

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20102

研究課題名(和文)細胞核への力学刺激によるDNAの分散効果を利用した細胞の機能制御の試み

研究課題名(英文) Feasibility study on cell function control utilizing intranuclear dispersion of DNA induced with mechanical stimulation to the nucleus

研究代表者

松本 健郎 (Matsumoto, Takeo)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：30209639

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)：細胞核に力学刺激を加えることで核内DNA分布を変化させ、これで細胞機能を制御することを目指し2年間の研究を行った。まず培養骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の核にマイクロピペットで圧縮刺激を加える実験系を開発し、核を5 μ m圧縮したところ3分後に核内のクロマチン凝集体の数が減少することが判った。次に一度に多数の細胞核を圧縮するため、微細加工で一辺100 μ m、深さ10 μ mの正方形のウェルが多数並んだPDMS製基板を作製し、このウェルにひとつずつ細胞を落とし込み、上からカバーガラスを押し付ける系の試作を試みたが、基板と圧子板の平行度の問題から細胞の圧縮は困難で、この方法は不適切であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ流路に細胞を流す実験から細胞核を圧縮することでクロマチン凝集体の数が減少することは判っていたが、5 μ mの圧縮により3分後に減少するという定量的なデータが得られた点が第1の成果である。また、この場合も凝集体の数の現象が見られたのは押込の中心部だけであり、圧子先端の球の曲率から考えて押込の中心部と周辺部の押込量の差がたかだか0.5 μ mであることを考えあわせると、圧縮量の僅かの差が凝集体数の減少に決定的な影響を与えることが分かった点が第2の成果と言える。また、ウェルに細胞を落とし込み、上からカバーガラスで圧縮する方式が困難であることが判った点も今後の装置開発において重要な情報と言える。

研究成果の概要(英文)：Two-year study was conducted to control cell function utilizing intranuclear dispersion of DNA induced with mechanical stimulation to the nucleus. We compressed the nucleus of cultured osteoblastic cell line MC3T3-E1 with a micropipette tip by 5 microns, and found that the number of aggregates of chromatin decreases in 3 minutes. We then fabricated a PDMS substrate having wells (100 micron x 100 micron, depth 10 micron) with soft photolithography. We put the cells in the wells, one per each well, and tried to compress them with a cover glass, but failed because the parallelism between the substrate and the cover glass was not enough.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス メカノバイオロジー 細胞核 クロマチン DNA 力学刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の機能発現が核内の DNA の物理的な分布の違いに影響されることが認識され始めている。例えば、血管壁内の平滑筋細胞は増殖能やタンパク合成能は殆ど無く、収縮能に富んだ収縮型というタイプの細胞であり、核内部では高濃度の DNA (正確には DNA とタンパク質の複合体であるクロマチン) が核膜付近に集中しており、核中央部の DNA 濃度は低い。一方、これを数週間培養すると収縮能は失われる代わりに増殖が盛んな合成型というタイプに変化するが、この際は DNA が核内に緩やかに満遍なく拡がった状態になっている。タンパク質の合成には DNA の 2 重ラセンがほどこけ、mRNA への転写が起こることが必要であるが、収縮型の細胞では、エメリンなどのタンパク質により DNA が核膜に固定されているためにこのような反応が起こらず、後者では、DNA の 2 重ラセンが緩みやすいため mRNA の合成が生じやすく、結果としてタンパクの合成、更には増殖が活発になるのではないかと考えられている。一方、我々は、核内の DNA 分布が核の変形で容易に変化することを見出した。即ち、細胞に外部から圧縮力を加えることにより、核膜に曲げや伸展などの変形が生じ、これにより核膜に留められていた DNA が外れて核内に分散し、転写が盛んになる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず、細胞核を外部から力を加えて定量的に変形させ、この力学刺激によって生じる核内の DNA 分布の変化を調べる系の確立を目的とした。特に効率的な刺激条件を探るためには刺激を加えた後の DNA 分布の変化をリアルタイムで観察することが必要と考え、刺激後の変化を秒単位で観察できる力学刺激系の確立を目標とした。なお、刺激の種類によっては DNA を凝集させる可能性も考えられるので、特に凝集した DNA を分散させる刺激条件に着目することにした。そして、このような力学刺激を加えることにより、細胞の機能がどのように変化するのか調べることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

