

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03804

研究課題名（和文）細胞骨格と核の「繋がり」に基づく細胞の恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Investigation on the homeostasis mechanism of cells based on the nucleus-cytoskeleton connections

研究代表者

長山 和亮（Nagayama, Kazuaki）

茨城大学・応用理工学野・教授

研究者番号：10359763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：血管平滑筋細胞の恒常性維持機構を明らかにすべく、培養平滑筋細胞を配列・組織化して収縮型へと分化誘導する手法、原子間力顕微鏡で細胞内張力や核の硬さを詳細解析する手法を開発した。さらに、動脈拍動を考慮した伸展刺激を負荷して細胞応答を解析する技術確立した。平滑筋分化が促進すると核膜が硬化し、アクチン細胞骨格と核をつなぐリンカー分子が減少する一方で、中間径フィラメントが核を保持することを見出し、正常な分化型平滑筋では核への過剰な力の伝達が抑制されていることが示唆された。一方で、平滑筋の脱分化が進むと核が軟化して変形しやすくなり、伸展刺激下でのYAPの核内移行などが促進される可能性が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題研究で得られた成果は、細胞外の力が細胞骨格を伝わって、遺伝子を保存する核に伝達されることを実験的に証明した研究である。そして、細胞骨格と核の繋がり、細胞の分化過程で大きく変化することを明らかにし、この繋がりによって細胞への物理的的刺激による遺伝子発現感度が決定される可能性を示したものである。今後、それぞれの細胞骨格分子と核をつなぐリンカー分子の選択的操作による創薬技術への展開などが期待できる。また、開発したコラーゲン製の微細溝基質は、血管平滑筋細胞に限らず様々な細胞を用いた人工組織形成用の基材として実用可能性が大きい技術である。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of vascular smooth muscle cell (VSMC) homeostasis, we developed a novel micro-grooved collagen substrate to control cell orientation similar to that in aortic walls, and found that the contractile differentiation of VSMCs were significantly facilitated on this substrate. We also investigated the internal tension of actin stress fibers and the mechanical properties of the nucleus in VSMCs using atomic force microscopy, and found that nuclear stiffening and the loss of nuclear-cytoskeletal connection may be important factors not only in the maintenance of the VSMC contractile phenotype but also in the protection of biomechanical and physiological integrity of the cell nucleus from external mechanical disturbances.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞バイオメカニクス メカノバイオロジー 細胞核 細胞骨格 DNA

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、生化学因子の変化だけでなく周囲の力学環境の変化に応じて増殖性や物質産生などの機能を調整し、分化までも変化させる。例えば、血管平滑筋細胞は、正常な力学環境（常に拍動による伸展刺激を受けている）の動脈壁内では収縮要素に富んだ「収縮型」細胞であり、その収縮能により血管径を正常に調節している。しかし、静的無負荷状態に曝すと、細胞骨格や核の形が大きく変化して収縮機能を著しく低下させ、増殖・物質合成に富む「合成型」細胞へ脱分化する。合成型細胞は、動脈硬化病変部でも確認されており、生体の健全性・恒常性維持という観点からも、細胞の力学応答機構を明らかにすることは、バイオメカニクスおよび生体医工学分野の最重要課題の1つである。

このような観点から研究代表者は、細胞内の細胞骨格と核の力学特性や、これらに生じる力を詳しく調べてきた。この過程で、収縮性のアクチン細胞骨格が核と強固に結合していることを世界に先駆けて見出した。このような、細胞骨格と核の「繋がり」は、様々な細胞の機能発現にも密接に関わっている可能性が高く、細胞骨格の力が核に伝わり、核内の mRNA の転写活性などにも影響を与える可能性が十分に考えられる。しかし、細胞骨格と核の繋がりが、細胞の生命活動にとってどのような生理学的・力学的役割をしているのか全く明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

