

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650104

研究課題名（和文）細胞核の形態操作と核への力学刺激負荷による細胞機能制御の試み

研究課題名（英文）Control of cell functions by mechanical stimulation of cell nuclei

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、細胞が自身の機能を大きく変化させる分化・脱分化の過程に注目し、細胞核の3次元形態や核に加わる力を見積もる手法の確立、ならびに、細胞核の力学場を操作する手法の確立を目指した。骨芽前駆細胞の骨分化過程において、細胞の石灰化に先んじて、ストレスファイバ型のアクチン細胞骨格が、細胞周辺に局在化するデンスペリフェラルバンド型へ移行し、核の高さの増加・投影面積の減少が見られることがわかった。細胞内にて核に加わる力の変化が、骨芽細胞の分化に影響する可能性が示唆された。また、細胞核に直接的な力や変形を加えるツールとして、外部磁場で自由に変形が可能な、磁気駆動式のマイクロピラーアレイ基板を開発し、細胞核への力学刺激負荷系の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to elucidate the changes in the mechanical environment of cell nuclei during cell differentiation, and to establish a method to apply mechanical stimuli to intracellular nucleus directly. We found that actin cytoskeletal filaments have crucial roles in the intracellular force balance three dimensionally during cell differentiation, which control the three dimensional morphology of nucleus. We also developed a magnetic micropillar array substrate made of silicone elastomer (poly(dimethylsiloxane): PDMS). We successfully embedded iron particles into the micropillars and controlled their location in the substrate. Application of external magnetic field creates forces on the particles in the pillars, and an external force can be transferred to nuclei of cells. This technique can be utilized for direct mechanical stimulation of cell nuclei.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総計 | 2,900,000 | 390,000 | 3,290,000 |

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に応じて、増殖性や運動性、物質産生などの機能を調整し、分化の方向までも変化させる (Englar et al, Cell, 2004). このような細胞の機能変化は、核と細胞質間でのゲノム DNA 情報の精密な制御によって調整されていると考えられている。最近では、GFP などの遺伝子組換え技術や分子イメージング技術の発達により、核内外の特定のタンパク質などの挙動を可視化・解析することによって、核と細胞質間での物質・情報交換経路が徐々に明らかになってきている。

一方、これまでに申請者らは、血管などの生体組織内で生じている引張・圧縮などの力学環境の変化が、細胞形態や細胞の内部構造に与える影響を詳しく調べてきた。その過程で、核の形態変化や、核に加わる力の大きさや方向などの力学的因子が、細胞の機能調整に密接に関与しているのではないかと考えた。さらに、多分化能を有する ES 細胞の核が、線維芽細胞などの核に比べ柔らかく、これが多分化能と関連している可能性 (Discher DE et al, PNAS, 2007) も指摘され始めている。これらのことから、核の形態変化、核への力やひずみの変化が、細胞の機能調整に多大な影響を与えている可能性があるが、この点については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、細胞が自身の機能を大きく変化させる分化・脱分化の過程に注目し、細胞核の3次元形態や、核に加わる力を見積もる手法を確立する。これと平行して、細胞核の力学場を操作する手法を確立していく。そして、細胞の分化・脱分化過程での、細胞核の力学場に関するデータを蓄積し、実際に細胞核へ力やひずみを負荷できる技術の提案を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の分化・脱分化の過程における細胞核の3次元形態・力学場の解析：骨芽前駆細胞 (MC3T3-E1) が骨芽細胞に分化して石灰化を生じていく過程に注目し、その過程で、細胞内の核に生じていると考えられるひずみがどのように変化していくか調査した。すなわち、MC3T3-E1 細胞を骨誘導培地中で長期間培養しながら、核の3次元形状を詳細に計測した。さらに、化学処理によってアクチン細胞骨格を選択的に破壊して、細胞内張力を解放する前後において核の形状変化を計測し、核に生じる圧縮ひずみを見積もる方法を検討した。

