

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19021048

研究課題名（和文） 骨格筋細胞分化における単一細胞からの分化シグナル伝達の解析

研究課題名（英文） Analysis of signaling pathway in muscle differentiation of single cell

研究代表者

中村 史（NAKAMURA CHIKASHI）

産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・グループ長

研究者番号：40357661

研究成果の概要：我々は抗体修飾した原子間力顕微鏡（AFM）を用いて細胞操作技術の開発を行っている。本特定領域公募研究では AFM 探針を用いて細胞表面のタンパク質を力学的に検出し、細胞の分化状態を評価する方法を開発した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	2,400,000	0	2,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	4,700,000	0	4,700,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：細胞操作、分化誘導、遺伝子導入、AFM、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

骨格筋への細胞分化は MyoD ファミリーによって制御されており、MyoD の発現により骨格筋に特徴的なタンパク質の発現が促される。自己分泌シグナルであるインシュリン様増殖因子 IGF-II は細胞外に分泌され、細胞表面に存在する IGF-1 受容体と結合することで正の制御因子として働き、MyoD の発現を促進する。分化シグナルの伝搬は近傍細胞に対して多数の細胞が同時に組織形成を行うために分化周期を同期するための機構であると考えられるが、生体内でのその伝搬速度や濃度は不明である。

2. 研究の目的

本研究ではマウス繊維芽細胞 C3H10T1/2 を DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジンによって骨格筋に分化誘導し、IGF-1 受容体に結合した IGF-II を力学的に検出することによって分化状態の評価を試みた。

3. 研究の方法

AFM はカンチレバー先端の探針と試料の間に働く相互作用を数 pN レベルの力分解能で測定できる装置である。カンチレバーにかかる力を縦軸に、移動距離を横軸にプロットしたグラフをフォースディスタンスカーブ（FDカーブ）と呼ぶ。抗体修飾探針を細胞表面に接触させ、抗体-リガンド-受容体のサンド

イッチ結合を形成させる。探針を引き離す過程において結合の破断に要する力がFDカーブ上に現れる。これを unbinding force (UBF) と定義し、相互作用の解析に用いた。

4. 研究成果

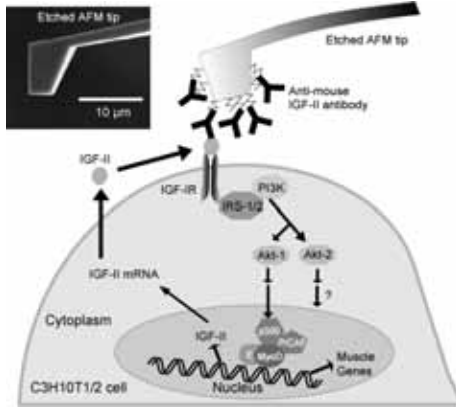


図1 骨格筋分化における IGF-II シグナル伝達と IGF-I 受容体に結合した IGF-II の力学検出

培養3日目の C3H10T1/2 を 20 μM 5-アザシチジンで 48 時間処理することによって骨格筋に分化誘導した。その後、通常の培地で2日間培養し、さらに骨格筋への分化を促進するため、20 nM ジヒドロテストステロンで処理した。AFM 探針は、探針の圧入による機械的刺激を低減するために¹⁾、また細胞との接触面積を増大するために先端を集束イオンビームでエッチングし接触面積およそ 10 μm^2 にしたものをを用いた(図1)。カンチレバーはバネ定数が 0.2 N/m のものを用い、負荷速度は 400 nN/s の条件で測定を行った。細胞表面の IGF-I 受容体に結合した IGF-II を力学検出するために、抗 IGF-II 抗体を修飾した AFM 探針を細胞に接触させることで受容体-リガンド-抗体の複合体を形成させ、引き離した時の UBF を観察した。測定を繰り返し、UBF のヒストグラムを作製すると正規分布に従うピークが周期的に現れ、その最小単位から単一の分子間相互作用の UBF を求めることができる。本研究で使用した抗 IGF-II 抗体では、およそ 100 pN が最小単位であることが示された。

1 回の測定において、抗 IGF-II 抗体修飾 AFM 探針を 1 細胞あたり 10 回接触し、10 細胞に対して操作を行った。5-アザシチジン処理をしていない場合では数十 pN 程度の非特異的吸着力が検出されたが、特異的な UBF と明瞭に区別することが可能であった。誘導後の細胞でも、10 回の測定中に UBF が全く検出されない細胞が 20~30%程度含まれることがわかった。UBF が検出できない細胞は分化誘導が十分でないものと考えられるが、形態に

特徴的な差は見られず、本手法によって細胞をきたまま非侵襲的に識別することが可能であった。本分化誘導手法により、細胞融合しミオシン重鎖陽性となり、筋細胞に到達する細胞は最大でも 20%程度に留まり、培養初期段階において既にシグナル伝達陰性の細胞が含まれていることは妥当な結果である。本測定の結果は、分化シグナルの伝達が十分でないことがインビトロにおける細胞の分化誘導の不確実性の要因であることを証明している。

培養期間1日目から9日目まで、5-アザシチジンを処理した細胞としていない細胞に対して力学測定を行い、UBF の平均を算出した。処理前には UBF の平均値は 40 pN 以下であったことに対して、処理後1日目では 53 pN に、2日目では 112 pN に増加した。培地交換後では UBF は 81 pN と減少し、ジヒドロテストステロンを添加して2日間培養した時の結果では 5-アザシチジン処理前と同程度になった。一方、5-アザシチジンで処理しない場合は培養日数に関係なく平均で 40 pN 以下であった。さらに、5-アザシチジンを処理した細胞の培地中に終濃度 20 nM の IGF-II を添加した後に力学測定を行ったところ、添加しない場合と大きな差は観察されなかった。経時変化が IGF-I 受容体の発現量を示唆しており、IGF-II の分泌量が反映されたものではないことを示している。