以上の疑問を明らかにすべく、本研究では、細胞骨格と核の「繋がり」を精密に計測する手法と、核内外での生化学シグナルの変化を正確に捉える手法を確立し、細胞構造が大きく変化する分化・脱分化の過程で、これらの「繋がり」がどのように変化するか定量化し、細胞骨格と核の「繋がり」に基づく細胞の恒常性維持機構の理解を目指した。

### 3. 研究の方法

血管組織の生化学場と力学場を考慮した細胞培養系を構築し、細胞骨格と核の間の力の伝達を定量解析かつ操作する手法を確立する。次に、これらの力の伝達と細胞の収縮性・増殖性といった機能発現との関連性を明らかにして、力学的側面から血管平滑筋の機能維持・疾患発生メカニズムを明らかにすることを目指した。

具体的には、動脈内に豊富に存在するコラーゲンそのものを使った独自の微細溝基質を使って、培養平滑筋細胞を効率的に配列・組織化して収縮型へと分化誘導する手法を確立する。

さらに、血管拍動を模擬した伸展刺激を顕微鏡下で細胞に加えるシステムを開発し、細胞応答を詳しく解析する。加えて、原子間力顕微鏡で細胞張力や核の力学特性を精密に分析し、細胞骨格と核の繋がりを定量的に評価できる系を確立する。

### 4. 研究成果

血管組織中に豊富に存在するコラーゲンを使って、幅が約 5 μm, 凹凸が約 500 nm ほどの微細な溝を形成した基質を生成する独自の手法を編み出した (図 1)。従来の MEMS 技術を使った微細加工基板に比べ、細胞と基質との接着が強固であり、配列・組織化した平滑筋細胞を長期間安定して培養可能となった (図 1, 2)。

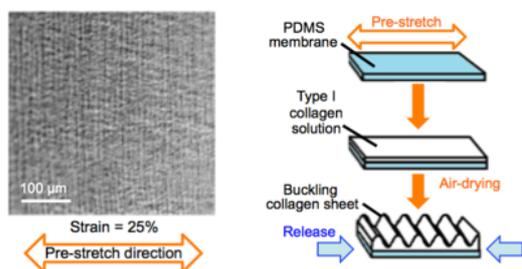


図1. 細胞を一樣に配列・組織化させるための微細な溝を持つコラーゲン基質(左)。コラーゲンマトリクスの座屈現象を利用して、MEMS などの高コストな特殊技術を必要とせず生成できる(右)<sup>1)</sup>。

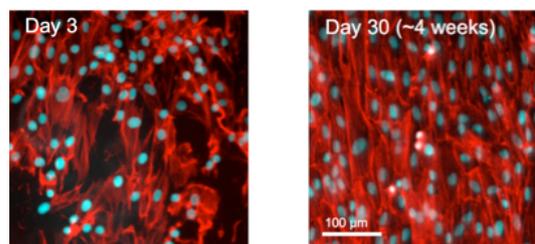


図2. 従来の MEMS 技術で作製した微細溝基板では、わずか3日ほどで細胞が剥がれ始めた(左)が、本研究で開発した微細溝コラーゲン基質上では4週間以上、配列が乱れることなく培養可能であることを確認している(右)<sup>1)</sup>。

この基質上で血管平滑筋細胞を培養すると細胞が配列・組織化し、脱分化した合成型平滑筋細胞の収縮タンパク質の発現を向上させ、in vivoに近い形態と機能を有した平滑筋細胞組織を構築できることを見出した (図 3)。また、顕微鏡ステージ上でこれらの配列細胞組織に任意の波形のストレッチを加えながら、共焦点顕微鏡で核と細胞骨格のダイナミクスを詳細に観察できる系を構築できた。この系を活用して調査を進めた結果、配列組織化が進んだ平滑筋細胞では、

収縮タンパク質の発現が向上すると共に、アクチン細胞骨格が細胞核から離れるように局在に変化させ（図4）、核膜とアクチンを繋ぐリンカー分子であるネスプリンの発現も有意に低下することが分かった。そして、細胞組織全体にストレッチを加えても核があまり変形せずに、力が伝わり難い細胞構造へと変化しているという興味深い知見が得られた。

