

## 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 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510122

研究課題名（和文） 単一細胞レベルの創傷治癒過程解析

研究課題名（英文） Analysis of Wound Healing Process at the Single Cellular Level

研究代表者

AFRIN REHANA (AFRIN REHANA)

東京工業大学・大学院理工学研究科・東工大特別研究員

研究者番号：70447556

研究成果の概要（和文）：

生細胞に人工的に与えた傷の修復過程を知ることは創傷治癒の観点から重要である。我々は原子間力顕微鏡探針の細い針の先につけたガラス球に、細胞膜溶解機能を持つ酵素を結合し、これを細胞に接触させて与えた傷の自己修復能時間と傷の大きさとの関係を得た。細胞に与えた傷害の修復時間は、修復開始までに一定の時間が必要であった。形成時に細胞上に出現する泡状構造（ブレブ）の成長・収縮過程を解析した。我々はまた細胞内ストレスファイバーに与えた傷の修復についての観察もおこなった。

研究成果の概要（英文）：

From the point of wound healing view, it is important to analyze the repair process of artificially inflicted damages to a live cell. We employed a small glass bead glued at the end of a thin tip of atomic force microscope and coated with enzyme with cell membrane hydrolyzing activity. When the glass bead touched the cell surface, it created a small hole on the cell membrane. First we studied the correlation between the time of repair of the hole and the hole diameter. We noticed that a certain time is required before repair process effectively started. We also noticed that bubble like structures were formed on the cell surface (blebs) and studied the growth and retraction process of them. We also studied the repair process of the damages given to intracellular stress fibers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			0
年度			0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：分子マニピュレーション 細胞創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒過程の解明は医学的な重要性はもとより、基礎生物学的にも、また近年熱心に

提唱されているナノメディシンの今後の発展のためにもその意義を認められている[1]。従来より単一細胞生物であるアメーバなど

が細胞膜に生じた孔を短時間で修復する能力が観察されている[2]。また、最近では分子生物学の知識を生かした研究がショウジョウバエを対象に行われ、創傷部位を中心にその治癒過程において、周辺細胞にJNK末端活性化経路が活性化される事実が観察されている[3]。培養細胞系では、シート状に培養した表皮細胞に創傷を与えた後、その治癒過程の一環として表皮細胞増殖因子受容体の活性化が報じられている[4]。日本における創傷治癒研究も医学領域で活発であり、創傷痕と治癒過程の相関などが研究されている[5]。また、ナノテクノロジーの発展に伴って、ナノ粒子への人体への影響も東谷等により重点的に研究され始めている[6]。これらの研究は極めて示唆に富んだ重要な内容を含んでいる。我々はこれまで、分子および細胞レベルでのナノテクノロジー開発を行い、今後のバイオナノテクノロジー開発の目的である細胞手術の基盤的研究として単一細胞レベルの制御された創傷の治癒過程をさらに詳しく解析することが重要であると考え、本研究課題の申請をするに至った。

[1] “Wound Healing” by DiPietro and Burns (2003), Humana Press.

[2] Jeon and Jeon, J. Cell Biol., 67 243-249 (1975).

[3] Galko and Krasnow, Plos Biology, 2 1114-1126 (2004).

[4] Block and Klarlund, Mol Biol Cell., 19 4909-4917 (2008).

[5] 創傷の治療：最近の進歩（第2版）波利井 清紀（克誠堂出版）(2005)

[6] Vakarelski IU, Higashitani K et al. Langmuir. 23, 10893-6 (2007).

## 2. 研究の目的

培養細胞レベルにおける創傷治癒モデルを作り、創傷の大きさおよび障害の程度と治癒時間の関係を確立し、これに対する培養条件の影響を検討する。細胞に対して位置と大きさのコントロールされた損傷を与えるには、大きさの違うガラスビーズに細胞膜を破壊するフォスホリパーゼを架橋剤を用いて固定し、このビーズをマイクロマニピュレータによって細胞表面に接触させて細胞膜や細胞内構造を局所的に分解する方法を用いる。こうして細胞膜の特定位置に生じた孔の大きさとその後の細胞の生存率の関係、また細胞が生存する範囲内の損傷に対しては、その大きさと治癒時間の相関を測定する。細胞膜だけでなく、細胞内のタンパク質性構造にまで損傷を与えるためには、ビーズにフォスホリパーゼとタンパク質分解酵素を固定し、細胞膜に開いた孔からさらに探針を細胞内に挿入する。損傷過程、治癒過程を蛍光顕微鏡および原子間力顕微鏡による映像化に

