

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18340122
 研究課題名（和文） 細胞コロニー内の細胞に個別に蓄積される力学的記憶の解明
 研究課題名（英文） Mechanical memory effect of cells in colony

研究代表者
 川端 和重 (KAWABATA KAZUSHIGE)
 北海道大学・大学院理学研究院・教授
 研究者番号：20261274

研究成果の概要：細胞集団がどのように連携・協同して血管や臓器などのマクロな形態を形成するかその機構を解明することを目的に、細胞に蓄積される力学的記憶効果を調べた。本研究では、走査型プローブ顕微鏡を用いた新たな測定装置を構築し、細胞に力学的変形刺激を加えた場合に細胞内に発生する力の応答を調べた。その結果、細胞の変形パターンによって、その後の細胞の力学的応答が大きく異なり、細胞レベルに力学的な記憶効果があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理,化学物理

キーワード：細胞、細胞コロニー、走査型プローブ顕微鏡、力学的応答、力学的メモリー効果

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に突入した生命科学は更なる進歩を遂げ続けており、ゲノムの網羅的解析にとどまらず、ゲノムから生成されるタンパク質とその機能、更には生成されたタンパク質間の相互作用の網羅的解析へと進みつつある。しかし、対象領域をゲノムからタンパク質へと拡大するにしたがって、網羅的解析の対象となる要素数は指数関数的に増大し、一個の細胞の巨視的な機能を理解するだけでも、関係する要素の組み合わせの数は天文学的

な数になる。

生命体には、物質にはない巨視的なスケールで現れる生命体独自の協同現象（細胞系集団形成）が数多く存在する。例えば、初期胚発生の原腸貫入に見られる細胞集団が作り出す形態形成や損傷前の形態に戻る自己修復等がある。さらに、近年、これらの形態形成に細胞集団で協同的な集団運動が関連していることが明らかになっている。

細胞の力学的性質の研究は、このような巨視的な機能を解明する新たなアプローチとして注目されている。最近、生きた1細胞の力

学的性質を調べる研究が、生化学会、米国細胞生物学会、国際生物物理学会等でいろいろな研究が報告されている。手法も、磁気ビーズ、マルチプローブアレイ、ガラスキャピラリー、蛍光ビーズを含有させた弾性体基盤、走査型プローブ顕微鏡を用いた生きた細胞の粘弾性（特に周波数特性）などいろいろな方法が提案され、細胞の力学的な性質に関する結果が得られている。（J.Uhde et al, Phys. Rev. Lett, 93 (2004) 268101, N.Desprat et al, Biophys. J. ,88(2005)2224 など）これらは、細胞内の材料的な観点からの粘弾性という受動的な性質を明らかにするものであって、収縮力の能動的な性質（特に外的力に対する新たな力の発生や記憶効果）を明らかにしてはいない。しかし、細胞の運動や組織形成にはこのような能動的な機能を明らかにしてはじめて現象の記述が可能になる。しかし、現時点では上述のように生きた細胞の受動的な力学特性（粘弾性および粘性の周波数分散）を調べるにとどまっている。

本グループの研究経緯：細胞内および細胞コロニーの運動性や力学性質を明らかにするために、測定手法を確立し以下の結果を得ている。（1）生きた細胞の硬さの分布を走査型プローブ顕微鏡によって明らかにする方法を確立した。（M. Nagayama, et al.; *Cell Motil. Cytoskeleton*, 50, 173-179 (2001).）（2）細胞骨格と硬さ分布の比較およびY27632等のactin-myosinの相互作用を生化学的に変化させる等の方法により、細胞の硬さはストレスファイバーの張力を反映する。（M. Nagayama et al, *Exp. Cell. Research*, 300, 396-405 (2004).）（3）細胞膜のようなゲルと基盤表面が接着点を形成して接着力（摩擦力）を増加させる。（T. Nitta, *J. Phys. Soc. Jpn* (2005). 日本物理学会 17年度注目論文賞受賞）（4）シリコンゴム弾性基盤を用いることにより、細胞を収縮しても伸張させても、細胞は細胞内張力を一定に保つ（細胞内張力ホメオスタシス）（図1）。（T. Mizutani et al、*Cell Motil. Cytoskeleton* 52, 242-248 (2004).）（5）細胞コロニー内の硬さ分布を調べるために、

