

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20679

研究課題名（和文）マイクロ曲面操作で切り拓く細胞の形状認識機構と接着界面力学のメカノバイオロジー

研究課題名（英文）Development of microdevices to investigate cellular curvature-sensing mechanisms based on mechanobiology of adhesion interface

研究代表者

山下 忠紘（Yamashita, Tadahiro）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教

研究者番号：00827339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マイクロ曲面上で血管平滑筋細胞が示す挙動の詳細を観察するために、培養面の曲率を操作可能な新しい細胞培養技術の開発に取り組んだ。変形する曲面の上で血管平滑筋細胞を培養し、培養面の曲率の変化に対する細胞の配向追従挙動の観察を初めて実現した。さらに細胞培養系に改良を施すことで、曲面上で細胞が発する張力の計測に取り組み、培養面の凸形状が平滑筋細胞の表現型を収縮型に誘導することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで生物学分野で焦点が当てられてこなかった「培養面のわずかな曲率が細胞に与える影響」を解析するための新しい技術基盤を構築した。そして、単一細胞よりもはるかに大きい直径数mm程度の曲面が細胞の配向や表現型に影響を与えることを実験的に明らかにした。これらの知見は、将来の再生医療において、細胞の挙動を制御し、体外で組織や臓器の構築を行う際の、足場材料の形状設計指針となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a new micro-cell-culture platform that enables temporal change of curvature of the cell-adhering surface, to investigate the detail of unique behaviours that vascular smooth muscle cells (VSMCs) show on curved surfaces at the scale of several hundred micrometres. To prove the concept, VSMCs were exposed to a sudden change of the curvature of the cell-adhering plane, and their response in orientation was monitored, showing their acute sensitivity to the surface curvature. Additionally, cellular contractility was measured by improving the controlling system. These observations on VSMCs on curved surfaces suggest that the curvature of the cell-adhering plane has a significant impact on the phenotype of VSMCs.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：曲率 血管平滑筋細胞 マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

20 世紀の分子生物学の発展により、生命活動の根幹が緻密に制御された生化学反応のネットワークであることが明らかになった。しかしながら近年、細胞の分化や発生あるいはガン化といったあらゆる生命現象に、生化学反応だけでは解釈できない力学的なメカニズムが介在していることが示され、その仕組みを究明する複合生物学領域がメカノバイオロジーとして急速に発展し[1: T. Iskratsch *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2014), 2: V. Vogel, *Annu. Rev. Physiol.* (2018)], 注目を集めている。すなわち、メカノバイオロジーの核心は「細胞は力や形状といった力学的な情報をどのようにして生化学反応と結びつけ、組織・生体の機能制御に用いているか」を理解することにある。研究代表者はこの領域において、単一細胞より数十倍以上スケールが大きく、従来細胞や組織の影響を与えることは無いと認識されてきた直径数百 μm ~数 mm の曲面が組織の形態形成に強い影響を与えることを発見し[3: T. Yamashita *et al.*, *Acta Biomater.* (2016)], 細胞が立体的な組織を形成するプロセスを A. 接着面の曲率 B. 細胞が発する張力 C. 細胞の接着力からなる接着界面の力学バランスに基づいて説明する物理モデルを世界に先駆けて提唱した。今後このモデルを定量的に検証することで、「接着界面の力学バランスがどのような分子メカニズムを通じて細胞の形状認識能力や機能制御に影響を与えるか」を解明し、発生や癌化といった生体スケールの生命現象の理解や、組織工学的に細胞から複雑な組織や臓器を作り上げる際の設計指針の樹立を目指し、研究に取り組んでいる。以降、本報告書において、「単一細胞よりも大きい、曲率半径百 μm ~数 mm 程度の平滑な曲面」をマイクロ曲面と呼ぶ。

