

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22944

研究課題名（和文）細胞の“構造と力の記憶”メカニズムの探求

研究課題名（英文）Study on the mechanism of structural and tensional memory of cells

研究代表者

長山 和亮（Nagayama, Kazuaki）

茨城大学・理工学研究科（工学野）・教授

研究者番号：10359763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞の構造と力の記憶メカニズムを探るとともに、その生理的意義を明らかにすることを目的とし、特に細胞老化との関わりに着目しながら2年間の研究を進めてきた。血管平滑筋細胞を対象として、低継代数の細胞と、継代を重ねた細胞を準備し、アクチン細胞骨格の分布様態、細胞張力、細胞の運動特性を調査した。継代数が増えると細胞面積が増加するが、細胞張力が減少し、運動能にも低下が見られた。アクチン細胞骨格を物理的に切断して、収縮挙動と構造・力の再現力を評価したところ、継代数が進むにつれて復帰能は高まるが、再現性は乏しくなる傾向が得られた。細胞の張力や構造の記憶能力が細胞老化に深く関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞の継代数が増え老化が進むと細胞張力が減少し運動能にも低下が見られること、個々のアクチン細胞骨格の復帰能力は高まるがその再現性は乏しくなることを明らかにした。さらに、細胞が自身の力学構造の再現と崩壊を巧みに切り換える機能を持っており、その機能は細胞老化と密接に関わることが示唆された。本研究では、このような1つ1つの細胞に備わる「構造と力の再現能力」が、様々な外乱に対する組織全体の恒常性を維持するキーファクターとなっている可能性を世界で初めて得た研究であり、疾患や創傷の早期治療手法の開発などに応用展開できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism of a structural and tensional memory of cells with consideration for cell aging. We used vascular smooth muscle cells and found that cell aging increased cell projected area while it reduced intracellular tension and migration ability. We further found that tensional memory of actin stress fibers in vascular smooth muscle cells tended to decrease with cell aging. These results indicate that cell aging not only affects cell morphology and biochemical functions but also mechanical properties of cells involving in cellular mechanotransduction.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞バイオメカニクス メカノバイオロジー 細胞骨格 細胞核 恒常性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血管や骨などの生体組織は、周囲の力学環境の変化に応じて組織構造を再構築する。この再構築を支える細胞内要素として、アクチンストレスファイバが着目されている。我々は、最近、ストレスファイバには、一旦バラバラになっても自己の線維構造や配向、さらに発生する力も効率良く再現させる「構造と力の記憶」が備わる可能性に気付いた。このような個々の細胞骨格分子の記憶特性は、外乱に対する組織全体の恒常性を保つ基盤原理となっている可能性が高い。しかし、ストレスファイバが、どのようにして自己の分子構造や張力を記憶しているのか、そして、力学的恒常性の維持と再構築をどのように切り替えているのか明らかとなっていない。また、このようなアクチン細胞骨格の力と構造の記憶力が、細胞の脱分化や老化などによってどのように変化するのか全く不明であった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、アクチン細胞骨格に着目し、特に細胞老化の観点から、細胞が発生する張力や細胞運動がどのように変化するのか詳しく調べることを目的とした。さらに、生化学的・物理的外乱を加え分解させた後、その分子構造や張力が再現する過程を詳しく調べた。そして、細胞の構造と力の記憶メカニズムを探るとともに、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 試料細胞には購入時の継代数が3のブタ胸大動脈由来血管平滑筋細胞 (PSMC010, コスモバイオ株式会社) を用いた。これらを10%のウシ胎児血清を含むDMEM培地中で37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95%Airの環境で増殖させて培養し、細胞がセミコンフルエントに達した時点で1:4の比率で継代した。本研究では繰り返し継代することで細胞の老化を促進させ、継代数で老化の進行度を、若い細胞 (継代数4-6)、中程度の細胞 (継代数7-11)、老化が進んだ細胞 (継代数15以上) と分類して使用した。なお、老化により面積が増加する核小体の形態を計測したところ、継代数4の細胞と比較して継代数17の細胞では核小体の面積が有意に増加したため、このように定義した。

