

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420179

研究課題名(和文)細胞の振動モード測定による動的力学刺激感受システムの解明

研究課題名(英文) Investigation of a Dynamic Mechanosensing System by Measuring Natural Modes of Vibration of a Cell

研究代表者

白石 俊彦 (SHIRAIISHI, TOSHIHIKO)

横浜国立大学・環境情報研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30361877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞を大規模構造システムとして捉え、機械的振動に対する細胞の振動モードをマイクロオーダーで測定し、細胞内の局所的な変形と生化学反応との対応関係を明らかにすることを目的とする。実験の結果、生きた細胞の振動モードの測定システムを構築し、細胞内アクチンフィラメントおよび細胞核の振動挙動を測定可能であることを示した。さらに、力学刺激負荷時の細胞内の局所的な変位と生化学反応との対応関係の測定を行い、細胞内アクチンフィラメントの変位とカルシウムイオン濃度変化率の最大値との間に単調増加関係があることを示した。これより、力学-生化学変換機構としての細胞の力学刺激感受システムの一部が明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：This report describes the micron-sized measurement of natural modes of vibration of a cell under mechanical vibration and the relationship between local deformation and biochemical reaction in a cell. As a result, we developed the experimental system for the measurement of natural modes of vibration for a living cell and confirmed its feasibility. Furthermore, we measured the relationship between the displacement of actin cytoskeletons and the maximum value of the change rate of calcium ion concentration of a cell. This indicates that the mechanical sensing system of a cell is partially clarified.

研究分野：工学

キーワード：機械力学・制御 細胞 骨 振動学 振動モード 固有振動数 モデル化 力学センサ

### 1. 研究開始当初の背景

生体は地上では常に 1G という重力を受けており、力学環境に応じてある平衡状態を維持している。このことは、宇宙飛行士の骨量が無重力下の宇宙滞在中には減少し、帰還後にほぼ回復することからも明らかである。また、歩行運動のような周期的な力学刺激により、生体の骨形成が促進されることもよく知られている。骨形成は骨芽細胞によって行われるため、細胞レベルでの力学刺激の影響を検証することが必要不可欠である。

細胞に関する研究は主に生化学で扱われてきた対象であり、その機能はタンパク質を基本とした化学反応をもとに記述されてきた。この手法により多くの知見が得られ有効性が示されているが、細胞の有する多様な機能の一部が解明されたに過ぎないという側面もある。機械力学的観点から細胞を捉えようと、細胞は力学環境下に存在し、細胞骨格と呼ばれる骨組構造や焦点接着と呼ばれる支持構造などの多様な器官を内部に含む大規模構造物として扱うことができる。また、細胞は構造物として力学的にその形状を維持するだけでなく、周囲の力学環境を感知し適応的に応答することで、細胞骨格が変化して細胞の形状や運動を変化させたり、細胞が産生する骨などの物質の量が変化したりするという報告がある。これらのことを考慮すると、細胞を一種の知的構造システムとみなし、センサ、コントローラ、アクチュエータが細胞のどの部分に存在し、それらがどのように関わり合っているのかといった機械システム的な捉え方ができるのではないかと推察される。このようにして、従来とはまったく別のアプローチによって細胞の機能を説明できる可能性がある。

細胞が力学刺激を感受し、応答するメカニズムに関する研究は、生化学を中心として 1980 年代後半から活発に行われているが、力学刺激を受けた後に細胞内で連鎖的に生じる化学反応の一部が解明されたに過ぎないのが現状である。また、細胞の力学特性は、バイオメカニクスを研究対象とする機械工学者によって 1970 年代頃から測定されているが、静力学的な特性測定にとどまっており、動力学的な視点に基づいた研究はあまりみられない。力学刺激を感受する細胞のセンサシステムに注目すると、動力学的な刺激がどのような生化学的な信号に変換されるかを把握することが必要であるが、未解明な点が多いのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、次の 2 点を目的とする。