2016 年以降、マイクロ曲面上に存在する細胞が、平面上と全く異なる遊走挙動[4: K. Anselme *et al.*, *Nat. Commun.* (2018)]や伸展形態[5: K. J. Stebe *et al.*, *Biophys. J.* (2018)], さらに分化まで示すこと[6: A. Petersen *et al.*, *Adv. Sci.* (2017)]が複数の研究グループから相次いで報告された。これらの報告は、細胞が接着面のわずかな曲率を何らかの力学的な仕組みを通じて認識し、内部の生化学反応系を制御するメカノセンシング機構の存在を強く示唆するものであるが、その実態は全く明らかになっていない。この解明を阻む大きな問題は、マイクロ曲面上での細胞の振る舞いを観察するための技術的基盤の欠如である。フォトリソグラフィーをはじめとするマイクロ・ナノ加工技術は、曲面様構造体の成形に適用することができず、曲率半径 1mm 前後の滑らかな曲面様構造体の成形は依然として大きな困難を伴う。細胞の曲面認識挙動の詳細を解明するためには、マイクロ曲面の形状を自在に操作し、その上に存在する細胞の様子を観察できる新しい実験技術が必要である。

2. 研究の目的

マイクロ曲面上で細胞が示す特異な挙動の詳細を解析するため、本研究は細胞培養面の曲率を操作可能であり、なおかつマイクロ曲面上に存在する細胞の様子を経時的に観察することが可能な新しい細胞培養技術を開発することを目的とする。具体的に、空気圧制御により細胞培養面を滑らかに変形することができるマイクロ曲面細胞培養デバイスを開発し、培養面の変形に対する細胞応答のリアルタイム観察に取り組んだ。次に、マイクロ曲面が細胞の表現型に与える影響の調査に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究はまず、培養表面の曲率を操作可能なマイクロ曲面細胞培養デバイス(図 1)の製作に取り組んだ。本デバイスは、シリコンシート薄膜を底面に持つ細胞培養表面と、光硬化性樹脂 SU-8 製のマイクロスリット、減圧チャンバーからなる(図 1A 左)。圧力コントローラーを介して減圧チャンバー内の空気圧を制御することで、細胞培養面の曲率を操作することが可能である(図 1A 右)。また、曲率の大きさや向きは、空気圧やスリットの向きを変えることで細胞培養中の任意のタイミングで変化させることができる。このようなマイクロ曲面細胞培養デバイスを用いて、モデル細胞であるヒト大動脈血管平滑筋細胞(HASMC)がマイクロ曲面上で示す振る舞いを解析した。線形スリットを用いて曲率 1mm^{-1} の半円溝状の曲面を形成し、その上で HASMC を培養した(図 1B)。24 時間細胞培養を継続した後、スリットの方角を 90° 転換することで溝の方角を変え、その後 24 時間細胞培養を継続した。細胞培養期間中、培地に Hoechst 33342 を添加し、細胞核の様子を 6 時間ごとに蛍光顕微鏡で観察した。そして、細胞核が半円溝の軸方向に対して示す配向角の変遷を解析することで、細胞がマイクロ曲面の変形に対して示す追従挙動を評価した。

