

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680049

研究課題名(和文)炎症沈静・慢性化の根幹機構の解明：システムメカノバイオロジーの創成へ

研究課題名(英文)Transient/sustained activation of pro-inflammatory signaling that depends on cellular mechanical forces

研究代表者

出口 真次(Deguchi, Shinji)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30379713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症自体は免疫反応によるものであるが、原細胞における炎症「促進」反応の沈静化と慢性化には、力学的な力が関与することを実証するのが本研究の目的である。力は細胞-基質間接着(焦点接着斑)へと物理的に作用するため、本研究では焦点接着斑を構成するタンパク質の一つpaxillin(および炎症促進に関わるそのチロシン残基pY118のリン酸化)に特に注目して力が及ぼす影響を調べた。その結果、力(細胞収縮力)が弱い条件ではpY118のリン酸化レベルが有意に高く、rac1の活性化を導いて炎症を促進する反応を起こすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Inflammation is associated with the immune response in the body, but here we hypothesize that pro-inflammatory signaling within tissue cells is regulated by mechanical forces in a manner independent of the immune response. We particularly focus on a particular protein, paxillin, which constitutes cell-substrate adhesions or focal adhesions where cellular contractile forces are constantly exerted. Tyrosine phosphorylation of paxillin is significantly increased upon reduction in cellular contractile forces, which then activates rac1 and induces pro-inflammatory response. These results show that cells exhibit chronic and transient activation of pro-inflammatory response in the absence and presence of contractile forces, respectively.

研究分野：生体医工学

キーワード：張力ホメオスタシス 適応 メカノコントローラー メカノバイオロジー 非筋II型ミオシン 焦点接着斑

1. 研究開始当初の背景

炎症の慢性化は動脈硬化など深刻な病気に深く関与している。炎症は生体の防御反応であり、通常一過性に沈静化するものの、何らかの原因で持続し、ひいては慢性化することが問題となる。炎症の慢性化は多くの組織で起こりうるが、それは免疫系の異常に関わる問題として研究されるのが一般的である。しかし、炎症を促進する原細胞自体に異常があり、その炎症促進反応の沈静化機構に破綻が起こるために慢性化を導くとの考えも存在する。特に、昨今のメカノバイオロジー研究の進展から、細胞の機能に物理的な力が重要な役割を果たしていることが分子レベルで明らかになりつつある。それらの背景のもと、本研究は原細胞における炎症促進反応の沈静化・慢性化と力の関係に注目するものである。

2. 研究の目的

炎症自体は免疫反応によるものであるが、原細胞における炎症「促進」反応の沈静化と持続化には、力学的な力が関与するケースがあることを示すことが本研究の目的である。特に、非免疫細胞を用いて個々の細胞レベルで起こる炎症促進シグナル伝達経路の活性化と不活性化が、細胞内の力学的状態に基づいて説明できることを示す。

3. 研究の方法

非免疫細胞に作用する力を人為的に操作もしくはモニタリング(可視化)しながら、炎症促進に関わる分子の活性化について調べる。通常、細胞内もしくは細胞が発生する微小な力を可視化もしくは評価することは容易ではないために、それを可能にする新しい手法の開発に取り組むとともに、それらを可視化せずとも人為的に力の状態を調節できる方法も開発する。また、細胞が力を受け、もしくは力を支えて、それを炎症促進シグナルへと変換する細胞内要素として焦点接着斑(細胞-基質間接着)に着目し、中でも paxillin を対象としてその応答を調べる。

4. 研究成果

マイクロパターンングと呼ばれる、細胞の力学的状態を人為的に調節できる新しい方法を開発した。これは細胞接着領域の調節により、細胞形態を強制的に規定するとともに、細胞内部の焦点接着斑の極性を特定の方向ひいては細胞発生力の大きさを定めることができるものである。

