

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25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22240056
 研究課題名(和文) 医工学的解析に基づく生体機械受容システムの分子的基盤と生理学的意義の解明
 研究課題名(英文) Elucidation of Biological Adaptation and Remodeling Mechanisms to Mechanical Stress Based on the Development of Novel Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS) technology
 研究代表者
 成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：40252233

研究成果の概要(和文)：生体内では至るところで、重力・伸展や剪断応力といった物理的な機械刺激が生じている。細胞の機械受容システムを介して伝達されるこのような刺激は、単に生体にとって不利益なストレスではなく、発生過程や臓器機能発現に不可欠な生体情報であることが次第に明らかになってきた。本研究では、独自のメカニカルストレス負荷システムおよび評価系の開発を通して生体での機械受容環境を再現し、生体の巧みなメカニカルストレス応答機構を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：Physical and mechanical stimuli such as gravity, extension, and shearing stress are generated throughout a living body. It has been gradually revealed that these stimuli, which are transmitted via the mechanotransduction mechanisms of cells, are not simply detrimental stresses for living organisms, but rather are biological information essential to developmental processes and functional adaptation of organs. In this project, on the basis of the development of original loading systems for mechanical stress to cells and tissues, the cellular adaptive responses to the mechanical stimuli and their transduction mechanisms in a variety of mechanosensitive tissues are to be examined. Thus, the project aims to elucidate the molecular mechanisms and roles of mechanotransduction system, which is utilized as a basis of many physiological events. It can also contribute to develop therapeutic approach to cancer invasion, cardiac hypertrophy, and regeneration of neuronal circuit.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2011年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2012年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
総計	38,900,000	11,670,000	50,570,000

研究分野：人間医工学

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：メカノセンサー、機械受容システム、メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、生物において、メカニカルストレスは有用な生理情報であることが知られている。研究開始当初の段階では、生体の機械受容システムの分子的基盤が不明であったために、強力な分子生物学的手法を用いたトランスレーショナルリサーチへと展開出来ず、生体の機械受容システムの生理的意義や病態発症における役割は不明なままであった。

細胞の機械受容応答を解析するためには、生体の複雑なメカニカルストレスを再現できる *in vitro* 実験系を確立しなければならない。我々はこれまでに、細胞への機械負荷装置を独自に開発しており、伸展培養により生じる細胞形態や分子活性の応答解析、および細胞内 Ca^{2+} イメージング解析を可能としていた。また、我々は MEMS 技術を駆使したマイクロコンタクトプリント法を用いた細胞形態・接着班や細胞間連絡の制御法を開発し、単一細胞の伸展培養も可能としていた。この装置を使うことで、細胞の機械受容応答を詳細に解析することが可能となっていた。我々は、これまでに、研究のニーズにあった生体内環境を再現する機械負荷システムを開発してきた経験を有しており、生体の機械受容システムを解明するメカノフィジオロジー研究にはこのような医工学的アプローチが必須であるという考えは変わらない。

生体の機械受容システムの実体解明の中核をなすのは、メカノセンサー分子の同定である。我々は、上述したように、伸展刺激負荷システムを開発している。これを利用して、

機械受容チャネル候補遺伝子を導入した細胞でのみ、選択的に細胞外から Ca^{2+} が流入することを証明する実験的検証を重ねてきた。その結果として、あるチャネル分子に機械刺激に対する特異的な反応が見られることを証明した。この機械受容チャネルは、恒常的に機械刺激を受ける肺や、血管内皮細胞、神経の成長円錐にも広く発現しており、生体の役割は想像以上に大きく多岐にわたると考えている。本研究開始当初に、遺伝子改変マウスを完成したばかりであり、生体メカノセンサーの生理的、病態生理的機能を解析することが可能となった段階であった。