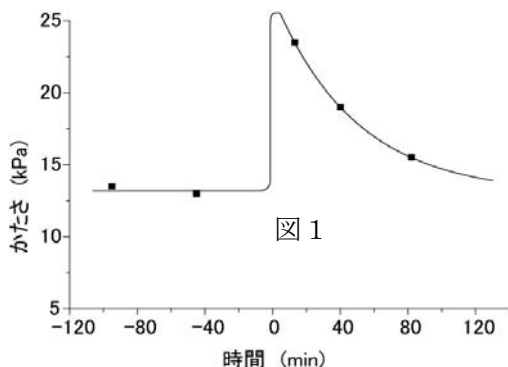
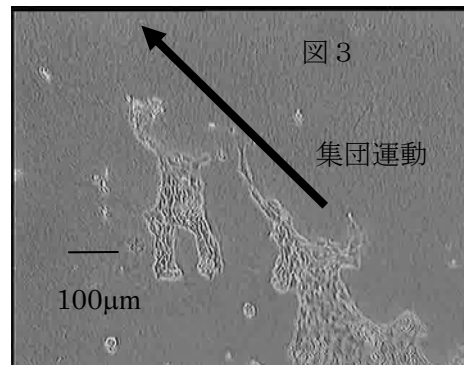
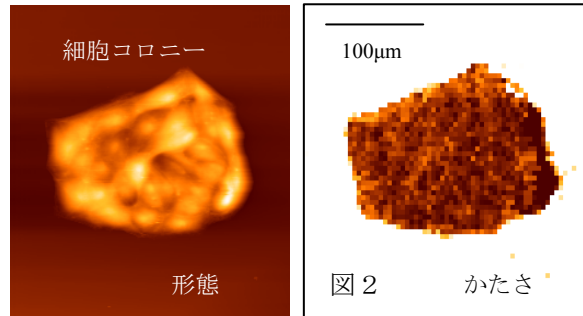


図1

400 μm を走査できるワイドレンジ走査型プローブ顕微鏡を自作し、細胞コロニー内で細胞ごとの硬さ分布を測定し、細胞の硬さが運動方向に対応している。（図2）（T. Mizutani, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 43, 4525-4528 (2004).）（6）ゲル上の上皮細胞は、1000個以上の細胞が細胞の走化性とは異なる協調的に一方向に集団運動をする現象を発見した。（図3）（H. Haga et al, *Biophyscal. J.*, 88, 2250-2256 (2005).）



これらの結果から、細胞およびその集団の力学的性質は単に受動的な性質だけではなく、能動的な性質（張力ホメオスタシス、コロニー内の張力分布、細胞集団運動）があるということを示した。

私たちは、このような性質のみならず外的刺激に対する骨格ネットワークに発生する収縮力の応答を通して、細胞が集団となることで生まれる協調性などの能動的な力学的性質を解明することが重要と考えている。

2. 研究の目的

形態形成機構を細胞レベルから明らかにする。その起源として、1細胞内および細胞コロニー内に働く細胞内張力の記憶に注目した。本研究では、細胞コロニーの構成要素である細胞の力学的性質における記憶効果を実験的に明らかにすることを目的とした。このため、生きた細胞および細胞コロニーに外的な刺激を加えた後の細胞内および細胞間張力分布の時間変化を調べ、細胞にどのように力学的刺激が蓄積されその後消えていくかを実験的に明らかにした。この能動的な性質こそが細胞の運動や集団運動、組織形成といった巨視的機能の記述に必須であると