(1) 細胞を大規模構造システムとして捉えて、機械的振動に対する細胞の振動モードをミクロンオーダーで測定すること

細胞はその内部構造が変化することで、細胞内の各種タンパク質の空間的位置関係が

変化し、生化学反応に影響を及ぼして、力学刺激を感知しているとする報告がある。そこで、機械的振動を与えて細胞の振動モードを測定し、細胞の内部構造の局所的な変形を求める。細胞は無色透明なため、このままでは培養状態で生きたままの細胞の内部構造を得ることができない。そこで、細胞核に蛍光を発するタンパク質の遺伝子を注入し、細胞骨格と呼ばれるタンパク質からなる細胞の骨格構造が発光するようにして、蛍光顕微鏡を用いて可視化する。その細胞を入れた培養容器を顕微鏡ステージ上で加振器を用いてミクロンオーダーで正弦波加振する。研究代表者の過去の研究成果より、骨形成に効果的な振動数は数十 Hz 程度であると考えられるので、微弱に発光する骨芽細胞の内部構造の振動による変化を観察するために、高感度な高速度カメラを用いる。振動前の画像から細胞骨格の特徴点を抽出し、振動時にその点を追跡するという画像処理プログラムを開発することにより、細胞の内部構造の局所的な変形を求め、細胞の振動モードとそれに対応する固有振動数を求める。

(2) 細胞の振動モードと細胞内の生化学反応との対応関係を明らかにすること

細胞の力学刺激感受システムとしては、細胞の内部構造の変形に応じてその生化学反応が変化する、力学 - 生化学変換機構が考えられる。これは、機械工学においてセンサとして用いられるひずみゲージが力学 - 電気変換機構からなるのと類似していると推察される。そこで、細胞の振動モードの腹で強い生化学反応に変換されているかを確認し、細胞の力学センサの較正が可能かを検証する。

### 3. 研究の方法

研究代表者は現在までに、細胞培養に必要な装置として、クリーンベンチ、細胞培養器、滅菌器、冷凍庫等を用意し実験を行っている。また、骨芽細胞の細胞核に蛍光を発するタンパク質の遺伝子を注入して、細胞骨格の一種のアクチンを発光させ、生きた状態の細胞の内部構造を蛍光顕微鏡により観察している。

本研究では、図 1 のような実験装置を製作し、機械的振動に対する細胞の振動モードを測定する。マウスの骨芽細胞を培養した容器をミクロンオーダーで正弦波加振できるように、顕微鏡ステージ上に加振器を設置する。最大 100Hz 程度で加振したときの細胞の内部構造の変形を撮影するために、通常の連続撮影法とともに、振動計測で一般的に用いられるストロボ効果による振動モード測定の原理を応用して、加振振動数に同期させて蛍光顕微鏡画像を取得する撮影法を適用する。ただし、細胞の内部構造である細胞骨格や細胞核が発する蛍光は微弱であるため、通常のカメラだと露光時間を長くしなければならず、振動時の内部構造がぶれて撮影されてしまう。そのため、高感度な高速度デジタルカメラ

ラを用いる．変形前後の画像を用いて，特徴点抽出・追跡アルゴリズムであるKanade-Lucas-Tomasi法（KLT法）により細胞骨格の各特徴点を追跡することで，細胞の各固有振動数における振動モードを求めることが可能である．

次に，細胞の振動モードを考慮して加振時に細胞内で大きく変形する部分の変形の大きさを求め，それとその部分に生じる生化学反応の強さとの対応関係を求めることで細胞の力学センサを同定する．生化学反応については，力学刺激感受に関わる化学物質の一つであるカルシウムイオンの濃度に応じて蛍光を呈する試薬を用いて，細胞内のカルシウムイオン濃度を測定する．細胞骨格には緑色を呈する試薬を，カルシウムイオン濃度には赤色を呈する試薬をそれぞれ使用することで，細胞骨格の変形の大きさと生化学反応の強さを同時に測定する．細胞の力学センサが存在する部分では変形の大きさに応じて生化学反応が強くなることが予想され，力学刺激感受メカニズムの推定が可能となる．

