

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24680051

研究課題名(和文)細胞の力学応答機構解明のための細胞骨格～核膜～DNAの力学的相互作用の解析

研究課題名(英文)Biomechanical analysis of the nuclear-cytoskeletal interactions to elucidate the cellular mechanotransduction mechanism

研究代表者

長山 和亮(NAGAYAMA, KAZUAKI)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：10359763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞の力学応答機構を解明する観点から、特に血管平滑筋細胞を対象として、細胞骨格と核膜、核膜とクロマチン間の結合に着目し、これらの力学的相互作用と細胞の機能発現との関連性を明らかにすることを目的とした。平滑筋分化において、アクチン細胞骨格と核膜の結合の強化、それに伴う核内クロマチンの凝集が、細胞の収縮機能の保持に密接に関わることが見出された。また、このような平滑筋分化が実際の血管環境に近い細胞配列状態や繰返ひずみ環境でさらに促進されること、核の変形によって細胞増殖の抑制機能が発現することが示唆された。本研究により、細胞に備わる新たな「力学刺激-生化学応答変換機構」の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the roles of the nuclear-cytoskeletal interactions in vascular smooth muscle differentiation. We found that mechanical interaction between actin cytoskeleton and the nucleus significantly increased and chromatin condensation could be observed clearly during smooth muscle differentiation. The cell tissue orientation and cyclic stretch mechanical stimulation also induced the nuclear-cytoskeletal interactions and induced the smooth muscle differentiation. The results of this study will provide new prospects of cellular mechanotransduction mechanism.

研究分野：細胞バイオメカニクス、メカノバイオロジー

キーワード：細胞バイオメカニクス メカノバイオロジー 細胞骨格 細胞核 DNA メカノトランスダクション 生体計測

1. 研究開始当初の背景

細胞は、与えられた力学環境の変化に応じ機能を变化させる。例えば、血管平滑筋細胞は、正常な力学環境下の血管壁内では収縮要素に富んだ「収縮型」と呼ばれる表現型を示し、その収縮能により血管径を適切に調節している。しかし、静的無負荷状態の培養環境に曝すと、細胞骨格や核などの構造を变化させるとともに、収縮機能を著しく低下させ、増殖能、物質合成に富んだ「合成型」細胞へ变化する。合成型細胞は、動脈硬化病変部位でも確認されており、生体器官の健全性維持という観点からも、力学的作用に基づく細胞機能の変化の詳細を明らかにすることが重要となってきた。すなわち、細胞がどのようにして細胞外の力学的因子を捉え、細胞内に伝達して新たな機能を発現するのかを明らかにすることが必要不可欠である。

このような観点から研究代表者は、これまでに、細胞内の細胞骨格・核などの個々の構成要素に生じる力の大きさ・方向の変化を定量解析する手法の確立に取り組んできた。この過程で、収縮性の細胞骨格であるアクチンストレスファイバに起因する細胞内の張力によって、細胞内の核に圧縮力が作用していることを明らかにした。さらに、細胞内張力の変化に応じて核の3次元形態がダイナミックに変化することや、核と細胞骨格が強固に結合している可能性を世界に先駆けて見いだしてきた。

このような細胞骨格と核との力学的な相互作用は、細胞の機能発現過程にも密接に関与している可能性が高い。すなわち、細胞骨格と核膜との間の力学的結合を介し、細胞骨格に生じる力の変化が直接的に核膜に伝達され、核膜内面に配置されたDNA（正確にはクロマチン）の分布や、様々な遺伝情報がコードされたDNAの転写領域にすら変化を引き起こすといった可能性が考えられる。しかし、これらは、現状では全く明らかとなっていない。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、細胞骨格～核膜～クロマチン間の力学的相互作用を計測・定量化する手法を確立し、血管平滑筋細胞が自身の機能を大きく变化させる分化・脱分化の過程で、これらの力学的相互作用がどのように変化するのか、特に細胞の収縮性・増殖性の変化との関連性を可能な限り明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料：試料には、研究代表者が力学特性などのデータを多く蓄積するラットやブタの胸大動脈平滑筋細胞を適用した。

