

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760091

研究課題名(和文) 力学環境変化に対する骨系細胞の構造形成ダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of structural formation of osteoblastic cells  
responding to change in its peripheral mechanical environment

研究代表者

田原 大輔(TAWARA DAISUKE)

龍谷大学・理工学部・助教

研究者番号：20447907

研究成果の概要(和文):

本研究では、骨の力学的適応を担う骨系細胞の活動における細胞周囲の力学環境変化のセンシング機構の解明を目指し、細胞骨格の構造変化に及ぼす力学的因子の影響を検討した。焦点接着斑分布を制御した細胞内の主要なアクチンストレスファイバーは、制御のない場合に比べ、接着斑分布に依存して配向し、見かけの形成(重合)過程が早くなることが観察より示された。これらの結果より、アクチンフィラメントの束化密度と内部に作用する張力の変化および、焦点接着斑分布の変化が、細胞周囲の力学環境変化のセンサーとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

In this study, we investigated the mechanism to sense changes in peripheral mechanical environment and effects of mechanical factors on structural changes of cytoskeleton in osteoblastic cells (MC3T3-E1) which plays an important role for mechanical adaptation of bone. We observed the reorganization process of actin stress fibers in osteoblastic cells under controlled focal adhesion complex. The morphological characteristics of the actin cytoskeleton on the substrate with/without micropatterning were observed for the fixed cells, and we confirmed that the controlled adhesion induced preferred orientation of the cells and fibers. Additionally, we found that the micropatterned substrate enhanced formation of actin stress fibers.

These results suggest that density of actin-bundling and internal tensile forces in actin filaments and distribution of focal adhesion complex in cytoskeleton are one of the important factors to sense changes in peripheral mechanical environment in osteoblastic cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生体力学

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料・材料力学

キーワード：機械材料・材料力学、バイオメカニクス、アクチン細胞骨格、骨系細胞、焦点接着斑、マイクロパターンニング、力学的適応、生物・生体工学

### 1. 研究開始当初の背景

骨の力学的適応を担う骨系細胞の活動に対し、細胞周囲の力学環境変化のセンサーメカニズムと、それに応じた細胞内のマイクロ構造変化における力学因子の関連の解明が望まれる。特に、細胞の構造と機能を司るアクチン細胞骨格構造（アクチンフィラメントの束からなるアクチンストレスファイバー）は、細胞内で焦点接着斑を含む力学構造システムを形成し、常に重合・脱重合、分岐、切断等により動的に変化することで、細胞の形態・機能を調整している。それらの過程において、多くの生化学因子だけでなく、作用する張力や変形などの力学的因子が重要な役割を果たしている。例えば、細胞に流れ刺激や繰り返し伸展刺激を加えると、細胞骨格構造が再構築され、配向変化が生じること、アクチン細胞骨格に作用する張力が、アクチンストレスファイバーの脱重合や重合に関与していることなどが示唆されている。さらに、細胞外基質への接着部位となる焦点接着斑における接着力が、接着斑に作用する張力に依存することも知られている。

そこで、本研究では、細胞の焦点接着斑分布の制御上での脱重合・重合過程におけるストレスファイバー量の経時変化に着目した。また、それらの過程におけるストレスファイバー内張力の影響および、ストレスファイバー内の張力とアクチン重合速度との関連の解明を目指すこととした。

### 2. 研究の目的

本研究では、実験的検討から以下の点について明らかにすることを目的とした。

- (1) 焦点接着斑分布制御の有無によるアクチンストレスファイバーの形成方向の定量的差異
- (2) 焦点接着斑分布制御の有無によるアクチンストレスファイバーの形成量の経時変化と定量的差異
- (3) 焦点接着斑分布制御上のアクチンストレスファイバー形成量の経時変化におけるファイバー内張力の影響

### 3. 研究の方法

- (1) マイクロパターニングによる焦点接着斑分布の制御

細胞接着因子であるフィブロネクチンのマイクロパターニング技術を用い、パターン上に細胞を播種し、焦点接着斑分布の制御を行った。本研究では、フィブロネクチンマイクロパターニングの作成のために、PDMS-stamp を使用した。マイクロパターンの作成概要とスタンプ形状を図 1 に示す。このスタンプは、等間隔に長方形が転写された形状を有している。本研究では、 $20\mu\text{m} \times$

