

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22960

研究課題名（和文）力学刺激を用いた細胞核内DNA分散誘導による細胞機能制御

研究課題名（英文）Cell function control utilizing intranuclear dispersion of DNA induced with mechanical stimulation

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）：細胞核に変形を加え核内DNA分布を変化させることで細胞機能を制御することを目指した。深さ35μm、幅10μm程度の細溝を有するPDMS製弾性基板を作製、この基板を引張って溝を広げた状態で培養骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を落とし込み、元に戻すことで核を細胞質ごと15-20%圧縮した。1回の圧縮ではDNA凝集塊の個数や体積に変化は見られなかったが、5回では凝集塊の総体積は減少、個数は増加する場合と減少する場合があった。凝集塊の総体積は圧縮刺激を受けると減少すること、凝集塊の個数は、分裂して増加する場合、計測限界以下の大きさになり減少する場合などが考えられ、変化は単純ではないことが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞核を圧縮することでクロマチン凝集体の総体積が減少することは判っていたが、17%の1回の圧縮では変化しないが、それより小さい15%であっても5回の圧縮で減少する、即ち、圧縮量だけでなく、回数も重要であることが判った点が第1の成果である。また従来、凝集体の個数も減少するものと思われてきたが、場合によって増える場合もあることが分かり、圧縮により大きな凝集体が複数の小さな凝集体に分裂する可能性、小さな凝集体が分裂して計測限界以下の大きさになる可能性が考えられることが判った点が第2の成果と言える。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to control cell function utilizing intranuclear dispersion of DNA induced with mechanical deformation of the nucleus. We fabricated a PDMS substrate having a narrow groove with a depth of 35 μm and a width of about 10 μm, and stretched it to widen the groove to make cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1) into the groove. The substrate was then released to compress cell nuclei along with the cytoplasm by 15-20%. No change was observed in the number or volume of DNA aggregates in one compression, but the total volume of the aggregates decreased when they are compressed five times. The number of the aggregates increased or decreased depending on the sample. The total volume of aggregates may decrease when the nuclei receive enough amount of compression stimulus. With regard to their number, the change was not simple for it may increase when the aggregates split and may decrease when the split volume become below the measurement limit.

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞核内の DNA の物理的な分布の違いが、細胞の機能発現に影響を与え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やタンパク合成は殆ど行わず、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』に変化し、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 重らせんがほどけ、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 重らせんが緩みやすいため 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、刺激後の変化を観察できる力学刺激系の確立を目標とした。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かを調べることを第 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：

対象には、主にラット胸大動脈壁から単離した平滑筋細胞を使用する。この細胞は単離当初は収縮型であり、DNA は細胞核膜近傍に集中しているが、増殖因子の入った培地中で 1 週間ほど培養すると、合成型に変化し、DNA が核内に分散するとともに、盛んに増殖するようになる。そして収縮能は失われる。そこで収縮型細胞の核に力学刺激を加えることで、核内の DNA の分散が促進し、通常の培養環境よりも早く合成型に到達するかどうか検討する。また、未分化な細胞の例として、マウスやラット骨髄から採取した間葉系幹細胞を用い、この細胞に対する力学刺激の影響を調べる。

1) 顕微鏡下観察型刺激負荷装置の試作と評価： 以前試みたマイクロ流路による変形負荷では大量の細胞を処理できるが、変形負荷中の核内 DNA の動態が判らない。そこで、変形中の核内の変化を観察できるよう圧縮型の装置を試作する。微細加工技術で作製した深さ 30 μm 、幅 10 μm 程度の溝を有するシリコンゴム製の弾性基板である。この基板を培養液中で両側に引張り、溝を 20 μm 程度に拡げた状態で DNA を蛍光染色した細胞を散布し、溝に細胞を落とし込む。その後、弾性基板の引張を開放して基板の弾性復元力で細胞を圧縮する。基板の引張・除荷を繰り返すことで細胞核に繰返圧縮を加える。また、基板をせん断変形させることにより、細胞核にせん断変形を加えることも可能である。このような力学負荷の間、DNA 分布の変化を経時観察できる系を構築する。平滑筋細胞、骨髄由来細胞の大きさに応じて、適切な力学刺激が加えられるように溝幅を何通りか変えたものを試作する。