2. 研究の目的

生体の機械受容システムを解明するためには、機械受容チャネル分子をターゲットとした分子細胞生理学的解析と、その遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの生理学的評価が不可欠である。これらの解析は、体の各所で負荷されるメカニカルストレスを再現する実験装置の開発と、適切な生体機能評価システムの確立を克服してこそ可能となる。本研究では、オリジナルな研究対象である機械受容分子とその分子ツールおよび遺伝子改変マウスを保有しているというアドバンテージを生かし、分子・細胞・生体を網羅したマルチレベル医工学的解析を可能とする装置や評価系の開発を行い、得られた結果をマイクロとマクロをフィードバックしながらトランスレーショナルリサーチを展開することを通して、生体の機械受容システムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

これまでの我々の研究によって、本研究のターゲット分子であるメカノセンサー分子は、体の各所に広く発現していることが明らかとなってきた。これらの各組織において、生理的レベルの機械刺激、また病態発症を引き起こすようなレベルの機械刺激負荷に対する細胞応答に、このメカノセンサー分子がどのように関わっているかを分子レベルで解析する。そのツールとして、メカノセンサー分子をターゲットとして作成した遺伝子改変マウスを利用する。さらに、これらの解析には、医工学器機を用いた生理機能測定が欠かせないため、必要に応じてマウス用に小型化した計測器機を開発・使用するなど、独自の医工学的解析法を駆使する。

また、生体の機械受容システムの分子的基盤を得るためには、メカノセンサー分子複合体の実体解明が不可欠であるが、一定の時間を要することが想像されるため初年度よりとりかかるとは。得られた結果を細胞レベルの再構築実験に持ち込み、機械受容機能を創発するための分子部品とその仕組みを分子レベルで解明する。

4. 研究成果

(1) 生体の機械受容システムの生理学的重要性と病態生理学的意義の解明

既に作成済みのメカノセンサー分子をターゲットとした遺伝子改変マウスの表現型を詳細に解析した。この結果、様々な生理応答の変化、生理的なレベルを超えた負荷に対する応答などが、正常マウスを大きく異なっていた。これらの理由は、細胞外からのメカニカルストレスを受容するメカノセンサーを介した細胞内シグナル伝達系の変化であることが明らかとなってきた。また、生体のメカノセンサー分子がうまく働かないことで、負荷に対する応答のみならず、細胞や組織の成熟・

分化にも影響があることが明らかとなってきた。これらの研究成果は、現在論文執筆中である。

(2) 遺伝子改変マウスの生理機能解析を進める上で欠かすことの出来ない医工学器機の開発および小型動物（マウス用）への最適化を図った。このことで、特にマウスの循環動態解析や、筋機能解析、機械刺激応答解析が定量的実験として解析することが可能となった。

(3) 生体の機械受容システムの分子基盤の解明

これまでの再構築実験において、生体の機械受容チャンネルは1分子ではその機能を十分に発揮できないことから、形質膜上では周囲の分子複合体と協調して機能していることが予想された。我々は、生化学的に機械受容チャンネルを中心とした分子複合体の解明をおこなった。この結果、いくつかの結合分子が明らかになった。このことから、細胞系での機能実験をおこなうことが可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- (1) Hata M, Naruse K, Ozawa S, Kobayashi Y, Nakamura N, Kojima N, Omi M, Katanosaka Y, Nishikawa T, Naruse K, Tanaka Y, Matsubara T. Mechanical stretch increases the proliferation while inhibiting the osteogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Tissue. Eng. Part. A.*, 2013, 19; 625-633. (査読有)
- (2) Shibata AC, Chen LH, Nagai R, Ishidate F, Chadda R, Miwa Y, Naruse K, Shirai YM, Fujiwara TK, Kusumi A. Rac1 recruitment to the archipelago structure of the focal adhesion through the fluid membrane as revealed by single-molecule analysis. *Cytoskeleton.*, 2013 70;161-177. (査読有)
- (3) Hara T, Matsuura K, Kodama T, Sato K, Kikkawa Y, Muneto T, Tanaka J, Naruse K.

