

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月16日現在

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞の力学応答機構の解明という観点から、生理状態の細胞内部の微細構造体に生じる力・ひずみと、それらの力学特性を定量化し、細胞内での力・ひずみの伝達機構の解明を目指した。アクチンストレスファイバや微小管などの細胞骨格に生じる引張り力・圧縮力のバランスによって、細胞の3次元形態や収縮力が精密に制御されていることが分かった。さらに、細胞骨格と細胞核が力学的に結合しており、基質に生じた力や変形が細胞骨格を介して核に直接伝わり、核内部のDNA構造に変化を与えうることが分かった。本研究によって、細胞に備わる新たな「力学刺激-生化学応答変換機構」の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to elucidate how forces applied to cells are transmitted through intracellular components. We found that cytoskeletal filaments, such as actin stress fibers (SFs) and microtubules, have crucial roles in maintaining whole cell mechanical properties, and they contribute to the intracellular force balance three dimensionally, which control the internal tension of cells and their three dimensional morphology. We also found that SFs firmly connected to nuclear membrane, and the internal force of SFs transmitted mechanically to the nuclear membrane. These direct force transmission may induce the conformation changes of intranuclear DNA. The results of this study will provide new prospects in cellular mechanotransduction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	18,300,000	5,490,000	23,790,000

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・生体材料学

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

1. 研究開始当初の背景

細胞は、与えられた力学環境の変化に応じ機能を変化させる。例えば、血管平滑筋細胞は、正常な力学環境下の血管壁内では収縮要素に富んだ「収縮型」と呼ばれる表現型を示し、その収縮能により血管径を適切に調節している。しかし、静的無負荷状態の培養環境に曝すと、細胞骨格や核などの構造を変化させるとともに、収縮機能を著しく低下させ、増殖能、物質合成に富んだ「合成型」細胞へ変化する。合成型細胞は、動脈硬化病変部位でも確認されており、生体器官の健全性維持という観点からも、力学的作用に基づく細胞機能の変化の詳細を明らかにすることが重要となってきた。すなわち、細胞がどのようにして外部の力やひずみの変化を捉え、細胞内に伝えて機能変化を引き起こすのかを明らかにすることが必要不可欠である。

最近では、焦点接着斑と呼ばれる細胞と基質との接着部位から、細胞骨格を介した細胞内の力学情報伝達機構などが提唱されており、細胞外基質に生じた応力やひずみが、細胞内に機械的に伝達されている可能性が指摘され始めている。しかし、これらの力学情報は定量的には明らかとされておらず、これらが細胞の機能調整を司る細胞核に対して、どのように伝達されて機能変化にまで反映されるのか全く明らかとなっていない。

2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、本研究では、生理状態の細胞内の細胞骨格や細胞核に生じる力・ひずみと、それらの力学特性を定量化する手法を確立し、細胞内の力・ひずみの伝達機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料：試料には、研究代表者が力学特性などのデータを多く蓄積するラットやブタの胸大動脈平滑筋細胞を適用した。

(2) 細胞骨格の力学的役割と力学特性の定量化：まず、現有する細胞用マイクロ引張試験装置を応用して、単一の血管平滑筋細胞の引張特性を計測した。収縮性の細胞骨格であるアクチンストレスファイバや、細胞分裂の制御などに関わる微小管などを対象とし、特定の細胞骨格を破壊する前後で細胞の力学特性の変化を精密に計測した。さらに細胞骨格の分布様態・本数を求め、それぞれの細胞骨格の力学特性を定量化した。

また、微細加工技術を利用して、直径・長さが数 μm の微細な柱が無数に並んだシリコンラバー製のマイクロピラー基板を作製した。この基板上で細胞を培養し、細胞接着部位でのピラーの変形から、個々の接着部位での張力ベクトルを算出し、細胞内の力・ひずみ分布を検討した。

(3) 細胞骨格や核の残留ひずみの定量化：ピコ秒のパルスレーザと顕微鏡に組み込み、細胞内のサブミクロンオーダーの微細構造物を詳細観察しながら切断可能なレーザアブレーション装置を構築した。これを用いて、1本1本の細胞骨格を切断し、その後の変形挙動から個々の細胞骨格に作用する残留ひずみを定量化した。また、細胞膜や細胞骨格を選択的に除去して、細胞核を単離し、単離前後の変形から、細胞核の生理的残留ひずみを算出した。