(2) 細胞核に直接的な力や変形を加えるツールの開発：微細加工技術を利用して、直径 3 μm 、高さ約 10 μm ほどのシリコンラバー

製マイクロピラーアレイを作製し、それに磁性粒子を埋め込み、外部磁場で変形させることができる磁気駆動式マイクロピラーデバイスの開発を進めた。磁気駆動式ピラーの鑄型は、フォトリソグラフィ法で作製し、ピラーに埋め込む磁性粒子として平均粒径 1.5 μm の鉄粉 (HQ, BASF) を使用した。市販の PDMS (Sylgard 184, Dow-Corning) に対し、鉄粉を調合した硬化剤を体積比 10 : 1 で混合し、鉄粉含有 PDMS を作製した。この鉄粉含有 PDMS を鑄型全面に注ぎ、100 $^{\circ}\text{C}$ で1時間処理して熱硬化させ、鑄型から PDMS を剥離し、全領域のピラーに鉄粉を埋め込んだ基板を作製した。

本研究では、鉄粉を埋め込んだピラーを基板の所望の領域に作製する手法も検討した。この場合、短冊状に加工した PDMS 製シート (厚み約 0.1 mm) を鑄型の表面にマスクとして貼り付け、鉄粉を埋め込むピラー以外の鑄型孔を閉じた状態で鉄粉含有 PDMS を注ぎ込み、前述の方法で鉄粉を孔の奥底に沈み込ませた。その後マスクを取り外し、鉄粉を含まない PDMS を新たに注ぎ込み、前述の熱硬化処理を施してピラー基板を作製した。

4. 研究成果

(1) 細胞の分化・脱分化の過程における細胞核の3次元形態・力学場の解析：MC3T3-E1 細胞を骨分化誘導培地中で培養していくと、2週間ほどで骨芽細胞へ分化が進み、石灰化が生じた。細胞核やアクチン細胞骨格の形態に着目し、共焦点顕微鏡でそれらの3次元的な分布を調べたところ、細胞の石灰化に先んじて、ストレスファイバ型のアクチン細胞骨格が、細胞周辺に局在化するデンスペリフェラルバンド型へ移行し、核の高さの増加・投影面積の減少が生じることがわかった (図1)。また、核の体積は有意に減少していた。このような核形態の変化が、細胞内張力の低減による核への圧縮力の解放に起因することが分かった。細胞内にて核に加わる力の変化が、骨芽細胞の分化に影響する可能性が示唆された。

また、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDを投与し、細胞内張力を解放する前後で、核の形態を精密計測したところ、石灰化後の細胞の核では、核を取り巻くアクチン細胞骨格が減少している (図1右) にも関わらず、核への圧縮ひずみが増加している傾向が得られた。このことから、骨芽前駆細胞の石灰化過程において、核そのものの力学特性も変化している可能性が考えられた。

