

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03508

研究課題名（和文）内皮細胞Primary ciliumの力学特性計測とメカノセンシング機構の解明

研究課題名（英文）Mechanical characteristics of endothelial primary cilium and understanding of its mechanosensing mechanism

研究代表者

大橋 俊朗（Ohashi, Toshiro）

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：30270812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、細胞表面に存在する直径200nm程度、長さ数 μm 程度の微小な一次繊毛（Primary cilium）の力学特性を詳細に計測し、内皮細胞のメカノセンサとしての同定を試みることを目的とした。力学特性計測のためにマイクロ引張試験機を自作しPrimary ciliumのヤング率を詳細に計測することに成功した。また、単離一次繊毛に対して引張刺激によるカルシウム応答を観察した結果、一次繊毛内にカルシウム上昇が観察され、一次繊毛表面に存在するカルシウムチャネルがカルシウムを取り込んでいることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アテローム性動脈硬化症の好発部位は血管の曲がり部や分岐部に多く、複雑な流れ場によるせん断応力が血管内皮細胞の形態・機能を変化させ病変の発生に結びついていくと考えられている。このことから内皮細胞の力学応答機構の解明は、アテローム性動脈硬化症病態原因の解明や治療法の開発における基礎研究として学術的意義および社会的意義がある。特に、Primary ciliumは直径200nm程度、長さ数 μm 程度の非常に小さいファイバ状の構造体であり、このような微小構造体の力学特性を計測すること自体に学術的なインパクトがある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to measure mechanical properties of endothelial primary cilia with the diameter of ca. 200 nm and the length of several micron existing on the cell surface and to identify them as a mechanosensor. We fabricated an in-house micro-tensile tester to measure mechanical properties of primary cilia and successfully obtained their Young's modulus. In addition, when calcium experiments were performed on the isolated primary cilia by tensile stimulation, an increase in calcium expression was observed in the primary cilia, indicating that calcium channels existing on the surface of primary cilia could activate the entry of calcium ion.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：血管内皮細胞 Primary Cilium 力学特性 メカノセンシング機構

1. 研究開始当初の背景

細胞は周囲の力学環境に適応して形態および機能を変化させることが知られている。これは細胞が力学刺激を感知・伝達し生化学的信号に変換しているためである。細胞のメカノセンシング機構を理解することは、細胞そして組織の生理・病理に深く関わることから大変重要である。例えば、血管内皮細胞は常に血流に曝されて形態や機能を変化させることが知られている。アテローム性動脈硬化症の好発部位は血管の曲がり部や分岐部に多く、複雑な流れ場によるせん断応力が内皮細胞の形態・機能を変化させアテローム性動脈硬化症の発生に結びついていくと考えられている。このことから血管内皮細胞はアテローム性動脈硬化症の発生に深く関与していると考えられてきたが、内皮細胞のメカノセンシング機構の全容は明らかではない。せん断応力に対する内皮細胞のメカノセンサ候補として膜タンパク質、細胞骨格、焦点接着斑、細胞間接着部位などが挙げられている。近年では、内皮細胞表面に突出する Primary cilium が力学刺激の感知に関与していることが指摘されている (Hoey, *et al.*, J Biomech, 2012)。Primary cilium は細胞膜上に突き出た微小管で構成された小器官であり、内皮細胞だけでなく様々な細胞で存在が確認されている。メカノセンサとしての感度を考える上で、Primary cilium の力学特性を知ることは非常に重要であるが、計測の困難さから流れに対する変形により力学特性を推定した報告が僅かに見られる程度であり、単離した Primary cilium に対する計測例は研究代表者の知る限り見られない。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに本研究課題では、血管内皮細胞より単離した Primary cilium の力学特性を初めて直接計測し、培養系において Primary cilium に力学刺激を直接負荷することで内皮細胞の流れに対するメカノセンサとしての同定を試み、内皮細胞の力学応答機構をより追求することを目的とする。Primary cilium は直径 200nm 程度、長さ数 μm ~10 μm 程度の非常に小さいファイバ状の構造体であり、このような微小構造体の力学特性を計測すること自体に学術的なインパクトがある。高分子やカーボン等のナノファイバはティッシュエンジニアリングや複合材料など様々な用途があり社会実装上也意義がある。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞の培養および Primary cilium の単離

細胞試料にはウシ大動脈由来内皮細胞を用いた。Primary cilium は細胞表面に発現する微小管構造様の直径 200nm、長さ数 μm ~10 μm 程度の微小な突起である。内皮細胞の場合、血管部位により 10~数 10%程度の細胞に発現している (図 1(a)、Lim, *et al.*, Cilia, 2015)。まず、可視化を行うために acetylated α -tubulin による免疫蛍光染色を行った。単離には遠心分離法および poly-L-lysine をコーティングしたカバーガラスによる単離・回収技術 (図 1(b)、Huang *et al.*, Am J Physiol, 2006) を用いた。

