

機関番号：13903

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20680025

研究課題名 (和文) 細胞の力学応答機構解明を目指した細胞内残留応力場のその場計測手法の確立

研究課題名 (英文) Development of in situ measurement technique to evaluate the internal stress of intracellular structures

研究代表者

長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10359763

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料

キーワード：バイオメカニクス、生物・生体工学、メカノトランスダクション、細胞骨格、力学特性、細胞の力学応答

1. 研究計画の概要

本研究では、力や変形に対して細胞が能動的に機能を変化させるメカノトランスダクション機構の解明という観点から、まず、生理状態の細胞内部の細胞骨格や核に生じている引張・圧縮ひずみや、それぞれの細胞内構成要素の力学特性を計測し、細胞内部の残留応力・ひずみ分布を明らかにしていく。そして、基質に生じた力や変形が細胞内をどのように伝わり、どのようにして細胞の機能変化を引き起こすトリガーとして作用しているのか明らかにしていく。特に血管の収縮・弛緩を担っている血管平滑筋細胞を対象として、細胞の力学応答機構の解明を目指していく。

2. 研究の進捗状況

(1) 細胞骨格と核の残留ひずみ・力学特性解析

これまでに、アクチンストレスファイバ (SF) などの個々の細胞骨格を顕微鏡下で詳細に観察しながらレーザーで切断し、残留応力を解放させたときの変形挙動を計測できるシステムを構築した。これを用いて血管平滑筋細胞内の 1 本の SF の残留ひずみを計測したところ、細胞内の部位によって大きく異なり、20～60%の引張ひずみが生じていることが明らかとなってきた。また、2本のマイクロガラスニードルを用いた単離細胞の引張試験から、細胞内 SF のステイフネスを非侵襲的に求める手法を確立した。SFの平均ステイフネスが約0.7 nN/%であること、細胞の収縮活性化に伴い細胞焦点接着斑が成長しつつ SF 同士が融合して太くなり、SFのステイフネスが2倍以上も上昇することなどが明らかとなった。

次に、細胞内での核のひずみを求めるため、SFの張力を増加・減少させたときの、核の3次元形態と細胞内張力ベクトルの変化を詳細に計測した。その結果、生理状態の核にはSFの張力に起因する圧縮力が基質面に対して垂直方向に生じており、50%以上もの圧縮ひずみが生じていることが示唆された。

(2) 細胞骨格と核の機械的相互作用の調査

次のステップとして、SFの張力が、細胞内の核に直接伝わっているのかどうか調査した。すなわち、前述のレーザーシステムを用いて、個々のSFを切断して張力を解放したときの核および核内DNAの挙動を詳細に調べた。核の上を横切るSFを切断したところ、SFが収縮するとともに、SF直下の核が大きく移動・変形した。このとき核膜直下のDNAの分布・構造にも有意な変化が生じた。これらことから、SFと核膜との間には、かなり大きな機械的インタラクションが作用しており、SFの張力が直接的に核に伝わり、核内のDNA構造にも変化を与えるといった、新たなメカノトランスダクション機構の存在が実験的に示された。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

理由：血管平滑筋細胞を対象として、当初の目的であった生理状態の細胞骨格や核に生じている引張・圧縮ひずみ、それぞれの細胞内構成要素の力学特性を計測する手法をすでに確立することができた。また、これらの力学パラメータが細胞の収縮活性化に伴い、どの程度の範囲で変化するか定量的なデータも得られている。さらに、細胞骨格と核

との間にはかなり強固な機械的相互作用が働いており、細胞骨格に生じた力の変化が核に直接伝わり、核内の DNA 構造にも変化を与えうるといった新たなメカノトランスダクション機構についての知見を得ることができた。

4. 今後の研究の推進方策

現在、より生体内に近い力学環境を模擬した実験系の確立を進めている。すなわち、基質上に張り付いた細胞に巨視的な引張・圧縮変形を加えながら細胞骨格や核に加わる力の変化を捉えつつ、核内の DNA の構造・分布変化を詳細に観察・解析していく。特にこのような変形を受けたときに、核内の特定の DNA の転写活性がどのように変化していくかに注目し、細胞のメカノトランスダクション機構の理解を深めていく。

5. 代表的な研究成果

(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 8 件)

1. Nagayama K, Matsumoto T, Dynamic Change in Morphology and Traction Forces at Focal Adhesions in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells during Contraction. *Cellular and Molecular Bioengineering* (印刷中) 【査読有り】.
2. Nagayama K, Matsumoto T, Estimation of Single Stress Fiber Stiffness in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells under Relaxed and Contracted States: Its Relation to Dynamic Rearrangement of Stress Fibers. *Journal of Biomechanics* 43, 1443-1449 (2010) 【査読有り】.
3. Nagayama K, Morishima N, Matsumoto T Effects of three-dimensional culture and cyclic stretch stimulation on expression of contractile proteins in freshly isolated rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 4, 286-297 (2009) 【査読有り】.
4. Nagayama K, Matsumoto T, Contribution of Actin Filaments and Microtubules to Quasi-in situ Tensile Properties and Internal Force Balance of Cultured Smooth Muscle Cells on a Substrate. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 295, 1569-1578, (2008) 【査読有り】.

[学会発表] (計 3 5 件)

1. Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T, In situ observation of dynamic deformation of nucleus induced with laser nano-dissection of stress fibers: Mechanical interaction

between stress fibers and nucleus, International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities : 2011.01.24-26: Westin Awaji Island, Japan.

2. Nagayama K, Kimura Y, Matsumoto T, Strain waveform dependence of stress fiber reorientation in cyclically stretched osteoblast-like cells: Possible effects of viscoelastic compression of stress fibers during stretch cycle. The Sixth World Congress of Biomechanics : 2010.08.01-06: Singapore 【Invited speaker】.
3. 長山和亮, 浜田保弘, 松本健郎, 焦点接着部位への独立した力学刺激負荷を目指した磁気駆動式マイクロピラーデバイスの開発 第 49 回日本生体医工学会大会: 2010.06.25-27: 大阪 【依頼講演】
4. Nagayama K, Matsumoto T, Measurement of traction force at focal adhesions during macroscopic stretch of smooth muscle cells. BMES 2009 Annual Fall Meeting 2009 : 2009. 10. 07-10: Pittsburgh, USA.
5. Nagayama K, Kimura Y, Matsumoto T, Effects of cyclic stretch waveform and cell density on the cyclic stretch-induced stress fiber reorientation in osteoblast-like cells. The 4th Asian-Pacific Conference on Biomechanics : 2009.4.14-17: Christchurch, New Zealand.
6. Nagayama K, Matsumoto T, Contribution of Stress Fibers to Quasi-in situ Tensile Stiffness of Smooth Muscle Cells. 2008 BMES Annual Fall Meeting: 2008.10.02-04: St. Louis, USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 変形可能な微小構造体の製造方法

発明者: 長山和亮, 浜田保弘, 松本健郎

権利者: 国立大学法人名古屋工業大学

種類: 特許権

番号: 2010-003205

出願年月日: 2010 年 1 月 8 日

国内外の別: 国内