当初計画した方法は以下の通りであった：

ラット胸大動脈壁から単離した平滑筋細胞を対象とし、力学負荷を加える装置を試作した後、DNA の分散状態、細胞の増殖率・収縮能、収縮蛋白の発現量等を評価する。また、細胞が未分化な方向に進む可能性を考え、細胞初期化マーカーの発現、あるいは線維芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞のマーカー等の発現を調べる。

1) 顕微鏡下押付型刺激負荷装置の試作と評価： 細胞変形中の核内の変化をリアルタイムで観察できるように押付型の装置を試作する。DNA を蛍光染色した細胞を押付装置の基板上に散布し、顕微鏡下で観察しながら、上からカバーガラスを押し付ける。押付装置基板は段差が $3\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ 程度の物を色々作る。上からカバーガラスを押し付けることで、細胞は段差分の厚みまで押しつぶされる。この際の DNA 分布の変化を押し付ける間、経時観察できる系を構築する。

2) 力学刺激を加えた細胞の機能評価 I： 1) で力学刺激を加えた細胞ならびに対照群の細胞を培養シャーレに播種し、核内の DNA の分散状態、細胞の増殖能・形態、収縮能の変化などを調べる。収縮能の変化は、平滑筋細胞収縮薬であるノルアドレナリンを加えた際の形態変化を調べるとともに、細胞内のアクチンフィラメントを染色し、その濃度や形状を定量化することで形態学的にも調べる。

3) 細胞のマーカーの調査： 力学刺激を加えた細胞の細胞初期化マーカー、あるいは線維芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞のマーカー等の発現を調べるため、どのようなマーカーが適当なのか調べ、1 次抗体、2 次抗体などの条件を決定する。

4) 力学刺激を加えた細胞の機能評価 II： 遺伝子の発現の制限がなくなるということは、細胞が未分化な方向に進むことであるので、3) の実験条件が決定でき次第、細胞初期化マーカーの発現、あるいは、他の細胞への転換の可能性も考え、線維芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞のマーカーなどの発現をチェックし、細胞核への繰返し変形が細胞機能に与える影響を調査する。

しかし実際には、次章に示すように、力学負荷を加える系の開発が難航し、個々の単離細胞に独立して力学刺激を加える系を開発し、力学刺激後の細胞内クロマチン分布の変化を調べるに留まった。

4. 研究成果

まずは実験系確立のため、培養操作が容易であり当研究室での使用経験の豊富なマウス頭蓋

骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いることにした。そしてこの細胞を対象に、核に圧縮刺激を加える実験系の開発に取り組み、圧縮刺激を加えた後の核内クロマチンの変化を調べた。すなわち、顕微鏡下でクロマチンを Hoechst33342 で染色した細胞をフィブロネクチンコートしたスライドガラス上に播種し、細胞が基板に軽く接着した後、先端を直径 30 μm 程度の球状に加工したガラスマイクロピペットをマイクロマニピュレータを操作して細胞に押し付け、核を 5 μm 程度圧縮した後、元に戻した。核圧縮前、圧縮直後、圧縮から 3 分後の 3 通りの条件で核内のクロマチンの凝集塊の個数を計測したところ、圧縮から 3 分後に凝集塊の個数が有意に減少することが判った。

次にこの現象を生じる圧縮量の閾値を調べるため、押し込量を 0 から 5 μm の範囲で変化させてクロマチン凝集体の数の変化を調べた。その結果、3 μm の押し込までは凝集体の数に変化がなかったが、5 μm では 3 分後に有意に減少することが分かった。しかし、この場合も凝集体の数の現象が見られたのは押し込の中心部だけであった。圧子先端の球の曲率から考えて押し込の中心部と周辺部の押し込量の差はたかだか 0.5 μm であり、圧縮量の僅かの差が凝集体数の減少に決定的な影響を与えることが分かった。

しかしこの方法は操作が煩雑である上に、一度に一つの細胞しか圧縮することができない。当初の研究計画で定めたように、圧縮刺激を加えた細胞の増殖能や形態、発現タンパクなどを統計的に調べるためには、大量の細胞を圧縮して変化を調べる必要がある。そこで、一度に多数の細胞核を圧縮するために、フォトリソグラフィ法で作製した型を利用して、一辺 100 μm 、深さ 10 μm の正方形のウェルが多数並んだ PDMS 製基板を作製した。そして、このウェルにひとつずつ細胞を落とし込み、上からカバーガラスを押し付けることで細胞の圧縮を行う系を試作した。実際に細胞の圧縮を試みたが、カバーガラスと PDMS 製基板の平面度が十分でないために細胞を一様に圧縮することが困難で、この方法は不適切であることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)・・・全て査読有り

Sugita S, Mizutani E, Hozaki M, Nakamura M, Matsumoto T: Photoelasticity-based evaluation of cellular contractile force for phenotypic discrimination of vascular smooth muscle cells, Scientific Reports 9-1: 3960 (2019) DOI: doi: 10.1038/s41598-019-40578-7.