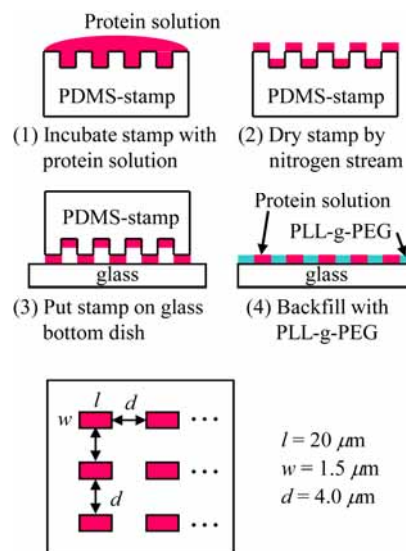


図 1 マイクロパターニングの作成

$1.5\mu\text{m}$ , 間隔  $4.0\mu\text{m}$  の長方形が並んだスタンプを使用した。これを用いて、フィブロネクチンと Fibrinogen Alexa 546 conjugate の混合液をディッシュにスタンプすることで、長方形の細胞接着領域が形成されるとともに、パターンを蛍光観察することが可能となった。スタンプ後、焦点接着斑の形成阻害剤である Poly-L-Lysine-graft-Poly Ethylene Glycol (PLL-g-PEG, 1mg/ml in 10mM Hepes buffer) でディッシュをコーティングすることにより、スタンプした部分のみを細胞接着領域とした。

- (2) アクチン細胞骨格構造の再重合過程の観察

複数の細胞を対象に、パターニングの有無による再重合過程の傾向を観察した。図 2 に示すように、予め通常培養した細胞において、アクチンの重合阻害剤である Cytochalasin D により脱重合処理後、アクチン再形成開始から特定時間の経過ごとに、パラホルムアル

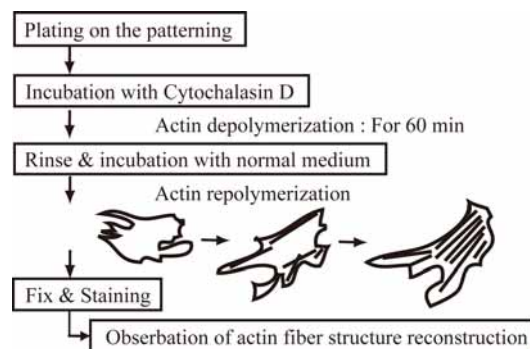


図 2 アクチン再形成開始からの経時的観察

デヒドを用いて細胞を固定した．その後，脱膜処理を施し，蛍光色素である Alexa488-Phalloidin でアクチンファイバーを染色して観察を行った．なお，観察には共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いた．

### (3) 細胞外基質の圧縮変形によるアクチンフィラメントの張力解放に伴うアクチン細胞骨格構造の変化の観察

伸展したシリコンチャンバー上に播種した複数の細胞を対象に，細胞外基質の変形による圧縮ひずみを細胞に負荷し，アクチンフィラメントの張力解放に伴う細胞骨格構造の変化の過程をパターンングの有無で観察，比較した．細胞への圧縮ひずみ負荷後の特定時間の経過ごとに，細胞の固定，脱膜処理を施し，Alexa488-Phalloidin でアクチンファイバーを染色して観察を行った．

## 4. 研究成果

### (1) 焦点接着斑分布制御の有無によるアクチンストレスファイバーの配向性と細胞骨格構造の形成速度

細胞内で再構築される主要なアクチンストレスファイバーは，焦点接着斑分布の制御に依存し，配向性を示すことが示された．アクチン再重合過程におけるアクチンファイバー構造の代表観察例を図3に示す．図では，脱重合処理後，通常培地に入れ替え，再重合を開始させた時点をも  $t = 0 \text{ min}$  とした．まず，脱重合前のパターン上の細胞において，アクチンフィラメントの先端がパターン上で観察され，多くの細胞が長方形パターンの長手方向に配向していることが確認された．また，細胞内の多くのアクチンファイバーも，同様に配向していた．パターンがない場合の細胞は，細胞形状の特定方向への配向は観察されず，内部のアクチンファイバーは任意の方向を向いていた．これらより，細胞形状および

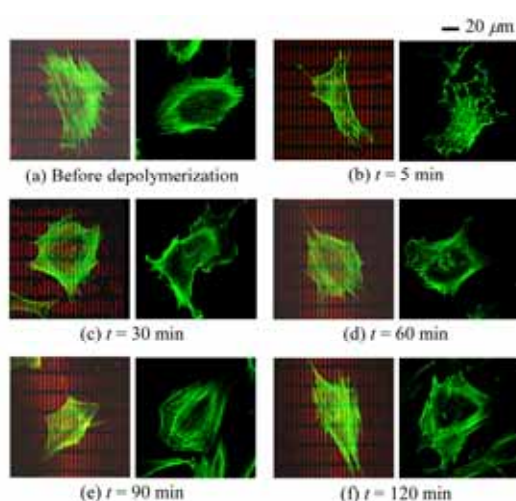


図3 アクチン細胞骨格構造の再形成過程

アクチン骨格の配向性は，パターンにより制御されることを確認した．

次に，時刻  $t = 5 \text{ min}$  において，パターン上の細胞内のファイバー構造は，図3(b)に示すように，ほぼ脱重合されたままであるが，細胞輪郭部付近の線維が太くなっている．パターンがない場合では，アクチンファイバーのネットワーク構造は細胞全体で観察されない．さらに，時刻  $t = 30 \text{ min}$  におけるパターン上の細胞(図3(c))では，細胞輪郭線に沿ったアクチンファイバー構造が細胞中央へ向かって形成され，輪郭部の線維もさらに太くなっている．これに対し，パターンがない場合は，ファイバー構造が輪郭部付近でわずかに形成されている．

