

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12865

研究課題名(和文)細胞の“構造と力の記憶”メカニズムを探る

研究課題名(英文)Study on a mechanical memory of the intracellular forces and structures

研究代表者

長山 和亮(Nagayama, Kazuaki)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：10359763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000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。一方、アクチン細胞骨格を脱重合した後、再び最重合させて、細胞張力の再現力を評価したところ、継代数が進むにつれて再現性が高まる傾向が見られた。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。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of a mechanical memory of the intracellular forces and structures 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：細胞骨格 細胞核 メカノバイオロジー 細胞計測・操作

1. 研究開始当初の背景

血管や骨などの生体組織は力学環境の変化に応じて「リモデリング」する。このリモデリングを支える細胞内要素として、アクチン細胞骨格が注目されてきた。我々は、最近、アクチン細胞骨格には、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、アクチン細胞骨格が、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リモデリング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

試料として、ブタ胸大動脈由来平滑筋細胞を対象として、継代数が比較的少ない細胞（継代数3～5）と、継代を重ねて老化を進ませた細胞（継代数8～13）を準備した。細胞の老化判定には、 α -galactosidase の検出蛍光試薬 SPiDER-Gal (同仁化学) を使用した。これらの細胞を、シリコンラバーで作製したマイクロピラー基板（直径 $3\mu\text{m}$ 、高さ $9\mu\text{m}$ の微細円柱を配列させた微細加工基板）上に播種しながら、個々のマイクロピラーの変形量を計測することで、細胞の発生する張力ベクトルを定量解析した。マイクロピラー基板には、その先端部分のみに細胞が接着できるように、あらかじめ接着タンパク質のフィブロネクチンをスタンプ方式で塗布した（図1）。専用の顕微鏡ステージインキュベータシステムを用いて細胞を培養しながら、その様子を顕微鏡下でリアルタイムに観察し、細胞の運動および張力の変化を詳細に解析した。

また、アクチン細胞骨格の構造や張力の再現性を検討するために、細胞に対してアクチン重合阻害薬である cytochalasin D を30分間投与して、その構造を破壊した後、薬剤を洗い流して細胞骨格の構造を復帰させる実験を行った。このときの様子も併せて顕微鏡下で観察した。

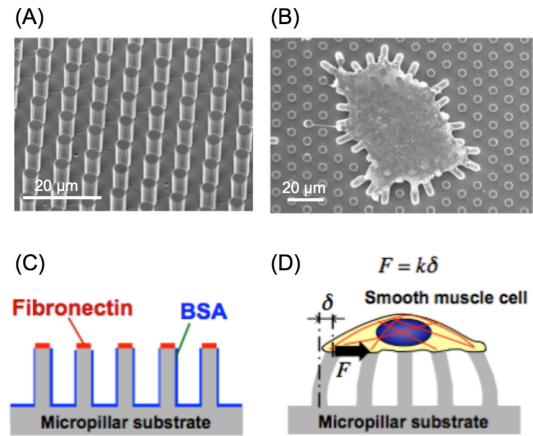


図1 細胞張力計測のためのマイクロピラー基板 (A) とピラー上に広がった細胞の様子 (B)。ピラー先端に接着タンパク質をコートして接着を促す (C)。細胞の張力によってピラーが変形する (D)

4. 研究成果

継代数の少ない血管平滑筋細胞では、紡錘型の細胞形態が多く見られ、平滑筋特有の細長い細胞が観察された。アクチン細胞骨格も細胞の長軸方向に様に配向しているように見えた。しかし、継代数が進み、細胞の老化が進むと、比較的ランダムな細胞形態となり、アクチン細胞骨格も全方向に放射状に広がっている細胞が観察された（図2）。両群の細胞面積を計測したところ、継代数の少ない若い細胞では、 $1000\mu\text{m}^2$ に留まっていたが、細胞が老化することで、面積が3倍程度まで増加した（図3）。

さらに、マイクロピラー基板を用いた細胞の張力計測の結果、継代数の少ない細胞では、細胞接着部位での張力が $60\sim 80\text{ nN}$ の範囲で変動していたが、継代によって細胞の老化が進むと、張力は $30\sim 50\text{ nN}$ の範囲となり、有意に減少することが分かった（図4）。また、継代数が少ない細胞は仮足の形成頻度が高く、移動速度も速いが、老化が進むことで運動能が低下していくことが明らかとなった。

一方、アクチン細胞骨格構造を人為的に破壊した後、再び最重合させる実験によって、細胞張力の復元能力を評価したところ、継代数が進むにつれて復元能が高くなるような傾向が見られた（図5、6）。

