

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：特別推進研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20001007

研究課題名（和文） 細胞の力覚機構の解明

研究課題名（英文） Study of Mechanisms of Cellular Mechanosensing

研究代表者

佐藤 正明 (SATO MASAOKI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：30111371

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、バイオイメージング、細胞外基質、細胞骨格、細胞内情報伝達、Rho ファミリー、ストレスファイバ、メカノセンシング

1. 研究計画の概要

我々の体を構成する細胞の多くは力を感じるセンサ「力覚」を有している。細胞に外力が負荷されると、これらのセンサが力学的刺激を生化学的信号へと変換し、その結果細胞の機能や形態に様々な変化が起こるものと考えられる。我々はこれまでに血管内皮細胞に血流を模した流体せん断応力や血管壁の伸縮を模した繰返し伸展刺激を負荷することによって、内皮細胞の力学刺激に対する形態的応答に着目し研究を行ってきたが、一般的に細胞がどのように力学刺激を感知し、力学刺激の方向に依存してその形態や細胞骨格構造を変化させるのかについては全く不明である。そこで本研究では、細胞に特異的に力学刺激を負荷する手法と最先端のバイオイメージング技術を融合した実験系を駆使して、力覚候補部位に備わる機能と、細胞の形態的応答に潜む原理或いはこれらの時空間的關係について研究し、最終的には細胞力覚機構の全容を解明する。

2. 研究の進捗状況

これまで以下に示す主に4つの領域について研究を実施してきた。

(1) 流れ負荷実験に基づいた細胞の応答機構

① 流れ負荷時に内皮細胞が変形している様子をリアルタイムに観察できるシステムを開発し、細胞内のひずみ分布も解析した。この技術を使って細胞内のストレスファイバに発生するひずみの計測にも成功した。

② T型チャンバを新たに開発し、細胞間接着部位に力を作用させ、この部位の力覚機能の

可能性を明らかにした。

③ PDMS製マイクロピラーアレイ上に内皮細胞を培養し、流れを負荷しながら細胞牽引力の変化を計測することに成功し、形態変化と共に牽引力がダイナミックに変化していく様子を詳細に捉えた。

(2) 張力負荷実験に基づいた細胞の応答機構

① 細胞の局所に力学刺激を与えるための磁気ピンセットを開発した。

② 単離骨細胞の力学刺激に対するカルシウム応答および一酸化窒素産生挙動を観察する *in vitro* 実験系を確立し、局所的な刺激に対するそれらの応答の時間的変化と空間的局在の特性を明らかにした。

③ 繰返し伸展刺激による内皮細胞の極性転換と細胞内アクチン骨格の再構築に関与する Rho ファミリーの活性化因子(Rho-GEF)の網羅的探索を行った結果、GEF-H1を含む複数の遺伝子の同定に成功した。

(3) 細胞力学応答プロセスにおける細胞内シグナルの分子イメージング

① 力学刺激負荷時の細胞内のシグナル伝達をライブイメージングによって観察する技術を開発し、RhoGTPaseの活性状態変化をFRET観察することに成功した。

② 独自に開発した「運動できる培養筋細胞系」を利用することにより、生体筋では解析が難しかった収縮活動依存性の「細胞内シグナル伝達系活性化」から「機能遺伝子の発現」に至る過程を分子レベルで解明した。

(4) ストレスファイバの力覚に果たす役割

細胞は自らが受けた「力」をいつまで生化学量に変換し続けるかは、これまで説明されていなかった。これを説明する「力」のホメオスタシスの分子メカニズムを提案した。

3. 現在までの達成度

②概ね順調に進展している。

(理由)

当初計画していた、細胞の力覚と想定していた部位への局所力学刺激装置の製作が軌道に乗らず、計画の若干の修正を行った。しかしながら、同等以上の機能を有する2種類の新たな装置の開発に成功した。1つは、T型チャンバによる細胞間接着部位への力学刺激負荷であり、他の1つは細胞への流れ刺激負荷と同時に細胞の牽引力を計測可能な装置の開発である。これらの装置の活用により、従来想定していなかった細胞の力学応答の様子が明らかとなってきた。細胞への張力負荷によって応答する蛋白質や遺伝子の同定に成功し、力覚機構の解明に一步近づいた感をもっている。また、単離したストレスファイバの収縮力の計測を始めとして、力覚機構の新たな概念を提示できる可能性も示されてきている。これらの内容の一部は既に国際誌に公表してきているが、さらにレベルの高い雑誌への公表を促進していく。