(2) 細胞骨格と細胞核の力学的結合状態の定量化：まず、これまでに構築したパルスレーザーによる細胞骨格切断システムを改良し、核周辺の細胞骨格を切断したときの核の移動、核膜の変形およびクロマチンの3次元分布のダイナミクスを詳細に観察できる系を構築する。このために新規にニポウ式の高速共焦点スキャナを導入した。そして、予め蛍光プローブでクロマチンを可視化しておき、細胞骨格を切断して力を解放した後の核の移動量や変形量、核膜直下のクロマチン分布の変化に着目し、細胞骨格の張力との相関があるかどうか詳しく解析した。

(3) 血管平滑筋分化・脱分化過程における細胞骨格と核膜の結合変化の理解：動脈組織から単離した直後の平滑筋細胞を、血清含有培地で培養すると、増殖性の高い合成型細胞に脱分化していく。この過程において、細胞骨格の分布様態や核の3次元形態ならびに、原子間力顕微鏡を用いて核の力学特性の変化を詳しく調べた。

また、これらの脱分化した培養血管平滑筋細胞に対し、インシュリン等の生存因子を添加した無血清培地中で培養することで、再度、平滑筋分化を促進させることができる。この過程において、細胞核周辺のアクチンストレスファイバの3次元的な分布様態を共焦点顕微鏡で詳細に調べた。また、レーザーアブレーションシステムを利用して、個々のアクチンストレスファイバを切断したときの収縮量や、核の移動量を定量解析して、細胞骨格の張力の変化や、核膜との結合状態の変化を考察した。

(4) 血管内力学環境を模擬した培養系の確立と細胞骨格～核膜～クロマチン間の力学的相互作用の解析：実際の動脈壁内では、血管平滑筋細胞が血管の円周方向に配列し、拍動に起因する周期的なひずみ環境に曝されている。このような力学環境を考慮した培養系の確立を目指した。そして、実際の血管組織内に近い状態で細胞を配列させながら培養し、細胞内のアクチン細胞骨格と核膜との結合状態と核内のクロマチンの凝集変化を詳しく解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格と細胞核の力学的結合状態の定量化：血管平滑筋細胞に対し、予め GFP アクチンを導入して、細胞内のストレスファイバを蛍光可視化した。また、細胞核内の DNA を Hoechst33342 で同様に可視化した。そして、パルスレーザーによる細胞骨格切断システムを活用して、細胞内の個々のストレスファイバを切断し、その後のファイバの収縮挙動と核のダイナミクスを詳細に解析した。核の上面のストレスファイバには、核膜表面に強

く押し付けられているものや、滑らかに核膜を覆っているものなど、様々な様子が見られたので、これらの違いと、切断後のファイバの収縮量や核の移動量に着目して詳しく調べた(図1)。そして、ストレスファイバの収縮挙動の核の移動力を考慮した粘弾性モデルを提案し、これを用いて、ストレスファイバと核膜の結合力を定量化した。その結果、核膜に押し付けられているストレスファイバの方が、その他のストレスファイバに比べて、張力が2倍以上高く、核膜との結合力も有意に高いことが明らかとなった(図2)。

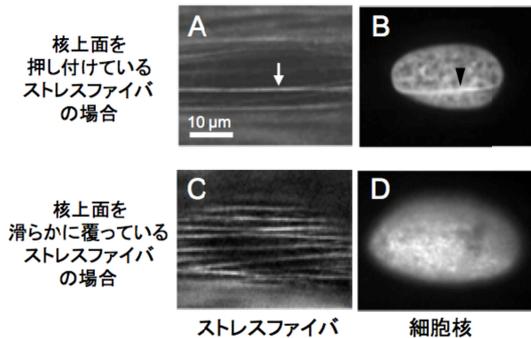


図1：培養血管平滑筋細胞の細胞核と核上に分布するアクチンストレスファイバ。

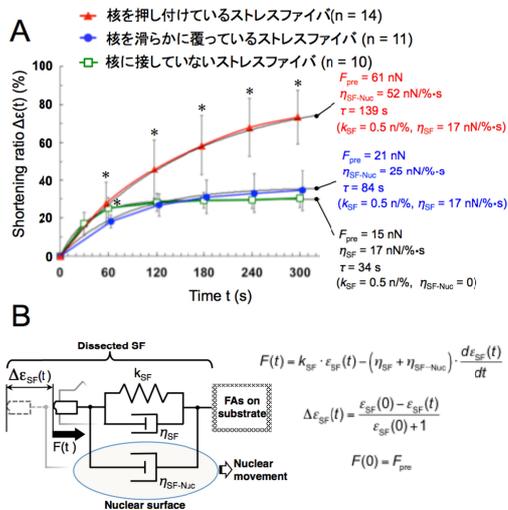


図2：(A)レーザーで切断した個々のストレスファイバの収縮挙動。(B)ストレスファイバと核の結合力を定量化するための粘弾性モデル。

(2) 血管平滑筋分化・脱分化過程における細胞骨格と核膜の結合変化の理解：動脈組織から単離した直後の平滑筋細胞を血清含有培地で培養して脱分化させながらストレスファイバの分布様態と核の3次元形態の変化を詳しく調べた。脱分化が進み合成型細胞へと変遷していくと核の面積、高さ、体積が増えて核が肥大化し、遺伝子の転写空間の増加が示唆された。一方、このような合成型細胞

でも、細胞同士が密着すると増殖が抑えられ、核の体積が半分程度まで減少した。また、合成型細胞への変遷が進むと、核周辺のアクチン細胞骨格による拘束が弛んでいく結果が得られた。一方で、核の弾性率には大きな変化が見られなかったが、合成型細胞では変形の際の核の粘性が有意に高くなった。

続いて、これらの脱分化した培養血管平滑筋細胞に対し、インシュリン等を添加した無血清培地中で培養し、再度、平滑筋分化を促進させた。すると、平滑筋収縮薬に対する反応が格段に向上し、収縮活性化時の張力が、合成型細胞に比べ倍増することが分かった。また、核の面積の減少が見られるとともに、核上では発達したストレスファイバが観察され、ストレスファイバが核膜に顕著に押しこまれている細胞が増加した。さらに、ストレスファイバに沿って核内のDNAが直線状に集積している細胞が多く見られた(図3)。一方で、このように収縮型へと分化した平滑筋細胞内のストレスファイバをレーザーで切断してみると、合成型細胞に比べ収縮量が減少した。すなわち、平滑筋分化が促進すると、待機状態でのストレスファイバの張力は比較的低いレベルを保つようになるが、収縮活性化時にはより大きな張力を発揮するように変化していくと考えられた。

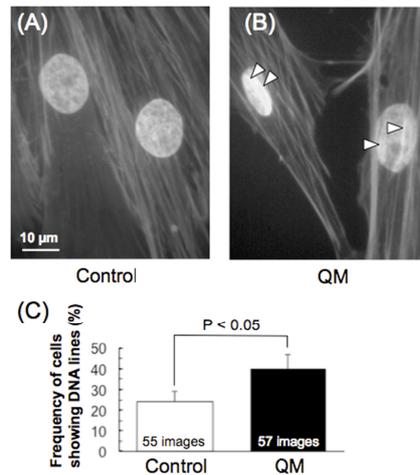


図3：合成型平滑筋細胞内(A)および収縮型へと分化促進させた平滑筋細胞内(B)の核とストレスファイバの蛍光画像の代表例。収縮型へと分化促進すると、核を上から押し付けるストレスファイバが増加し、それによってDNAが直線状に分布する細胞が有意に増加する(C)。

(3) 血管内力学環境を模擬した培養系の確立と細胞骨格～核膜～クロマチン間の力学的相互作用の解析：血管壁内構造と力学環境を考慮しつつ、細胞組織の3次元構造を詳細に観察するための実験系を構築した。このために、血管平滑筋細胞を一様に配列・組織化

させる技術を考案した。具体的には、独自のコラーゲン配列技術を編みだし、シリコーン弾性膜上に微細な溝構造を持ったコラーゲン基質を作製して、このコラーゲンの微細溝方向に細胞を一様に配列させて組織化させることに成功した。細胞を配列・組織化させる(図4)ことによって、細胞内の核の形態が in vivo と同様に細長い形態に変化し、ストレスファイバが核を取り巻くように分布を変化させることが分かった。また、核内のクロマチンの凝集が促進されることが分かってきた。

さらに、実際の血管壁内の動的な力学環境も考慮し、拍動と血圧変動を模擬して、細胞組織に引張りひずみを負荷しながら細胞内を詳細観察する実験系も構築した。顕微鏡観察型のストレッチシステムを開発し、上記の配列化細胞組織を顕微鏡下で保温しながら連続観察できるように改造した。そして、細胞運動方向に対して、伸展率10%、周波数1Hz程の繰り返しひずみを様々な方向から負荷したときの変化を調べた。平坦なコラーゲン組織上では引張方向に対して直交する方向に細胞が遊走・分裂をして、組織を形成していくが、一様に配列化させた組織の場合は、ひずみ方向を変化させても、その配列状態が維持されることが分かった。

以上のように、細胞間の接着や配列、さらに生体内で生じている繰り返しひずみによって、細胞骨格と核膜との結合状態が強化され、核内のクロマチン凝集を促進させるといった、新たなメカノトランスダクション機構の存在が示唆された。

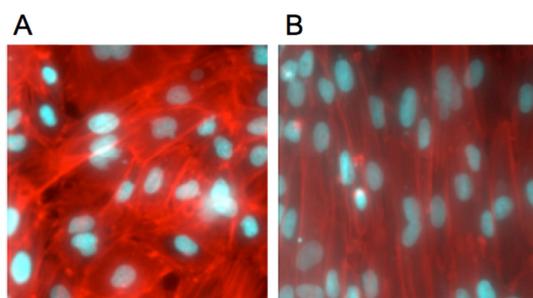


図4：通常の静置培養状態(A)と、独自のコラーゲン基質配列技術を利用して配列組織化させた平滑筋細胞(B)。実際の血管組織内と同様に細胞が配列化し、細胞核が細長い形態へと変化する。

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23件)

Wang J, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T:

Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, doi.org/10.1299/jbse.15-00637, (in press, 2016年発行予定)【査読あり】

王軍鋒, 杉田修啓, 長山和亮, 松本健郎: 細胞の基板接着・伸展過程における焦点接着斑の形態変化の解析, *生体医工学*, (印刷中, 2016年発行予定)【査読あり】

Matsumoto T, Sugita S, Nagayama K: Chapter 6.4 Tensile Properties of Smooth Muscle Cells, Elastin and Collagen Fibers, *Vascular Engineering* (Tanishita K and Yamamoto K, eds), ISBN: 978-4-431-54800-3 (Print)

978-4-431-54801-0 (Online), Springer (2016)【依頼総説, 査読あり】

Nagayama K, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: Mechanical trapping of the nucleus on micropillared surfaces inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells but not cervical cancer HeLa cells, *Journal of Biomechanics*, 48(10), 1796-1803, (2015)【査読あり】

Nagayama K, Saito S, Matsumoto T: Multiphasic stress relaxation response of freshly isolated and cultured vascular smooth muscle cells measured by quasi-in situ tensile test, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 25(3), 299-312, (2015)【査読あり】

長山和亮: 弾性マイクロピラー基板を用いた細胞張力の定量解析と細胞内の核に加わる力の推定, *日本機械学会論文集*, 81(824), 14-00692, (2015)【査読あり】

大橋俊朗, 長山和亮, 工藤奨: 高度物理刺激と生体応答(3)～力学刺激による細胞応答と応用 その1～, *養賢堂「機械の研究」*, 67(10), 884-892, (2015)【依頼解説, 査読あり】

長山和亮, 松本健郎: 組織再生に向けた細胞のメカノトランスダクションの理解とその制御, *ファルマシア*, 51(11) 1066-1068, (2015)【依頼解説, 査読あり】

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: 細胞骨格・核のメカノトランスダクションとその解析技法: □アクチンストレスファイバーから核への力の伝達, *細胞工学* 33 (9), 922-927, (2014)【依頼解説, 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, Kobayasi 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】

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】

Matsumoto T, Nagayama K: Tensile properties of vascular smooth muscle cells: Bridging vascular and cellular biomechanics (Review), *Journal of Biomechanics* 45-5, 745-55, (2012) 【査読あり】

(ほか6件)

〔学会発表〕(計60件)

長山和亮: 細胞核の変形の生理学的意義に関する実験的考察, 日本機械学会バイオエンジニアリング講演会, 東京, 2016.

1. 9-10.

長山和亮: 繰返引張ひずみ場での細胞組織の再配列原理の理解, 日本機械学会M&M2015 材料力学カンファレンス, 東京, 2015.11.21-22

Nagayama K: Nuclear-cytoskeletal Interactions in Vascular Smooth Muscle Cells: Possible Roles in the Regulation of Cell Differentiation, The International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics 2015 (ATEM'15), OS18-1, Toyohashi, 2015. 10. 4-8.

Wang J, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T: Spatiotemporal Dynamics of Actin during Adhesion Process of MC3T3-E1 Cells to Substrate, The International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics 2015 (ATEM'15), OS18-3, Toyohashi, 2015. 10. 4-8.

Nagayama K, Murakami Y, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: Nuclear mechanics and mechanotransduction, -the role of the nuclear deformability in cell proliferation-, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, GS1-1, Sapporo, 2015. 9. 16-19.

Wang J, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T: Dynamics of actin filaments during adhesion process of MC3T3E-1 cells to substrate, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, PS2-13, Sapporo, 2015. 9. 16-19.

長山和亮, 濱路祐未, 佐藤祐次, 松本健郎: マイクロピラーによる細胞核の力学的拘束は正常細胞の増殖を抑制するが腫瘍細胞には影響しない, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢, 2015.9.13-15.

内田敬一, 長山和亮: 3次元環境下で培養した血管平滑筋細胞の力学情報伝達機構の解析, 第23回茨城講演会, 日立, 2015. 8. 28.

長山和亮: 微細加工基板を用いた細胞核の機械的拘束と細胞増殖性への影響, 第23回茨城講演会, 日立, 2015. 8. 28.

長山和亮: 細胞機能操作・診断ツールとしての磁気駆動MEMSデバイス開発, 第23回茨城講演会, 日立, 2015. 8. 28.

杉田修啓, 松川瞬, 長山和亮, 松本健郎: 2種のラット腹部大動脈瘤モデル間の弾性線維量と力学特性の差異, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015. 5. 7-9

矢口俊之, 河口磨紀, 杉田修啓, 長山和亮, 松本健郎: 家兔総頸動脈における in situ FMD再現系の構築, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015. 5. 7-9.

王軍鋒, 杉田修啓, 長山和亮, 松本健郎:

細胞の基板付着・伸展過程における焦点接着斑の形態変化の観察, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015. 5. 7-9.

長山和亮: マイクロピラー基板を用いた細胞核の機械的拘束と細胞増殖性への影響, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015. 5. 7-9.

長山和亮, 岩田 誠, 松本健郎: アクチン細胞骨格と核との力学的結合が血管平滑筋細胞の分化に与える影響, 日本生物物理学会第52回年会, 札幌, 2014. 9. 25-27.

王 軍鋒, 長山和亮, 松本健郎: 基板接着に伴う細胞内焦点接着斑の形態変化の観察, 日本機械学会 2014 年度年次大会, 東京, 2014. 9. 7-10.

長山和亮, 井上卓也, 松本健郎: 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基板の開発, 日本機械学会 2014 茨城講演会, 日立, 2014. 9. 5.

Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T: Analysis of the Cytoskeleton-Nucleus Mechanotransduction Pathway: Direct Force Transmission from the Actin Stress Fibers to the Nucleus, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics Shima, Japan, 2014, 9. 1-4

【招待講演】

Nagayama K, Yahiro Y, Yamazaki S, Matsumoto T: Mechanical interaction between actin stress fibers and the nucleus: Direct force transmission from the whole-cell level to the nucleus, The 7th World Congress of Biomechanics (WBC2014), C31, Boston, USA, 2014. 7. 6-11【招待講演】

Nagayama K, Iwata M, Hamaji Y, Matsumoto T: Changes in the mechanical environment of nucleus during the phenotypic changes of vascular smooth muscle cells, International Symposium on Mechanobiology 2014 (ISMB2014), Okayama, 2014. 5.20-23 .

(その他 40 件)

〔その他〕

ホームページ等

- ・ <http://biomech.web.nitech.ac.jp/top.html>
- ・ <https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/27/0002641/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI)

茨城大学・大学院理工学研究科・教授

(旧所属: 名古屋工業大学・大学院理工学研究科・

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

該当なし