本技術は細胞の分化状態を無標識かつ非侵襲で正確に判別できる非常に有用なものであり、分化した細胞を選別する技術に発展することが期待される。

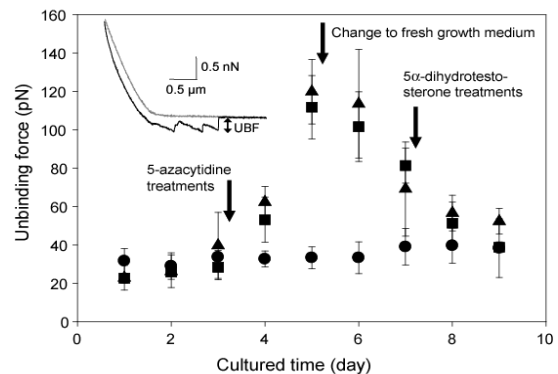


図2 骨格筋分化過程における UBF の経時変化

- 5-アザシチジン処理
- 5-アザシチジン無処理
- 5-アザシチジン処理
- + 20 nM IGF-II 添加

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1件)

Successive evaluation of a muscle differentiation process by a method of mechanical force detection of insulin-like growth factor-II bound to receptors on a living cell surface using an AFM, Sung-Woong Han, Chikashi Nakamura*, Shingo Mieda, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura and Jun Miyake, J. Mol. Recog. (submitted, 査読有)

[学会発表](計17件)

国際

Nakamura C, Kamiishi H, Han SW, Miyake J “Force mechanical analysis of nanoneedle insertion into a living cell using AFM” Engineering Cell Biology II, 2007/8, Boston, USA

Nakamura C, Nakamura N, Miyake J “Mechanical force analysis of ultra-thin needle insertion into a single living cell using AFM” The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2007/9, Ibuka Memorial Hall, Waseda University (invited)

Han SW, Nakamura C, Kihara T, Mieda S, Nakamura N, Miyake J “Mechanical detection of muscle differentiation of C3H10T1/2 using AFM and anti-IGF-II antibody immobilized tip” AFM BioMed Conference Monterey 2008, 2008/10, Monterey, California, USA

Nakamura C, Mieda S, Kamiishi H, Han SW, Kihara T, Nakamura N, Miyake J “AFM based engineering for single-cell analysis” PRiME 2008: Joint international meeting of 214th Meeting of ECS and The Electrochemical Society 2008 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, 2008/10, Honolulu, Hawaii (invited)

Nakamura C, Han SW, Nakamura N, Miyake J “骨格筋細胞分化における単一細胞からの分化シグナル伝達の解析” International Life Surveyor Symposium, 2009/1, Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

国内

中村 史「AFMでナノスケールの針を挿入する細胞操作技術」、有機バイオSPM研究会・2007、2007年8月、幕張メッセ(依頼講演)

三枝真吾、中村 史、中村徳幸、三宅 淳

「抗体修飾ナノ針を用いた神経幹細胞マーカー蛋白質の力学検出による細胞選別法の開発」、日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム、2007年9月、早稲田大学国際会議場

三枝真吾、中村 史、中村徳幸、三宅 淳「抗体修飾ナノ針を用いた神経幹細胞の力学的選別方法の開発」、第59回日本生物工学会大会、2007年9月、広島大学東広島キャンパス総合科学部

中村 史「ナノスケールの針の細胞への挿入操作と力計測」、講演・意見交換会 化学・バイオ研究者にとっての「微細加工とナノ計測」、2008年1月、産総研つくばセンター(依頼講演)

三枝真吾、中村 史、木原隆典、中村徳幸、三宅 淳「細胞骨格タンパク質の力学的検出」、SoftNANO 2008、2008年1月、東京工業大学すずかけ台キャンパスすずかけホール

韓 成雄、中村 史、中村徳幸、三宅 淳「IGF-IIとIGF-I受容体の結合の力学的検出」、日本化学会第88春季年会、2008年3月、立教大学池袋キャンパス

三枝真吾、中村 史、木原隆典、中村徳幸、三宅 淳「抗体修飾ナノ針を用いた細胞内繊維状蛋白質の力学検出による細胞選別法の開発」、電気化学会第75回大会、2008年3月、山梨大学

韓 成雄、中村 史、三枝真吾、木原隆典、中村徳幸、三宅 淳「ナノ針とAFMを用いた骨格筋分化誘導マーカータンパク質の力学的検出」、第60回日本生物工学会大会(2008)、2008年8月、東北学院大学土樋キャンパス

韓 成雄、中村 史、三枝真吾、木原隆典、中村徳幸、三宅 淳「AFMを用いた骨格筋細胞分化の力学的評価」、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月、東京工業大学すずかけ台キャンパス

中村 史、韓 成雄「細胞表面受容体に結合したリガンドの力学検出と分化過程の評価」、平成20年度日本顕微鏡学会SPM研究会第11回研究会、2008年11月、湯沢ニューオータニホテル

中村 史「ナノスケールの針の機械的挿入による細胞操作技術」、シンポジウム「ナノバイオテクノロジーの新展開」、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月、神戸ポートアイランド(招待講演)

中村 史、韓 成雄、柳 昇桓、三枝真吾、中村徳幸、三宅 淳「細胞表面IGF-I受容体に結合したIGF-IIリガンドの抗体修飾探針による力学検出」、日本化学会第89春季年会(2009)、日本大学理工学部船橋キャンパス

[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://unit.aist.go.jp/rice/research/ce11-surgery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 史 (NAKAMURA CHIKASHI)

研究者番号：40357661

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