考えている。

3. 研究の方法

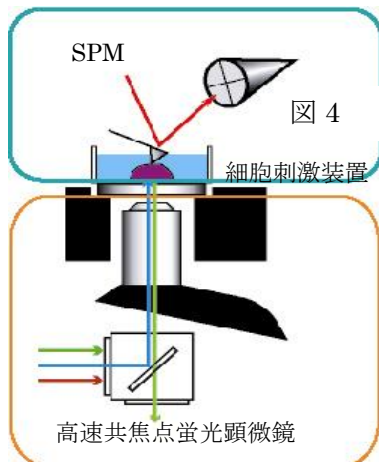
外界から小さないろいろなパターンの力学的刺激（力や変形）を加えた場合、細胞コロニー内に生じる細胞内張力分布の時間発展を走査型プローブ顕微鏡によってリアルタイムで観測する。このような測定系を走査型プローブ顕微鏡と倒立型蛍光顕微鏡および培養細胞にいろいろなパターンで伸張伸縮変形を加えることができる任意パターン刺激装置を導入して新たに構築した。その上で、これを用いて、細胞に刺激を加え、細胞内張力の変化を測定した。

(1) 試料調整

・細胞は培養細胞（繊維芽細胞、上皮細胞）。培養環境下において、細胞を微分干涉顕微鏡と間欠録画装置によって長時間観察し、画像解析用コンピューターにより細胞の運動性を評価確認した。

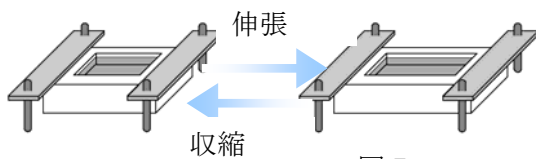
(2) 細胞内張力測定装置の構築

走査型プローブ顕微鏡（SPM）による生きた細胞の硬さ分布測定系。広範囲走査ステージにより生きた細胞および細胞コロニーを測定することが可能となる測定系を構築する。



本測定に適した piezo 駆動ソフトウェアを独自に開発した。また、細胞の力学的応答と同時に細胞内の骨格の動態を観察するために、SPMと共焦点蛍光顕微鏡および以下の細胞刺激装置を組み合わせた装置を構築した。（図4）

(3) 細胞への任意パターン刺激装置の作成
細胞に収縮・伸張の刺激を任意パターンで加えるために、細胞はシリコンラバー製の弾性



基盤シャーレを自作した。（図5）このシャーレをコンピューター制御可能な2台の電

動1軸ステージによっておこなえるような駆動装置を作成した。これらは、長時間観察においても細胞の活性が損なわれないように環境保持装置内に構築した。細胞に加えた伸張収縮刺激の基本パターンを図6に示す。変形の大きさは測定効果の大きい8%とした。

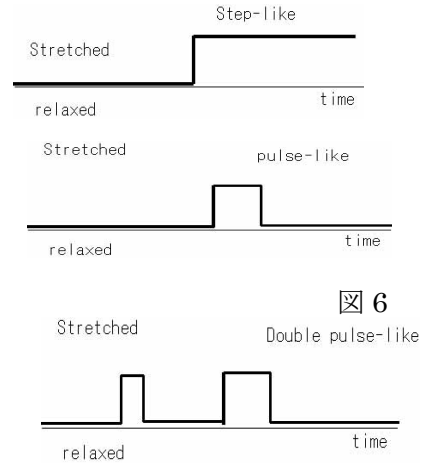


図6

(4) 生体蛍光蛋白（GFP）観察条件の確立
GFPを用いて、アクチンおよびミオシンを生細胞中で蛍光染色し、GFP導入によっても細胞が正常に培養するか状態の確認を行なう。良好な状態を作るために、トランスフェクション条件の最適化をおこなう。