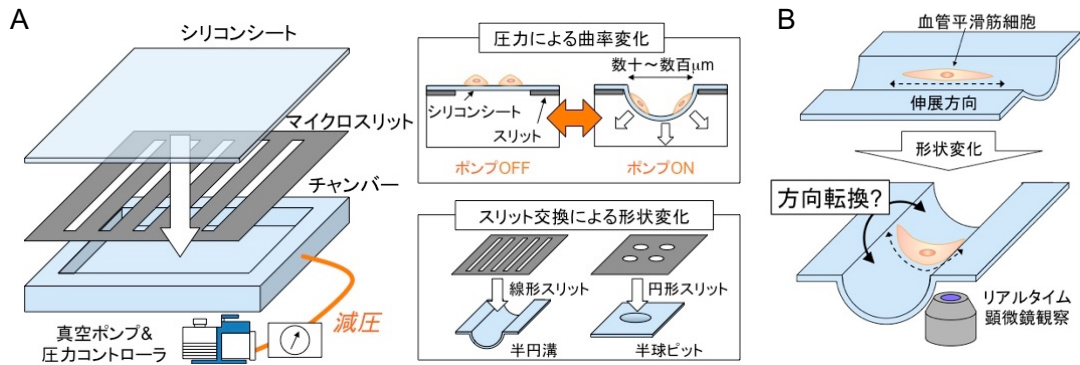


図 1 マイクロ曲面細胞培養デバイスの動作原理 (A) 装置構成および空気圧制御による培養面変形の原理 (B) 曲率の変化に対する細胞応答の観察

4. 研究成果

まず初めに、製作したマイクロ曲面細胞培養デバイスの動作検証を行なった。減圧チャンバ内外の空気圧差を操作し、マイクロスリット上に設置したシリコンシート薄膜が示す曲率を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。直線形状および円形状のどちらのマイクロスリットを用いた場合でも、空気圧差が 200kPa 程度まで増大するにつれ、シリコンシート薄膜の曲率は直線的に増加した。その後、曲率の増加幅は次第に減少し、一定の値に漸近するような様子を見せ

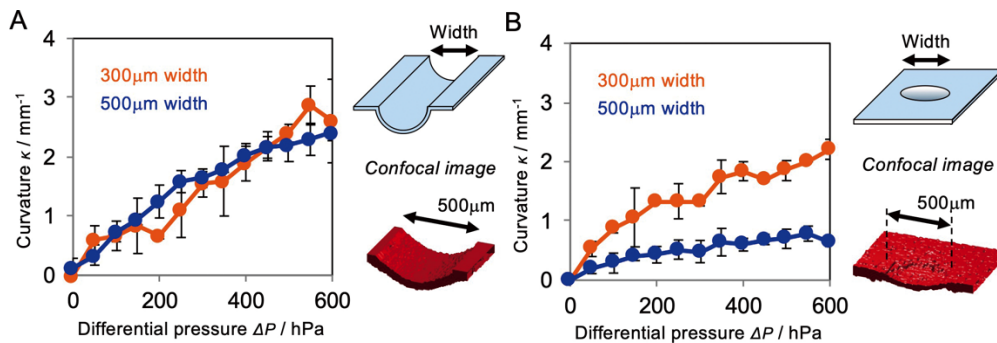


図 2 空気圧制御による細胞培養面の曲率操作 (A) 直線形状スリットを介したシリコンシートの変形特性 (B) 円形状スリットを介したシリコンシートの変形特性

た。この結果から、本デバイスを用いて直線形、円形ともに曲率 2mm^{-1} 程度のマイクロ曲面を形成できることを確認した。

次に、HASMC を培養した培養面を、直線形スリット上で曲率半径 1mm^{-1} の半円溝状に変形し、細胞核が溝に対して示す配向角を経時的に観察した(図 3)。細胞培養直後はランダムな方向を向いていた HASMC の細胞核は、培養時間が経過するにつれて溝の方向に従うように向きを変え