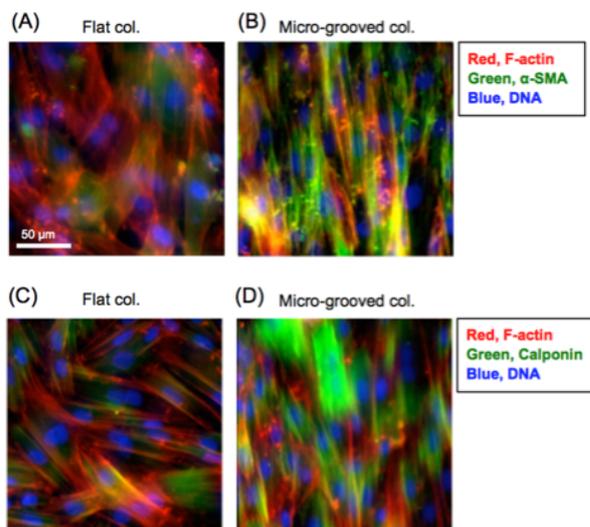


図3. 平坦なコラーゲン基質では平滑筋細胞の形状や向きは多様であり、収縮関連タンパク質である $\alpha$ SMAやcalponinの発現も低い(A, C)。我々の微細溝コラーゲン基質上で培養することで、配列した組織を形成するとともに、収縮関連タンパク質の発現が著しく向上した(B, D)。

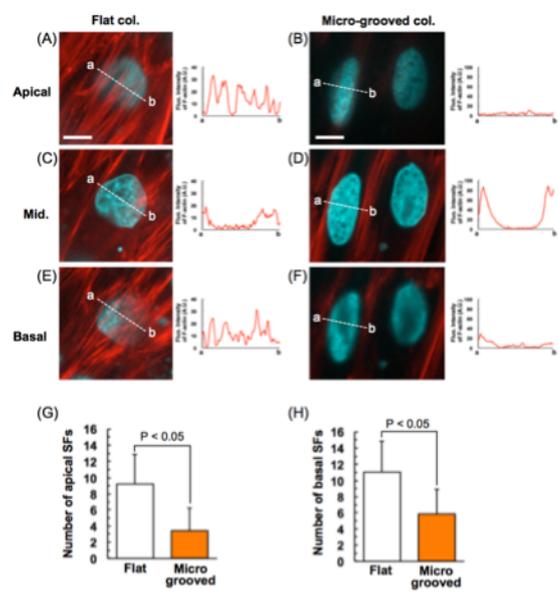


図4. 平坦なコラーゲン基質では平滑筋細胞の Apical 側と Basal 側に発達したアクチンストレスファイバが形成され、核が圧縮されている(A, E)。我々の微細溝コラーゲン基質上で培養すると、アクチンが核を側面から挟むように局在し、収縮関連タンパク質の発現が向上した(B, F)。Apical, Basal 側のアクチン本数も著しく減少した<sup>1)</sup>。

また、原子間力顕微鏡による高速押込走査モードを活用し、細胞の個々のアクチンストレスファイバの張力状態や核周辺の力学特性を詳細に分析した。配列組織化を促進させて、分化誘導させた平滑筋細胞の張力状態を詳しく調べたところ、細胞核周りのストレスファイバの張力が大幅に低下して、核に加わる圧縮力が減少するといった新たな知見が得られ（図5）、これが平滑筋分化に密接に関与している可能性を得た。

さらに、低血清環境で培養することで、平滑筋分化をより促進させると、アクチンが核から外れるだけでなく、中間径フィラメントが核を保持するように、核周辺に局在を変化させることを発見した。

すなわち、正常な分化型平滑筋では核への過剰な力の伝達が抑制されていることが示唆された。一方で、平滑筋の脱分化が進むと核が軟化して変形しやすくなり、伸展刺激下での YAP の核内移行などが促進される可能性が得られた。