Fan Y, Wang JF, Maeda E, Murase K, Matsumoto T: Analysis of heterogeneous deformation in the wall of rabbit thoracic aorta at a microscopic level, Advanced Biomedical Engineering 8, 7-13 (2019) DOI: 10.14326/abe.8.7

Nagayama K, Inoue T, Hamada Y, Sugita S, Matsumoto T: Direct application of mechanical stimulation to cell adhesion sites using a novel magnetic-driven micropillar substrate, Biomed Microdevices 20-4, 85 (2018) DOI: 10.1007/s10544-018-0328-y

Bansod YD, Matsumoto T, Nagayama K, Bursa J: A Finite Element Bendo-Tensegrity Model of Eukaryotic Cell, J Biomech Engng 140-10, 101001-9 (2018) DOI: 10.1115/1.4040246.

Maeda E, Nakagaki M, Ichikawa K, Nagayama K, Matsumoto T: Effects of cyclic compression on the mechanical properties and calcification process of immature chick bone tissue in culture, Bone Reports 6, 120-8 (2017) DOI:10.1016/j.bonr.2017.04.002

Murakami F, Ando Y, Miyagi A, Sugita S, Ueno N, Matsumoto T: Measurement of surface topography and stiffness distribution on cross section of *Xenopus laevis* tailbud for estimation of mechanical environment in embryo, Development, Growth & Differentiation 59-5, 434-443 (2017) DOI: 10.1111/dgd.12372

Nagayama K, Inoue T, Hamada Y, Matsumoto T: A novel patterned magnetic micropillar array substrate for analysis of cellular mechanical responses, J Biomechanics 65, 194-202 (2017) DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.10.017

[学会発表](計7件)

森 尚輝, 王 軍鋒, 前田英次郎, 村瀬晃平, 松本健郎: 圧縮刺激が細胞核内 DNA の凝集状態に与える影響の定量評価, 第 29 回バイオフロンティア講演会 (2018/10/24-25, 千葉)

Fan Y, Wang JF, Maeda E, Murase K, Matsumoto T: Analysis of heterogeneous deformation in the wall of rabbit thoracic aorta at a microscopic level, 生体医工学シンポジウム 2018 (2018/9/14-15, 名工大) 【Poster】

森 尚輝, 王 軍鋒, 前田英次郎, 村瀬晃平, 松本健郎: 圧縮刺激が核内クロマチンに与える影響の評価に関する基礎的研究, 第 41 回日本バイオレオロジー学会年会 (2018/6/16-7, 名古屋) 【Poster】

松本健郎: 高血圧に伴う肥厚メカニズムの解明に向けた動脈壁変形のマルチスケール計測, 第 57 回日本生体医工学学会大会 (2018/6/19-21, 札幌)

森 尚輝, 前田英次郎, 村瀬晃平, 松本健郎: 細胞力学刺激の細胞核への影響の定量評価に関する基礎的研究, 日本機械学会東海支部第 49 回学生員卒業研究発表講演会 (2018/3/12, 名大)

Matsumoto T, Takahashi Y, Owaki Y, Nagayama K: Estimation of shear deformation of glycocalyx layer on vascular endothelial cells in response to fluid flow, The Third International Symposium on Mechanobiology (2017/12/11-4, Singapore) 【Invited speaker】

Matsumoto T: Biomechanical Approaches toward Estimation of Stress Distribution in *Xenopus Laevis* Embryos, Japan-UCI Meeting on 3D Morphogenesis (2017/7/10-11, University of California, Irvine, USA) 【Invited symposiast】

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

・ホームページ等

<http://bio.mech.nagoya-u.ac.jp/>

・受賞等

学会発表 において筆頭演者の森 尚輝がベストプレゼンテーションアワードを受賞, 学会発表 において筆頭演者の森 尚輝が第41回日本バイオレオロジー学会年会優秀ポスター賞を受賞した.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 前田 英次郎

ローマ字氏名: (MAEDA, Eijiro)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 大学院工学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 20581614

(2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。