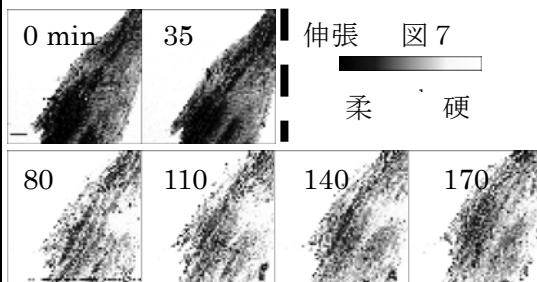
外力印加直後の細胞骨格（アクチンフィラメント）の空間分布の時間変化を高速共焦点蛍光顕微鏡によって観測する。観測した画像は、高解像度 CCD カメラを用いてデジタル高速ストレージに蓄積し、後に画像解析を行い、刺激に対する細胞骨格形成の変化を調べる。

4. 研究成果

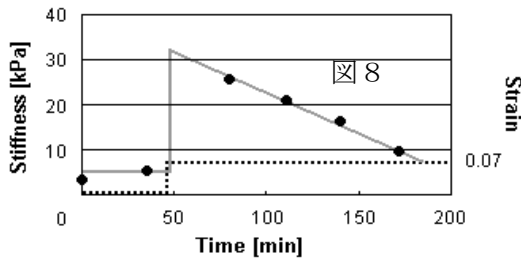
細胞内張力測定装置および細胞刺激装置を用いていろいろなパターンの伸張収縮刺激を加え、細胞内張力の変化を調べた。

(1) ステップ型変形刺激（張力ホメオスタシス）

図7に細胞の硬さ分布の時間変化を示す。測定35分後に8%伸張変形を加えた。その後150分間伸張を維持した。伸張を加える前は、同様の柔らかさを示しているが、伸張に伴って細胞の硬さは急激に増加し、その後緩やかに約2時間程度で柔らかくなった。細胞の硬さの変化は、細胞内張力をなくす（ミオシン



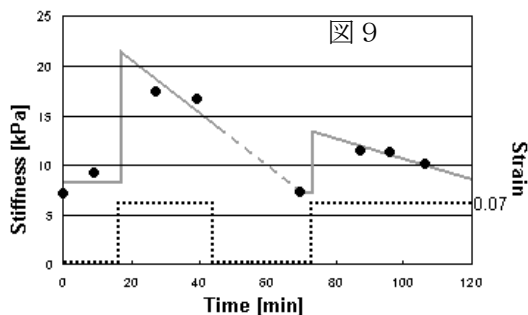
の活性阻害) 試薬 (Y27632) を加えるとこの応答がなくなることから細胞内張力を主に反映している。細胞の核付近の硬さの平均値の時間変化を図 8 に示す。逆に細胞の収縮に関しても、硬さは急激な減少の後に緩やかな増加をした。これらのことから、細胞は外的な変形に伴う張力の増加を防ぐようにする、言い換えると、細胞内の張力を一定に保つ傾向を示すことがわかった。(張力ホメオスタシス)



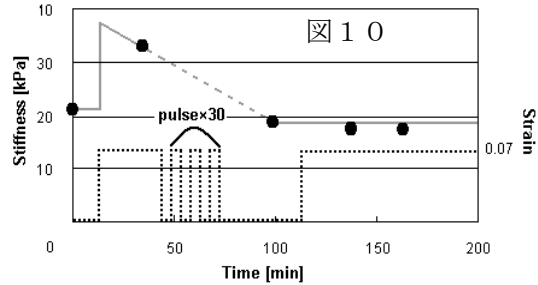
(2) 変形刺激が次の変形刺激に与える影響 (張力メモリー効果)

① 持続時間 30 分のパルス型変形刺激を加え、その後 30 分間刺激を加えない状態を 30 分 (安静時間) 保持し、再度、ステップ型変形刺激を加えた。図 9 に細胞変形パターンと細胞の硬さ応答の時間変化を示す。1 回目のパルス刺激では、上述のステップ型変形刺激と同様に、急激に硬さが増加した後に緩やかに減少した。そして、2 回目のパルス刺激においても 1 回目の刺激と同様に急激な増加の後に緩やかな減少を示した。このことから、1 回目の変形刺激は、2 回目の細胞内張力の変形刺激に対する応答に大きな影響を与えないということがわかった。