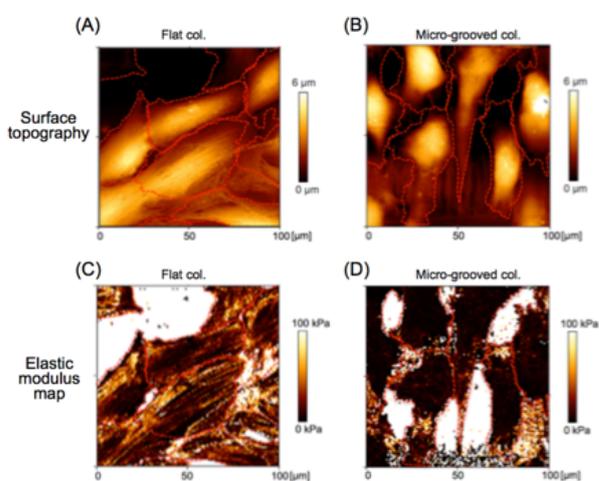


図5. 平坦なコラーゲン基質上の細胞表面には発達したアクチンストレスファイバが形成され、その部分は硬く、張力が高い(A, C)。微細溝コラーゲン基質上で培養して配列組織化させると、そのような硬いファイバが見られなくなり、細胞張力が著しく低下していることが分かった(B, D)。  
※C, D の白い部分が硬く張力が高い部位