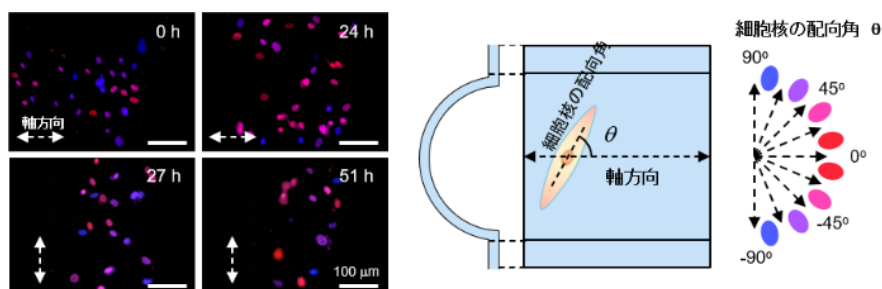


図 3 マイクロ曲面上で培養された HASMC の細胞核

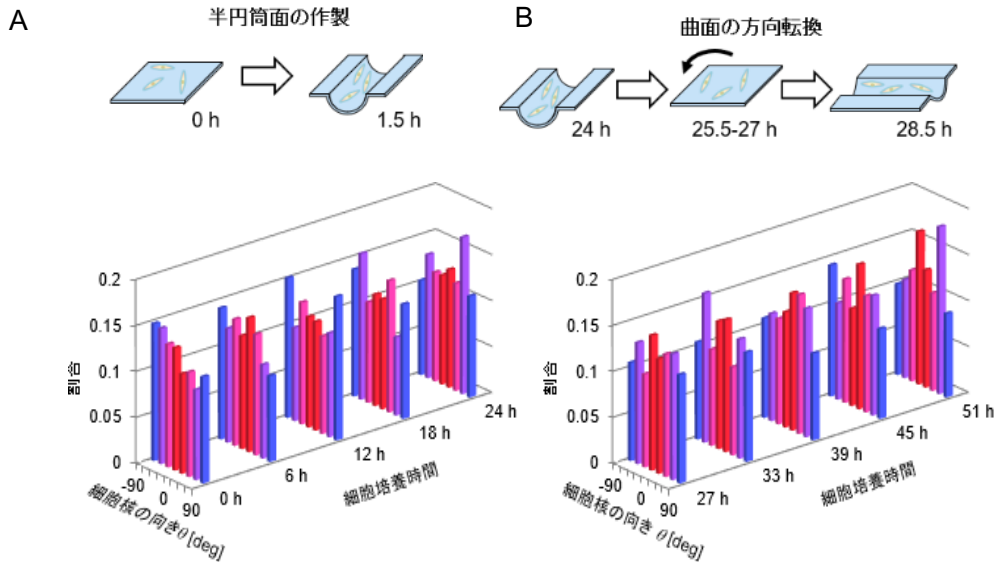


図4 曲面の方向転換に対する細胞核の配向応答 (A) 曲面形成から24時間の細胞核の配向角 (B) 方向転換後24時間の細胞核の配向角

ていった。次に、マイクロスリットを90°回転し、観察を継続したところ、HASMCの細胞核は方向転換後の溝の方向に従うように配向角を変化させた。これらの結果は、HASMCが曲率半径1mm⁻¹(直径2mm相当)のわずかな曲率を敏感に検知し、細胞の向きを制御していることを示唆している。これまでに当該研究分野では、温度変化を起点とする形状記憶ポリマーの変形挙動を利用して、細胞培養面に形成した幅数μmの溝状構造の方向転換実験が行われ、溝状構造体に対する細胞の追従挙動が報告された[7: M. Ebara et al., *Int. J. Nanomed.* (2014)]。本研究はさらに大きなスケールで、曲面状の溝構造の方向転換に対しても、細胞が同様の追従挙動を示すことを確認した。これらのスケールが異なる構造体を認識する際、細胞内で共通の生化学シグナルが働いているか、それとも全く異なる生化学シグナルが働いているか、現時点で明らかではない。また、本研究では、曲率1mm⁻¹のマイクロ曲面に対する追従挙動が観察されたが、単一細胞がどの程度までわずかな曲率を認識できるかについて、一般的な見解はまだ定まっていない[8: R. Truckenmüller et al., *Trends Biotechnol.*, (2018)]。本デバイスによる細胞培養技術は、今後これらの詳細を解明するための技術的基盤となることが期待される。