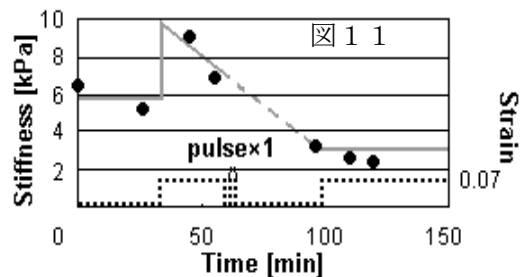
② 持続時間 30 分のパルス型変形刺激の後に持続時間 1 分の短いパルスを 30 回加え、その後 30 分間刺激を加えない状態で保持し、再度ステップ型変形を加えて細胞の硬さ応答を調べた。(図 10) 最初のパルス型変形刺激に対して、細胞は急激に細胞内張力を増加させた後にもとの値に戻るというホメオスタシス型の応答をするが、30 回の伸縮刺激後は、細胞の伸張に対して内部張力の応答がほとんどなくなることが明らかになった。言い



換えると、細胞は 2 回目のパルス型変形刺激に対する応答に関して、その 30 分前に加えた 30 回のパルス刺激の影響を細胞内に残している、すなわち、細胞内にそれ以前の刺激の情報が記憶されている。この実験により細胞内に**張力記憶効果**があることが見出した。



③ 記憶効果の性質を明らかにするために以下の条件で実験を行った。持続時間 30 分のパルス型変形刺激の 1 分後に持続時間 1 分の短いパルスを 1 ~ 30 回まで変化して加え、その後 30 分間刺激を加えない状態で保持し、再度ステップ型変形を加えて細胞の硬さ応答を調べた。図 11 に 1 回加えたときの変形パターンと細胞の硬さの応答を示す。最初のパルス型変形刺激に対して細胞は、急激に細胞内張力を増加させた後にもとの値に戻るが、1 回の伸縮刺激後は、細胞の伸張に対して内部張力の応答がほとんどなくなった。この結果は、パルスの回数を変化させても同じ結果を得た。これにより、1 分間の短いパルスがその後の記憶を作ってい



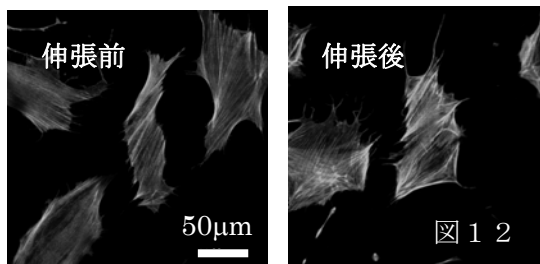
るといえる。

④ 短いパルスのどの部分が細胞の記憶に影響するのかを明らかにするために、持続時間 30 分の長いパルス型変形刺激の 15 分後に持続時間 1 分の短いパルスを 1 回加えその 15 分後に再びステップ型変形を加えた。その結果、この場合は最後のステップ型変形においても細胞の硬さは張力応答を示すことがわかった。このことから細胞内の張力記憶は持続時間 30 分のパルス型変形刺激と短いパルスの連動が重要であることがわかった。すなわち、1 回目の長いパルス型変形刺激

の収縮の後1分で再び伸張させるということが重要であるといえる。

(3) 細胞張力記憶のメカニズム

張力記憶の機構として、張力の発生源として細胞内を張り巡る細胞骨格であるアクチンネットワークとこのネットワークに収縮力を生み出すミオシンのリン酸化状態の変化が考えられる。アクチンネットワークへの記憶としては、比較的長い伸張収縮変形に対しては、細胞骨格は維持されるが、短い時間の伸張収縮変形に対して、細胞骨格が破壊される等の理由により、その後の張力応答ができなくなる可能性がある。そこで、抗体を用いて細胞内のフィラメントアクチンを蛍光標識し、③の収縮伸張刺激パターンを加える前と後における細胞内のネットワークの破壊の状況を調べた。(図1 2) その結果、変形刺激後においても前と同様に細胞骨格のネットワークは明確に確認することができた。このことから、細胞内の張力記憶はミオシンの活性状況に起因することがわかった。