4. 今後の研究の推進方策

引き続き主に4つの領域で研究を推進する。

(1) 流れ負荷実験に基づいた細胞の応答機構

①空間的せん断応力勾配の感知メカニズムにおいて細胞間接着分子を起点としたシグナル伝達経路が想定されるので、阻害因子を用いてシグナル伝達経路および関与する因子の特定を行う。

②流れ負荷時の細胞の牽引力変化をより詳細に追跡すると共に、マイクロピラーの空間分布や形状を変化させた場合について検討する。

(2) 張力負荷実験に基づいた細胞の応答機構

①細胞間接着に依存したストレスファイバの張力変化が、細胞応答に対する焦点接着斑分子および細胞間接着分子の働きに影響している可能性があり、RNA干渉法および活性阻害因子を用いて分子の働きを調べる。

②単離骨細胞の力学刺激に対する一酸化窒素産生応答とカルシウム応答との関連を探る *in vitro* 実験系を確立し、骨マトリクス内の *in vivo* 状態における骨細胞メカノセンシング機構について考察する。

③同定した力学応答に関わる Rho-GEF の機能解析と共に、基質の硬さ依存的な上皮間葉転換に関与する Rho-GEF の網羅的探索を行い、力学応答における細胞骨格再構築の作用機序とシグナル伝達機構の解明を行う。

(3) 細胞力学応答プロセスにおける細胞内シグナルの分子イメージング

①アクチンフィラメント再構築を引き起こす Rac1 および RhoA 活性化に対するストレスファイバを介した張力伝達の役割を検討するため、試薬によるストレスファイバの張力調節を行った際の Rac1 および RhoA 活性変化

を FRET イメージング技術により評価する。

②力学刺激に対する適応反応を生細胞内にて世界で最高精度にてナノ計測することが可能になった。この独自の評価系を利用し、細胞力覚と細胞内シグナル伝達系との連結分子機序について究明する。

(4) ストレスファイバの力覚に果たす役割

提案した力のホメオスタシスの分子メカニズムについて、より広範囲のシグナルとの関連を調べる。そこから、力のホメオスタシスの破綻と病変発生との関連を明示する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 73 件)

(1) Y. Ueki, N. Sakamoto and M. Sato: Direct measurement of shear strain in adherent vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394, 94-99, 2010. (査読有)

(2) T. Adachi, Y. Kameo and M. Hojo: Trabecular bone remodelling simulation considering osteocytic response to fluid-induced shear stress. *Phil. Trans. Roy. Soc. A* 368, 2669-2682, 2010. (査読有)

(3) T. Tsuji, Y. Ohta, Y. Kanno, K. Hirose, K. Ohashi and K. Mizuno: Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 3590-3600, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 162 件)

(1) M. Sato: Dynamic mechanical deformation and strain distribution in endothelial cells exposed to fluid shear stress. 8th International Conference on Cell Engineering, 2010年6月11日, アイルランド、ダブリン

[図書] (計 3 件)

(1) S. Deguchi and M. Sato, Cambridge University Press, Cellular Mechanotransduction: Diverse Perspectives from Molecules to Tissue, 2010, pp. 220-233.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 高代謝能を有する培養筋細胞の作製方法、発明者: 神崎 展、権利者: 東北大学、種類: 米国特許登録、番号: 第 7, 829, 334 号、取得年月日: 2010年11月9日、国内外の別: 外国

[その他]

上記雑誌論文(1)の研究が 2010 年の「Faculty of 1000 Medicine」に選定された。この内容は同年 3 月の NHK 仙台放送「てれまさむね」で報道されると共に 5 月の Nature Web 特集記事でも紹介された。

本研究主題と関連した安達らの論文が 2011 年 4 月に Nature 誌 (472 巻) に掲載された。