この後，再重合時間が進むにつれ，両者とも，細胞の周囲から中央へ向かい，アクチンファイバー構造が徐々に増加していく様子が観察された．時刻  $t = 60 \text{ min}$  におけるパターン上(図3(d))では，中央部までファイバーの形成された細胞が多く観察された．時刻  $t = 120 \text{ min}$ (図3(f))では，両者とも脱重合処理前と同様に，細胞の形状に沿ったファイバー構造が細胞中央部にまで確認できた．その中でもより太い線維は，パターン上ではパターンの長手方向に配向しており，パターンのない場合は任意の方向を向いていた．

ここで，図4に示すように，細胞形状を楕円近似し，その楕円の長軸と長方形パターンの長手方向(画像の水平方向)とのなす角度の分布を  $-90^\circ$  から  $90^\circ$  の範囲で評価，算出した．パターンがない場合の細胞は広い範囲の角度に分布しているのに対し，パターン上では  $0^\circ$  前後の細胞が多く確認された．これより，パターン上において，主要な線維は，再重合

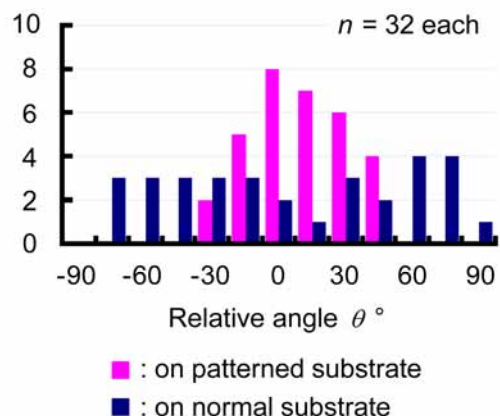
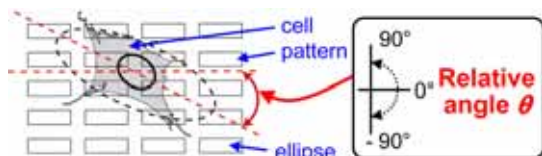


図4 主要なアクチン細胞骨格構造の配向性評価

後もパターンの方に配向性を有していることが示された。

以上の結果から、アクチンファイバーの形成方向は、パターンに依存することが示された。また、焦点接着斑の分布により、形成速度が変化することが示唆された。

(2) 焦点接着斑分布制御上のアクチンストレスファイバー形成量の経時変化におけるファイバー内張力の影響

研究成果(1)の観察結果をふまえ、まず、予備検討として、骨芽細胞様細胞のアクチン細胞骨格構造に対し、生化学的に脱重合および再重合を起こさせ、それぞれの過程における細胞骨格構造の変化を焦点接着斑分布制御の有無で経時的に観察・比較した。また、アクチン細胞骨格領域におけるアクチンの輝度分布と束化したアクチン繊維構造の解析に基づき、それらの細胞骨格構造変化の定量的評価を試みた。定量的有意差を示す評価指標の導入には至らなかったが、定性的な観察結果から、焦点接着斑分布の有無により細胞骨格構造変化に差異が生じることが認められた。それらの差異を生み出す1つの因子として、焦点接着斑分布の制御によるアクチンフィラメントの束化密度の変化に起因するストレスファイバー内の張力変化が考えら

れた。このため、次に、細胞骨格構造が十分に形成された細胞に対し、細胞外基質の変形による圧縮ひずみを負荷し、アクチンストレスファイバーの張力を解放して脱重合を起こさせ、細胞骨格構造の変化の履歴を焦点接着斑分布の制御の有無で比較・評価した。細胞内の主要なアクチンストレスファイバーに負荷されたひずみ量と、ひずみ負荷後のアクチンファイバーの蛍光輝度変化の平均を図5(a), (b)に示す。図より、大きなひずみ量が負荷された細胞群において、アクチンファイバーの蛍光輝度変化量に有意な差が認められた。この結果により、焦点接着斑分布を制御した細胞骨格構造の主要なアクチンストレスファイバーは、制御のない場合に比べ、ファイバー内の張力解放による脱重合過程時に維持されやすいことが示唆された。以上より、細胞骨格構造を形成するアクチンストレスファイバーの束化の密度と内部に作用する張力の変化が、細胞骨格構造全体の構造変化に関連することが考察された。これらは、焦点接着斑分布の変化が、細胞周囲の力学的環境変化のセンサーメカニズムとして重要な役割を果たしていることを新たに示唆するものである。

