要な役割を持つと考えられる。

細胞核への力学伝達の重要性は近年注目されてきている。その背景の一つとして、核膜裏打ち構造をなす核ラミナの構成タンパク質ラミンや LINC 複合体の変異・遺伝子発現欠損はプロジェリア症候群や筋ジストロフィ

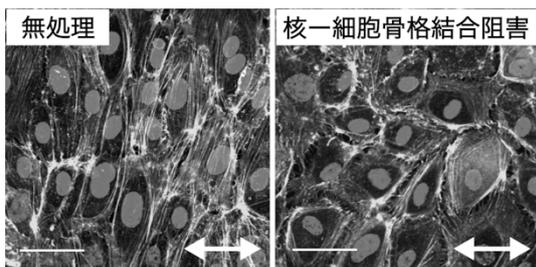


図1 細胞核-細胞骨格結合阻害によるアクチン細胞骨格構造変化の違い(矢印、伸展刺激負荷方向; Bar = 50 μ m)

ーなど重篤な疾患の発症に関与し、“Laminopathy”として認知されていることが挙げられる。Laminopathy の特徴として細胞核の形状や力学特性の異常が知られている。そのため、細胞核の細胞力学的な役割解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞核への力学伝達が細胞核自身の力学特性および細胞の力学応答に対する役割の解明を目的として、繰り返し伸展刺激を負荷した線維芽細胞の細胞形態および細胞核弾性率変化に対する Nesprin-1 を発現抑制の影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および Nesprin-1 発現抑制

ヒト皮膚線維芽細胞（理研セルバンク）を実験に用いた。細胞に対し、導入試薬を用いて Nesprin-1 に対する siRNA を導入し、Nesprin-1 の発現抑制を行った。免疫蛍光染色により Nesprin-1 の発現抑制を予め確認した。

(2) 繰り返し伸展刺激負荷

ストレッチチャンバに播種した細胞に対して 10%ひずみ、1Hz の単軸繰り返し伸展刺激を負荷した。伸展刺激負荷後の細胞を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、細胞核およびアクチンフィラメントを蛍光標識した。倒立型蛍光顕微鏡を用いて取得した蛍光画像から画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health) を用いて細胞の形態評価を行った。用手的に抽出した細胞輪郭形状を ImageJ の機能を用いて相当楕円近似し、相当楕円の短軸長さと長軸長さの比（逆アスペクト比）を求めた。

(3) 細胞核弾性率計測

伸展刺激負荷後、原子間力顕微鏡を用いて細胞の核上部付近を押し込みフォースカーブを取得し、得られた力-押し込み量関係から細胞核弾性率を算出した。

4. 研究成果

(1) Nesprin-1 発現抑制した細胞の細胞核弾性率変化

無処理の野生型細胞群および siRNA 処理細胞群ともに繰り返し伸展刺激負荷後、1 時間で細胞核弾性率の低下が見られた。その後、刺激を 24 時間まで負荷し続けたところ、野生型細胞群では細胞核弾性率の回復が確認された。一方で siRNA 処理群では細胞核弾性率は低下したままであった。この結果は、力学刺激によって低下した細胞核弾性率回復に対して Nesprin-1 が重要な役割を持つことを示唆する。

(2) Nesprin-1 発現抑制した細胞の細胞形態変化

線維芽細胞に繰り返し伸展刺激を負荷した結果、野生型群および siRNA 処理群ともに負荷 1 時間で一旦収縮した形状を示した (図 2)。その後負荷 6 時間で両群ともに、伸展刺激方向に対して直交方向への再配向を示したものの、野生型細胞群に比べ siRNA 処理群では形態変化時の細胞伸長の低下が観察された。また、Actinomycin D 処理により遺伝子発現を抑制した細胞においても同様の形態変化が観察されたことから、伸展刺激による細胞の伸長・配向は遺伝子発現変化を伴わない細胞内シグナル経路によって生じることが明らかに

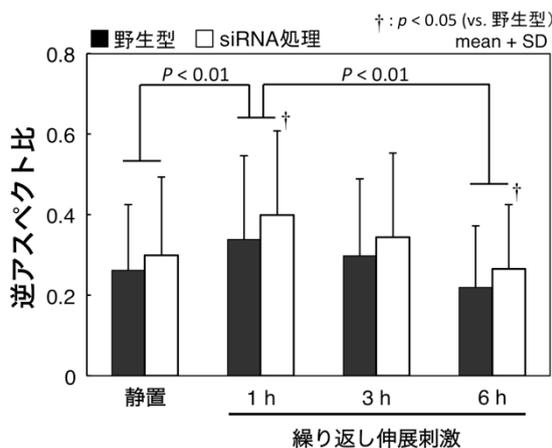


図2 繰り返し伸展刺激負荷による線維芽細胞逆アスペクト比変化

なった。

さらに細胞伸長に対する細胞核の力学的役割を検討するため、Trichostatin A 処理により細胞核弾性率を低下させた細胞に繰り返し伸展刺激を負荷させたところ、負荷 1 時間で一旦収縮した形状を示し、その後再配向現象を示したものの、細胞伸長度は低下したままであった。以上の結果より、細胞核力学特性は繰り返し伸展刺激曝された細胞の極性を有した伸長に対して力学的に重要な役割を持つことが明らかになった。Nesprin-1 を発現抑制した場合、細胞核の力学的な役割が細胞内において機能しないため、細胞伸長度の低下が生じたと考えられた。