(2) Primary cilium の力学特性計測

単離した Primary cilium に対して、マイクロフルイディクスデバイス、マイクロ引張試験機、AFM (原子間力顕微鏡) による力学試験技術を確立した。マイクロフルイディクスデバイスについては、Primary cilium などの微小ファイバの曲げ特性を高効率に計測できるデバイスとして新規に開発した。また、マイクロ引張試験機では顕微鏡下で微小な構造物を 2 本のカンチレバーで引っ張ることができるマイクロ引張試験機 (Deguchi *et al.*, J Biomech, 2006) を自作した (図 1)。

まず、単離した Primary cilium の曲げ特性を高効率に計測するため、マイクロフルイディクスデバイスを作製した (図 2(a))。Primary cilium を長さによって受ける流体力の違いにより仕分けするソーティング部と Primary cilium を補足し横流によって曲げ変形を起こさせる計測部で構成される。次に、マイクロ引張試験機を作製し Primary cilium の引張試験を行った (図 2(b))。さらに、AFM を利用し Primary cilium に押し込みによる曲げ試験を行った (図 2(c))。

(3) Primary cilium 力学応答実験

単離した内皮細胞 Primary cilium に力学刺激を負荷し、カルシウム応答を観察する実験技術を確立した。単離一次繊毛に対して引張刺激を与え、一次繊毛内カルシウム応答 (Rhod-3 AM) を観察した。

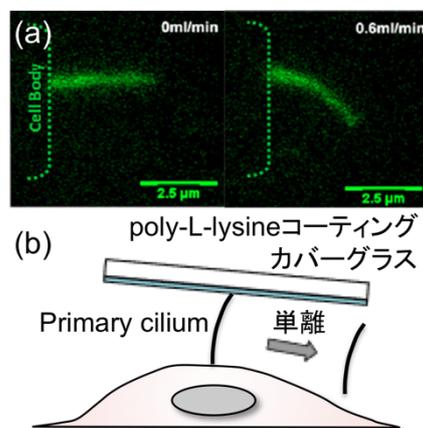


図 1 (a)Primary cilium の流れ変形と (b)Primary cilium の単離。

4. 研究成果

Primary Cilium の単離においては、遠心分離法およびカバーリップを用いた単離技術に確立に成功したが、回収率が高い遠心分離法を採用することとした。試料として、継代数 6 のウシ大動脈内皮細胞を用い、コンフルエント状態から 2 週間培養することで一次繊毛の様な発現を促した。一次繊毛の同定、光学顕微鏡下での観察を行うため一次繊毛に存在するアセチル化 α チューブリンを対象として一次繊毛の免疫蛍光染色を行った。一次抗体には Acetylated α tubulin 抗体 (sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, USA), 二次抗体には Alexa Fluor® 488 標識付き抗マウス IgG(H+L)抗体 (Goat Anti-Mouse IgG(H+L), Human ads-Alexa Fluor® 488, SouthernBiotech, USA) を用いた。免疫蛍光染色された細胞を PBS とともに遠心管に移し、4°C で 10 分間 1000 x g で遠心分離を行い、PBS によって希釈された上清を 4°C で 30 分間 40000 x g で遠心分離し細胞片を回収することで細胞から単離された一次繊毛を観察することができた (図 3)。

Primary cilium の力学特性計測として、マイクロフレイディクスデバイス技術では流路内において Primary cilium の補足に困難が認められた。一方、マイクロ引張試験装置の製作は順調に行うことができた。また、AFM 押し込み試験にも成功し、Primary cilium の局所ヤング率を計測することができ、引張試験と同程度のヤング率を得た。

マイクロ引張試験において、荷重計測を行うガラス針にはバネ定数が $0.89 \text{ nN}/\mu\text{m}$ であるものを使用した。一次繊毛とガラス針の接着にはエポキシ系接着剤であるアラルダイトを使用し、接着が確認されたのち一次繊毛とガラス針の変形の様子を観察した。マイクロ引張試験の結果、圧電素子の変位に応じて一次繊毛およびガラス針が変形することが観察された (図 4)。一次繊毛の断面は別途 TEM 観察を行い、直径は 200 nm 程度であることを確認した。異なるひずみ速度で引張試験を行った結果、ヤング率はひずみ速度が 0.01 から 0.3 まで変化するのに伴い、約 50 kPa から約 200 kPa へと上昇し粘弾性特性を示すことがわかった (図 5)。過去の報告において、流れ負荷を用いた曲げ試験の結果から一次繊毛のヤング率は 178 kPa と推定されており、本研究で得られたヤング率は同程度の値となった。

また、単離一次繊毛に対して引張刺激によるカルシウム応答を観察した結果、一次繊毛内にカルシウム上昇が観察され、一次繊毛表面に存在するカルシウムチャネルがカルシウムを取り込んでいることが確認された。このことから、流れ刺激に対して一次繊毛はそのヤング率に応じたたわみを示し、一次繊毛表面のカルシウムチャネルによって取り込まれたカルシウムが細胞内に流れ込み細胞内シグナル伝達が励起されることが示唆された。