(4) 細胞骨格から核への力学情報伝達経路の解明：前述のレーザアブレーション装置を用いて、収縮性の細胞骨格であるストレスファイバを切断し、その張力を解放したときの細胞核の移動量・変形量を計測した。そして、ストレスファイバと細胞核の結合状態について検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞の引張特性・力学バランスに対するストレスファイバと微小管の役割：基質に張り付いた形状を保持しながら細胞の引張特性を計測する手法を確立した。生理的な変形範囲として、細胞に15%の引張りひずみを負荷・除荷するサイクル試験を実施して、張力-ひずみ関係を計測し、その傾きから細胞のスティフネス（かたさ）を算出した。1サイクル目の引張負荷・除荷では、細胞の張力-ひずみ関係が大きなヒステリシスループを描くのにに対し、2サイクル目以降で細胞の力学特性が安定化することが分かった（図1，雑誌論文3,12など）。ストレスファイバや微小管を選択的に破壊すると、細胞のスティフネスがそれぞれ70%、30%も減少した。また、それぞれの細胞骨格を破壊前後で、細胞の3次元形態や、収縮特性を精密計測した結果、細胞核の高さや細胞の収縮量が可逆的に変化することが分かった（図2）。

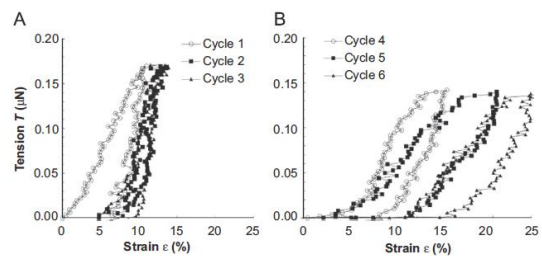


図1：未処理の血管平滑筋細胞の張力-ひずみ曲線

(A). 収縮性の細胞骨格であるストレスファイバを破壊した細胞から得た張力-ひずみ曲線 (B). ストレスファイバを破壊すると曲線の傾き（細胞の引張かたさに相当）が減少し、引張負荷・除荷過程で大きなヒステリシスループを描くようになる。

以上のように細胞骨格であるアクチンストレスファイバが張力を負担し、ちょうどテ

ントのロープのような状態で細胞の形態や機械的特性を安定化していること、一方、微小管はストレスファイバの張力に抵抗する圧縮部材として働いていることを明らかにした。また、これらの細胞骨格による力のバランスの変化によって、細胞の機械的特性や収縮力、細胞核付近の3次元形態が可逆的に変化することを、初めて実験的に明らかにすることができた。

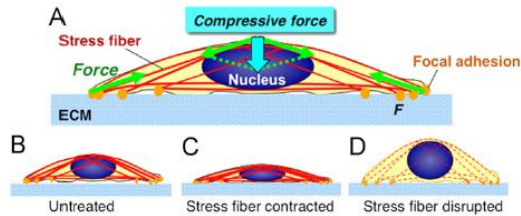


図2：細胞の力学モデル。生理状態の細胞内ではストレスファイバの張力によって細胞核が圧縮力を受けている。

(2) ストレスファイバの力学特性と生理的ひずみの定量化：前述の単一細胞の引張試験の手法を応用し、ストレスファイバを破壊前後の細胞のスティフネスを求めた。これと併せて細胞内のストレスファイバの本数を精密計測して、スティフネス値の差をこれで除すことで、1本のストレスファイバのかたさを求める手法を確立した。セロトニンなどの収縮薬によって活性化されると、血管平滑筋細胞内のストレスファイバ1本あたりの収縮力が約20nNから50nN以上に上昇し、ファイバのかたさも2倍以上増加することが明らかとなった(雑誌論文6, 10など)。また、収縮活性化環境では、ストレスファイバは単に張力を増加させるだけでなく、お互いに融合しつつ、その力の方向も均一化し、細胞全体の張力を細胞外に効率よく伝達している可能性が示唆された。

また、前述のレーザーアブレーション装置を用いてストレスファイバを切断した時の収縮量を計測することで、ファイバの生理的引張ひずみが20%程度であること、細胞の上側と下側(基質側)では、ストレスファイバの収縮量が大きく異なることが分かった。

(3) ストレスファイバと細胞核の機械的結合と核内DNAへの影響の検討：レーザーアブレーション装置で、細胞内の1本のストレスファイバを切断し、その張力を解放した。細胞核の上を横切るストレスファイバを切断するとファイバが直ちに収縮し、その方向に核が移動しつつ、核膜が局所的に変形した(図3, 4, 雑誌論文3,4など)。核の上のストレスファイバの下には核膜のリンカータンパク質が分布しており、その直下にDNAが凝集していた(図5)。そして、このようなストレスファイバを切断するとDNAの凝集体が