本研究ではさらに繰り返し伸展刺激によって引き起こされる細胞核弾性率の減少およびその回復メカニズムを検討するため、細胞核構造である核ラミナやクロマチンのアセチル化状態を免疫蛍光染色法により可視化・顕微鏡観察を行った。しかし、これら構造に顕著な変化は認められなかった。今後さらに構造タンパク質発現量分析などを含めた詳細な評価が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

① D. Yoshino, N. Sakamoto, M. Sato: Fluid shear stress combined with shear stress spatial gradients regulate vascular endothelial morphology, *Integrative Biology*, Vol. 9 (7), pp.584-594, 2017. (DOI: 10.1039/C7IB00065K)

② N. Sakamoto, M. Ogawa, K. Sadamoto, M. Takeuchi, N. Kataoka: Mechanical role of nesprin-1-mediated nucleus-actin filament binding in cyclic stretch-induced fibroblast elongation. *Cellular and Molecular Bioengineering*, Vol. 10 (4), pp. 327-338, 2017. (DOI: 10.1007/s12195-017-0487-6)

③ X. Han, N. Sakamoto, N. Tomita, H. Meng, M. Sato, M. Ohta: Influence of shear stress on

phenotype and MMP production of smooth muscle cells in a co-culture model. Journal of Biorheology, Vol. 31 (2), pp. 50-56, 2017. (DOI:10.17106/jbr.31.50)

④ N. Sakamoto, K. Sadamoto: Effect of low oxygen conditions on matrix metalloproteinase-9 production of macrophages subjected to cyclic stretching: involvement of ERK and Rho kinase pathways. Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 12 (1), p. 16-00590, 2017. (DOI:10.1299/jbse.16-00590)

[学会発表] (計 10 件)

① 小林裕季, 木村 俊, 武居直行, 坂元尚哉, 接着基質伸展に伴う細胞内局所変形挙動のその場観察装置の開発. 日本機械学会関東学生会第 57 回学生員卒業研究発表講演会, 2018 年.

② 坂元尚哉, 香嶋謙志郎, 定本 紀代美, 小川 麻衣, 片岡 則之, 竹内 雅貴, 伸展刺激による線維芽細胞核力学特性変化に対する Nesprin を介した力学伝達の寄与, 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年.

③ 伊藤 佳祐, 伊井 仁志, 和田 成生, 坂元尚哉, 線維芽細胞牽引力に対する細胞核の力学的役割. 日本機械学会第 28 回バイオフロンティア講演会, 2017 年.

④ 坂元尚哉, 堀江 悠太, 大山 侑樹, 舘林 耕平, 中村 匡徳, 高せん断応力環境に対する血管内皮細胞の形態応答. 第 40 回日本バイオレオロジー学会, 2017 年.

⑤ 坂元尚哉, 定本紀代美, 小川麻衣, 片岡則之, 竹内雅貴, 香嶋謙志郎, 細胞核-アクチンフィラメント結合が伸展刺激による細胞核力学特性変化に果たす役割. 第 37 回バイオトライボロジシンポジウム, 2017 年.

⑥ 坂元尚哉, 小川 麻衣, 定本 紀代美, 竹内 雅貴, 片岡 則之, 繰り返し伸展刺激による細胞形態変化と細胞核力学特性の関係, 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

⑦ N. Sakamoto, K. Sadamoto, M. Ogawa, M. Takeuchi, N. Kataoka, Changes in nuclear stiffness of nesprin-1 depleted fibroblasts exposed to cyclic stretching, Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference, 2016 年

⑧ 定本紀代美, 小川麻衣, 片岡則之, 竹内雅貴, 坂元尚哉, 繰り返し伸展刺激を負荷した線維芽細胞核の弾性率に対する Nesprin-1 発現抑制の影響. 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年

⑨ N. Sakamoto, T. Kishimoto, C.E. Kuriki, Proliferation of nesprin-1 knocked-down fibroblasts cultured on substrates of different stiffness. International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics, 2015 年

⑩ 坂元尚哉, 小川麻衣, 定本紀代美, Nesprin-1 を発現抑制した線維芽細胞の繰り返し伸展刺激に対する形態変化. 第 54 回日本生体医工学会大会, 2015 年

[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
研究室ホームページ :
<http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/mechanobio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂元 尚哉 (SAKAMOTO, Naoya)
首都大学東京システムデザイン研究科・准教授
研究者番号 : 20361115