5. 主な発表論文等

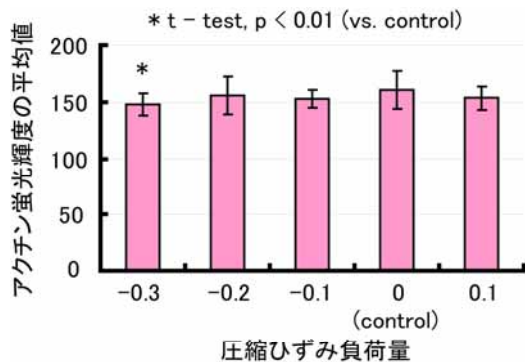
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

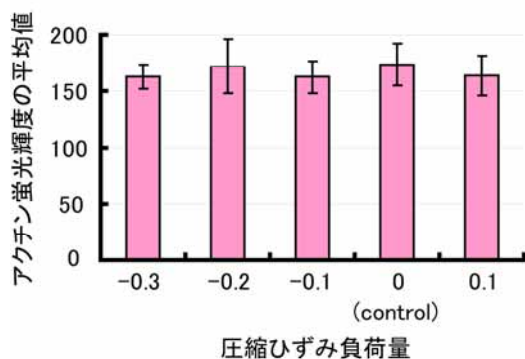
Daisuke Tawara, Jiro Sakamoto, Hideki Murakami, Norio Kawahara, Juhachi Oda, Katsuro Tomita, Mechanical therapeutic effects in osteoporotic L1-vertebrae evaluated by nonlinear patient-specific finite element analysis, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 査読有, Vol. 5, No. 5, 2010, 499-514

田原大輔, 高野直樹, 安達泰治, 中野貴由, マルチスケール応力解析によるヒト椎体海綿骨の力学的評価, 日本骨形態計測学会雑誌, 査読有, 第20巻, 第1号, 2010, S100-S107

Daisuke Tawara, Jiro Sakamoto, Hideki Murakami, Norio Kawahara, Juhachi Oda, Katsuro Tomita, Mechanical evaluation by patient-specific finite element analyses demonstrates therapeutic effects for osteoporotic vertebrae Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 査読有, Vol. 3, No. 1, 2010, 31-40



(a) 焦点接着斑分布の制御あり



(b) 焦点接着斑分布の制御なし

図5 焦点接着斑分布の制御の有無におけるひずみ負荷後のアクチン細胞骨格構造の変化

〔学会発表〕(計7件)

田原大輔, 安達泰治, 骨リモデリングによる骨梁形態変化に伴う海綿骨の力学的特性変化, 理研シンポジウム VCAD システム研究2010, 2011年3月2日, 埼玉県, 理化学研究所

田原大輔, アクチン細胞骨格の構造変化とアクチン重合観察の挑戦, 第3回バイオメカニクスセミナー, 2011年1月28日, 京都府, 京都大学再生医科学研究所

田原大輔, 柴田竜也, 堀川武, 安達泰治, 骨再構築シミュレーションによる海綿骨の形態変化を考慮した力学的特性評価, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月8日, 熊本県, 熊本大学

Daisuke Tawara, Jiro Sakamoto, Hideki Murakami, Norio Kawahara, Prediction of change in bone strength of osteoporotic vertebra during 3-year drug treatment based on numerical bone fracture analysis, 5th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics, 2010年11月7日, 京都府, 龍谷大学

田原大輔, 坂本二郎, 村上英樹, 川原範夫, 富田勝郎, 患者別 CT-有限要素解析による投薬中骨粗鬆症椎体の力学的評価, 第37回日本臨床バイオメカニクス学会, 2010年11月2日, 京都府, 京都国際会館

田原大輔, 安達泰治, 再構築による骨梁形態変化を考慮した骨梁骨の力学的特性評価, 第37回日本臨床バイオメカニクス学会, 2010年11月2日, 京都府, 京都国際会館

田原大輔, 医療画像に基づく骨のイメージベース力学解析とその応用, バイオメックフォーラム 21 第54回研究会, 2009年10月3日, 大阪府, 大阪大学

〔図書〕(計1件)

坂本二郎, 田原大輔, メジカルビュー社, 脊椎骨折のバイオメカニズム, 臨床画像, 2009, 第25巻, 第8号, 848-855

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 大輔 (TAWARA DAISUKE)  
龍谷大学・理工学部・助教  
研究者番号: 20447907

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

須長 純子 (SUNAGA JUNKO)  
理化学研究所・VCAD システム研究プログラム・細胞シミュレーションチーム・リサーチアソシエイト