(2) 細胞老化に伴う細胞張力の変化を調べるため、微細加工技術にて作製したシリコンラバー (Polydimethylsiloxane, PDMS (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit)) 製のマイクロピラー基板を用いた (図1)。マイクロピラーの直径は3 μm、高さは9 μmとし、ピラー同士の付着を防ぐため、ピラーの中心間距離は9 μmとした。細胞接着タンパク質であるフィブロネクチン溶液をPDMSシート上に滴下し、クリーンベンチ内で乾燥させた。PDMSシートのフィブロネクチン面を、マイクロピラー基板の表面に軽く押し付けて、フィブロネクチンをピラー先端面にのみ転写した。その後、血管平滑筋細胞を播種し、インキュベータ内で5時間以上培養して、細胞が十分に広がっていることを確認した。これらの細胞試料を生きた状態で倒立顕微鏡のステージ上に設置し、培養環境を制御しながら、電子増倍型デジタル CCD カメラで細胞とピラー先端の画像を撮影した。そして、細胞が接着しているピラーを選択し、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて、輝点追跡用のプラグイン (Track Mate) でピラー先端の輝点を自動追跡し、x方向、y方向のピラーの変位を精密に計測した。計測されたピラーの変位量に、ピラーのバネ定数を乗ずることで、各ピラーの張力を求め、細胞全体の張力ベクトルを評価した。

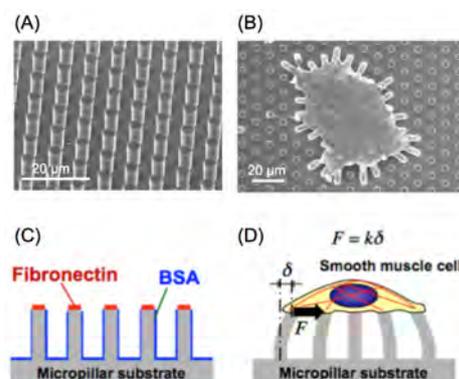


図1 細胞張力計測のためのマイクロピラー基板 (A) とピラー上に広がった細胞の様子 (B)。ピラー先端に接着タンパク質をコートして接着を促す (C)。細胞の張力によってピラーが変形する (D)

(3) 倒立型蛍光顕微鏡に、波長 355 nm、パルス幅約 400 ps のレーザユニットを組み、顕微鏡観察しながら細胞骨格を切断できるレーザアブレーションシステムを構築した (図2)。ディッシュ上で培養した細胞試料を顕微鏡に設置し、顕微鏡焦点に位置するアクチン細胞骨格に対して、高倍率対物レンズで焦点を 1 μm 未満に絞ったレーザ光を照射して切断することに成功した。細胞の端から端まで横切るようなストレスファイバ (アクチン細胞骨格とミオシンタンパク質を主体とする太い線維束) を対象とし、その中央付近を切断して、細胞骨格の収縮挙動ならびに復帰過程を電子増倍型デジタル CCD カメラで連続的に撮影した。一連の実験は、顕微鏡ステージ設置型 CO<sub>2</sub> インキュベータを使って細胞培養環境を維持しながら行った。

得られたストレスファイバの収縮画像に対し、画像解析ソフトウェアを使って、対象となるストレスファイバの初期長さとして切断後  $t$  秒後の長さを計測し、切断されたストレスファイバの収縮挙動および復帰挙動を詳しく調査した。