#### 4. 研究成果

まず，マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1において，細胞骨格の一種のアクチンフィラメントおよび細胞核を発光させ，蛍光顕微鏡ステージ上で加振器を用いて加振し，細胞の振動モードおよび共振曲線を測定するシステムを構築した(図1)．顕微鏡画像取得では，通常の連続撮影法だけでなく，ストロボ効果を利用した撮影法を確立した．図2は実験結果の一例として正弦波加振時の細胞核の蛍光顕微鏡画像を示しており，これにより細胞核の振動状態を可視化可能であることを示した．実験の結果，今回の測定条件では，100 Hz までの振動数では明瞭な振動モードが確認されないことを示した．さらに詳細な検討のためには，測定分解能の向上や他の細胞内小器官についての測定が必要である可能性を示唆した．

次に，細胞の振動モードを模擬するために，細胞内の一箇所に磁性粒子を付着させ，それにマイクロピペットを用いて微小な変形を与え，そのときの細胞内各所における局所的な変位と生化学反応との対応関係の測定を行った．変位についてはアクチンフィラメントの変位，生化学反応についてはカルシウムイオン濃度を測定した．その結果，細胞内のアクチンフィラメントの変位分布を取得した(図3)．また，細胞内の各局所でのカルシウムイオン濃度の変化率を取得した(図4)．さらに，細胞内のアクチンフィラメントの変位とカルシウムイオン濃度変化率の最大値との間に単調増加関係があることを示した(図5)．これより，力学-生化学変換機構としての細胞の力学刺激感受システムの一部が明らかにされた．

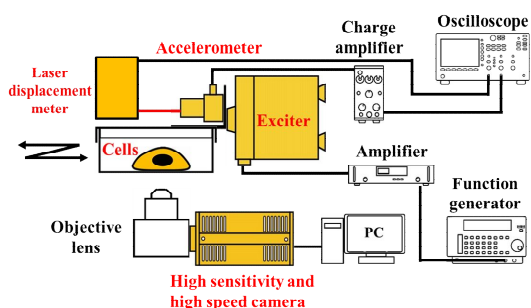


図1 細胞の振動モード測定装置．

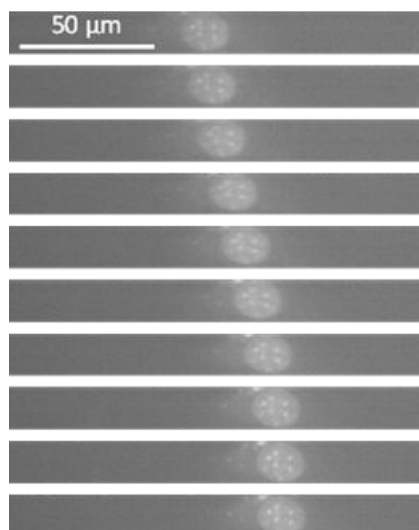


図2 正弦波加振時の細胞核の蛍光顕微鏡画像（振動数 25Hz，加速度振幅 0.04G，フレームレート 500fps）．

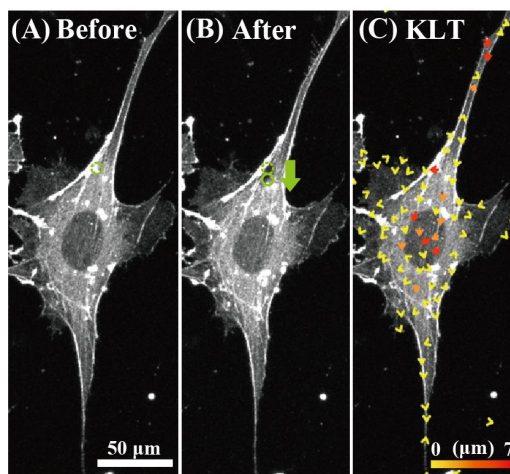


図3 細胞内のアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡画像．(A) 力学刺激負荷前．(B) 力学刺激負荷後．(C) 変位分布．