- A tilting embryo culture system increases the number of high-grade human blastocysts with high implantation competence. *Reprod. Biomed. Online.*, 2013, 26;260-8. (査読有)
- (4) Matsuura K, Asano Y, Yamada A, Naruse K, Sensors (Basel). Detection of Microcococcus luteus biofilm formation in microfluidic environments by pH measurement using an ion-sensitive field-effect transistor. *Sensors.*, 2013, 13;2484-2493. (査読有)
- (5) Takahashi K, Kakimoto Y, Toda K, Naruse K, Mechanobiology in cardiac physiology and diseases. *J. Cell. Mol. Med.*, 2013, 17;225-232. (査読有)
- (6) Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Hayano S, Balam TA, Naruse K, Yamashiro T. Ex vivo real-time observation of Ca²⁺ signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface. *Bone.*, 2013, 53;204-215. (査読有)
- (7) Shibata AC, Fujiwara TK, Chen L, Suzuki KG, Ishikawa Y, Nemoto YL, Miwa Y, Kalay Z, Chadda R, Naruse K, Kusumi A. Archipelago architecture of the focal adhesion: membrane molecules freely enter and exit from the focal adhesion zone. *Cytoskeleton.*, 2012, 69; 380-392. (査読有)
- (8) Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Kurosaka H, Naruse K, Yamashiro T. In situ imaging of the autonomous intracellular Ca²⁺ oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. *Bone.*, 2012, 50; 842-852. (査読有)
- (9) Matsuura K, Takenami M, Kuroda Y, Hyakutake T, Yanase S, Naruse K. Screening of sperm velocity by fluid mechanical characteristics of a cyclo-olefin polymer microfluidic sperm-sorting device. *Reprod. Biomed. Online.*, 2012, 24;109-115. (査読有)
- (10) Nagai Y, Yokoi H, Kaihara K, Naruse K. Biomaterials. The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel. 2012, 33;1044-51. (査読有)
- (11) Morioka M, Parameswaran H, Naruse K, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y, Suki B, Ito S. Microtubule dynamics regulate cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells. *PLoS One.* 2011, 6;e26384. doi: 10.1371/journal.pone.0026384. (査読有)
- (12) Iribe G, Jin H, Naruse K. Role of sarcolemmal BK(Ca) channels in stretch-induced extrasystoles in isolated chick hearts. *Circ. J.*, 2011, 75;2552-8. (査読有)
- (13) Takata N, Furumatsu T, Abe N, Naruse K, Ozaki T. Comparison between loose fragment chondrocytes and condyle fibrochondrocytes in cellular proliferation and redifferentiation. *J. Orthop. Sci.*, 2011, 16;589-597. (査読有)
- (14) Kubota R, Numaguchi Y, Ishii M, Niwa M, Okumura K, Naruse K, Murohara T. Ischemia-induced angiogenesis is impaired in aminopeptidase A deficient mice via down-regulation of HIF-1 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 402;396-401. (査読有)
- (15) Koike T, Matsuura K, Naruse K, Funahashi H. In-vitro culture with a tilting device in chemically defined media during meiotic maturation and early development improves the quality of blastocysts derived from in-vitro matured and fertilized porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 2010, 56;552-557. (査読有)
- (16) Sano H, Matsuura K, Naruse K, Funahashi H. Application of a microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced the incidence of polyspermic penetration. *Theriogenology.*, 2010, 74;863-870. (査読有)
- (17) Iribe G, Jin H, Kaihara K, Naruse K. Effects of axial stretch on sarcolemmal BKCa channels in post-hatch chick ventricular myocytes. *Exp. Physiol.*, 2010, 95;699-711. (査読有)
- (18) Matsuura K, Hayashi N, Takiue C, Hirata R, Habara T, Naruse K. : Blastocyst quality scoring based on morphologic grading correlates with cell number. *Fertil. Steril.*, 2010, 94;1135-1137. (査読有)
- (19) Ito S, Suki B, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y, Sokabe M.: Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca²⁺ influx in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2010, 43;26-34. (査読有)

〔学会発表〕 (計 50 件)

招待講演 (国際)