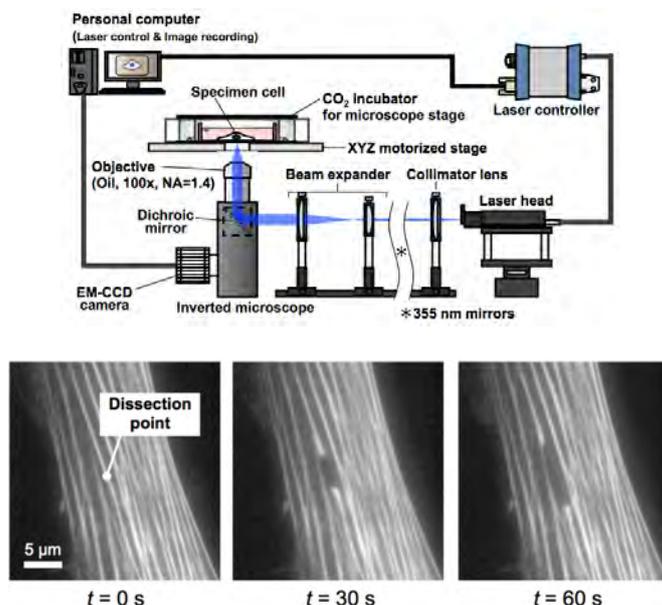


図2 細胞骨格を切断するためのレーザアブレーションシステム (上). 細胞内の1本のアクチンストレスファイバをレーザで切断したときの収縮挙動 (下).

#### 4. 研究成果

継代数が異なる3群の血管平滑筋細胞に対し、DNA複製期(S期)に移行した細胞割合を計測したところ、Young群、Middle群、Old群で、それぞれ約45%、約65%、約38%となった。細胞増殖能はMiddle群で最も高くなり、継代培養によって細胞の脱分化が促進されたと考えられる。さらに継代培養を続けたOld群では、Middle群に比べて有意に増殖能が低下したことから、脱分化だけでなく、細胞の老化の影響が現れている可能性が示唆された。

次に、それぞれの継代数の細胞をマイクロピラー基板上で培養し、細胞張力を計測した結果を図3に示す。いずれの群の細胞も、ピラーの先端に接着して広がっていることを確認した(図3A-C)。特に細胞両端に位置するピラーの撓みが比較的大きく、接着部位にて10-40 nNの張力を発生していることが確認できた。細胞接着部位でのピラーの変位から、個々の細胞の全体張力  $F_{all}$  を算出してみると、脱分化が進むにつれて細胞の張力が徐々に低下していく傾向がみられた(図3D)。すなわち、十分に脱分化が進行し、細胞の老化の影響が現れ始めたOld群では、他群と比べて張力が有意に低くなり、Young群の細胞張力の半分ほどの値になった(図3D)。また、マイクロピラー基板上での細胞の面積を比較したところ、Young群、Middle群、Old群で、それぞれ約2750  $\mu\text{m}^2$ 、2500  $\mu\text{m}^2$ 、1100  $\mu\text{m}^2$  となり、平坦な基板上での結果と異なり、継代数が大きくなるにつれて細胞面積が減少する傾向が見られた。平坦な基板に比べ、マイクロピラー基板では、個々のピラーの間に数  $\mu\text{m}$  のスペースが空いており、細胞は仮足を伸ばしてその間隙をまたぎながら伸展していくと考えられる。このような環境では、細胞が仮足を安定して成長させる能力の差などが顕著に現れやすいと考えられ、継代培養による細胞の脱分化および老化によって、仮足を伸ばして伸展する能力にも影響が生じた可能性がある。さらに、このような仮足形成能の違いが、細胞が損傷を受けたときの構造の復帰能力に繋がる可能性がある。

最後に、継代数が異なる3群の細胞に対し、細胞内部のストレスファイバを切断して、その収縮挙動を詳細に観察した(図4)。いずれの群でも切断されたストレスファイバは直ちに細胞両端に向かって収縮し、徐々にその収縮速度を低下させ、1次遅滞的な収縮挙動を見せた。特にYoung群では収縮量が大きく、切断から1分ほどで急速に収縮し(図4A-C)、5分後には半分以下の長さになった。得られた収縮データから、収縮率  $\alpha$  と時定数  $\tau$  を算出したところ、収縮率  $\alpha$  はYoung群で最も高く初期長さの60%程度まで収縮することが分かった。一方、Middle群やOld群では30%程度の収縮率に留まった(図4J)。時定数  $\tau$  も老化が進むほど徐々に小さくなる傾向があり、Young群に比べてOld群では有意に小さく、より早く収縮が完了することが分かった(図4K)。さらに、それぞれの群について、切断後のストレスファイバの挙動を長時間撮影したところ、一部の細胞で、収縮過程の途中で、構造を復帰させる様子が確認された。特に老化が進んだ細胞では、周囲の細かいアクチン線維と融合しながら、即座に新たな線維構造が再生される傾向があったが、その初期の配向特性は失われるといった興味深いデータが得られた。