2) 力学刺激を加えた細胞の機能評価 I： まず、平滑筋細胞について検討する。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、平滑筋収縮薬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) 力学刺激を加えた細胞の機能評価 II： 未分化な細胞の例として骨髄由来間葉系幹細胞について同様の力学負荷を行う。力学刺激により DNA の分散が促進され、遺伝子の発現の物理的制限がなくなることで細胞が未分化な方向に進む可能性が考えられる。そこで、細胞初期化マーカーである Oct-4 や alkaline phosphatase 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，実験装置を試作し，その性能を評価し，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，顕微鏡下観察型刺激負荷装置の試作と評価を行った．具体的にはフォトリソグラフィで作製した細溝を有するシリコンゴム製の弾性基板を細胞線返引張負荷用のシリコンチャンバの底面に貼り付けたものである．細溝は約 50 μm 間隔とし，深さ 35 μm 以上，幅は 7.5, 10, 15 μm の 3 条件で作製した．溝を作るための型は高さ 35 μm 以上，幅 7.5~15 μm の壁が基板の上に平行に何列も並んだ物になるが，そのままでは壁が倒れてしまうために，壁と壁の間を高さ壁と同じで幅 10 μm の補強壁で 150 μm おきに繋ぐことにした．試作した基板のマクロな引張量と溝幅の変化量の関係を調べた．何れの条件でもチャンバを 1.8 倍に伸ばしたときに，溝幅は 3 倍程度まで拡がり，最小溝幅の 7.5 μm でも使用する細胞 (MC3T3-E1) の平均直径 20 μm より幅を大きくすることができ，細胞を落とし込むことができた．なお，細胞が溝に落ち込む割合を増やすため，基板表面を 2% BSA でコートして細胞の基板接着を抑制することが有効であった．

次に試作した顕微鏡下観察型刺激負荷装置を用いて細胞核の圧縮試験を行った．本装置でマウス頭頂骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を圧縮した．核を 1 回しか圧縮しない場合は，圧縮量が 17% であっても核内の DNA 凝集塊の個数にも体積分布にも顕著な変化は見られなかった．一方，5 回圧縮した場合は，圧縮量が 15%，30% の時，いずれも凝集塊の体積は小さくなり，凝集塊の個数は増加する場合と減少する場合があった．これより，核内 DNA 凝集塊の総体積は十分大きな圧縮刺激を受けると減少すること，圧縮刺激の強度には変形の大きさよりも変形の回数の方が利いている可能性があること，凝集塊の個数は，分裂して増加する場合，合体して減少する場合，小さくなり計測不能となるため減少する場合などが考えられ，変化は単純ではないことなどが明らかとなった．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasatani Katsumi、Majima Tokifumi、Murase Kohei、Takeuchi Naoki、Matsumoto Takeo、Oshima Yasushi、Takai Shinro	4. 巻 87
2. 論文標題 Three-Dimensional Finite Analysis of the Optimal Alignment of the Tibial Implant in Unicompartmental Knee Arthroplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 60～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-202	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 -
1. 著者名 Maeda Eijiro、Kuroyanagi Kaname、Ando Yoriko、Matsumoto Takeo	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of Substrate Stiffness on Morphology and MMP 1 Gene Expression in Tenocytes Stimulated With Interleukin 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 150～159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Atsutaka、Hongu Jun-ichi、Matsumoto Takeo	4. 巻 69
2. 論文標題 Theoretical elastic tensile behavior of muscle fiber bundles in traumatic loading events	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Biomechanics	6. 最初と最後の頁 184～190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiomech.2019.07.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Junfeng、Sugita Shukei、Michiue Tatsuo、Tsuboi Takashi、Kitaguchi Tetsuya、Matsumoto Takeo	4. 巻 33
2. 論文標題 A novel FRET analysis method for tension dynamics in a single actin stress fiber: Application to MC3T3-E1 cells during movement on a substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biorheology	6. 最初と最後の頁 21～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17106/jbr.33.21	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 -

1. 著者名 松本健郎	4. 巻 272-2
2. 論文標題 細胞核への力学刺激と核内クロマチン分布	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ『ラミノパチーとはなにか』	6. 最初と最後の頁 147-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Matsumoto T, Hirooka C, Fan Y, Wang J, Mori N, Maeda E
2. 発表標題 Dependency of Nuclear Deformation of Smooth Muscle Cells on Tissue Stretch Direction May Explain Anisotropic Response of Aortic Wall to Hypertension
3. 学会等名 International Conference on Biomechanics and Medical Engineering Yuan-Cheng Fung 100th Birthday Celebration (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto T
2. 発表標題 Lamellar Unit and Biomechanics of Aortic Wall
3. 学会等名 The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本健郎
2. 発表標題 動脈壁の力学応答解明を目指したマルチスケール・バイオメカニクス
3. 学会等名 日本機械学会中四国支部・特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王軍鋒, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 無負荷培養に伴う家兔胸大動脈壁内平滑筋細胞核の形態変化の観察
3. 学会等名 日本機械学会第30回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森尚輝, 王軍鋒, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 刺激量・時間を変更可能な大規模細胞圧縮装置の試作
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fan Y, Wang J, Maeda E, Matsumoto T
2. 発表標題 Three-dimensional deformation and rotation of aortic smooth muscle nuclei in response to tissue stretch is dependent on the stretch direction
3. 学会等名 The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田脩真, 廣岡千鶴, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 マウス胸大動脈平滑筋細胞核の変形異方性 (高血圧に対する力学応答の異方性との関連)
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王軍鋒, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 培養家兔胸大動脈の中膜平滑筋細胞の核とアクチン形態に対する繰返引張負荷の影響
3. 学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学・バイオメカニクス研究室 http://bio.mech.nagoya-u.ac.jp/
--

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
研究分担者	前田 英次郎 (Maeda Eijiro) (20581614)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	

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
---------	---------