

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650257

研究課題名(和文)細胞内張力分布の直接的操作による細胞分裂制御の試み

研究課題名(英文)Direct manipulation of the intracellular stress distribution for controlling cell division

研究代表者

長山 和亮(Nagayama, Kazuaki)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10359763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内の張力分布を直接操作することで、細胞分裂や増殖性にどのような影響を与え得るか調べた。マイクロピラー基板上で細胞を培養し、ピラーの変形量から細胞接着部の張力を計測し、細胞に変形を加えながら細胞内張力分布を計測・操作する手法を開発した。これを用いてヒト子宮頸がん由来細胞株(HeLa細胞)に対し、引張りを加えたときの、細胞分裂への影響を調べた。有糸分裂開始直前に、染色体赤道面に垂直に引張りを加えると、当初の向きと直行方向に有糸分裂が進み、やや遅れて細胞質分裂に至るといった興味深い結果が得られた。ひずみ負荷のタイミングや方向を調整して細胞分裂の方向や頻度を制御できる可能性が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a technique to measure the dynamic changes in intracellular stress distribution during cell stretching, and we also established to manipulate intracellular tension. Using these techniques, we investigated the effects of mechanical stimuli, such as cell stretching, on the division and proliferation of HeLa cells. We found that the cell spindle orientation during mitosis dramatically changed following cell stretching in perpendicular to the equator plane of the cells: HeLa cells divided in perpendicular to the stretch direction. These results indicate that cells divide according to mechanical factors provided by the forces applied to the cells. Our technique would be useful in investigating the mechanotransduction mechanisms of dividing cells.

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 生体・情報計測 細胞骨格 細胞核 メカノトランスダクション

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は生命維持のための基本機構であり、従来は、細胞骨格の一つである微小管などの細胞内の構成要素の働きのみによって精密に制御されていると考えられてきた。一方、研究代表者は、これまでに細胞の力学応答に関して詳細に調査してきた結果、細胞-基質の接着状態や基質の力学特性、細胞-基質間に作用する力の変化といった、細胞外の力学的作用の重要性に気づき、これらが細胞分裂過程や細胞の増殖性などに大きく影響すると考えた。細胞が、周囲を取り巻いている細胞外基質との接着部位(焦点接着斑)を介して、細胞に加わる力の変化を感知しながら、その分裂周期や成長方向を調整している可能性があると考えられるが、この点については全く明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、まず、1) 細胞の個々の接着部位-基質間に生じる力を計測しつつ、それぞれの接着部位に独立した変形を加えて細胞内張力分布を操作できる系を構築する。次に、2) 細胞分裂過程での核や細胞骨格の動きを詳細に観察しながら、個々の接着部位に生じる力の大きさ・方向の変化を計測し、細胞と基質との接着状態や、細胞に加わる力の大きさ・方向といった力学作用が細胞分裂過程や細胞の増殖性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、1) 申請者らがこれまで確立してきた、弾性マイクロピラー基板等を利用した、細胞焦点接着斑での張力分布計測の技術を応用し、細胞の個々の接着部位-基質間に生じる力を計測しつつ、それぞれの接着部位に独立した変形を加えて細胞内張力分布を操作する方法を確立する。2) 次に、細胞分裂過程での核や細胞骨格の動きを詳細に観察しながら、個々の接着部位に生じる力の大きさ・方向の変化を計測し、細胞と基質との接着状態や、細胞に加わる力の大きさ・方向といった力学作用が細胞分裂や細胞の増殖性などに与える影響を明らかにしていく。

## 4. 研究成果

### 1) 力学刺激負荷中の細胞張力分布・細胞分裂過程のその場計測システムの確立

まず、力学刺激負荷中の細胞張力分布・細胞分裂過程のその場計測系の確立に着手した。シリコンラバー製のマイクロピラー基板上で細胞を培養し、個々のピラーの変形量から細胞の接着部位での張力を正確に計測する技術を確立し、このピラー基板ごと単軸引張や圧縮を加えながら細胞分裂過程での細胞内張力分布を精密に計測できる手法を開発した。また、単軸引張だけでなく、シリコンラバー基板上で細胞を培養しながら、

顕微鏡観察下で基板を円筒(インデターリング)に押し付けて全方向に均等に引張や圧縮を負荷する等二軸引張装置を試作した。この装置のインデターリングの断面形状を真円ではなく楕円等にするによって、単軸引張を負荷することも可能となった。リングを回転させることで楕円の長軸方向を変更し、任意の方向に引張ひずみを負荷できる機構を開発した。さらに、これまでに開発した磁気駆動式ピラーを用い、局所的に磁場を形成できる磁気ピンセットを作製して外部から磁場を負荷し、細胞の特定の焦点接着斑に独立した変形を加え、その後の細胞分裂を詳細に観察できる実験系も確立した。

これらの成果は、日本機械学会 第22回バイオフロンティア講演会(2012.10.5-6, 弘前)や Biomedical Engineering Society 2012 Annual Fall Meeting 2012 (2012. 10. 24-27, Georgia World Congress Center Atlanta, Georgia, USA)などで発表した。また、これらの内容をまとめて Journal of Biomechanical Science and Engineering 誌に投稿し、掲載された論文(Nagayama K et al, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 7, 130-140, 2012)は、2012年度の Paper of the Year Award と Graphics of the Year Award を同時受賞した(<http://jbse.org/awards/2012.php>)。

### 2) 力学場操作による細胞分裂制御

1)にて構築した力学刺激負荷中の細胞分裂過程のその場計測システムを用いて、特にヒト子宮頸がん由来細胞株(HeLa 細胞)を対象に、有糸分裂、細胞質分裂の過程にて引張ひずみを負荷したときの、その後の分裂過程に与える影響を調べた。有糸分裂開始直前に、その染色体赤道面に対し垂直方向に10%程の引張りひずみを負荷すると、染色体集団が回転し、当初の向きと直行方向に有糸分裂が進み、やや遅れて細胞質分裂に至るという興味深い結果が一部で得られた。一方で、有糸分裂が完了した細胞に対して同様の引張りを加えても、細胞分裂の方向に変化が生じなかった。このように、ひずみ負荷の方向やタイミングを考慮することで、細胞分裂の方向や頻度を制御できる可能性が得られた。

さらに、微細加工技術で作成したマイクロピラーや側面に凹凸を持つマイクロ流路を用い、細胞核に局所的に変形を加えることができる基板を試作した。これらを用いて血管平滑筋細胞の核の形態を拘束しながら培養をすると、血清含有培地中においても、細胞の分裂が劇的に抑制されることが分かった。これらの成果の一部は、人工臓器学会誌の依頼解説(-最近の進歩- 細胞のバイオメカニクス: 組織再生に向けたメカノトランスダクションの理解とその制御, 人工臓器 42-3, 205-208, 2013)として紹介するとともに、現在、データをまとめて国際誌に論文投稿準備中である。

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8件)

Nagayama K., Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T., Estimation of the mechanical connection between apical stress fibers and the nucleus in vascular smooth muscle cells cultured on a substrate, *Journal of Biomechanics*, 47, 1422-1429, 2014 【査読あり】

長山和亮, 松本健郎, -最近の進歩- 細胞のバイオメカニクス: 組織再生に向けたメカノトランスダクションの理解とその制御, *人工臓器* 42-3, 205-208, 2013 【依頼解説】

矢口俊之, 武澤健司, 長山和亮, 益田博之, 松本健郎, ヒト橈骨動脈の力学特性の非侵襲計測法の確立と力学特性に対する平滑筋収縮状態の影響評価, *ライフサポート* 25-4, 143-150, 2013 【査読あり】

Nagayama K., Yahiro Y, Matsumoto T., Apical and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of the nucleus in smooth muscle cells cultured on a substrate, *Cellular and Molecular Bioengineering* 6-4, 473-481, 2013 【査読あり】

Hara Y, Nagayama K., Yamamoto TS, Matsumoto T., Suzuki M, Ueno N, Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in Xenopus notochord formation during gastrulation, *Developmental Biology* 382-2, 482-495, 2013 【査読あり】

Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, Kida YS, Ueki Y, Nagayama K., Kawakami K, Matsumoto T., Sato M, Ogura T □ Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21, *Nature Communications* 4, 1978, 2013 【査読あり】

Hirano T, Kobayashi A, Nakaza T, Kitagawa Shinya, Ohtani K, Nagayama K., Matsumoto T., Low-flow-resistance Methacrylate-based Polymer Monolithic Column Prepared by Low-conversion Ultraviolet Photopolymerization at Low Temperature, *Analytical Sciences* 29-2, 205-211, 2013 【査読あり】

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, 1469-1478,

2012 【査読あり】

〔学会発表〕(計23件)

Kazuaki NAGAYAMA., Yuki YAHIRO, Sho YAMAZAKI, Mitsuhiro UKIKI, and Takeo MATSUMOTO. On the Roles of Actin Stress Fibers on the Mechanical Regulation of Nucleus in Adherent Cells, The 15th International Conference on Biomedical Engineering. (ICBME 2013), Singapore, 2013.12.5-7.

Kazuaki NAGAYAMA Takuya INOUE, Yasuhiro HAMADA, Shukei SUGITA. and Takeo MATSUMOTO. Direct application of mechanical stimuli to cell adhesion sites using magnetic-driven micropillar substrates, The 15th International Conference on Biomedical Engineering. (ICBME 2013), Singapore, 2013.12.5-7.

長山和亮: 「メカノトランスダクションの解明に向けた細胞バイオメカニクス: 焦点接着斑・細胞骨格・核の力学的相互作用の解析」, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.4-5 【招待講演】

Kazuaki NAGAYAMA. Yuki YAHIRO, and Takeo MATSUMOTO. 「Actin cap fibers and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of nucleus in vascular smooth muscle cells」, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kobe, Japan, 2013.10.27-30.

長山和亮, 児玉文基, 松本健郎: 「骨芽細胞様細胞 Saos-2 の石灰化過程における核内外の力学場の変化」, 日本機械学会 2013年度年次大会, 岡山, 2013.9.9-11.

Kazuaki NAGAYAMA. Yuki YAHIRO, Mitsuhiro UKIKI, and Takeo MATSUMOTO. Actin cap fibers and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of cell nucleus, The 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics (APCB2013), Seoul Korea, 2013.8.29-31.

Kazuaki NAGAYAMA. Akifumi ADACHI, Keisuke SASASHIMA, and Takeo MATSUMOTO. Laser Nano-Dissection for Analysis of Cellular Mechanotransduction: Direct Force Transmission from Actin Stress Fibers to Nucleus: Tensional Homeostasis of Vascular Smooth Muscle Cells, the 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, Japan, 2013. 7. 3-7 【依頼講演】

Kazuaki NAGAYAMA. Study on the Biomechanical Response of Cells using Microfabricated Tools and Optics: Intracellular

Force Transmission Involved in Cellular Functions」  
The 6th Workshop on Biological Applications of  
Plasma, Osaka, 2013.3.8【招待講演】

長山和亮：「細胞の力学応答を司る細胞内構  
成要素の力学的相互作用」, 細胞研究会「細胞  
機能究明の最前線」, 千葉大学, 2013.3.1【招待  
講演】

Kazuaki NAGAYAMA, Yuki YAHIRO, Sho  
YAMAZAKI, and Takeo MATSUMOTO: On the  
Roles of Actin Stress Fibers on the Mechanical  
Environment of Nucleus in Adherent Cells, The 23<sup>rd</sup>  
RIKEN Center for Developmental Biology (CDB)  
Meeting, Building multicellular systems from  
Cellular Cross-Talk, the RIKEN Center for  
Developmental Biology, Kobe, Japan, 2013. 1.  
22-23

長山和亮, 八尋勇樹, 松本健郎: 細胞核の力  
学環境に対するアクチンストレスファイバの  
役割, 第25回バイオエンジニアリング講演会,  
つくば, 2013.1.9-11.

佐藤聡俊, 長山和亮, 松本健郎: 血管平滑筋  
細胞内ストレスファイバの配向再現メカニ  
ズムに関する研究(中間径フィラメントおよび細  
胞骨格リンカータンパク質との相互作用), 第  
25回バイオエンジニアリング講演会, つくば,  
2013.1.9-11.

児玉文基, 長山和亮, 松本健郎: 骨芽前駆細  
胞の骨分化過程における細胞核の力学特性の  
計測, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大  
会 2012, 名古屋大学, 2012.11.2-4.

井上卓哉, 長山和亮, 松本健郎: 磁気駆動式  
マイクロピラーを用いた細胞焦点接着斑への  
直接力学刺激負荷と細胞力学応答の解析, 生活  
生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2012, 名  
古屋大学, 2012.11.2-4.

佐藤聡俊, 長山和亮, 松本健郎: 血管平滑筋  
細胞内ストレスファイバの配向再現メカニ  
ズムに関する研究, 生活生命支援医療福祉工学系  
学会連合大会 2012, 名古屋大学, 2012.11.2-4.

井上卓哉, 長山和亮, 松本健郎: 磁気駆動マ  
イクロピラーを用いた細胞の接着部位への直  
接的力学刺激負荷と張力応答解析, 日本機械学  
会 第 22 回バイオフロンティア講演会, 弘前,  
2012.10.5-6.

児玉文基, 長山和亮, 松本健郎: 骨芽前駆細  
胞の骨分化に伴う細胞核の力学特性変化の計  
測, 日本機械学会 第 22 回バイオフロンティア  
講演会, 弘前, 2012.10.5-6.

Kazuaki NAGAYAMA, Akifumi ADACHI,  
Keisuke SASASHIMA, and Takeo

MATSUMOTO: In-situ Measurement of Traction  
Force at Focal Adhesions during Macroscopic  
Stretch/Release of Vascular Smooth Muscle Cells:  
Tensional Homeostasis of Vascular Smooth Muscle  
Cells, BMES 2012 Annual Fall Meeting 2012,  
Georgia World Congress Center Atlanta, Georgia,  
USA, 2012. 10. 24-27.

長山和亮, 佐藤聡俊, 八尋勇樹, 楊 云峰,  
松本健郎: 血管平滑筋細胞内ストレスファイバ  
の配向ならびに張力の再現機構に関する研究,  
日本機械学会 M&M2012 カンファレンス, 愛媛  
大, 2012.9.22-24.

長山和亮, 木村勇樹, 牧野成孝, 松本健郎:  
線返引張ひずみ波形に依存した骨芽細胞様細  
胞 MC3T3-E1 のストレスファイバ再配向メカ  
ニズム, 日本機械学会 2012 年度年次大会, 金  
沢大, 2012.9.10-12.

②山崎将, 長山和亮, 松本健郎: ストレスフ  
アイバから細胞核への直接的張力伝達に関す  
る研究: ストレスファイバと核膜の結合状態の影  
響, 日本機械学会 2012 年度年次大会, 金沢大,  
2012.9.10-12.

② Kazuaki NAGAYAMA, Akifumi ADACHI,  
Keisuke SASASHIMA, and Takeo  
MATSUMOTO: In-Situ Measurement of Traction  
Force at Focal Adhesions during Macroscopic Cell  
Stretching Using an Elastic Micropillar Substrate:  
Tensional Homeostasis of Vascular Smooth Muscle  
Cells, The Ninth International Conference on Flow  
Dynamics, Sendai, Japan, 2012. 9. 19-21.

③ Kazuaki NAGAYAMA, Takuya INOUE,  
Yasuhiro HAMADA, and Takeo MATSUMOTO: A  
novel magnetic-driven micropillar array substrate  
for analysis of mechanical responses of cells, 第 51  
回日本生体医工学会大会, 福岡, 2012.5.10-12  
【依頼講演】

〔図書〕(計 0 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
該当なし

取得状況(計 0 件)  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
名古屋工業大学バイオメカニクス研究室  
<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・工学研究科・准教授  
研究者番号：10359763

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

松本 健郎 (MATSUMOTO, Takeo)  
名古屋工業大学・工学研究科・教授  
研究者番号：30209639

杉田 修啓 (SUGITA, Shukei)  
名古屋工業大学・工学研究科・助教  
研究者番号：20532104