より追跡する。

## 3. 研究の方法

ホスホリパーゼ A 2 でコートしたガラスビーズをつけたマイクロマニピュレータにより細胞膜に直径 5 - 10  $\mu\text{m}$  に制御された孔をあけた後、その修復過程を記録・解析する。

上記の方法で孔をあけた細胞膜から、プロテアーゼを固定したガラスビーズを細胞内に挿入し、ビーズ周辺の細胞骨格を分解し損傷を与える。細胞骨格形成タンパク質はGFPタンパク質との融合により、蛍光顕微鏡による可視化がされている。その後の細胞骨格構造の修復過程を記録し、損傷以前と同様の構造が再生するの可否を知る。

細胞が創傷を受けてからの治癒過程での細胞内生化学環境の変化を単一細胞レベルで解析する。

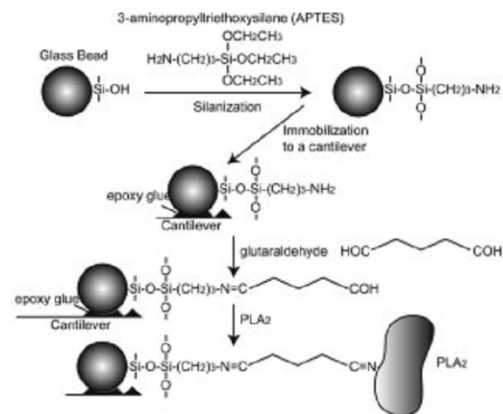


図1. ガラス小球への phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) の固定方法。

## 4. 研究成果

生きた培養細胞に人工的に与えた傷がどのようにして修復されるのを知ることが、傷の大きさと細胞の生存ないし致死の関係や、修復される傷の場合は、その修復速度や修復機構を知ることは、創傷治癒の観点から基本的に重要である。我々は細い針の先につけたガラス球に、細胞膜や細胞内構造を溶解する昨日を持つ酵素を結合し、これを細胞に接触させることにより細胞膜や細胞内構造を部分的に破壊する方法で細胞に傷を与えた。傷の大きさはガラス球の大きさや、細胞にガラス球を押し付ける力を変えることでコントロールできる。まず、細胞膜脂質を溶解する酵素を結合したガラス球を使用した場合、5-10 ミクロンの直径をもつ穴が数分以内に細胞膜に生じる。ガラス球を除去したあと10分程度でこの穴は細胞の自己修復能により塞がれるが、穴の形成直後から細胞膜上の多くの場所で小さい袋状の構造が突起してく

る。これはブレブ (bleb) と呼ばれる泡状構造で、脂質膜がその直下にある細胞骨格膜から離れた部分に、細胞内の浸透圧により生じることが知られている。ガラス球接触より前に大きなブレブ構造が出現している細胞に対して穿孔作業を行うと、ブレブは急速に縮まるので、穴が開いていることの証明となるし、ブレブが浸透圧の作用で生じていることが間接的に証明できる。(以上論文執筆中)ガラス球にタンパク質を分解する酵素を結合して細胞表面に穴をあける実験を行った。修復過程は脂質膜だけを分解したときに比べて時間がかかるようであった。ブレブの形成も見られた(図2)。