生体内に存在する血管平滑筋細胞は、収縮型もしくは増殖型のいずれかの表現型を維持し、その機能を制御していることが知られている。本研究は次に、培養面の曲率が細胞の表現型に及ぼす影響を調査するため、マイクロ曲面細胞培養デバイスに改良を施し、曲面上に存在するHASMCの張力の計測に取り組んだ(図5)。本空圧制御装置は、コンプレッサと真空ポンプを圧力源とし、それぞれが発生する正圧と負圧をデバイス内部へ導く。圧力源は電空レギュレータを介してデバイスに接続されており、電空レギュレータは信号制御部からの入力信号に応じて、デバイス内部の空気槽の圧力を適切な値に調節する。信号制御部はArduinoとDAコンバータからなり、Arduinoのプログラム上で設定した電圧信号を電空レギュレータに送る。このような装置を用いて、細胞培養面の曲率を精密に操作できる実験系を構築した。空気圧操作により形成したマイクロ曲面上でHASMCを培養すると、細胞が発する張力によって培養面が牽引され、その曲率がわずかに変化する。このわずかな曲率変化を検出することで、培養面のシリコンゴムシートの変形特性から、曲面上で細胞が発する張力の大きさを推定することが可能である。実際に細胞培養面内外の圧力差を

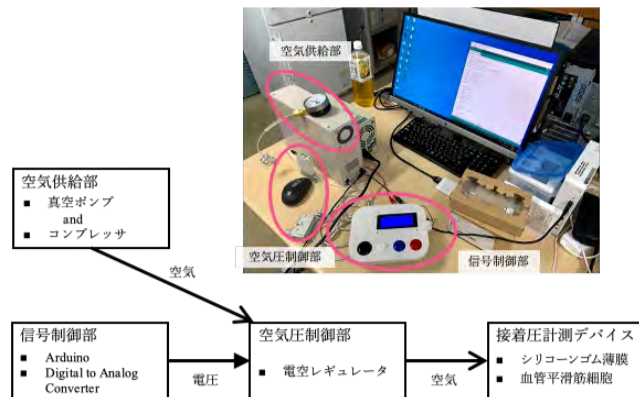


図5 加圧・減圧に対応した空気圧制御装置

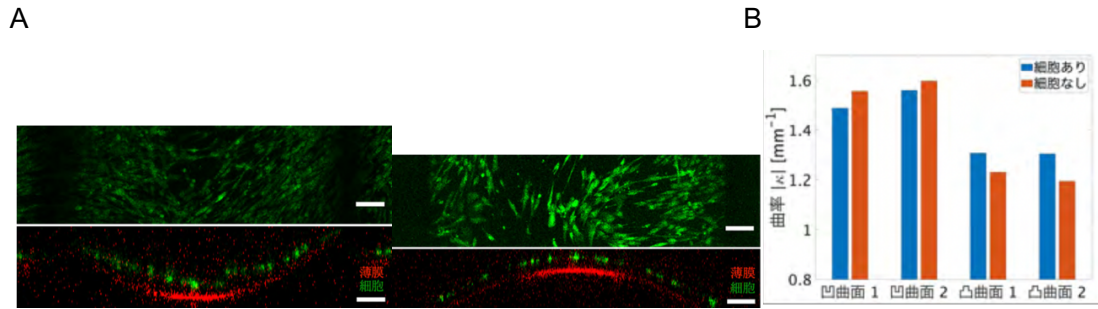


図 6 (A) シリコンシート薄膜上で細胞された HASMC の様子 (左: 凹面, 右: 凸面) (B) 細胞の有無により生じる培養面の曲率の違い

一定に維持しながら HASMC をシリコンシート薄膜上でコンフルエント状態になるまで培養した結果(図 6A)、細胞の有無によってわずかに培養面の曲率の違いが観察された(図 6B)。