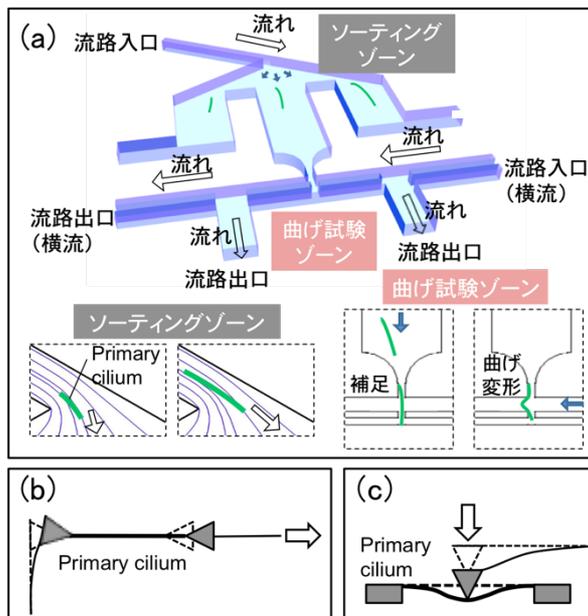


図 2 (a)マイクロフレイディクス, (b)マイクロ引張試験, (c)AFM による Primary cilium の力学試験。

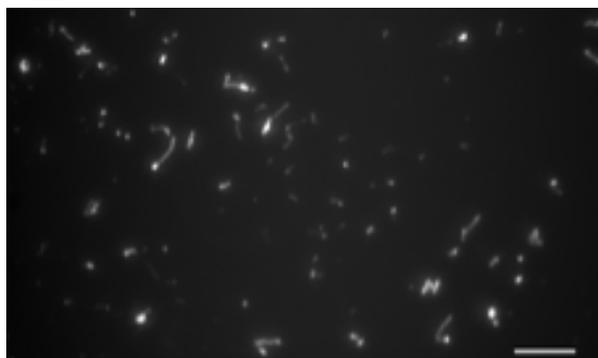


図 3 単離された primary cilium。スケール: 20 μm 。

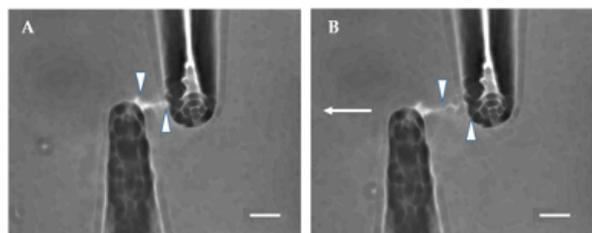


図 4 マイクロ引張試験の様子。左: 引張前、右図引張後。

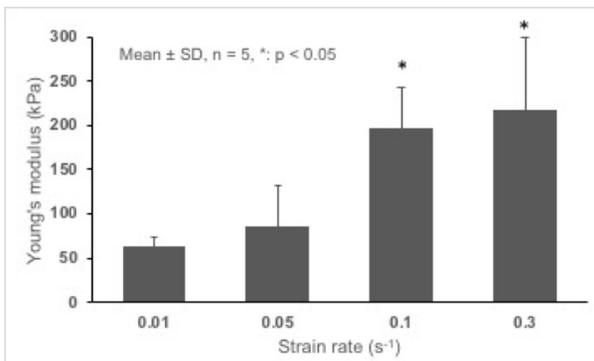


図 5 異なるひずみ速度に対する primary cilium のヤング率の変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tien Dung Do, Katsuyoshi Jimuro, Toshiro Ohashi
2. 発表標題 Measurement of mechanical properties of isolated primary cilia using micro-tensile tester
3. 学会等名 第42回日本バイオロロジー学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li Jingyi, Ricardo Manuel Ibarra, Toshiro Ohashi
2. 発表標題 Measurement of mechanical properties of endothelial glycocalyx by using magnetic beads
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tien Dung Do, Katsuyuki Jimuro, Cai Haonan, Satoshi Matsuo, Ricardo Manuel Ibarra, Toshiro Ohashi
2. 発表標題 Mechanical Characterization of MDCK Primary Cilia and implications for internal structure
3. 学会等名 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 智史, 玉井 克志, 蔡 昊男, 大橋俊朗
2. 発表標題 内皮細胞一次繊毛の可視化および力学特性計測技術の開発
3. 学会等名 第41回日本バイオロロジー学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇室 勝善, Tien Dung DO, 大橋 俊朗
2. 発表標題 マイクロ引張試験による細胞一次繊毛の力学特性計測
3. 学会等名 第9回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haonan CAI, 大橋 俊朗
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた細胞一次繊毛の力学特性計測
3. 学会等名 第9回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiro Ohashi
2. 発表標題 Investigation of Endothelial Mechanotransduction Mechanism: Mechanical Properties of Primary Cilia
3. 学会等名 11th Australasian Biomechanics Conference 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------