以上のように、本研究によって、細胞の張力や構造の記憶能力が細胞の老化に深く関わる可能性が示された。

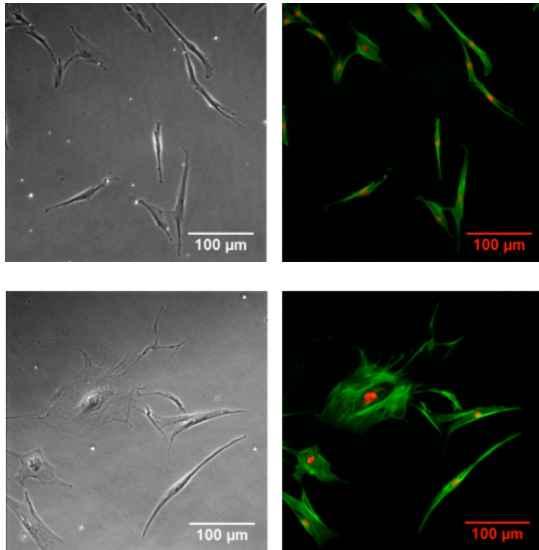


図2 細胞の位相差画像（左）とアクチン細胞骨格の蛍光画像（右）. 継代数の少ない細胞群（上段）と継代を進めて老化させた細胞群（下段）.

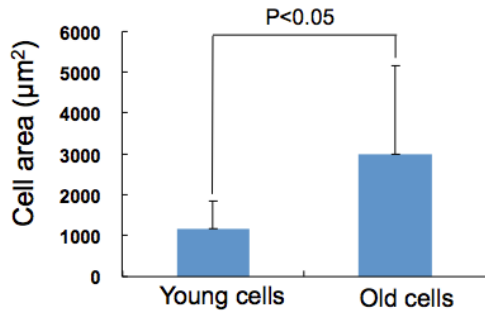


図3 細胞面積の違い.

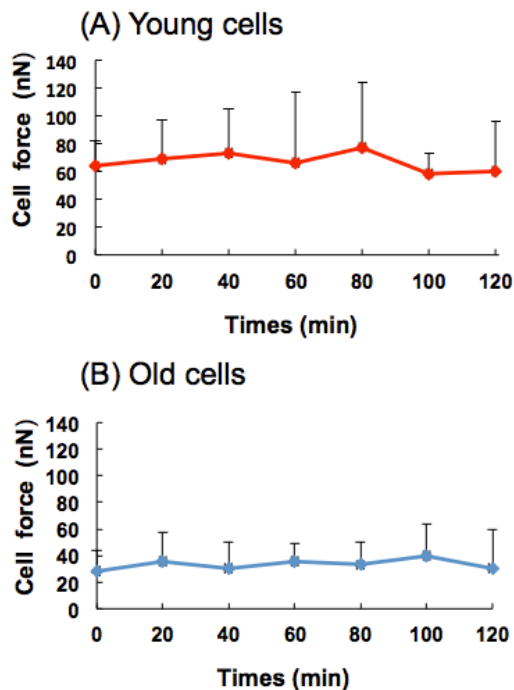


図4 細胞張力の経時変化

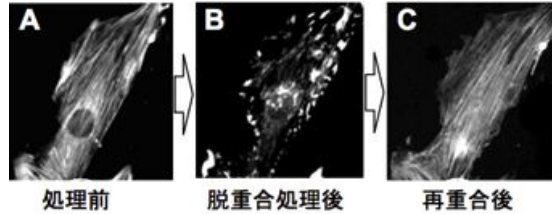


図5 血管平滑筋細胞のアクチン細胞骨格の重合阻害薬で完全にバラバラにした後(B), 薬剤を洗い流して再重合させた様子(C).

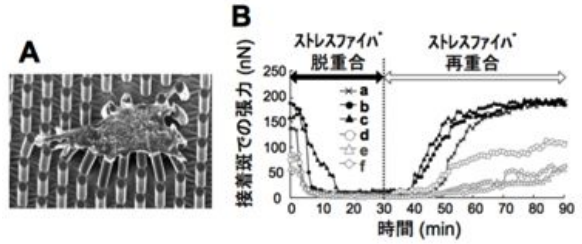


図6 シリコンラバーで作製したマイクロピラーアレイ基板（直径 3μm, 高さ 9μm の微細円柱を配列させた微細加工基板）上に播種した血管平滑筋細胞 (A). アクチン細胞骨格を一旦脱重合してから, 再度重合させたときの細胞張力の変化の例 (B).

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7件)

K. Nagayama, T. Inoue, Y. Hamada, T. Matsumoto, A novel patterned magnetic micropillar array substrate for analysis of cellular mechanical responses, *Journal of Biomechanics* 65, 194-202, (2017) [査読有].

E. Maeda, M. Nakagaki, K. Ichikawa, K. Nagayama, T. Matsumoto, Effects of cyclic compression on the mechanical properties and calcification process of immature chick bone tissue in culture, *Bone Reports* 6, 120-128, (2017) [査読有].