- (1) Yamada A, Mohri S, Nakamura M, Naruse K: Automatic measurement system for biological applications based on pH using ISFET sensor probe. MHS2010 & Micro-Nano Global

COE, Nagoya, 2010年11月7-10日

(2) Li JC, Matsuura K, Kuroda Y, Funahashi H, Naruse K: Application of Mechanical Stimuli using a Microfluidic Air Actuating System to Cultured Mammalian Embryos. MHS2010 & Micro-Nano Global COE, Nagoya, 2010年11月7-10日

(3) Takahashi K, Toda K, Saruwatari K, Yokoyama T, Naruse K, Sokabe M : Conformational change of membrane proteins in response to membrane tension — a coarse grained molecular dynamics simulation study. BIT's 5th Annual Protein and Peptide Conference, China, 2012年3月23-25日

〔図書〕(計3件)

(1) Matsuura K, Naruse K: Use of Silicone Elastomer-Based Microfluidic Devices and Systems in Reproductive Technologies. Advanced Elastomers - Technology, Properties and Applications, pp243-262, 2012

(2) Takahashi K, Naruse K. Stretch-activated BK channel and heart function. Prog. Biophys. Mol. Biol., 2012, 110;239-244.

(3) 成瀬恵治: 第5章アクチュエータが切り拓く医療、福祉：5.1 医学、バイオ研究での利用．アクチュエータが未来を造る，pp177-186, 2011年11月15日発行，産業図書(株)出版

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

(1)名称：高強度ペプチドゲル(クロスリンク法による高強度ペプチドハイドロゲル)
発明者：松浦 宏治、北松 瑞生、黒田 ユカ、永井 祐介、成瀬 恵治
権利者：国立大学法人岡山大学、(株)メニコン

種類：特許

番号：特願 2010-287249

出願年月日：22年12月24日

国内外の別：国内

(2)名称：細胞培養器

発明者：永井祐介、成瀬恵治

権利者：国立大学法人岡山大学、(株)メニコン

種類：特許

番号：特願 2011-099776, PCT/JP2012/061271

出願年月日：23年4月27日，24年4月26日

国内外の別：国内外

○取得状況(計4件)

(1)名称：自己組織化ペプチドおよび高強度ペプチドゲル

発明者：永井祐介、横井秀典、上杉晃司、成瀬恵治

権利者：国立大学法人岡山大学、(株)メニコン

種類：特許

番号：特許第4620804号

取得年月日：22年11月5日

国内外の別：国内

(2)名称：機械受容(StretchActivated)チャンネルの活性化抑制剤

発明者：成瀬恵治、曾我部正博

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特許第4654432号

取得年月日：23年1月7日

国内外の別：国内

(3)名称：平面パッチクランプ用支持体の製造方法

発明者：成瀬恵治

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：特許第4899051号

取得年月日：24年1月13日

国内外の別：国内

(4)名称：卵細胞の培養装置

発明者：成瀬恵治、舟橋弘晃、石田敬雄、松浦宏治、原 鐵晃

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：特許第5083952号

取得年月日：24年9月14日

国内外の別：国内

〔その他〕

報道関連情報

(1)22年6月21日 日本産業新聞「卵細胞培養し不妊治療」

(2)22年8月22日 山陽新聞「良質受精卵高率で培養」

(3)23年8月31日 NHK「ためしてガッテン：もみ出し&マッサージ ホントの実力大検証！」

(4)23年12月5日 日本経済新聞「細胞培養技術」

(5)24年1月25日 NHK「ためしてガッテン：30秒で肌が！血管が！冬の若返りストレッチ」

ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/phy2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233

(2)研究分担者

毛利 聡 (MOHRI SATOSHI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00294413

中村 一文 (NAKAMURA KAZUFUMI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：10335630

竹居 孝二 (TAKEI KOHJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：40322226

山田 浩司 (YAMADA HIROSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：80325092

入部 玄太郎 (IRIBE GENTARO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：90284885

片野坂友紀 (KATANOSAKA YUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60432639