以上のように、細胞内にて、アクチン細胞骨格に起因する力の変化が、細胞内の核の3次元的な形態に変化を与え、骨芽細胞の分化様態に影響する可能性が示唆された。

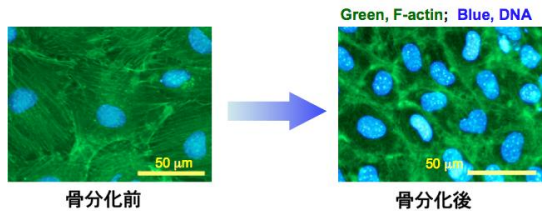


図1：骨分化前後でのMC3T3-E1細胞のアクチン細胞骨格と細胞核。

(2) 細胞核に直接的な力や変形を加えるツールの開発：直径3 μmと4 μmの磁気駆動式ピラーを作製し、それらの駆動の様子を撮影して評価した。ネオジウム磁石をピラー基板に近づけ磁場を印加していくと、ほぼ全ての磁気駆動式ピラーが右側にたわんでいることが確認できた。このピラー先端にかかる力をピラーのたわみ量から求めたところ(図2), 直径3 μmでは 66 ± 17 nN (mean \pm SD, n = 920), 直径4 μmでは 169 ± 84 nN (n = 880)の力が作用しており、直径4 μmの方が平均で2.5倍ほど大きな力を発生できることが分かった。しかし、直径3 μmのピラーに比べ、直径4 μmのピラーでは力のばらつきが大きくなる傾向が見られた。直径4 μmの場合では、鋳型孔直径と鉄粉粒子径(平均1.5 μm)との差がより大きいので、個々の鉄粉が傾きながら積み重なるなど、多様な状態で埋め込まれている可能性があるが、現時点では詳細は不明である。今後は、PDMS中の鉄粉が鋳型の孔に入るときの動きを数値シミュレーションするなどして、ピラーへの鉄粉の埋め込み量を均一化する方法の検討が必要と考えられる。

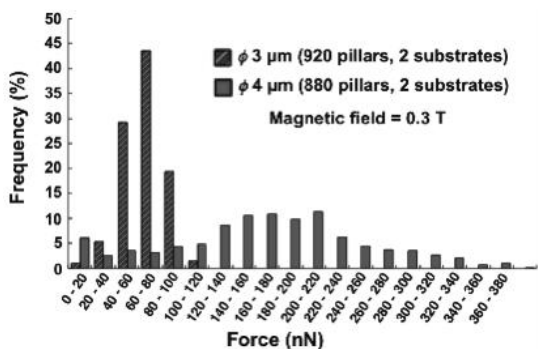


図2：作製した磁気駆動式ピラーの発生力分布図。

図3に鉄粉を埋め込むピラーの領域を調整して作製した基板の例を示す。鋳型をマスクングすることにより、鉄粉を埋め込んだピラーを片側領域だけ、あるいは1列だけに限定して作製し、外部磁場で動かせることを確認した。今後、マスクの形状を工夫することで、様々なパターンに配列させた磁気駆動式ピラーを作製することができるという。

また、これらのピラー基板に対して、全面

に細胞接着タンパク質を塗布して細胞を播種すると、図4のように、複数のピラーの間に細胞核を挟むことができる。すなわち、この状態でピラーを駆動させれば、核に直接的な力や変形を加えることが可能である。

以上のように、本研究で開発した磁気駆動式マイクロピラーは、細胞核に対して、直接的な力学刺激を加えることができる有効なツールと言える。今後は、これを用いて、細胞核に力や変形を加え、核内DNA構造や特定遺伝子の転写活性を調査する研究へと発展することが期待される。

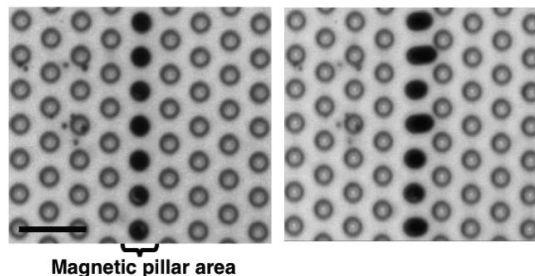


図3. 1列のみに磁性体を埋め込んだ磁気駆動式ピラー基板の様子。外部磁場によって、1列のピラー群のみが右に曲がっている様子が分かる(右)。

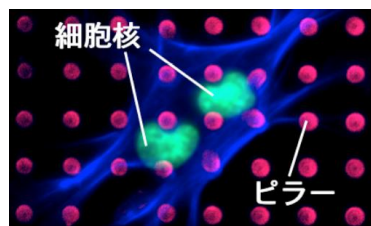


図4. ピラー基板に落とし込んで培養した細胞の核の様子。細胞核がピラーに挟まれている様子が分かる。

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. 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* 45-5, 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) 【採否決定用査読あり】
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】

[学会発表] (計 12 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】 □

[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>

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

松本 健郎 (MATSUMOTO TAKEO)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30209639

(3) 連携研究者

該当なし