(4) 本研究のまとめと今後の展望

細胞の能動的な性質を実験的に明らかにする実験系を構築した。これを用いて、細胞にいろいろなパターンの外的な変形刺激を加えてその張力応答を調べた。その結果、一細胞レベルに記憶現象があることを明らかにした。記憶効果につながるのは、伸張収縮の連動であることを示した。また、この現象は細胞骨格に力を発生させるミオシンの活性に起源があることを見出した。このような体細胞に記憶現象があることを示した例は世界初である。今後は、さらに一細胞および細胞集団における記憶の性質を明らかにし、形態形成との関連を明確にしていく予定である。

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 11 件)

①T. Mizutani, K. Kawabata, Y. Koyama, M. Takahashi, H. Haga: “Regulation of Cellular Contractile Force in Response to Mechanical Stretch by Diphosphorylation

of Myosin Regulatory Light Chain via RhoA Signaling Cascade”, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *in press* (2009). 査読有

②W. Mitsui, K. Tamura, T. Mizutani, H. Haga and K. Kawabata: “Mechanical Response of Single Myoblasts to Various Stretching Patterns Visualized by Scanning Probe Microscopy”, *Archives of Histology and Cytology*, *in press* (2009). 査読有

③T. Nishioka, Y. Miyai, H. Haga, K. Kawabata, H. Shirato, A. Homma, K. Shibata and M. Yasuda: “Novel Function of Transcription Factor ATF5: Blockade of p53-dependent Apoptosis Induced by Ionizing Irradiation”, *Cell Structure and Function*, 34, 17-22 (2009). 査読有

④T. Kawamoto, H. Haga, K. Tamura, T. Mizutani, and K. Kawabata: “Mechanical Response to Isotropic Shrinkage of Fibroblasts Measured by Scanning Probe Microscopy”, *Japanese Journal of Applied Physics*, 47, 6173-6176 (2008). 査読有

⑤K. Tamura, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata: “Visualization of stretch-induced intracellular tensional response of single fibroblasts by mechanical scanning probe microscopy”, *Japanese Journal of Applied Physics*, 46, 5631-5635 (2007). 査読有

⑥H. Haga, M. Nagayama and K. Kawabata: “Imaging Mechanical Properties of Living Cells by Scanning Probe Microscopy”, *Current Nanoscience*, 3, 97-103 (2007). 査読有

⑦T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata: “Development of a Device to Stretch Tissue-like Materials and to Measure Their Mechanical Properties by Scanning Probe Microscopy” *Acta Biomaterialia*, 3, 485-493 (2007). 査読有

⑧H. Haga and K. Kawabata: “Collective Movement and Morphogenesis of Epithelial Cells”, *Proceedings of the international symposium on topological aspects of critical systems and networks*, 82-85 (2007). 査読有

⑨T. Mizutani, H. Haga, Y. Koyama, M. Takahashi, K. Kawabata:

“Diphosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain Enhances the Tension Acting on Stress Fibers in Fibroblasts”, *Journal of Cellular Physiology*, 209, 726-731 (2006). 査読有

⑩T. Mizutani, H. Haga, K. Kato, K. Matsuda, and K. Kawabata: “Observation of Stiff Domain Structure on Collagen Gels by

Wide-Range Scanning Probe Microscopy”, Japanese Journal of Applied Physics, 45, 2353-2356 (2006). 査読有

⑪ K. Kato, Y. Ohmori, T. Mizutani, H. Haga, K. Ohashi, T. Ito, and K. Kawabata: “The Role of Actin-Binding Protein Filamin A in Cellular Stiffness and Morphology Studied by Wide-Range Scanning Probe Microscopy”, Japanese Journal of Applied Physics, 45, 2328-2332 (2006). 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