凹面および凸面のどちらのマイクロ曲面上でも、細胞の有無によって 0.1mm^{-1} 程度の曲率の違いが見られた。シリコンシート薄膜の変形特性をもとに細胞が発する張力を概算したところ、単一細胞当たりの張力は凹面上で $3.1\mu\text{N}$ 、凸面上で $6.4\mu\text{N}$ と見積もられ、凸面上で HASMC はより強い張力を発していることが明らかになった。また、血管平滑筋細胞の収縮型マーカーである α -平滑筋アクチン(αSMA)を免疫染色して観察したところ、凸面上に存在する平滑筋細胞で αSMA の発現量が上昇していることが確認された。これらの結果は、培養面のわずかな曲率が細胞の表現型にまで強い影響を及ぼしていることを示しており、今後生体医工学分野において細胞の培養環境を構築する際、形状、特にわずかな曲率の設計が、細胞の挙動を制御する上で重要となることを示唆している。

以上のように本研究は、これまで細胞生物学の観点からほとんど注目されることがなかった、細胞培養面のわずかな曲率が細胞の挙動に及ぼす影響を調査するための技術的基盤を構築した。今後、曲率に依存して細胞が張力および表現型を変化させる仕組みを明らかにすることで、細胞の形状認識機能の詳細を明らかにし、細胞の挙動を積極的に制御するための足場材料の形状設計指針が得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Yamashita Tadahiro, Nishina Takuya, Matsushita Ichiro, Sudo Ryo	4. 巻 36
2. 論文標題 Air-pressure-driven separable microdevice to control anisotropic curvature of cell culture surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1015-1019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20A001	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryosuke Matsuzawa, Philip Kollmannsberger, Ryo Sudo, Tadahiro Yamashita
2. 発表標題 Evaluation of tissue adhesion strength utilizing the spontaneous detachment from micro curvature
3. 学会等名 41st Engineering in Medicine and Biology Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadahiro Yamashita, Ichiro Matsushita, Ryo Sudo
2. 発表標題 An air-driven microdevice to tune the anisotropic curvature of cell adhesion plane to pursue the mechanobiology of curved surface
3. 学会等名 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下忠紘, 松下一郎, 須藤亮
2. 発表標題 空気圧を利用した可変曲面細胞培養デバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下忠紘, 松下一郎, 須藤亮
2. 発表標題 曲率を制御可能なマイクロ曲面細胞培養プラットフォームの開発
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松澤諒介, 山下忠紘, 須藤亮
2. 発表標題 マイクロ曲面からの脱離挙動を用いた組織接着強度評価法の開発
3. 学会等名 日本機械学会 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下忠紘
2. 発表標題 曲面上でガラリと変わる培養組織の振る舞い
3. 学会等名 第8回 Chem-Bio Joint Seminar 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下忠紘, 松下一郎, 須藤亮
2. 発表標題 細胞培養面の曲率を操作可能なマイクロデバイスの開発
3. 学会等名 LIFE2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内翠, 渡邊應文, 須藤亮, 山下忠紘
2. 発表標題 曲面上に存在する組織の張力計測手法の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁科拓哉, 松下一郎, 須藤亮, 山下忠紘
2. 発表標題 培養面の動的な曲率変化に対する血管平滑筋細胞の配向応答の解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松澤諒介, 須藤亮, 奥田覚, 山下忠紘
2. 発表標題 マイクロ曲面上における細胞集団の形態変化のモデル化
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下忠紘
2. 発表標題 曲面上での血管平滑筋細胞の振る舞いを解析するマイクロデバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下忠紘
2. 発表標題 人力オートメーション -N氏の奮闘に見る細胞実験自動化の谷-
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2021 チュートリアル・ワークショップ ラボラトリーオートメーション月例勉強会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ryosuke Matsuzawa, Midori Takeuchi, Takuya Nishina, Tadahiro Yamashita	4. 発行年 2021年
2. 出版社 RSC Publishing	5. 総ページ数 -
3. 書名 Material-based Mechanobiology, Curvature Mechanobiology	

〔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

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		
ドイツ	University of Wuerzburg		