細胞内の細胞骨格構造の一部であるストレスファイバーに与えた傷はファイバーが完全に切断されない場合、パキシリンタンパク質の機能により修復されることが当研究室

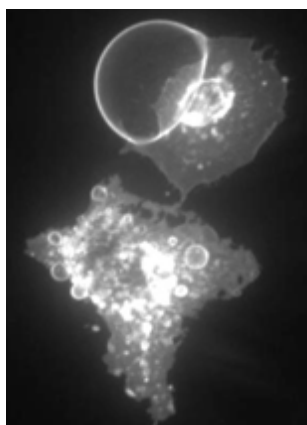


図2. 細胞表面に生じた泡状構造(ブレブ)。上: 自然状態で生じた大型泡構造。下: 人工的に生成させた泡構造。

の中山等との共同研究でわかった。傷が大きい場合はストレスファイバーが両側に引っ張られているため、傷はさらに進行して完全切断にいたることが多い。

## 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10件)

1 Requirement of LIM domains for the transient accumulation of paxillin at damaged stress fibres, Takahiro Watanabe-Nakayama, Masakazu Saito, Shin'ichi Machida, Kikuo Kishimoto, Rehana Afrin and Atsushi Ikai: *Biology Open*, (2013), doi: 10.1242/bio.20134531 (印刷中) (査読有)

2 Interaction of Serum Proteins with Surface of Hemodialysis Fiber Membranes. Rehana Afrin, Yuji Shirako, Kikuo Kishimoto and Atsushi Ikai. : *Jpn. J. Appl. Phys.*, 51 (2012) 08KB10, DOI:

10.1143/AP.51.08KB10 (査読有) .

3 Force Extension of Delipidated Red Blood Cell Cytoskeleton with Little Indication of Spectrin Unfolding. Rehana Afrin, Masato Nakaji, Hiroshi Sekiguchi, David Lee, Kikuo Kishimoto and Atsushi Ikai. : *Cytoskeleton*, 69 (2012) 101-112. DOI: 10.1002/cm.21001 (査読有)

4 Fabricated Cantilever for AFM Measurements and manipulations: Pre-stress Analysis of Stress Fibers. Shinichi Machida, Takahiro Watanabe-Nakayama, Masakazu Saito, Rehana Afrin and Atsushi Ikai. : *Micron*, 43 (2012) 1380-1389. doi.org/10.1016/j.micron.2012.03.025 (査読有)

5 Mechanics of Intracellular Stress Fibers: A Short Review. Atsushi Ikai, Takahiro Watanabe-Nakayama, Shinichi Machida, Masakazu Saito, and Rehana Afrin. : *Jpn. J. Appl. Phys.*, 50 (2011) 08LA04. DOI: 10.1143/JJAP.50.08LA04 (査読有)

6 Direct Detection of Tension Recovery After Local Stretching of in Single Cell Level Surface. Takahiro W. Nakayama, Shin-ichi Machida, Ichiro Harada, Hiroshi Sekiguchi, Rehana Afrin, and Atsushi Ikai. : *Biophys. J.*, 100 (2011) 564-572. doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3693 (査読有)

7 Nonlinear Displacement of Ventral Stress Fibers Under an Externally Applied Lateral Force by an Atomic Force Microscope. Tomoro Hakari, Hiroshi Sekiguchi, Toshiya Osada, Kikuo Kishimoto, Rehana Afrin, and Atsushi Ikai. : *Cytoskeleton*, 68 (2011) 628-638. DOI: 10.1002/cm.20537 (査読有)

8 Micro-scoop for Manipulation of Micro Objects: Use of Fabricated Cantilever with Atomic Force Microscope, Takahiro Watanabe-Nakayama, Shin-ichi Machida, Rehana Afrin, and Atsushi Ikai. : *Small*, 6 (2010) 2853-2857. DOI: 10.1002/sml.201001632 (査読有)

9 Direct Manipulation of Intracellular Stress Fibers Using a Hook-shaped AFM probe. Shinichi Machida, Takahiro

Watanabe-Nakayama, Ichiro  
Harada, Rehana Afrin, Tomonobu Nakayama  
and Atsushi Ikai, : Nanotechnology, 21  
(2010) 385102. doi:  
10.1088/0957-4484/21/38/385102 (査読有)

10 Molecular Shape and Binding Force of  
Mycoplasma Mobile' s Leg Protein Gli349  
Revealed by an AFM Study. Charles Lesoil,  
Takahiro Nonaka, Hiroshi Sekiguchi,  
Toshiya Osada, Makoto Miyata, Rehana  
Afrin and Atsushi Ikai. : Biochem.  
Biophys. Res. Commun., 391 (2010)  
1312-1317. doi:  
10.1016/j.bbrc.2009.12.023. (査読有) .