以上の成果の一部を論文としてまとめ、現在、投稿準備を進めている。

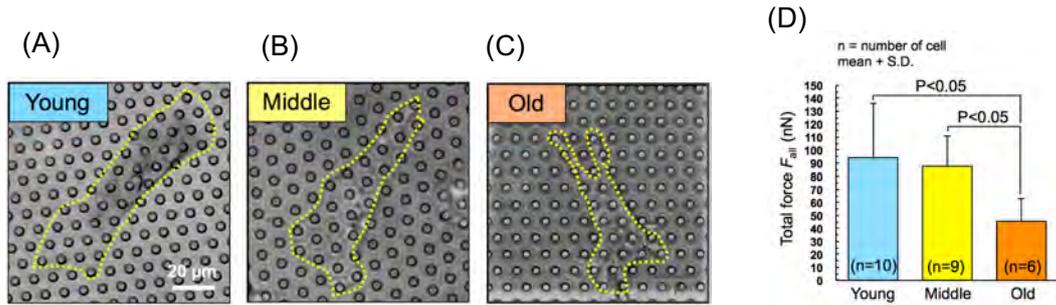


図3 張力計測用のマイクロピラー基板上に培養した血管平滑筋細胞. (A): 若い細胞 (継代数 4-6), (B): 中程度の細胞 (継代数 7-11), (C): 老化が進んだ細胞 (継代数 15 以上). (D): 細胞老化に伴う細胞張力の変化.

