

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05128

研究課題名（和文）圧刺激の可視化定量ツールの開発

研究課題名（英文）Development of system for visualization of cell function under pressure stimulation

研究代表者

森松 賢順（Morimatsu, Masatoshi）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：70580934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 24,100,000円

研究成果の概要（和文）：本領域では、脳内の圧刺激がもつ脳機能発現への役割と分子機構の解明を目的とし、「圧刺激を可視化定量するためのバイオプローブ」および「圧刺激の定量的操作法」を用いた圧刺激の可視化定量ツールを構築してきた。特に細胞接着や細胞核をターゲットにした圧刺激センサープローブを開発してきた。領域班との連携の結果、圧刺激に対応した細胞応答の計測に成功した。また、培地の循環と細胞への安定した圧刺激負を可能とする装置に成功し、圧刺激環境下での細胞機能のリアルタイム計測が可能となった。さらに、領域内での共同実験の遂行中に想定外の生命現象も観察され、新たな細胞の圧刺激応答現象の創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織や器官を構成する細胞は、周囲の力学刺激を受容し、細胞自身や組織の機能調節に利用している。本領域のターゲットである脳組織のみならず、血管や関節といった様々な組織においても、組織を構成する細胞は圧刺激を受容し、機能の発現・調節を行う。本研究成果で得られた基礎技術は、組織内の細胞および細胞構成分子に作用する力の定量的な制御と空間的パターンの可視化を加速し、組織機能の発現・調節におけるその圧刺激受容応答の役割の解明につながる。

研究成果の概要（英文）：We have developed tools to visualize and quantify cellular functions under pressure stimulation. As a result, we developed sensor probes to quantify cell adhesion force and nucleus tension force, and succeeded in measuring cellular responses in response to pressure stimulation with the research group. In addition, we succeeded in developing the stable pressure stimulation system and measuring cellular functions under pressure-stimulated conditions in real time. We also found unexpected biological phenomena while conducting collaborative experiments in the field, and succeeded in creating a new phenomenon of cellular pressure stimulation response.

研究分野：生物物理

キーワード：圧刺激 メカノバイオロジー センサープローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体器官の司令塔を担う脳は、頭蓋骨に囲まれた閉鎖空間において、脳実質圧や脳脊髄液圧等の圧力を常に受けおり、その圧力変化に伴う圧刺激の乱れが脳発生の妨げや病理現象の誘引となることが示唆されている。さらに脳組織内に着目すると、多くの細胞が込み合った環境下において相互に圧縮力を受け、脳機能を発現する。しかしながら、「これらの圧刺激を脳内細胞がどのように検知、応答して、脳組織の生理的・病理的機能の発現に至るのか」の問いに明確に答える研究は未だ存在しない。これは、脳内で細胞に加わる圧刺激の空間的パターンの解析あるいはその大きさの定量が困難であることに起因していた。

2. 研究の目的

圧刺激は「直接目に見えない」要素を含んだ物理作用であり、イメージングを代表とした「可視化」による空間情報の取得は非常に難しかった。そこで本計画研究では、「脳内の圧刺激がもつ脳機能発現への役割と分子機構の解明」の実現のため、組織において細胞、分子レベルでの「圧刺激を可視化定量するためのバイオプローブ」および「圧刺激の定量的操作法」技術を構築することを目的として設定した。

3. 研究の方法

(1) 圧刺激可視化定量プローブと圧刺激センサー細胞の構築

圧刺激可視化定量プローブについては、ターゲット分子や弾性バネ部位、可視化用色素ペアの選択が重要となるため、以下の条件に合わせた圧刺激可視化定量プローブの開発を行なった。

カドヘリンを代表とした細胞間接着に作用する圧力の可視化定量プローブ、ネスプリンを代表とする細胞核圧縮刺激の可視化定量プローブの開発のため、弾性バネ部位、可視化用色素ペアに改良を加えた。これらの開発した圧刺激可視化定量プローブを用いて、他グループと協力して細胞の圧刺激応答の計測を実施した。

上記の可視化定量プローブを導入した人工的な圧刺激センサー細胞を開発する。圧刺激センサー細胞を様々な組織に埋め込むことにより、任意の組織内における圧刺激環境の可視化を目指した。