[学会発表] (計12件)

1. Rehana Afrin, Exploring Atomic Force  
Microscopy for Single Cell Manipulations.  
Microscopy & Microanalysis (M&M) 2012  
Meeting, Phoenix, AZ, USA. July 29th - 2nd  
August, 2012.

2. Rehana Afrin, Exploring Atomic Force  
Microscopy for Nano-medical Applications.  
ACMM22/ICONN2012/APMC10 Combined  
Conference Perth, WA, Australia. February  
05 - 09, 2012.

3. Rehana Afrin, Interaction of Serum  
Proteins with the Surface of Hemodialysis  
Tubing. International Colloquium of  
Scanning Probe Microscopy (ICSPM19),  
Toyako, Hokkaido, Japan. December 19-21,  
2011.

4. Rehana Afrin, Exploring Atomic Force  
Microscopy for Single Cell Manipulations.  
Annual Meeting of the American Society for  
Cell Biology, Denver, CO, USA. December  
3-7, 2011

5. Rehana Afrin, Interaction Between  
Serum Proteins And Polymer Surface Studied  
By Atomic Force Microscopy. AFM-BioMed  
Conference, Paris, France. 23-27 August,  
2011.

6. Rehana Afrin, Atomic Force Microscopy  
for Nano-medical Applications." 2nd  
International Nano Medicine Conference.  
Sydney, NSW, Australia. July 14-16, 2011.

7. Rehana Afrin, Mechanical Interactions  
of Red Blood Cell Cytoskeleton and  
Associated Proteins. 13th International  
Scanning Probe Microscopy Conference

(ISPM), Munich, Germany. June 19-22,  
2011.

8. Rehana Afrin, Surface Morphology  
Study of Human Skin Cells with AFM and SEM  
55th Annual Meeting of the American  
Biophysical Society, Baltimore, MD, USA.  
March 3-9, 2011.

9. Rehana Afrin, Direct Manipulation Of  
Cytoskeletal Structures By Atomic Force  
Microscopy". 50th Annual Meeting of  
American Society of Cell Biology (ASCB),  
Philadelphia, PA. USA, December 10-15,  
2010.

10. Rehana Afrin, Exploring Atomic Force  
Microscopy for Single Cell Manipulations  
as a Novel Nanodevice for Nanomedical  
Application. 1st World Congress of  
Nanomedicine. Beijing, CHINA. October 22  
-26, 2010. Invited Talk.

11. Rehana Afrin, Direct Manipulation  
of Live Cells and Cytoskeletal Structure  
with Atomic Force Microscope. IMC 17, Rio  
De Janeiro, BRAZIL. September 15-19, 2010.

12. Rehana Afrin, Tensile Property of  
Delipidated Red Blood Cell Cytoskeleton".  
12th International Scanning Probe  
Microscopy Conference (ISPM), Sapporo,  
JAPAN. May 10-12, 2010.

[図書] (計2件)

1. Atsushi Ikai, Rehana Afrin, Takahiro  
Nakayama and Shin-ichi Machida Chapter 15.  
"Nano-surgical Manipulation of Living  
Cells with the AFM" in "Atomic Force  
Microscopy in liquid" Edited by Arturo M  
Baro and Ronald G Reifengerger (WILEY-VCH).  
(2012) 総ページ 362.

2. Atsushi Ikai and Rehana Afrin,  
Chapter 12 Mapping Membrane Proteins on  
Living Cells Using The Atomic Force  
Microscope in "Life at the Nanoscale:  
Atomic Force Microscopy of Live Cells"  
Edited by Yves F. Dufrene. (Pan Stanford  
Pub.) (2011) 総ページ 444.

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

A F R I N R E H A N A (AFRIN  
REHANA)

東京工業大学・大学院理工学研究科・東工大特別研究員  
研究者番号：70447556

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者  
猪飼 篤 (いかいあつし)  
東京工業大学・イノベーション研究推進体・特任教授  
研究者番号：50011713