<引用文献>

1) Nagayama K: A loss of nuclear–cytoskeletal interactions in vascular smooth muscle cell differentiation induced by a micro-grooved collagen substrate enabling the modeling of an in vivo cell arrangement, Bioengineering 8(9), 124, 2021.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yamashiro Yoshito, Ramirez Karina, Nagayama Kazuaki, Hattori Naoko, Liu Yu-Yu, Matsunaga Shinji, Tomita Shuhei, Kubota Yoshiaki, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 cvac190
2. 論文標題 Partial endothelial-to-mesenchymal transition mediated by HIF-induced CD45 in neointima formation upon carotid artery ligation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvac190	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 Katsuta Hiroki, Okuda Satoru, Nagayama Kazuaki, Machiyama Hiroaki, Kidoaki Satoru, Kato Masashi, Sokabe Masahiro, Miyata Takaki, Hirata Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Actin crosslinking by $\alpha$ -actinin averts viscous dissipation of myosin force transmission in stress fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106090~106090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106090	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 Nagayama Kazuaki, Kodama Fumiki, Wataya Naoki, Sato Akiko, Matsumoto Takeo	4. 巻 138
2. 論文標題 Changes in the intra- and extra-mechanical environment of the nucleus in Saos-2 osteoblastic cells during bone differentiation process: Nuclear shrinkage and stiffening in cell differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 105630~105630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2022.105630	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 綿谷直樹、長山和亮	4. 巻 89
2. 論文標題 マイクロ溝凹部での力学的拘束による血管平滑筋細胞の配列組織化と分化誘導	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本機械学会論文集	6. 最初と最後の頁 23~00004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/transjsme.23-00004	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 Sugita Shukei, Hozaki Masatoshi, Matsui Tsubasa S., Nagayama Kazuaki, Deguchi Shinji, Nakamura Masanori	4. 巻 620
2. 論文標題 Polarized light retardation analysis allows for the evaluation of tension in individual stress fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 49 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.06.066	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 Nagayama Kazuaki, Hanzawa Tatsuya	4. 巻 33
2. 論文標題 Cell type-specific orientation and migration responses for a microgrooved surface with shallow grooves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 393 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-211356	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 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Isozumi Noriyoshi, Kiriya Takao, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 C9orf72-Derived Proline:Arginine Poly-Dipeptides Modulate Cytoskeleton and Mechanical Stress Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.750829	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 Nagayama Kazuaki	4. 巻 8
2. 論文標題 A Loss of Nuclear-Cytoskeletal Interactions in Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation Induced by a Micro-Grooved Collagen Substrate Enabling the Modeling of an In Vivo Cell Arrangement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 124 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering8090124	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 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Isozumi Noriyoshi, Kiriya Takao, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 C9orf72-Derived Proline:Arginine Poly-Dipeptides Modulate Cytoskeleton and Mechanical Stress Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.750829	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 上杉 薫、佐藤 賢也、長山 和亮	4. 巻 21
2. 論文標題 細胞への静水圧刺激負荷による紫外線誘導DNA 損傷の抑制効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験力学	6. 最初と最後の頁 208~214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11395/jjsem.21.208	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 Uesugi Kaoru, Nagayama Kazuaki, Hirose Euichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Keeping a Clean Surface under Water: Nanoscale Nipple Array Decreases Surface Adsorption and Adhesion Forces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 81~81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jmse10010081	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15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 長山和亮
2. 発表標題 レーザーアブレーション法を用いた細胞の損傷回復機構の解析
3. 学会等名 2023年度精密工学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長山和亮
2. 発表標題 微細溝基板を用いた動脈内力学環境の再現と細胞収縮機能の向上
3. 学会等名 2023年度精密工学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野真太, 長山和亮
2. 発表標題 原子間力顕微鏡組込型の引張試験機の開発と力に対する細胞の張力変化の解析
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋未来, 長山和亮
2. 発表標題 機械学習を用いた無染色位相差顕微鏡画像からの細胞核抽出と評価
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuaki Nagayama
2. 発表標題 Biomechanical Approaches for Investigating the Roles of Actin-Nucleus Interactions in Vascular Cell Functions,
3. 学会等名 4th International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (Mechano-X BIO&CHEM 2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 綿谷直樹, 長山和亮
2. 発表標題 微細溝凹部での細胞の力学的拘束が血管平滑筋細胞の核形態と分化に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuaki Nagayama
2. 発表標題 The Roles of Nuclear-cytoskeletal Interactions in Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (WCB2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長山和亮
2. 発表標題 細胞の力学応答・修復におけるアクチン細胞骨格の役割
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 綿谷直樹, 上杉薫, 長山和亮
2. 発表標題 マイクロ溝基板を用いた細胞の形態制御と細胞内部構造の3次元解析
3. 学会等名 日本機械学会 2022年度茨城講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長山和亮
2. 発表標題 細胞の機能調整における核と細胞骨格の繋がり役割
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（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿谷直樹，長山和亮
2. 発表標題 微細溝コラーゲン基質上で配列化培養した血管平滑筋細胞への繰返伸展刺激負荷
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 綿谷直樹，長山和亮
2. 発表標題 血管壁の力学的・生化学的環境を考慮した細胞培養実験系の確立
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度茨城講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田圭吾，長山和亮
2. 発表標題 細胞の力学応答解析のための顕微鏡下伸展刺激負荷システムの開発
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度茨城講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長山和亮
2. 発表標題 血管平滑筋細胞の脱分化・老化に伴うアクチン細胞骨格の張力挙動変化
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上杉薫, 小幡祥太, 長山和亮
2. 発表標題 顕微鏡下マイクロ引張試験機による単一細胞の機械的特性・及び接着力の同時評価 ~微小管重合阻害した子宮頸癌由来HeLa細胞の力学的特性変化~
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

茨城大学 研究者情報 長山和亮 <a href="https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html">https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html</a> 茨城大学 マイクロ・ナノバイオメカニクス研究室ホームページ 研究業績 <a href="http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/achievements.html">http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/achievements.html</a> 茨城大学 研究者情報 長山和亮 <a href="https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html">https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html</a> 茨城大学 マイクロ・ナノバイオメカニクス研究室ホームページ 研究業績 <a href="http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/achievements.html">http://biomech.mechsys.ibaraki.ac.jp/achievements.html</a>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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	上杉 薫 (Uesugi Kaoru)  (20737027)	茨城大学・理工学研究科(工学野)・助教  (12101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山城 義人  (Yamashiro Yoshito)  (70751923)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長    (84404)	

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