T. Yaguchia, Y. Conga, K. Shimoa, T. Kurokawaa, S. Sugitaa, K. Nagayama, H. Masudad, T. Matsumoto, A novel apparatus for the multifaceted evaluation of arterial function through transmural pressure manipulation, *Annals of Biomedical Engineering*, (2017)[査読有]

佐川千秋, 長山和亮, マイクロピラー基板を用いた核の力学的拘束が細胞の紫外線耐性に与える影響. *日本機械学会論文集*, 83, 846, 16-00425, (2017). [査読有].

長山和亮, 福栄智大, 繰返引張ひずみによる核の形態変化と細胞紫外線耐性向上の

可能性,日本生体医工学会. 54(4), 184-191, (2016) [査読有].

A. Nagasaka, T. Shinoda, T. Kawaeue, M. Suzuki, K. Nagayama, T. Matsumoto, N. Ueno, A. Kawaguchi, T. Miyata, Differences in the Mechanical Properties of the Developing Cerebral Cortical Proliferative Zone between Mice and Ferrets at both the Tissue and Single-Cell Levels. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, Article139, 1-13, (2016) [査読有].

J. Wang, S. Sugita, K. Nagayama, T. Matsumoto, Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 11(1), 15-00637, (2016) [査読有].

[学会発表](計15件)

大畠成暁, 長山和亮, 細胞用マイクロ引張試験機を用いた細胞のステイフネスと接着力の定量解析, 日本機械学会関東支部 第24期総会・講演会, 2018/3/17-18, 東京

尾崎康史, 内田敬一, 長山和亮, コラーゲン微細溝基質を用いた配列化培養が血管平滑筋細胞の分化ならびに力学特性に与える影響, 日本機械学会関東支部 第24期総会・講演会, 2018/3/17-18, 東京

長山和亮, 細胞配列・運動におけるアクチン細胞骨格と核の機械的結合の重要性, 日本機械学会第30回ハイトシヅコアリソング講演会, 2017/12/14, 京都.

K. Nagayama, K. Uchida, S. Takeuchi, Investigation of the nuclear cytoskeletal interactions in vascular smooth muscle cells cultured on a micro-grooved collagen substrate, the 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics, 2017/9/14-17, Zermatt, Switzerland.

長山和亮, 内田敬一, 竹内 早希, コラーゲン微細溝基質を用いた血管平滑筋細胞の配列化培養と核に加わる力の実験的考察, 日本機械学会 2017年度年次大会 2017/9/3-6, さいたま.

飛田航, 長山和亮, 杉田修啓, 周囲環境が血管平滑筋細胞の細胞核形状に及ぼす影響, 日本機械学会 2017年度年次大会 2017/9/3-6, さいたま.

尾崎康史, 内田敬一, 長山和亮, コラーゲン微細溝基質を用いた血管平滑筋細胞の配列化培養と力学特性解析, 日本機械学会第25回茨城講演会, 2017/8/29, 日立.

大畠成暁, 長山和亮, 細胞用マイクロ引張試験機と原子間力顕微鏡を用いた細胞力学特性の統合解析, 日本機械学会第25回茨城講演会, 2017/8/29, 日立.

内田敬一, 長山和亮, 血管壁内細胞配列を考慮したコラーゲン微細溝基質の開発とこれを用いた血管平滑筋細胞の分化制御の

試み, 第26回ハイトシヅコ学会ハイトシヅコ講演会, 2017/3/10-11, 東京

大畠成暁, 長山和亮, 細胞内微細構造の力学特性計測を目指したマイクロ力学試験機の開発, 第26回ハイトシヅコ学会ハイトシヅコ講演会, 東京, 2017/3/10-11, 東京

長山和亮, 核の変形が細胞の生理機能に及ぼす影響, 日本機械学会第29回ハイトシヅコアリソング講演会, 2017/01/20, 名古屋.

K. Nagayama, K. Uchida, Control of vascular smooth muscle cell differentiation using a novel micro-grooved collagen substrate, 第54回日本生物物理学会大会, 2016/11/25-27, つくば.

長山和亮, 鈴木悠也, 繰返ひずみ場における細胞組織の創傷治癒運動の解析, 日本機械学会 2016年度年次大会, 2016/09/11-14, 福岡.

長山和亮, 微細加工基質を利用した力学的側面からの細胞機能計測・制御技術の開発, 2016年度精密工学会秋季大会, 2016/09/7, 水戸.

K. Nagayama, A study for the effects of the mechanical trapping of the nucleus on cellular events using a micropillar substrate, The 2016 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C2016), 2016/06/29-07/02, Washington, DC.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI)
茨城大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10359763

(2) 連携研究者

松本 健郎 (MATSUMOTO TAKEO)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30209639

菅原 路子 (SUGAWARA MICHIKO)
千葉大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30323041