(2) 圧刺激の定量的操作法の開発

本領域研究において神経上皮組織や脈絡叢オルガノイド、脳腫瘍細胞塊への静水圧負荷実験を行うため、安定でかつライブセルイメージングが可能な圧刺激負荷装置の開発を行なった。特に、圧刺激を維持しつつ、観察チャンバー内の培地環境の循環化が可能な圧刺激の定量的操作方法の模索および開発に注力した。

4. 研究成果

本領域では、圧刺激を可視化定量するためのバイオプローブ」および「圧刺激の定量的操作法」を用いた圧刺激の可視化定量ツールを構築してきた。

(1) 「圧刺激を可視化定量するためのバイオプローブ」に関しては、細胞接着や細胞核をターゲットに圧刺激センサープローブを開発した。使用した蛍光タンパク質は、従来のセンサープローブと比較し、高シグナルなセンサープローブの構築を実現した。プローブのシグナルの高さについてはさらなる改良の必要性があり、課題として多少残るものの、領域班との連携の結果、圧刺激に対応した細胞応答の計測に成功した。

また、この圧刺激センサープローブを他の細胞接着分子へ応用し、癌細胞の遊走メカニズムの解明に向けた研究への転用を見込むことができた。人工的な圧刺激センサー細胞に関しては、未だ実現していないものの、センサープローブの付加方法や人工細胞の大きさの選択等、今後の技術的課題を浮き彫りすることができた。

(2) 「圧刺激の定量的操作法」に関しては、培地の循環と細胞への安定した圧刺激負(5-200 mmHg)を可能とする装置に成功した。さらに、開発したシステムを用いて、圧刺激環境下での細胞機能のリアルタイム計測が可能となった。また、他の研究機関との新たな連携の結果、開発した装置を用いた循環器や泌尿器に関連する細胞や組織の機能解析への展開を見込めることができた。

さらに、領域内での共同実験の遂行中に想定外の生命現象も観察され、新たな細胞の圧刺激応答現象の創出に成功した。本結果については現在学術論文への投稿中である。

本研計画で開発された可視化定量技術は、圧刺激のみならず、様々な力学刺激を伴う広範な生

命機能現象への展開が見込めるため、「生体内の力学情報に基づく生命機能科学」と題した新たな学術分野創成への技術的基盤となった。

今後は、本研究推進中に表面化した技術的課題のさらなる改善や、各細胞や組織に最適な圧刺激の可視化定量ツールの構築を継続し、圧刺激に応じた機能発現への役割とその分子機構の解明を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Yohei, Nishiyama Masayoshi, Kai Hiroaki, Kaneko Toshiyuki, Kaihara Keiko, Iribe Gentaro, Takai Akira, Naruse Keiji, Morimatsu Masatoshi	4. 巻 121
2. 論文標題 High hydrostatic pressure induces slow contraction in mouse cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 3286 ~ 3294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2022.07.016	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 西山雅祥, 山口陽平, 金子智之, 森松賢順	4. 巻 55(14)
2. 論文標題 高圧力顕微鏡による心筋細胞の収縮イメージング	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 36-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森松 賢順、西山 雅祥、成瀬 恵治
2. 発表標題 高圧刺激下での細胞動態の可視化
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 Hydrostatic pressure stimuli regulate the pattern of the intracellular calcium concentration
3. 学会等名 第61回 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森松 賢順
2. 発表標題 圧刺激環境下における細胞機能の定量
3. 学会等名 第62回日本生体医工学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 浸透圧刺激による細胞内カルシウム応答の制御
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Gao Zidan, Yamada Ayaka, Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 Osmolarity Induces Acute Calcium Waves in HEK293 Cells
3. 学会等名 メカノバイオ討論会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Gao Zidan, Keiji Naruse, Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 Osmolarity Induces Acute 2 types Calcium Waves in HEK293 Cells
3. 学会等名 メカノバイオ討論会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xinxuan Li, Keiji Naruse, Masatoshi Morimatsu
2. 発表標題 TGF- Signaling Pathway in Chondrocytes under High Hydrostatic Pressure
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会学術大会, 2023年
4. 発表年 2023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
研究協力者	西山 雅祥 (Nishiyama Masayoshi)	近畿大学・理工学部・准教授 (34419)	
研究協力者	竹田 哲也 (Takeda Tetsuya)	岡山大学・医歯薬学域・研究准教授 (15301)	

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		
米国	Stanford University		