本方法を用いてヒト骨肉腫 U2OS 細胞と胚性血管平滑筋細胞 A7r5 細胞における力と炎症促進シグナルの持続化の関係を調べた。まず paxillin のチロシン残基 118 番目のリン酸化レベルが、細胞発生力と高い負の相関があることがわかった。これは上記のマイクロパターンング技術を用いて細胞の辺縁部に沿った力の勾配を調べ、paxillin の上記リン

酸化は抗体を用いた染色強度に基づき調べることによって明らかにしたものである。また、焦点接着斑の極性と細胞の長軸方向を人為的にそろえずに、力を出せない状態(張力に関するホメオスタシスを達成できない状態)を作ったところ、異常な規模のラメリポディアの発生が現れた。そこで炎症促進シグナルにも関連のある rac1 の特異的阻害剤で処理したところ、この異常なラメリポディアは抑えられた。つまり、細胞が力を出せない、より詳細には、細胞が張力ホメオスタシスを達成できない場合には、paxillin が脱リン酸化し、焦点接着斑が構造的に成熟せず、RhoA の活性化が抑えられ、RhoA に相反する役割を有する rac1 が持続的に活性化されたと考えられる。このように張力を出し続けることができない場合、その細胞は炎症反応を促進し続ける状態にあると言える。

また、上記の細胞が物理的力を出し続けることができない場合、分子的にどのような状態にあるのかを詳しく調べた。ここでも新しい人為的細胞状態操作・計測方法を開発した。その結果、まず上でも述べた通り、細胞の長軸方向と焦点接着斑の極性が一致しない場合に力を出しにくくなり、rac1 が活性化することがわかった。これは培養細胞を用いた実験系ではあるが、体内で想定される状況とは、例えば細胞周囲の細胞外マトリクスや何らかの物理的制約により細胞の形態が主要な焦点接着斑と同一方向にとることができない場合などが考えられる。このように例えば周囲の力学環境の都合により細胞が自由に形態を取りづらいう状態では、炎症を促進する可能性がある。また、別の実験において、例えば A7r5 細胞などの間葉系細胞の場合では細胞焦点接着斑は数百ナノメートルのサイズをとるが、それが何らかの理由により大きさの拡がりに制限が設けられた場合にも paxillin のリン酸化レベルが下がり、ひいては炎症促進経路が活性化することがわかった。つまり、焦点接着斑という細胞内の構造に対しても、自由な構造的拡がりに制限がある場合には、細胞自体の拡がりに制限があるときと同様な炎症促進反応活性化が起こることがわかった。焦点接着斑は細胞内で力を支える要素であるために、その大きさに制限があるということは力を支えづらく、それが生化学反応に変換されて、免疫細胞など周囲に助けを求める状態に移行するものと想像される。

本研究で着目した力による細胞の機能調整のメカニズムは、メカノバイオロジーという研究分野名のもと高く注目され始めている。本研究も上記の通り、物理的に密接に関連した炎症促進作用の活性化・持続化機構が存在することを強く示唆する結果が得ることができ、今後さらに重要で本質的な結果を導くための基礎を築くことができた。

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4件)

1. Saito, A.C., Matsui, T.S., Ohishi, T., Sato, M., Deguchi, S., Contact guidance of smooth muscle cells is associated with tension-mediated adhesion maturation. *Experimental Cell Research*, 327, 1-11, 2014.
2. Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., Microcontact peeling as a new method for cell micropatterning. *PLOS ONE*, 9, e102735, 2014.
3. Deguchi, S., Nagasawa, Y., Saito, A.C., Matsui, T.S., Yokoyama, S., Sato, M., Development of motorized plasma lithography for cell patterning. *Biotechnology Letters*, 36, 507-513, 2014.
4. Saito, A.C., Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S., Aligning cells in arbitrary directions on a membrane sheet using locally formed microwrinkles. *Biotechnology Letters*, 36, 391-396, 2014.

[学会発表](計14件)

1. Deguchi, S., Matsui, T.S., Komatsu, D., Kaunas, R., Sato, M.: Contractile properties of single stress fibers. BMES CMBE (Cellular & Molecular Bioengineering) 2013 Annual Meeting, Puerto Rico, Jan 2-5, 2013.
2. Sakamoto, N., Anno, T., Chubachi, S., Deguchi, S., Sato, M.: Role of Nucleus-Actin Filament Binding in Endothelial Cell Responses to Cyclic Stretching. International Symposium on Bio Medical Engineering Interface, Sendai, Mar 15, 2013.
3. Deguchi, S., Matsui, T.S., Saito, A.C., Sato, M.: Subcellular localization of focal adhesion proteins are determined by traction stress-dependent positive regulation. 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, Seoul, Aug 29-31, 2013.
4. Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Functional extraction of actin stress fibers for contractile force measurements in vitro. 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, Seoul, Aug 29-31, 2013.
5. Matsui, T.S., Deguchi, S.: In vitro contraction analysis of stress fibers isolated from aortic smooth muscle cells, 2013 American Society of Cell Biology Annual Meeting, New Orleans,

Dec 14-18, 2013.

6. Deguchi, S., Matsui, T.S.: A new micropatterning for the study of cellular morphogenesis, 2014 CMBE Conference, San Diego, Jan 7-11, 2014.
7. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Araki, T., Ohishi, T.: An alternative method for traction force microscopy. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
8. Matsui T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Biophysical properties of single actin stress fibers isolated from cultured smooth muscle cells. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
9. Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.: Development of a new technique for cell micropatterning. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
10. Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.: A novel cell micropatterning technique to circumvent direct adsorption of proteins to PDMS. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
11. Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Load-dependent contractile force generation of actin stress fibers. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
12. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Araki, T., Ohishi, T.: Force balance in mesenchymal cells revealed by new traction force microscopy. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
13. Deguchi, S.: Active biophysical properties of cells and subcellular components. 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Nov 9-12, 2014.
14. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S.: Force microscopy developed for screening studies on cultured cells. The 62nd NIBB Conference, Force in Development, Okazaki, Nov 17-19, 2014.

[図書](計3件)

1. バイオメカニクスの最前線. 編者 村上輝夫, 共立出版, 2013: 出口真次, 第2章 細胞による外力感知・適応のメカニズム pp. 7-40.
2. Dojin Bioscience シリーズ・メカノバイオロジー. 編者 曾我部正博, 化学同人: 出口真次, 松井翼, 佐藤正明, 第2章 細胞における力の発生と維持機構, 印刷中.

3. Vascular Engineering: Understanding of maintenance and treatment by multidiscipline approach. Editors: Tanishita, K., Yamamoto, K., Springer: Kaunas, R., Deguchi, S., Chapter 6. Cyclic stretch-induced reorganization of stress fibers in endothelial cell, in press.

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称 : 接触物体が発生する力の計測方法およびこれを用いたスクリーニング方法
発明者 : 出口真次, 横山奨, 松井翼
権利者 : 名古屋工業大学
種類・番号 : 特願 2013-271755
出願年月日 : 2013 年 12 月 27 日
国内外の別 : 国内

名称 : 接触物体が発生する力の計測方法およびこれを用いたスクリーニング方法
発明者 : 出口真次, 横山奨, 松井翼
権利者 : 名古屋工業大学
種類・番号 : 特願 2014-169119
出願年月日 : 2014 年 8 月 22 日
国内外の別 : 国内

名称 : 接触物体が発生する力を可視化および/または定量化するための表面改質方法およびこれを用いたスクリーニング方法, ならびにこれら方法に用いるキット
発明者 : 出口真次, 横山奨, 松井翼
権利者 : 名古屋工業大学
種類・番号 : 特願 2014-245641
出願年月日 : 2014 年 12 月 4 日
国内外の別 : 国内

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ

<http://mbl.web.nitech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口真次 (Shinji Deguchi)

名古屋工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 30379713

(2) 研究分担者