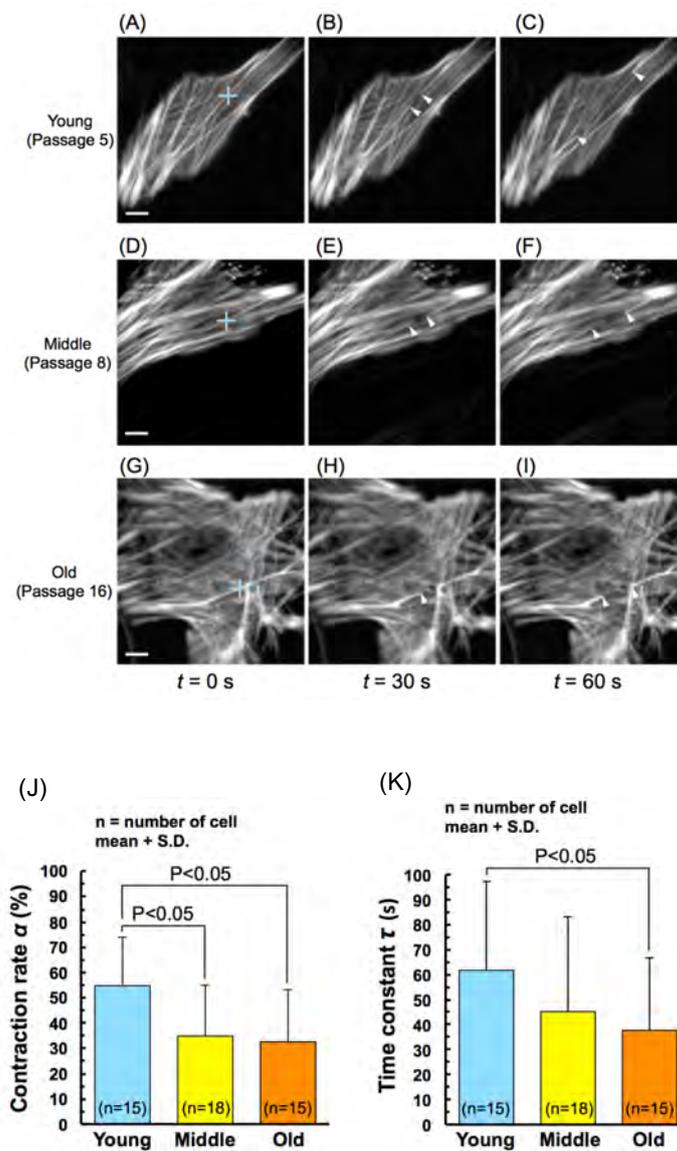


図4 血管平滑筋細胞の個々のアクチンストレスファイバをレーザーで切断後の収縮挙動の代表例. (A)~(C): 若い細胞 (継代数 4-6), (D)~(F): 中程度の細胞 (継代数 7-11), (G)~(I): 老化が進んだ細胞 (継代数 15 以上). (J): ファイバの収縮率の解析結果. (K): ファイバの収縮挙動における時定数の解析結果.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamashiro Yoshito, Thang Bui Quoc, Ramirez Karina, Shin Seung Jae, Kohata Tomohiro, Ohata Shigeaki, Nguyen Tram Anh Vu, Ohtsuki Sumio, Nagayama Kazuaki, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 117
2. 論文標題 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP in the vascular remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9896 ~ 9905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1919702117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagayama Kazuaki, Fukuei Tomohiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Cyclic stretch-induced mechanical stress to the cell nucleus inhibits ultraviolet radiation-induced DNA damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10237-019-01224-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagayama Kazuaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Biomechanical analysis of the mechanical environment of the cell nucleus in serum starvation-induced vascular smooth muscle cell differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 19-00364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/jbse.19-00364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 NAGAYAMA Kazuaki, NOGAMI Kenzo, SUGANO Shunta	4. 巻 86
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Contractile Ability of Vascular Smooth Muscle Cells Using a Micropillar Substrate and a Laser Nanoscissor System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society for Precision Engineering	6. 最初と最後の頁 813 ~ 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2493/jjspe.86.813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HANZAWA Tatsuya, NAGAYAMA Kazuaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Analysis of vascular smooth muscle cell and HeLa cell migration on the microgrooved substrate (Cell type differences of the mechanical sensing for microgrooved surfaces)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transactions of the JSME (in Japanese)	6. 最初と最後の頁 20-00301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/transjsme.20-00301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 OBATA Shota, NAGAYAMA Kazuaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Development of an in-process micro tensile tester and its application for measurement of the mechanical properties and adhesion forces of cells (Quantitative analysis of a cancer cell stiffness and adhesion forces)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transactions of the JSME (in Japanese)	6. 最初と最後の頁 20-00311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/transjsme.20-00311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐々木達也, 長山和亮
2. 発表標題 酸性ストレスが細胞周期および細胞運動に与える影響
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 長山和亮
2. 発表標題 繰返伸展刺激下での核の力学場の変化が細胞紫外線耐性に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田博教, 長山和亮
2. 発表標題 骨形成遺伝子抑制細胞の核の力学特性ならびに核内DNAの凝集解析
3. 学会等名 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 半沢達也, 長山和亮
2. 発表標題 セルソーティング技術への応用を目指した微細溝基板上での細胞運動解析
3. 学会等名 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野上謙三, 長山和亮
2. 発表標題 継代培養での老化に伴う血管平滑筋細胞の張力ならびに力学特性の変化
3. 学会等名 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagayama K
2. 発表標題 A novel micro-grooved collagen substrate for inducing vascular smooth muscle cell differentiation through cell tissue arrangement and nucleus remodeling
3. 学会等名 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagayama K, Fukuei T
2. 発表標題 Cyclic stretch-induced mechanical stress to the cell nucleus improves the ultraviolet radiation resistance in cells
3. 学会等名 The 17th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

茨城大学研究者情報 (長山和亮) <a href="https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html">https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html</a> 茨城大学 マイクロ・ナノバイオメカニクス研究室 (長山研) ホームページ <a href="http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/index.html">http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/index.html</a>
--

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
---------	---------