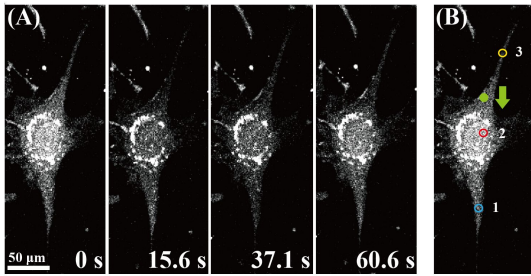


図4 細胞内のカルシウムイオン濃度の変化。(A) 経時変化。(B) 力学刺激負荷位置(緑点)。

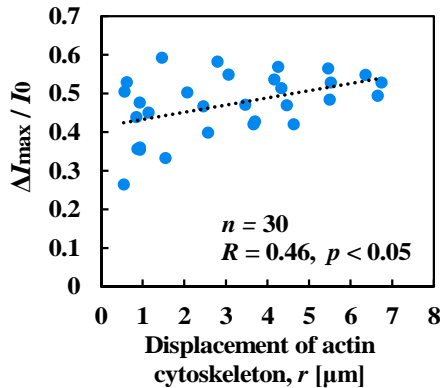


図5 細胞内のアクチンフィラメントの変位とカルシウムイオン濃度変化率の最大値との関係。

## 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) Tomohiro Fukuno and Toshihiko Shiraishi, Effects of Cyclic Strain at Focal Adhesions on Migration of and Osteoblast, Proceedings of the 2015 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2015) #IMECE2015-51447 (査読有)。

(2) Atsushi Horiguchi and Toshihiko Shiraishi, Study on a Cell Mechanosensing System by Measuring Structural Deformation and Biochemical Response, Proceedings of the 2015 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2015) #IMECE2015-51456 (査読有)。

(3) Toshihiko Shiraishi, Akinori Ishii and Shin Morishita, Effects of Mechanical Vibration on Multilayering of Cultured Osteoblasts, Proceedings of the 2014 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2014) #IMECE2014-37731 (査読有)。

(4) Toshihiko Shiraishi, Takuya Ohara and Shin Morishita, A Method for Applying High Cyclic Strain to Focal Adhesions and Measuring the Cell Response, Proceedings

of the 2013 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2013) #IMECE2013-64681 (査読有)。

〔学会発表〕(計33件)

(1) 福野智大, 細胞移動に対する焦点接着斑での繰り返しひずみの振幅と振動数の影響, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月10日, 東京。

(2) 堀口敦史, 細胞骨格の変形分布とカルシウム応答の同時計測による細胞の力覚システムの検討, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月10日, 東京。

(3) 福野智大, 細胞の移動と牽引力に対する焦点接着斑での繰り返しひずみの影響, 第22回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2015年12月19日, 橿原。

(4) 堀口敦史, 細胞骨格の変形分布を考慮した培養骨芽細胞の力覚システムの検討, 第22回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2015年12月19日, 橿原。

(5) Tomohiro Fukuno, Effects of Cyclic Strain at Focal Adhesions on Migration of and Osteoblast, The 2015 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2015年11月17日, 米国・ヒューストン。

(6) Atsushi Horiguchi, Study on a Cell Mechanosensing System by Measuring Structural Deformation and Biochemical Response, The 2015 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2015年11月17日, 米国・ヒューストン。

(7) 福野智大, 骨芽細胞の移動に対する焦点接着部での繰り返しひずみの振動数の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2015年8月28日, 弘前。

(8) 堀口敦史, 構造変形と生化学応答の同時計測による細胞の力学刺激感受システムの検討, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2015年8月28日, 弘前。

(9) 福野智大, 細胞移動に対する焦点接着斑での繰り返しひずみの振動数の影響, 日本機械学会関東支部第21期総会講演会, 2015年3月21日, 横浜。

(10) 堀口敦史, 構造変形と生化学応答の同時計測による細胞の力覚システムの検討, 日本機械学会関東支部第21期総会講演会, 2015年3月21日, 横浜。

(11) 石井明紀, 機械的振動下における細胞間接着の変化を考慮した細胞増殖メカニズムの検討, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9日, 新潟。

(12) 堀口敦史, 力学刺激に対する細胞の構造変形と生化学応答との関係, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9日, 新潟。

(13) 福野智大, 細胞移動に対する焦点接着



斑での繰り返しひずみの影響, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9日, 新潟.

(14) 福野智大, 細胞移動方向に対する焦点接着斑での繰り返しひずみの影響, 第21回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2014年12月20日, 檀原.

(15) 石井明紀, 機械的振動による細胞の重層化のメカニズムの検討, 第21回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2014年12月20日, 檀原.

(16) 堀口敦史, 細胞骨格の変形を考慮した培養骨芽細胞の力覚システムの検討, 第21回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2014年12月20日, 檀原.

(17) Akinori Ishii, Effects of Mechanical Vibration Stimulation on Cultured Osteoblasts, The 24th Annual Meeting of MRS-Japan 2014, 2014年12月11日, 横浜.

(18) Toshihiko Shiraishi, Effects of Mechanical Vibration on Multilayering of Cultured Osteoblasts, The 2014 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2014年11月18日, カナダ・モントリオール.

(19) 福野智大, 細胞に対する焦点接着部での繰り返しひずみの影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2014年8月28日, 東京.

(20) 石井明紀, 機械的振動による細胞増殖促進メカニズムの検討, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2014年8月28日, 東京.

(21) 堀口敦史, 内部構造の変形を考慮した細胞の力学刺激感受システムの検討, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2014年8月28日, 東京.

(22) Akinori Ishii, Effects of Mechanical Vibration on Cell Proliferation, The 13th Joint Symposium among Sister Universities in Mechanical Engineering, 2014年8月16日, 横浜.

(23) Atsushi Horiguchi, Study on a Cell Mechanosensing System Considering Deformation of Cytoskeletal Structure, The 13th Joint Symposium among Sister Universities in Mechanical Engineering, 2014年8月16日, 横浜.

(24) Tomohiro Fukuno, Development of Magnetic Micropillars to Apply Cyclic Strain to Focal Adhesions of Cells, The 13th Joint Symposium among Sister Universities in Mechanical Engineering, 2014年8月16日, 横浜.

(25) 石井明紀, 培養骨芽細胞の増殖と細胞間接着に対する機械的振動の影響, 日本機械学会第26回バイオエンジニアリング講演会, 2014年1月11日, 仙台.

(26) 小倉勇己, 大きなひずみ勾配をもつ繰り返し伸展刺激に対する培養骨芽細胞の応

答, 日本機械学会第26回バイオエンジニアリング講演会, 2014年1月11日, 仙台.

(27) 石井明紀, 機械的振動下における培養骨芽細胞の重層化と細胞間接着の関係, 第20回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2013年12月21日, 檀原.

(28) 小倉勇己, ひずみ勾配をもつ繰り返し伸展刺激に対する培養骨芽細胞の経時的形態変化, 第20回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2013年12月21日, 檀原.

(29) Toshihiko Shiraishi, Effects of Mechanical Vibration on Cell Proliferation and Differentiation, The 10th International Conference on Flow Dynamics, 2013年11月27日, 仙台.

(30) Toshihiko Shiraishi, A Method for Applying High Cyclic Strain to Focal Adhesions and Measuring the Cell Response, The 2013 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2013年11月20日, 米国・サンディエゴ.

(31) 白石俊彦, 機械力学的視点による細胞研究, 日本機械学会2013年度年次大会, 2013年9月10日, 岡山.

(32) 小倉勇己, 勾配をもつ繰り返し伸展ひずみ場における骨芽細胞の適応的応答, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2013年8月29日, 福岡.

(33) 石井明紀, 機械的振動下における細胞増殖促進と細胞間接着の関係, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2013年8月29日, 福岡.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 俊彦 (SHIRAISHI TOSHIHIKO)  
横浜国立大学・環境情報研究院・准教授  
研究者番号: 30361877

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: