

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760078

研究課題名(和文) 引張りを受ける細胞の細胞内力学場評価と力学刺激受容部位の解明

研究課題名(英文) Relationship between intracellular mechanical field and mechanosensors in stretched cell

研究代表者

佐藤 克也 (Sato, Katsuya)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・講師

研究者番号：10403651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、引張りを受ける細胞の変形および応答動態を単一細胞レベルで観察可能なデバイスを開発し、細胞の応答評価を行った。

まず、デバイスの改良を行い引張り付与時のピントずれを概ね抑制することに成功した。また、二重染色による蛍光輝度比観察法を導入することで、ピントずれに起因する蛍光輝度変化の影響をさらに低減することができた。

これらの改良によって、当初の目標であった高時間分解能での細胞応答観察が可能となり、実際に引張りを受ける細胞のカルシウム応答をこれまでにない高時間分解能でその場観察することに成功した。また、画像相関法を用いて、引張りを受ける細胞の細胞内ひずみ分布を計測する系の構築も行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel cell stretching micro device to observe cellular response to stretching stimuli with high spatial and temporal resolution.

First, we have modified our stretching device to reduce the focus drift during the stretching. And we have introduced the fluorescent ratiometric measurement to reduce influence of change in fluorescent intensity arose from the focus drift. Finally, we succeed to conduct observation of cellular response to stretching stimuli with high spatial and temporal resolution.

Second, we developed an experimental system to evaluate the intracellular strain field in stretched cell. We combined our cell stretching micro device and the image correlation method to measure the strain in stretched cell. We succeed to evaluate the strain field in the cell during stretch.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学、機械材料・材料力学

キーワード：細胞力覚 骨芽細胞 伸展刺激 力学的刺激 バイオメカニクス MEMS

1. 研究開始当初の背景

力学刺激(力や変形の負荷)に対する細胞の応答特性、およびその感知機構の解明は、バイオメカニクスにおける重要な課題である。力学刺激を細胞内部の生化学シグナルへと変換する機構としては、Ingberらによって提案された Tensegrity model があり、伸展活性(Stretch Activate:SA)チャンネルや、焦点接着、アクチン細胞骨格などが要素候補として挙げられている。このモデルは単純には、基質の変形が焦点接着からアクチン細胞骨格を経て細胞内に伝達される系として理解されている。また、個別の要素候補に対しては、例えば SA チャンネル活性と細胞膜張力との関係が評価されている。加えて、申請者らはアクチン細胞骨格の組織化度が、細胞の力学刺激感知特性に影響を与えていることを報告した。

このように、力学刺激感知機構の構成要素を個別に対象とした検討が行われている一方で、これらの要素の構造は例えばアクチン細胞骨格は、細胞内で複雑なネットワーク構造を形成している。そのために、細胞全体のレベルで見て均一なひずみが付与されたとしても、焦点接着-アクチン細胞骨格を経て細胞内に伝達される際に、細胞内微細構造レベルでは応力・ひずみの分布は不均一となり、単純な伝達系ではないことが予想される。しかしながら、現状において外部から加わる変形(力学刺激情報)が細胞内部でどのように伝達されているのか、また、細胞内のどの部位で感知されているのかその詳細な知見は未だ得られていない。

細胞が周囲の力学環境をどのように感知し、応答しているかの機構を解明するためには、細胞内微細構造を個別の対象とする検討のみでは不十分であり、各要素の動き、変形動態、働きを統合的に捉えることが不可欠である。これまで、アクチン細胞骨格などの細胞内微細構造が力学刺激情報の伝達経路であることが提案されながら、引張りを受けた際の細胞内における応力・ひずみ分布と細胞応答との関連性について検討がなされてこなかった理由の一つとして、実験観察系構築の困難さが挙げられる。細胞内微細構造レベルを可視化する高倍率観察では、引張りを受ける細胞のリアルタイムその場観察は、観察対象の剛体変位が無視できず、視野から逸脱することが障壁となって実現困難であった。そのため、細胞全体の剛体変位を伴わない局所変形を細胞に付与し、応答を観察する手法が用いられてきた。しかしながら、局所変形の付与では、応力・ひずみの分布も細胞内部の局所に限定され、その局所の変形状態を十分な精度で観察するためにはさらなる高倍率観察が必要となるジレンマに陥っていた。

そのために申請者らは、引張りを受ける細胞のその場観察を可能とする、細胞伸展マイクロデバイスを開発した。このデバイスは、引張りを付与するデバイス自体を顕微鏡視

野内に収まる程度まで小型化することで観察対象の剛体変位を低減している。このデバイスによって、申請者らは引張りを受ける細胞の高倍率観察下でのリアルタイムその場観察を実現しつつある。

2. 研究の目的

本課題では、まず、この細胞伸展マイクロデバイスを改良し、リアルタイムその場観察を実現することを目指す。その後、引張りを受ける細胞の応答が、細胞のどの部位から発生するのかを特定する。そして、実験後に固定した細胞の細胞内微細構造の詳細な画像データを取得して、そのデータからイメージベースの変形解析を行う。最終的には、引張り変形を受ける細胞の細胞内応力・ひずみ分布と、細胞応答発生部位との対応関係を検討することで、変形(力学刺激情報)が細胞内でどのように伝達され、感知されているかを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

まず、細胞伸展マイクロデバイスのピンとずれの問題を解決するためにデバイスの設計変更を行う。現在のデバイスは、可動部を軸受けによって支持している。しかしながら、この軸受け部のガタが原因となって伸展時にピンとずれが生じ、その場観察の妨げとなっていた。そこで、軸受けを弾性ヒンジに置き換えた構造に変更する。これによって、ガタを排除できるためピンとずれの抑制が期待できる。

次に、引張りを受ける細胞のリアルタイムその場観察による、カルシウム応答発生起点の特定を目指す。デバイスの改良によって引張り付与時のピンとずれ抑制が期待できるが、ピンとずれを全くなくすることは困難であると考えられる。そこで、カルシウム応答観察には、二種類の蛍光指示薬の輝度比からカルシウムイオン濃度を計測するレシオメトリー測定法を用いる。通常の蛍光観察法によるカルシウムイオン濃度測定は、一種類の蛍光指示薬を用いるが、その場合、ピンとずれが生じると細胞全体の蛍光輝度が変化するように観察されてしまい、細胞応答に起因する蛍光輝度変化を捉えられない。一方、レシオメトリー測定法では、二種類の蛍光指示薬の輝度比を用いるため、ピンとずれに起因する細胞全体の輝度変化の影響を相殺することができる。

これらに続いて、アクチン細胞骨格の詳細な画像に基づくイメージベースの変形解析系構築を行う。改良型細胞伸展マイクロデバイスをを用いることによって、引張りを受ける細胞の高時間・空間分解能でのその場観察が可能となる。そのため、細胞のカルシウム応答と同様に、細胞内微細構造を蛍光標識することによって、その変形動態を詳細に観察することが可能となる。この引張りを受ける細胞の細胞内微細構造レベルでの変形動態の

タイムラプスイメージを入力データとして画像相関法を用いることで、引張りを受ける細胞の細胞内ひずみ分布を明らかにすることができる。

最終的には、引張りを受ける細胞のカルシウム応答発生起点を特定し、その際の細胞内微細構造レベルでのひずみ分布を計測することで、細胞内力学場とカルシウム応答発生起点との関連性について検討する。

4. 研究成果

まず、細胞伸展マイクロデバイスの設計変更により、伸展刺激付与時のピントずれを概ね抑制することに成功した。これにより、初期の目標であった単一細胞レベルでの伸展刺激応答を高時間・空間分解能でその場観察することに成功した。

これまでの報告例では、伸展刺激を受ける細胞の応答観察を行う場合に、蛍光画像一枚を取得する時間間隔は数秒～数分オーダーの時間分解能であった。これに対して、本課題では1秒間に10フレーム以上のビデオ撮影に成功した。これは1枚あたり100m秒オーダーの時間分解能であり、分解能を10倍以上に高めることができた。

この成果によって、細胞応答の中でも比較的速い応答である細胞内カルシウムシグナル応答について、その発生起点の特定や細胞内での伝播の様子をその場観察することが可能になり、細胞が伸展刺激を感知する機構の解明に向けて非常に重要な実験観察データを取得できる。

また、細胞伸展マイクロデバイスを駆動する制御装置を開発した。これまでは油圧式三次元マイクロマニピュレーターを使用して手動によりデバイスを駆動していたが、これをヒンジ式 piezoアクチュエーターを応用した駆動制御装置に置き換えた。これにより、引張りひずみ量ならびにひずみ速度について、より定量的に制御できるようになった。また繰り返し伸展刺激も付与可能となり、様々な力学刺激付与条件下における細胞応答の検討が可能となった。

続いて、新たに蛍光輝度比観察系を導入した。その結果、Fluo3単体での蛍光観察では捉えることのできなかった微弱な細胞内カルシウム応答を観察することに成功した。また、細胞伸展時に生じるピントずれに起因する蛍光輝度の変化についても蛍光輝度比法を用いることによって、その影響を軽減できることを実証した。

この実験系改良を受けて、伸展刺激を受ける骨芽細胞の細胞内カルシウム応答を毎秒10フレームの高時間分解能でその場観察することに成功した。しかしながら、当初の目標であった細胞内部での応答発生起点を特定するまでには至らなかった。この原因は、当初の予想よりも伸展刺激付与に対する細胞内カルシウム応答が微弱であり、蛍光指示薬の蛍光輝度変化量が微小であったことが

挙げられる。蛍光輝度比観察による高感度化で応答の有無は捉えることができるようになったが、細胞内における蛍光輝度比の不均一性を評価することはできなかった。

また、伸展刺激を受ける細胞の細胞内ひずみ分布を測定するための実験系を構築した。遺伝子導入により細胞内のアクチン細胞骨格を蛍光標識し、伸展刺激付与時の変形挙動をその場観察することに成功した。取得した画像から、画像相関法を用いることで細胞内のひずみ分布を計測した。その結果、伸展を受ける細胞内においては、引張り方向と平行なひずみ成分のみではなく、引張り方向と直交した方向のひずみ成分も生じていることが明らかとなった。これは、細胞内でネットワーク構造を形成しているアクチン細胞骨格構造の不均一性・配向性によって生じている可能性を示唆している。

これらの結果を踏まえ、細胞のカルシウム応答観察系のさらなる高感度化を達成することによって、伸展刺激を受ける細胞の細胞内力学場とカルシウム応答発生との関連について解き明かすことが可能になると期待される。

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 2 件)

Yoshiaki Iwadate, Chika Okimura, Katsuya Sato, Yuta Nakashima, Masatsune Tsujioka and Kazuyuki Minami, Myosin-mediated directional migration of dictyostelium cells in response to cyclic stretching of substratum, *Biophysical Journal*, 査読有り, Vol.104, 2013, 748-758
中島雄太, 門司亮, 佐藤克也, 南和幸, 高精度細胞伸展マイクロデバイスの開発と引張りを受ける細胞のその場観察, *電気学会論文誌 E*, 査読有り, 巻 133, 2013, 350-357

[学会発表](計 4 件)

佐藤克也 他, ストレッチ刺激に対する培養骨芽細胞のカルシウム応答のその場観察, 第36回日本生体医工学会中国四国支部大会, 2013年10月19日, 愛媛大学医学部(愛媛県)
佐藤克也 他, 引張りを受ける骨芽細胞のカルシウム応答動態のその場観察, 日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月9日~11日, 産業技術総合研究所(茨城県)
佐藤克也 他, 引張りひずみ負荷に対する骨芽細胞応答のその場観察と評価, 日本機械学会 M&M2012 材料力学カンファレンス, 2012年9月21日~24日, 愛媛大学(愛媛県)
佐藤克也 他, ストレッチを受ける細胞

のリアルタイムその場観察用マイクロデ
バイスの開発,日本生体医工学会第51回
大会,2012年5月10日~12日,福岡国
際会議場(福岡県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.me.tokushima-u.ac.jp/aaelab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス

研究部・講師

研究者番号: 10403651