消失した。以上から、細胞骨格と核膜が強固に結合し、細胞骨格の力の変化が核内DNAの分布にも大きな変化を与えることを世界で初めて示した。このような力学的な結合の存在は、細胞外に生じた力・変形が細胞骨格を介して、細胞の機能調整を司る細胞核に直接的に伝達されていることを示している。本研究によって、細胞に備わる新たな「力学刺激-生化学応答変換機構」の可能性が示されたとと言える。

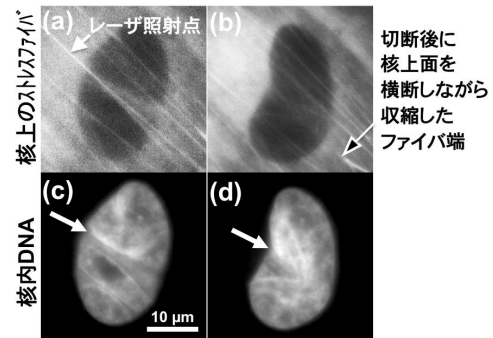


図3：レーザー切断前後のストレスファイバ(a, b)と核内DNA(c, d)の分布変化の様子。ストレスファイバと核内DNAをそれぞれGFPとHoechst33342で可視化した。核上のストレスファイバに沿ってDNAが線状に分布している様子が見られる(c矢印)。このようなストレスファイバをレーザー切断すると、ファイバは画像の右下方向に収縮し、その直下の核膜が引っ張られて顕著に変形した。内部のDNA分布も大きく変化の様子が見られた(d)。

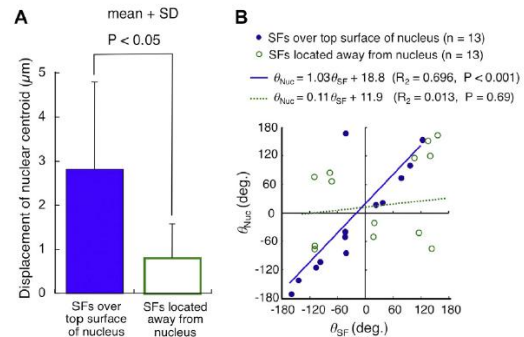


図4：ストレスファイバをレーザーで切断した後の核の移動量(A)、ファイバの収縮方向と核の移動方向との関係(B)。(青)核の上を横切るファイバを切断した場合。(白)核に接していないファイバを切断した場合。

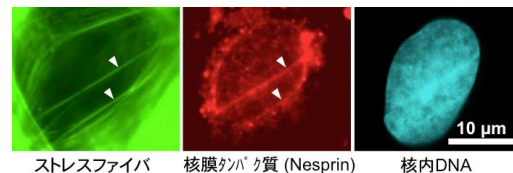


図5：血管平滑筋細胞内のストレスファイバ、核膜タンパク質、DNA：核の上のストレスファイバ(左)に沿って核膜タンパク質であるNesprinが線状に分布している(中)。DNAもこの線に沿って凝集している(右)。

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 17 件)

1. Nagayama K, Kimura Y, Makino N, Matsumoto T, Strain waveform dependence of stress fiber reorientation in cyclically stretched osteoblastic cells: Effects of viscoelastic compression of stress fibers, *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 302 (2012, in press) 【査読あり】
2. Nagayama K, Adachi A, Matsumoto T, Dynamic Changes of Traction Force at Focal Adhesions during Macroscopic Cell Stretching Using an Elastic Micropillar Substrate: Tensional homeostasis of aortic smooth muscle cells, *Journal of Biomechanical Science and Engineering* 7, 130-140, (2012) 【査読あり】
3. Matsumoto T, Nagayama K: Tensile properties of vascular smooth muscle cells: bridging vascular and cellular biomechanics, *Journal of Biomechanics* 45, 745-755 (2012) 【依頼総説, 査読あり】
4. Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T: Stress fibers stabilize the position of intranuclear DNA through mechanical connection with the nucleus in vascular smooth muscle cells, *FEBS Letters* 585-24, 3992-3997 (2011) 【査読あり】
5. Nagayama K, Adachi A, Matsumoto T: Heterogeneous Response of Traction Force at Focal Adhesions of Vascular Smooth Muscle Cells Subjected to Macroscopic Stretch on a Micropillar Substrate, *Journal of Biomechanics* 44, 2699-2705 (2011) 【査読あり】
6. 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* 4-3, 348-357 (2011) 【査読あり】
7. Miyasaka K, Kida Y, Banjo T, Ueki Y, Nagayama K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T: Heartbeat regulates cardiogenesis by suppressing retinoic acid signaling via expression of miR-143, *Mechanisms of Development* 128-1-2, 18-28 (2011) 【査読あり】
8. 長山和亮: 機械工学年鑑/4. バイオエンジニアリング/4.2.1 細胞のバイオメカニクス, 日本機械学会誌 106, 575 (2011) 【依頼総説, 分担執筆】
9. Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T: In situ observation of nuclear behavior during laser nano-dissection of actin stress fibers: mechanical interaction between actin stress fibers and nucleus, *Proceedings of the ASME 2011 Summer Bioengineering Conference, SBC2011-53264.pdf* (in CD-ROM) (2011) 【発表採否査読あり】
10. 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) 【査読あり】
11. 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) 【査読あり】
12. Nagayama K and 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) 【査読あり】

(その他 5 件)

[学会発表] (計 53 件)

1. 長山和亮, ストレスファイバと細胞核の機械的結合による核内DNA安定化の可能性, 第24回バイオエンジニアリング講演会: 2012.1.7-8: 豊中.
2. Nagayama K, On the roles of actin stress fibers on mechanical stabilization of the nucleus and intracellular DNA, The 5th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology: 2011.11.4-8: Shanghai-Hangzhou, China. 【招待講演】
3. Nagayama K, Dynamic behavior of nucleus and intranuclear DNA induced with laser nano-dissection of stress fibers in vascular smooth muscle cells, 日本生物物理学会第49回年会: 2011.9.16-18: 姫路.
4. Nagayama K, In situ observation of nuclear behavior during laser nano-dissection of actin stress fibers: Mechanical interaction between actin stress fibers and nucleus, ASME 2011 Summer Bioengineering Conference : 2011.06.22-25: Farmington, PA, USA.
5. 長山和亮, 細胞の力学応答解析ツールとしての磁気駆動式マイクロピラーデバイスの開発, 日本AEM学会第23回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム: 2011.5.18-20: 名古屋.
6. 長山和亮, アクチンストレスファイバのレーザー切断に伴う細胞核の変形挙動観察, 第50回日本生体医工学会大会: 2011.4.29-5.1: 東京.
7. 長山和亮, 血管平滑筋細胞内のアクチンストレスファイバと核の機械的相互作用に関する研究, 第20回ライフサポート学会フロンティア講演会: 2011.03.05: 東京.
8. Nagayama K, 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.

9. 長山和亮, 磁気駆動式マイクロピラーデバイスを用いた細胞焦点接着部位への力学刺激負荷, □第 23 回バイオエンジニアリング講演会: 2011.01.08-09: 熊本
10. 長山和亮, 培養血管平滑筋細胞の巨視的引張負荷・除荷に伴う細胞内張力変化のその場計測, 日本機械学会2010年度年次大会: 2010.09.06-08: 名古屋
11. Nagayama K, 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. 【招待講演】
12. 長山和亮, 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】
13. 長山和亮, 血管平滑筋細胞内ストレスファイバの配向ならびに張力の再現性に関する研究, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会: 2010.01.09-10: 岡山
14. Nagayama K, 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.
15. 長山和亮, 血管平滑筋細胞収縮に伴う焦点接着部位での張力変化と接着斑のダイナミクス, 日本機械学会 2009 年度年次大会: 2009. 09. 14-16: 岩手
16. Nagayama K, Measurement of traction force at focal adhesions of smooth muscle cells on microfabricated substrate during macroscopic stretching, The Third Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics: 2009. 09. 01-04: Engelberg, Switzerland.
17. 長山和亮, 血管平滑筋細胞の収縮活性化過程における焦点接着斑の動的挙動観察, 第 48 回日本生体医工学会大会: 2009.4.23-25: 東京
18. Nagayama K, 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.
19. 長山和亮, 細胞の巨視的引張りに伴う焦点接着部位での張力変化の計測, 日本機械学会 第 21 回バイオエンジニアリング講演会: 2009.01.23-24: 札幌
20. Nagayama K, 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.
21. 長山和亮, 力学的刺激による細胞機能制御の試み: 繰返引張刺激ならびに基板弾性率の違いが細胞形態および分化へ与える影響, 第 6 回生活支援工学系学会連合大会: 2008.09.17-19: 札幌
22. 長山和亮, 繰返引張刺激皮成分骨芽細胞様細胞内ストレスファイバの再構築方向に及ぼす影響,

第 47 回 日本生体医工学会大会: 2008.05.08-10:
神戸国際会議場.
(その他 31 件)

〔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: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2010-003205
出願年月日: 2010 年 1 月 8 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://biomech.web.nitech.ac.jp/top.html>
http://researcher.nitech.ac.jp/html/307_ja.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし