

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657105

研究課題名(和文)多粒子光トラップによる神経細胞の軸索伸長の制御とその特異性の起源の解明

研究課題名(英文)rigidity sensing and axonal growth guidance

研究代表者

水野 大介(mizuno, daisuke)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30452741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内部で生み出された力や内外環境の力学的な性質は、細胞の振る舞いに大きな影響を与える。最近、細胞は自他の境界(細胞膜)上に存在するセンサーで自ら発した力(周囲環境をけん引する力)を検出することで、自らの硬さを物差しとして周囲環境の硬さを測っていることが分かってきた。

本研究では、培養細胞が突起を細胞外環境中に伸展させる際に、周囲環境の力学的な要因が果たす役割を明らかにすることを旨とした実験的な研究および技術開発を行った。神経細胞をコラーゲンゲル中で培養するとともに、薬剤を封入できるベシクルを油水界面通過法により作製し、これらを3次元培養ゲル中に配置させるための技術開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Cellular forces and intra- and extra-cellular environments profoundly affects various cell behaviors. Recently, it has been understood that cells measure the rigidity of surrounding media using their own stiffness as a reference. In this study, we performed microrheology study in order to investigate the unique mechanism of the mechano-taxis during the axonal growth guidance. We cultured neurons in collagen gels together with the vesicles and microgels including the chemical cue for the axonal growth. We further developed the technology in order to control the 3D arrangements of cells and microgels.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：rigidity sensing マイクロレオロジー 神経突起 3次元培養 ベシクル 軸索伸張

1. 研究開始当初の背景

細胞は周囲環境からの生化学信号だけでなく、力学的な性質(硬さや力)にも依存して自らの振る舞い(遊走、分化、成長、分裂)を決定する。しかしながら細胞が周囲環境の力学的性質を計測する(rigidity sensing)メカニズムは長く不明であった。最近申請者らは、生体媒質中に分散させたコロイド粒子の揺らぎと応答を同時観測することで、1) "揺動散逸定理の破れ"として生体の"自発的力生成"と、2)媒質の力学的性質とを同時に求める手法を開発した(active/passive マイクロレオロジー)。さらに本手法を生きている細胞に適用して、細胞が生成した全ての力、および、そのうち周囲環境への伝達した成分(牽引力)とを初めて同時に定量化した。その結果、細胞が生成した力が外部環境へ伝達する効率は、自らと周囲環境の力学的性質の比に依存して大きく変化することを見出した。つまり細胞は、自他の境界(細胞膜)上に存在するセンサーで牽引力を検出することで、自らの硬さを物差しとして周囲環境の硬さを測っている。申請者らは、こうした原理に基づき多くの動物細胞が示す力学適応や力学遊走等の振る舞いを説明するメカニズムを提唱している。

2. 研究の目的

本研究では、細胞が突起(例えばニューロンの軸索)を伸長させる際に、周囲環境の力学的要因が果たす役割を究明することを目指した実験的研究を行う。そのために

(1)脳内環境を模した柔らかいゲル中でニューロンを3次元培養しつつ、SLM(空間位相変調素子)を用いた多点同時光トラップにより周辺ゲル中に力学的・生化学的場を自在に形成し、これらの制御された場が軸索の伸長の向きや速度に与える影響を系統的に観測するための技術開発を行う。さらに、

(2)周辺ゲルに配置したコロイド粒子の3次元力学応答を精密計測することで active/passive マイクロレオロジーによりニューロンが生み出す応力場を求める。これらの観測結果に基づき、ニューロンが柔らかい空間中を軸索伸長させる際に、他の細胞とは異なる動作決定を行う機構を究明するための実験的な知見が得られると期待される。

3. 研究の方法

(1)内部に軸索伸長を誘導する薬剤を封入したベシクルを油水界面通過法により収率良く作製した。ベシクル中には硬質の水

和ゲルも封入することで力学的安定性を付与するとともに、屈折率を周囲媒質よりも高くすることで光トラップや顕微鏡観察が容易になった(Fig.1)。また、SLM(位相変調素子)を用いた光トラップにより捕捉対象物を3次元空間中の任意の位置に配置する技術を開発する。SLMは液晶ディスプレイと同じ作動原理により、各ピクセルに入射した光の位相を8bit分解能で操作することで光の伝搬を制御して、例えば複数の集束点を形成することができる。

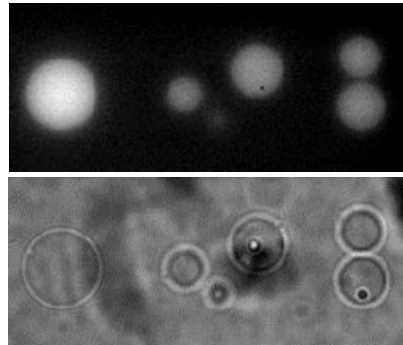


Fig.1 ベシクルの蛍光像と明視野像

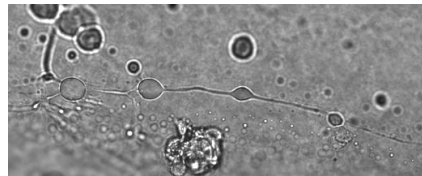


fig. 2 コラーゲンゲル中で連結した細胞

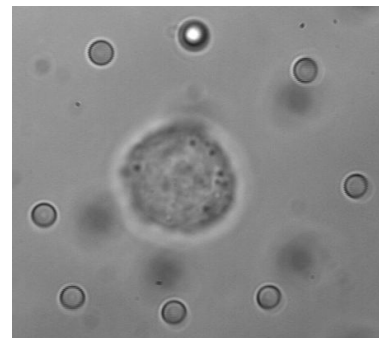


Fig.3 細胞と粒子の多点同時光トラップ

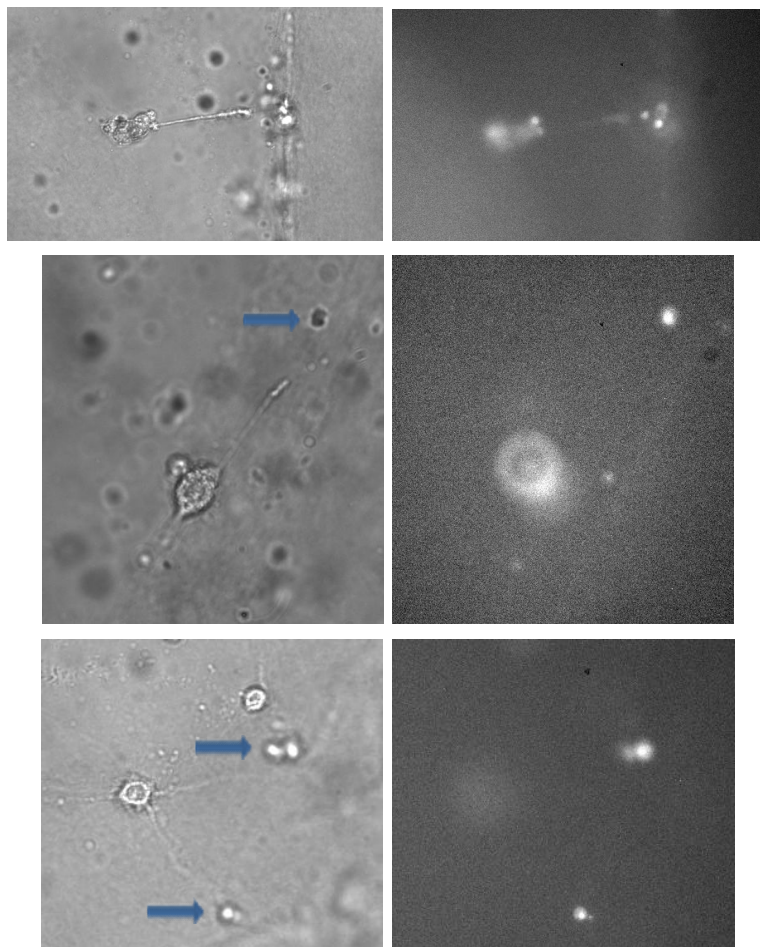
4. 研究成果

上述の通り、細胞は周囲環境の力学的性質を知覚してその挙動を変化させる。本研究ではさらに培養骨細胞が細胞突起を伸長させる際に、周囲環境の力学的要因が果たす役割を明らかにすることを目指した予備的な研究を行った。そのために生体環境を模したコラーゲンゲル中で3次元培養した細胞突起の伸張を誘導する薬剤を封入したベシクルを油水界面通過法により作製し、これを細胞とともに3次元培養ゲル中に分

散させた。ベシクルから徐放される誘導剤の空間的濃度勾配を感知して、付近に分散させた細胞がベシクルに向かって細胞突起を伸張させることが期待される(Fig.2)。

さらに SLM(空間位相変調素子)を用いた多点同時光トラップ行い、細胞とベシクルの配置を自在に制御することを可能にした(Fig.3)。これは、様々な種類の細胞を意のままに配置して、結合させるためのきそ技術である。また、同時に3次元培養ゲル中に屈折率の高いコロイド粒子を分散させておけば、これらを同時にトラップすることで、3次元培養ゲル、あるいは細胞自身の任意の部位を多点同時に力学刺激できる。

作製したマイクロゲルに神経細胞の軸索伸張を誘導する薬剤(NGF)を封入し、コーゲンゲル中で神経細胞とともに培養した。



NGF を封入したマイクロゲルに向かい、軸索を伸張させていることを示唆する種々の観察結果がえられた(図4)。得られた結果の統計解析や、NGF 放出の定量解析等が今後の課題である。

(2)

真核生物の細胞内外には細胞骨格や細胞外ゲルと呼ばれる繊維状のタンパク質重合体からなるネットワークが張り巡らされている。これらのゲル状物質は、外部環境か

ら加えられた力、あるいは内部で自発的に生じた力を受け止めて、さらには別の場所(例えば細胞膜上の力学受容体)に伝播させることで、細胞や器官の様々な振る舞いに影響を与える。細胞内外における力学刺激と、それに対する生理的応答は共にミクロなスケールで進行するために、そのメカニズムを理解するにはまず微視的な応力の存在下における細胞骨格の微視的な力学応答を調べる必要がある。

そこで本研究では、中間径フィラメントであるビメンチンゲルの内部に分散させた直径2ミクロンのコロイド粒子を光トラップし、微視的な空間スケールの力の単極子を生成させた。そこから数ミクロン離れた場所に存在するコロイド粒子の熱揺らぎを観測することで(マイクロレオロジー)、周辺のビメンチンゲルの力学特性を求めた。その結果細胞骨格ゲルの力学応答は加えられた力に依存して大きく変化し(非線形硬化現象)これによりシステムの対称性が破れて異方的な特性を示すことが分かった。

我々は、得られた実験結果は空間スケールによらない変形(affine 変形)を仮定した力学モデルでは全く理解することができないことを示した。構成高分子の持続長が架橋点間距離よりも長い細胞骨格においては、巨視的なスケールの変形と架橋点間距離程度の変形が異なること(非-affine)は、十分にあり得ることである。そこで、ミクロな空間スケールにおける非-affine な変形を考慮することで、実験結果(非線形かつ異方的な力学応答)を説明する理論モデルを提示した。これにより、逆に生体物質の力学特性の変化から内部に残留する応力を推定することが可能であることが示唆された。

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 3 件)

[1]High-frequency affine mechanics and nonaffine relaxation in a model cytoskeleton:

David Head, Emi Ikebe, Akiko Nakamasu, Peijuan Zhang, Lara Gay Villaruz, Suguru Kinoshita, Shoji Ando and Daisuke Mizuno, Physical Review E 42711 89 (2014) 査読有 <http://journals.aps.org/pre/abstract/10.1103/PhysRevE.89.042711>

[2]local mechanical response in semiflexible polymer networks subjected to an axisymmetric prestress:

David Head and Daisuke Mizuno, Physical Review E 22717 88 (2013) 査読有 (doi: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.88>).

022717)

[3][High-resolution microrheology in the pericellular matrix of prostate cancer cells:

Nadja Nijenhuis, Daisuke Mizuno, Jos A. E. Spaan, and Christoph F. Schmidt, J. Royal Soc. Interface 1742-5662 (2012) 査読有 (doi:10.1098)

[学会発表](計 44 件)

[1]水野 大介, 「揺動散逸定理を破る生き物の非平衡揺らぎの統計分布」, 第 69 回日本物理学会年次大会シンポジウム「動的ゆらぎの普遍法則」(東海大学 2014 年 03 月 28 日) 招待 口頭発表

[2]西澤賢治, 藤原慶, 柳澤実穂, 水野大介, 「細胞内部の粘性に対する多成分高分子混み合い効果の影響」, 日本物理学会 69 回年次大会 (東海大学, 2014 年 3 月 27 日).

[3]Masato Aridome, takasi kurihara, Heev Ayade, Irwin Zaid, Daisuke Mizuno, 「Non-Gauss athermal fluctuations in Bacterial bath」国際学会, 58th annual meeting of Biophysical Society, poster (Moscone Convention Center, San Francisco, USA , 2014 年 02 月 18 日)

[4]Heev Ayade, Irwin Zaid, Daisuke Mizuno, 「 Athermal Fluctuations of Probe Particles in Active Cytoskeletal Network」国際学会, 58th annual meeting of Biophysical Society, poster, (Moscone Convention Center, San Francisco, USA , 2014 年 02 月 16 日)

[5]Masato Aridome, takasi kurihara, Heev Ayade, Irwin Zaid, Daisuke Mizuno, 「 Non-Gauss athermal fluctuations in Bacterial bath」国際学会, KITP conference "Active Processes in Living and Nonliving Matter", poster (Kavli Institute for Theoretical Physics, University of California, Santa Barbara, USA , 2014 年 02 月 12 日)

[6]Heev Ayade, Irwin Zaid, Daisuke Mizuno 「 Athermal Fluctuations of Probe Particles in Active Cytoskeletal Network」国際学会, KITP conference "Active Processes in Living and Nonliving Matter", 一般, 口頭発表 (University of California, Santa Barbara, USA , 2014 年 02 月 10 日)

[7]水野大介, 「生き物の非平衡揺らぎ・混みあい効果と力学特性」, 揺らぎと構造の協奏: 非平衡系における普遍法則の確率第一回領域研究会 (KKR ホテル熱海, 2013 年 12 月 25 日 12 月 27 日) 口頭発表

[8]西澤賢治, 藤原慶, 柳澤実穂, 水野大介, 「多様な高分子の混み合い効果が

細胞内粘性へ及ぼす影響」, 第 3 回ソフトマター研究会 (首都大学東京, 2013 年 12 月 13 日)

[9]水野大介 (九大理) 「生き物の非平衡揺らぎの統計分布と力学特性」, 第 7 回物性科学領域横断研究会 (領域合同研究会) 口頭発表 (東京大学・武田ホール 2013 年 12 月 1 日)

[10]栗原喬、有留真人、水野大介「高分子ゲルの広帯域マイクロレオロジー」, 日本物理学会第 119 回九州支部例会 (久留米工業大学, 2013 年 11 月 30 日) 口頭発表

[11]有留真人、栗原喬、Heev Ayade, Irwin Zaid, 水野大介「遊走バクテリア懸濁液中における非平衡揺らぎの統計分布」, 日本物理学会第 119 回九州支部例会 (久留米工業大学, 2013 年 11 月 30 日) 口頭発表

[12]西澤賢治, 藤原慶, 柳澤実穂, 水野大介, 「細胞内の力学環境に対する分子混み合い効果」 "Molecular crowding effects on intracellular mechanical environments", 日本生物物理学会 2013 年会 (京都国際会議場, 2013 年 10 月 29 日)

[13]Zaid Irwin, Ayade Heev, Yeomans Julia, Mizuno Daisuke, 「Athermal Fluctuations of Probe Particles in Active Cytoskeletal Networks」 第 51 回日本生物物理学会年会 The 51st Annual Meeting of the BSJ, poster, (京都、アネックスホール, 2013/10/28)

[14]水野 大介 1, Villaruz Lara 1, 中益 朗子 1, 池辺 詠美 1, Head David 2 「 nonlinear stress propagation, anisotropic stiffening, and nonaffine relaxations in cytoskeletal networks」 第 51 回日本生物物理学会年会 The 51st Annual Meeting of the BSJ, poster, (京都、アネックスホール, 2013/10/28)

[15]Daisuke Mizuno, 「Levy statistics and dynamics in active cytoskeletons」国際, 15th SPVM National Physics Conference in Davao, 招待, 講演, (Davao City, Philippines, 2013 年 10 月 26 日)

[16]Daisuke Mizuno, 「Levy statistics and dynamics in active cytoskeletons」国際, 2013 SPP Physics Congress, 招待, 講演, (University of San Carlos, Cebu city, Philippines, 2013 年 10 月 24 日)

[17]西澤賢治, 藤原慶, 柳澤実穂, 水野大介, 「細胞内マイクロレオロジーに対する分子混み合い効果」, 日本物理学会 2013 年秋大会 (徳島大学, 2013 年 9 月 25 日)

[18]西澤賢治, 藤原慶, 柳澤実穂, 水野大介, 「Microrheology study of crowding effects on cell mechanics」, International Soft Matter Conference, (ローマ大, 2013 年 9 月 18 日).

[19]Heev Ayade, Irwin Zaid, Daisuke Mizuno, 「Levy statistics and dynamics in active cytoskeletons」国際学会, International Soft Matter Conference, poster (Rome Italy, 2013年09月17日)

[20]水野大介「マイクロレオロジーを用いた非平衡系(生き物)の力学計測」、ミクロからマクロへ階層を超える秩序形成のロジック 複合学研究会(淡路夢舞台国際会議場、2013年8月26日 28日)

[21]水野大介、「生体ソフトマターの非平衡力学計測システムの開発」、2013 旭硝子財団助成研究発表会(ホテルグランドヒル市ヶ谷、2013年7月29日)

[22]Daisuke Mizuno, 「Levy statistics and dynamics in active cytoskeletons」国際, 研究会, Taiwan International Workshop on Biological Physics and Complex Systems (BioComplex-Taiwan-2013), (national Taiwan University, 2013年07月19日)

[23]Rigidity sensing and active cytoskeleton (invited):Daisuke Mizuno Regional Bio-Soft Matter Workshop-2011, National Taiwan University, Taipei, 2013 July 18

[24]西澤賢治, 藤原慶, Marcel Bremerich, 柳澤実穂, 水野大介, "Glass-like behavior in cells", 7th Mini-Symposium on Liquids, (九州大学, 2013年7月6日)

[25]水野大介「細胞集団が形成する組織の非線形・非平衡メカニクスと自発生成力の観測」、ミクロからマクロへ階層を超える秩序形成のロジック 2013 年度班会議(淡路夢舞台国際会議場、2013年6月12日 14日)

[26]西澤賢治, 藤原慶, 柳澤実穂, 水野大介, 「マイクロレオロジーを用いた細胞内部の力学特性の研究~分子の混み合い効果~」, 第一回西日本非平衡ミニシンポジウム,(九州大学, 2013年5月31日)

[27]Feedback-enhanced Microrheology : HEEV AYADE, MARCEL BREMERICH, HIROSHI ARIMATSU, DAISUKE MIZUNO APS March meeting 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 March 20

[28]Nonlinear force propagation, anisotropic stiffening and non-affine relaxation in a model cytoskeleton : D. Mizuno APS March meeting 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 March 20

[29]Athermal Fluctuations of Probe Particles in Active Cytoskeletal Networks : HEEV AYADE, IRWIN ZAID, DAISUKE MIZUNO APS March meeting 2013, Baltimore, Maryland,

USA, 2013 March 20

[30]マイクロレオロジーを活用した塗膜構造形成過程の理解: 水野大介 平成 24 年度先端膜工学研究推進機構春季講演会、神戸大学、2013 3・5

[31]Nonlinear force propagation, anisotropic stiffening and non-affine relaxation in a model cytoskeleton : D. Mizuno Self-organization and Emergent Dynamics in Active Soft Matter Kyoto, Japan, Feb. 18(Mon.) - 20(Wed.), 2013

[32]フィードバック増強 active/passive マイクロレオロジーによる細胞骨格の力学計測: Marcel Bremerich, 有松寛, 水野大介 第 118 回日本物理学会九州支部例会、2012 年 12 月 8 日

[33]広帯域マイクロレオロジーにより観測される細胞骨格の非線形かつ異方的かつ非アファインな力学応答: 水野大介, David Head 第 118 回日本物理学会九州支部例会、琉球大学 2012 年 12 月 8 日

[34]Athermal Fluctuations of Different Probe Sizes in Active Cytoskeletal Networks : Heev Ayade, Irwin Zaid, 山本匠, 豊田聖啓, Peijuan Zhang, Julia Yeomans, 水野大介 第 118 回日本物理学会九州支部例会、2012 年 12 月 8 日

[35]揺動散逸定理を破る非平衡揺らぎの時空間構造(招待講演): 水野大介 第 17 回久保記念シンポジウム「ゆらぎのなかの構造」東京、2012 年 10 月 6 日

[36]力生成する細胞(骨格)が示す非平衡揺らぎの統計分布(招待講演): 水野大介 第 2 回ソフトマター研究会, 福岡, 2012 年 9 月 26 日

[37]AFM Probing Opioid Signalosome on Neuroblastoma : Lara Villaruz, Junhua Li, Catherine Tardin, Daisuke Mizuno 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋大学、2012 年 9 月 24 日

[38]Non-Gauss athermal fluctuations in active cytoskeletons (invited) : D. Mizuno The 50th Annual Meeting of the BJS, Symposium "Living matter far from equilibrium: from DNA to cytoskeletons and cells" Nagoya, Japan, 2012 年 9 月 23 日.

[39]Feedback-enhanced active-passive microrheology in cells : 有松寛, Bremerich Marcel, 水野大介, Ayade Heev, Zhang Peijuan 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋大学、2012 年 9 月 23 日

[40] Athermal Fluctuations in Active Cytoskeletal Networks Follow Truncated Levy Distribution: Ayade Heev, 山本匠, 水野大介

第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋大学、2012 年 9 月 23 日

[41] Force transmission and anisotropic stiffening of reconstituted cytoskeletons: Head David, 池辺詠美, 中益朗子, Zhang Peijuan, 安藤祥司, 水野大介, 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋大学、2012 年 9 月 22 日

[42] Anisotropic stiffening of cytoskeletons by local force transmission : D. Mizuno
Physcell 2012, Hyeres, France, Sep. 2-8, 2012

[43] Non-Gauss a-thermal fluctuations in active cytoskeletons (invited) : D. Mizuno
Biological & Pharmaceutical Complex Fluids: New Trends in Characterizing Microstructure, Interactions & Properties
An ECI Conference, Tomar, Portugal, 2012 年 8 月 1 日 .

[44] 細胞（骨格）の非平衡揺らぎと非線形かつ異方的かつ非 affine な力学応答: 水野大介, 第 2 回ソフトな物工の未来を考える会、かずさアカデミアホール 千葉 2012.7.7

〔その他〕

ホームページ等

<http://sleipnir.sci.kyushu-u.ac.jp/mizuno/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 大介 (MIZUNO, DAISUKE)
九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：30452741