- ①川端和重:「細胞および細胞集団の協調運動における動力学的効果」、日本機械学会 第 21 回バイオエンジニアリング講演会 基調講演、2009. 1. 24、札幌市
- ②川端 和重:「細胞協同運動における細胞内および細胞間の力学的コミュニケーション」、日本生物物理学会第46回年会 シンポジウムオーガナイザー、2008. 12. 3、福岡市
- ③川端和重:「バイオ高速 SPMによる細胞骨格動態観察」、日本顕微鏡学会SPM研究部会 招待講演、2008. 11. 28、南魚沼郡湯沢町
- ④川端 和重:「高分子ゲルにおける不均一な網目構造の静止摩擦力への効果」、摩擦の科学 シンポジウムオーガナイザー、2008. 9. 11、刈谷市
- ⑤川端 和重:「SPMによる細胞システムの協同現象の動力学的観察」、新世代研究所バイオ SPM研究会 招待講演、2008. 3. 14、新潟市
- ⑥川端 和重:「細胞システムの協同現象における動力学効果」、日本生物物理学会シンポジウム 招待講演、2007. 12. 23、横浜市
- ⑦芳賀 永:「細胞系における協調運動に伴う局所弾性率の時空間測定」、日本表面科学会 第 27 回表面科学講演大会 招待講演、2007. 11. 1、東京都
- ⑧T. Mizutani: “Wide range scanning probe microscopy for probing mechanical properties in a single cell or aggregative cells”, Advanced Technology Institute International Forum 2007 招待講演、2007. 10. 22, 千葉市
- ⑨水谷 武臣:「走査型プローブ顕微鏡による細胞集団の硬さ分布測定と細胞運動の観察」、日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会 招待講演、2007. 5. 20、新潟市
- ⑩川端 和重:「染色体凝集解明の力学的アプローチ」、日本応用物理学会シンポジウム 招待講演、2007. 3. 28、相模原市
- ⑪川端 和重:「ゲル界面の摩擦の素過程と制御」、日本物理学会シンポジウム 招待講演、2007. 3. 18、鹿児島市
- ⑫川端 和重:「細胞の力学量マッピングと運動制御」、新世代研究所合同シンポジウム 招待講演、2006. 11. 10、長野市

⑬川端 和重:「生細胞の力学的イメージングとその運動制御」、学術振興会 ナノプロブテクノロジー第 167 委員会 「光・プロブ技術を駆使した細胞操作とイメージング」招待講演、2006. 10. 26、横浜市

⑭ T. Mizutani: “Stiffness Measurement of an Epithelial Colony Using Wide-Range Scanning Probe Microscopy”, The 16th International Microscopy Congress 招待講演、2006. 9. 7, 札幌市

⑮ K. Kawabata: “Stiffness Response to External Deformation of Single Cells and Colony”, The 3rd Conference on Artificial Muscles Collaboration with Nanotechnology and Biology 招待講演、2006. 5. 31, 東京都

⑯川端 和重:「単一生細胞の力学的履歴効果」、第 45 回日本生体医工学会大会 招待講演、2006. 5. 15、福岡市

〔図書〕(計 2 件)

①T. Ushiki and K. Kawabata: Springer-Verlag, Applied Scanning Probe Methods X (2008), 285-308

②K. Kawabata, K. Nomura, K. Ikeda, O. Hoshi, D. Fukushi, H. Haga and T. Ushiki: Taylor & Francis Group, Chromosome Nanoscience and Technology (2007), 1-13

〔その他〕

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/research/archj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川端 和重 (KAWABATA KAZUSHIGE)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 20261274

(2) 研究分担者

芳賀 永 (HAGA HISASHI)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 00292045
根本 幸児 (NEMOTO KOJI)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 60202248

(3) 連携研究者

なし