

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19898

研究課題名（和文）細胞の高重力感知機構の解明と形質・分化制御への試み

研究課題名（英文）Elucidation of high gravity-sensing mechanisms in cells and its application to control cellular phenotype and differentiation

研究代表者

坂元 尚哉（SAKAMOTO, NAOYA）

東京都立大学・システムデザイン研究科・准教授

研究者番号：20361115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高重力を力学的な刺激とした平滑筋細胞の表現型変化誘導および細胞の高重力環境感知に対する細胞骨格構造の役割を検討した。コラーゲンゲル基質中で三次元培養した平滑筋細胞に、遠心分離に伴う高重力を負荷した結果、通常の培養状態に比べて生理的な状態に近い収縮型へと表現型変化傾向が認められた。また高重力負荷に伴い、平滑筋細胞の細胞骨格張力変化を示す結果が得られ、高重力感知および応答メカニズムへの細胞骨格張力変化の関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

力学刺激による細胞の表現型変化・分化誘導は、生体生理機能や疾患発症メカニズムの理解のみならず、再生医学技術開発などの応用の観点からも高い関心を集めている。高い重力環境も力学刺激として細胞に影響を及ぼす可能性が考えられるものの、その詳細は明らかになっていなかった。本研究成果は、遠心分離に伴う高重力環境が三次元培養した細胞に力学刺激として作用すること、また表現型変化を誘導できる可能性を示しており、重力感知に関する基礎的な知見のみならず、高重力を利用した技術開発へと寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated phenotypic changes in smooth muscle cells induced by hypergravity as a mechanical stimulus and examined the role of cytoskeletal structure in the cellular sensing of the hypergravity environment. Our findings showed that centrifugal hypergravity stimulation induces a phenotypic shift of smooth muscle cells cultured in a three-dimensional collagen gel matrix from a synthetic phenotype to a physiological contractile state. We also observed that cytoskeletal tensions of smooth muscle cells were increased by the application of hypergravity. The results suggest that changes in cytoskeletal tension may play a role in how cells sense and respond to hypergravity.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：生物・生体工学 細胞バイオメカニクス 細胞骨格 細胞核 高重力

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内において細胞は体液の流れや組織の変形に伴う伸展など力学刺激を感知し、機能や形状(表現型)の変化を示す。幹細胞やiPS細胞など未分化細胞が、異なる細胞種へと変化する分化に対しても力学刺激は大きく影響する。力学刺激による細胞の表現型変化・分化誘導は、生体生理機能や疾患発症メカニズムの理解のみならず、再生医工学技術開発などの応用の観点からも高い関心を集めている。

我々に常に作用する重力も力学刺激の一つである。細胞が重力変化を感知することは示唆されているものの、重力変化感知機構や応答に関して未解明な点は非常に多い。申請者らはコラーゲンゲル基質中で三次元的に培養した細胞に対して、遠心分離に伴う高重力を負荷したところ細胞形質の変化傾向を見出している。一方で、培養作業に必ず伴う浮遊細胞の遠心分離ではこの形質変化は確認されていない。ゲル基質中と浮遊状態では細胞形状だけでなく、細胞内構造に加え、細胞内密度差にも違いが生じる。このような培養環境変化に伴う要因が高重力に対する感受性の違いをもたらす可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、培養環境によって変化する細胞内構造の役割に注目した細胞の重力変化感知機構の解明を目指すとともに、高重力を刺激とする細胞表現型変化・分化誘導の可能性を探索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養およびコラーゲンゲル培養

実験にはヒト大動脈平滑筋細胞 (Human Aortic Smooth Muscle Cells; HASMC) を用いた。培養液には 20%v/v のウシ胎仔血清, 10 ng/mL の塩基性線維芽細胞増殖因子および 1 unit/mL の penicillin-streptomycin を含んだ Medium199 を使用した。フラスコまたは組織培養ディッシュに細胞を播種する際には、0.1 mg/mL の I 型コラーゲン溶液で予め培養面にコーティングを施した。

細胞の三次元培養法として先行研究と同様の手法を用い[1], 平滑筋細胞を含むコラーゲンゲル組織を作製した。5 mg/mL の I 型コラーゲン溶液, 10 倍濃度 MEM- $\alpha$ , 再構成緩衝液 (0.05 mol/L NaOH, 200 mmol/L HEPES, 0.26 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, pH8.6) を 8:1:1 の割合で混合し, フラスコから継代した細胞数 300,000 cells/mL の平滑筋細胞を懸濁した。細胞培養ディッシュに懸濁液を流し込み全体に広げ, 37°C で 30 分間培養することでコラーゲンゲル溶液をゲル化させた。その後 M199 培養液を加え 3 日間培養した。

#### (2) 高重力負荷

先行研究と同様に[1], 細胞培養ディッシュ内の培養液を取り除き, ポリカーボネート製メンブレンフィルタおよびシリコーン製圧縮プレート (直径 38 mm, 厚さ 1 mm) をゲル化したコラーゲンゲル上に設置した。プレート遠心機に細胞培養ディッシュを設置し, 相対遠心加速度 1,000 G で遠心分離を 10 分間行った。遠心分離後, メンブレンフィルタおよび圧縮プレートをコラーゲン組織上から取り除き, M199 培養液を加えて培養した。比較として, 遠心分離せずに静置培養した非圧縮コラーゲンゲル組織も作製した。2~3 日毎に培養液を交換した。

#### (3) 細胞蛍光染色

高重力負荷後, 平滑筋  $\alpha$  アクチンまたはリン酸化ミオシン軽鎖の免疫蛍光染色を行った。4% パラホルムアルデヒドを加え 4°C で一晩固定した後, それぞれの 1 次抗体を 1 時間, 続いて蛍光色素標識された 2 次抗体を 1 時間, それぞれ加え室温で培養した。PBS で洗浄した後, 1  $\mu$ g/mL の Hoechst3334 および Alexa Fluor 546 標識 Phalloidin を加えて 15 分間静置した。最後に PBS で洗浄した後, 褪色防止用封入材を用いてスライドガラスに封入し, 共焦点顕微鏡上で観察した。

#### (4) リアルタイム PCR

コラーゲンゲル中の平滑筋細胞から専用キットを用いて総 RNA を抽出した。得られた RNA から逆転写反応産物 cDNA を精製した後, リアルタイム PCR を実施した。対象とする mRNA 発現量を内部標準 GAPDH 遺伝子の mRNA 発現量によって正規化し, 相対的な mRNA 発現量を  $\Delta\Delta C_t$  法により算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 高重力負荷による平滑筋細胞の表現型変化

コラーゲンゲル基質中に包埋した平滑筋細胞に対して, 遠心分離機を用いて高重力を負荷した後, calcein-AM で染色し細胞生存評価を行った。通常重力環境で静置培養した細胞と比べて, 細胞の生存率には高重力負荷の影響は見られなかった。高重力負荷直後に, 細胞骨格であるアク

チンフィラメントの蛍光染色観察を行った結果、通常重力環境で培養した細胞と比較して、細胞骨格構造に顕著な変化は見られなかった。一方で、遠心分離による高重力を負荷した後、通常重力環境で5日間培養した結果、収縮型平滑筋細胞マーカーの一つ平滑筋 $\alpha$ アクチンで構成されたアクチンフィラメント線維の増加傾向が認められた(図1)。遠心せず通常重力環境で5日間静置培養した平滑筋細胞には $\alpha$ アクチン線維は観察されなかった。またリアルタイムPCR法に遺伝子発現を調べた結果、静置培養群に比べ、平滑筋 $\alpha$ アクチンに加えて収縮型平滑筋細胞マーカーである平滑筋ミオシン重鎖の発現量の増加を確認した。これらの結果からコラーゲンゲル中で三次元培養した平滑筋細胞に高重力を負荷することで、平滑筋細胞表現型を収縮型へ誘導できる可能性を示唆された。

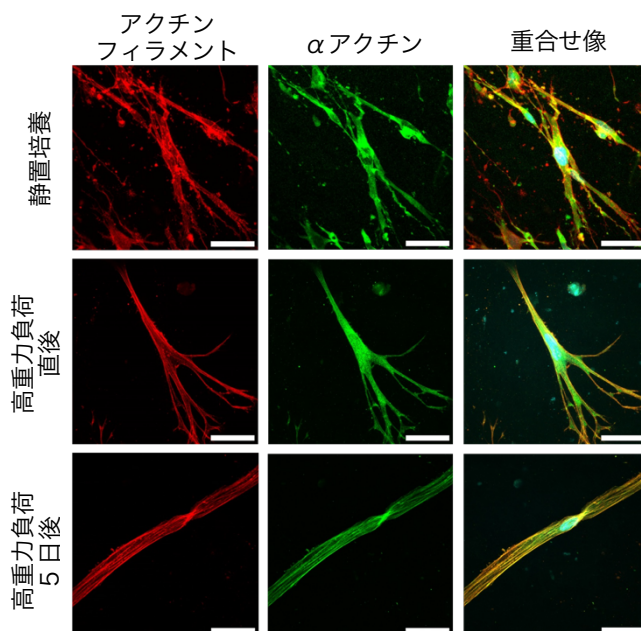


図1 平滑筋細胞の蛍光顕微鏡画像(赤:アクチンフィラメント, 緑, 平滑筋 $\alpha$ アクチン, シアン;細胞核). パーは50  $\mu$ mを示す.

### (2) 高重力負荷による細胞骨格張力変化

高重力負荷がアクチンフィラメント構造張力に及ぼす影響を明らかにするため、張力発生指標となるアクチンフィラメント構造構成タンパク質ミオシン軽鎖リン酸化を免疫蛍光染色法により調べた。その結果、コラーゲンゲル中の平滑筋細胞において、高重力負荷直後にリン酸化ミオシンが認められ、負荷後60分後まで通常重力環境で静置培養した細胞でもリン酸化状態が確認された(図2)。

また比較として、二次元平面基質に培養した細胞への高重力負荷を行った。カバーガラス上に培養した平滑筋細胞に対してプレート遠心分離機を用い、通常培養状態での重力方向である細胞下向きに高重力を10分間にわたって負荷した。その結果、通常重力環境で培養した細胞と比較して、顕著なミオシンのリン酸化は認められなかった。これら結果は高重力負荷によるアクチンフィラメント張力上昇を示唆しており、高重力感知および応答メカニズムにおいてアクチンフィラメントの関与が考えられた。

### (3) 高重力負荷によるアストロサイトの遺伝子発現変化

異なる細胞種への高重力負荷の影響を検討するため、コラーゲンゲル基質中に包埋培養したアストロサイトに対して遠心分離による高重力負荷を行った。アストロサイトの特異的マーカーであるグリア線維性酸性タンパク質GFAP発現をリアルタイムPCR法により調べた結果、高重力負荷による発現減少傾向が確認された。この結果は、アストロサイトの表現型変化を示唆するものであり[2]、平滑筋細胞とは異なる種の細胞表現型に対しても高重力負荷が影響を及ぼす可能性が考えられた。

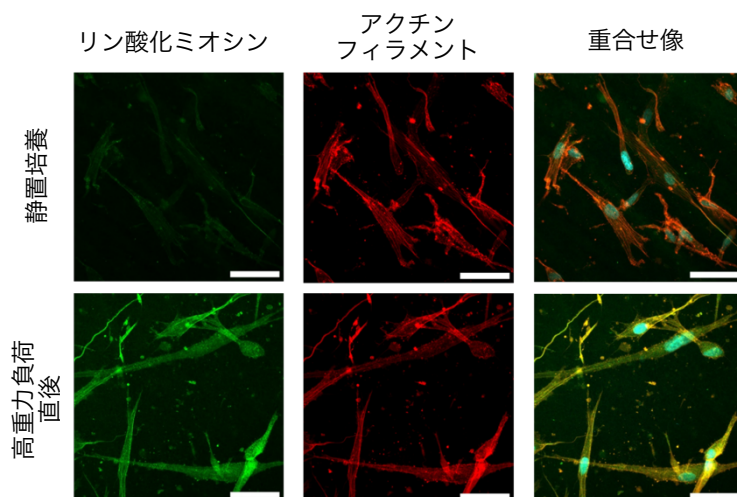


図2 コラーゲンゲル中の平滑筋細胞の蛍光顕微鏡画像(緑, リン酸化ミオシン, 赤:アクチンフィラメント, シアン;細胞核). パーは50  $\mu$ m.

### <引用文献>

- [1] Hiroshima, et al., A Compressed Collagen Construct for Studying Endothelial-Smooth Muscle Cell Interaction under High Shear Stress. *Ann Biomed Eng*, vol. 50, no. 8, 951-963, 2022.
- [2] Argaw et al., Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest*, vol. 122, no. 7, 2454-2468, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 沢崎薫, 中村匡徳, 木村直行, 川人宏次, 藤江裕道, 坂元尚哉
2. 発表標題 高壁せん断応力が内皮細胞と共培養した血管平滑筋細胞の表現型へ及ぼす影響
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沢崎薫, 中村匡徳, 木村直行, 川人宏次, 藤江裕道, 坂元尚哉
2. 発表標題 高壁せん断応力下における血管内皮細胞と共培養した血管平滑筋細胞の表現型転換
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 K. Sawasaki, M. Nakamura, N. Kimura, K. Kawahito, H. Fujie, N. Sakamoto
2. 発表標題 Phenotypic States of Smooth Muscle Cells in a Coculture Model under Higher Wall Shear Stress Condition
3. 学会等名 2022 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沢崎薫, 中村匡徳, 木村直行, 川人宏次, 藤江裕道, 坂元尚哉
2. 発表標題 壁せん断応力環境下における内皮細胞と共培養した血管平滑筋細胞の形態変化
3. 学会等名 第62回日本生体医工学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沢崎薫, 中村匡徳, 木村直行, 川人宏次, 藤江裕道, 坂元尚哉
2. 発表標題 特異的血流環境を模擬した高壁せん断応力が血管モデル内平滑筋細胞の表現型転換へ及ぼす影響の評価
3. 学会等名 第65回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沢崎薫, 中村匡徳, 木村直行, 川人宏次, 藤江裕道, 坂元尚哉
2. 発表標題 壁せん断応力に対する内皮細胞を介した血管平滑筋細胞の形態変化
3. 学会等名 日本機械学会2023年度年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Sawasaki, M. Nakamura, N. Kimura, K. Kawahito, H. Fujie, N. Sakamoto
2. 発表標題 Vascular Smooth Muscle Cell Alignment Induced by Cocultured Endothelial Cells Subjected to Wall Shear Stress
3. 学会等名 2023 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Mechanobiology Laboratory@TMU  <a href="http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/mechanobio/index.html">http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/mechanobio/index.html</a></p>
---

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	藤江 裕道  (FUJIE HIROMICHI)  (20199300)	東京都立大学・システムデザイン研究科・教授    (22604)	

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