

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350503

研究課題名(和文) 伸展変形挙動のその場観察による細胞内力学場評価と細胞骨格リモデリングの動態解明

研究課題名(英文) Evaluation of relationship between dynamic cytoskeletal rearrangement and intracellular mechanical field by using in situ observation of stretched cell

研究代表者

佐藤 克也 (Sato, Katsuya)

徳島大学・大学院理工学研究部・講師

研究者番号：10403651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、独自に開発した細胞伸展MEMSデバイスを用いて、ストレッチ刺激を受ける細胞の高時間・空間分解能でのその場観察を達成した。また、遺伝子導入によるアクチン細胞骨格の蛍光標識技術を用いて、ストレッチを受けた際の細胞内アクチン細胞骨格の変形動態を可視化した。

研究の結果、単軸のストレッチ刺激を受ける細胞内のアクチンストレスファイバーに生じる軸ひずみの分布は均一ではなく、細胞接着基質の均一変形場とは一致しないことを見出した。また、繰り返し伸縮を付与した場合のアクチンリモデリングについて、アクチン線維の脱重合が活発に行われる領域が細胞輪郭部に局在する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in conducting in situ time-lapse observation of stretched cell with high spatial and temporal resolution by using originally developed cell stretching MEMS device. Deformation dynamics of actin cytoskeleton under stretch application was visualized by the GFP-tagged lifeact polypeptide.

As the result of the experiment, we found that distribution of axial strain in the actin stress fiber was not uniform, and was not in accord with extracellular substrate deformation. We also found possibility that depolymerization of actin fibers during actin cytoskeletal rearrangement under cyclic stretch application was localized in the peripheral region of the cell.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：アクチンリモデリング バイオメカニクス ストレッチ刺激 骨芽細胞 MEMS

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の一種であるアクチンは、細胞の形態を維持し機械的強度を支えるのみではなく、他の様々な細胞機能においても重要な役割を果たしていることが報告されている。また、血管内皮細胞や骨芽細胞などでは、アクチン細胞骨格は配向した特徴的な構造をしている。この構造は、繰り返しの伸展刺激によって動的に再構築(リモデリング)され、引張りに対して直角をなす方向へ配向方向が変化することが知られている。このことに加えて、アクチン細胞骨格の配向方向の違いによって細胞の力学的刺激に対する応答特性が影響を受けていることから、アクチン細胞骨格のリモデリング機構を理解することは、細胞が外部から加わる力や変形を細胞内部でどのように伝達・感知しているのか。その機構を解明する上で非常に重要である。

アクチン細胞骨格リモデリングにおいては、申請者はアクチン線維に作用する張力の存在が重要であることを明らかにした。しかしながら、これらの実験系は、アクチン線維に生じるひずみ量を細胞形状から大まかに推定したり、あるいは細胞融解を利用した非生理的な局所収縮を細胞に与えたりする系であり、伸展刺激を受ける細胞の細胞内力学状態とアクチン細胞骨格リモデリングとの関係(例えば細胞内でひずみが集中している箇所とリモデリングが開始される起点箇所との対応関係など)を明らかにしたとは言い難い。

申請者ら以外のグループによる、伸展刺激を受ける細胞におけるアクチン細胞骨格リモデリングの動態を観察し評価した報告例では、繰り返し伸展刺激を受ける細胞を数分オーダーの時間間隔でスナップショットに撮り、アクチン細胞骨格の構造変化について詳細に論じているが、伸展刺激により生じる細胞内力学状態との関連については議論されていない。

伸展刺激を受ける細胞の細胞内力学状態が明らかにされていない理由の一つとして、伸展刺激を受ける細胞のその場観察が非常に困難であることが挙げられる。これまでの細胞伸展装置では、伸展中に細胞に生じる剛体変位が大きいため顕微鏡の観察視野から逸脱し、詳細なその場観察は不可能であった。そこで申請者らは、細胞伸展マイクロデバイスを開発し、伸展刺激を受ける細胞の詳細なその場観察を可能にした。伸展刺激に誘起されるアクチン細胞骨格の構造リモデリングについて、伸展刺激を受ける細胞の詳細なその場観察が可能になることで、細胞内力学状態とリモデリング動態との関連について議論することが可能となり、新たな知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、具体的に以下の3つのサブテーマを設定し、伸展刺激を受ける細胞の細胞内力学場評価とアクチン細胞骨格リモ

デリング動態との関連について検討する。

- (1) 細胞伸展マイクロデバイスの改良により、長時間動作と伸展動作時のピントずれ抑制を実現する。
- (2) 蛍光タンパク質標識遺伝子の導入と細胞伸展マイクロデバイスの使用により、伸展刺激を受ける細胞のアクチン細胞骨格におけるひずみ分布挙動の詳細なその場観察を実現する。
- (3) 伸展刺激を受ける細胞のアクチン細胞骨格に生じるひずみ分布とアクチン細胞骨格のリモデリング動態との対応関係について明らかにする。

上記のサブテーマを実施することで、伸展刺激を受ける細胞のアクチン細胞骨格において、細胞内のどの部分にひずみが集中しているのか。また、アクチン細胞骨格の構造リモデリングがどの部分から開始され、どのように構造が変化していくのか。細胞内のひずみ分布との関連について明らかにする。

3. 研究の方法

伸展刺激を受ける細胞のアクチン細胞骨格に生じるひずみ場を詳細にその場観察することによって明らかにし、アクチン細胞骨格の構造リモデリングと細胞内力学状態との関連について明らかにする。具体的には、

- (1) 細胞伸展マイクロデバイスを改良し、長時間動作と伸展動作時のピントずれ抑制を実現する。

まず、細胞伸展マイクロデバイスを長時間(60分間を目標)の繰り返し動作が可能となるように再設計する。

既存の細胞伸展マイクロデバイスは、伸展刺激負荷に対する細胞のカルシウムシグナル応答をその場観察するためのものである。カルシウムシグナル応答は伸展刺激の負荷直後にミリ秒オーダーで発生するため、デバイス動作は伸展負荷前から最大伸展状態までの1回のみであり、数秒間にわたり詳細にその場観察を行うことを設計仕様としていた。

これに対して、本研究課題で取り扱うアクチン細胞骨格の構造リモデリングでは、周期1Hzの繰り返し伸展刺激を60分間連続的に付与する。そのため、既存のデバイスでは繰り返し動作によってデバイスが破損する可能性がある。細胞伸展マイクロデバイスはスライダー、アーム、伸展チャンバーから構成されており、スライダーを押し込むことでスライダー先端部とアームの突起部が接触し、結果としてアームが左右方向へ押し広げられ、アームに把持された伸展チャンバーに引張りを付与する仕組みになっている。このアーム部分が弾性ヒンジであるため長時間の繰り返し動作によって破損する可能性が

ある。この部分について繰り返し動作を考慮して構造設計をやり直す。さらに、この再設計に併せてデバイス動作時の焦点面維持精度を向上させる。既存のデバイスでは、蛍光輝度比観察を用いることで伸展動作時に生じる10ミクロン程度の焦点ズレの影響を軽減しているが、本研究課題では緑色蛍光の単色蛍光観察となるため、より精度の高い観察を実現する必要がある。具体的には、アーム部のそりが焦点ずれの一因であることが分かっているため、そり方向の剛性を高めるようにアームの再設計を行う。目標仕様は、ピントずれ量1~2ミクロンとし、再設計後には、所望の性能を発揮できているかどうか、試作デバイスを製作して動作試験を行い確認する。

- (2) 蛍光タンパク質標識遺伝子の導入と細胞伸展マイクロデバイスの使用により、伸展刺激を受ける細胞のアクチン細胞骨格におけるひずみ分布挙動の詳細なその場観察を実現する。

細胞内のアクチン細胞骨格を蛍光標識遺伝子の導入により可視化し、伸展刺激による変形挙動をその場観察するための観察系を構築する。

アクチンと蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質を細胞内で発現させるための遺伝子導入試薬は様々なものが市販されているが、本申請課題では遺伝子導入効率を高めるために改変バキュロウィルスをベクターとする Invitrogen 社 Cell Light Actin-GFP 試薬を使用する。我々のグループは、これまでプラスミド DNA による細胞への遺伝子導入を行った経験を有しているが、改変バキュロウィルスをを用いる手法は経験がないため導入プロトコルを新たに構築する。具体的には、試薬濃度や細胞密度、導入培養時間などをパラメーターとして Actin-GFP 遺伝子導入効率 80% を目標としてパラメーター調整を行う。遺伝子導入効率が当初の計画通り達成できない場合には、エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA 導入など、他の遺伝子導入手法について採用を検討する。

続いて、アクチン細胞骨格の変形挙動をその場観察するための実験系構築を行う。繰り返し伸展刺激によるアクチン細胞骨格の構造リモデリングはおおよそ 60 分間の時間経過が必要である。この間、連続的に蛍光観察を行うことは GFP の蛍光褪色のために不可能である。そこで、アクチン細胞骨格の変形挙動を連続的にその場観察する系と数分間のインターバル撮影とを組み合わせた観察系を構築する。具体的には、周期 1 Hz の繰り返し伸展を数回分撮影するための 5 秒間程度の連続観察を 5 分間のインターバルごとに繰り返し行う観察系を想定している。ただし、各インターバル後の焦点面の再調整に要する操作や、GFP の蛍光褪色の進行度合いに

応じて連続撮影の時間とインターバル間隔を適切に調整する。

- (3) 伸展刺激を受ける細胞のアクチン細胞骨格に生じるひずみ分布とアクチン細胞骨格のリモデリング動態との対応関係について検討する。

伸展刺激による細胞内のアクチン細胞骨格におけるひずみ分布とアクチン細胞骨格の構造リモデリングとの関連について検討する。

細胞における力学刺激の伝達経路は、Ingber らによって提案されたテンセグリティモデルが受け入れられている。このモデルでは、基質の変形は焦点接着を介してアクチン細胞骨格や細胞核などへと伝達される。血管内皮細胞や骨芽細胞などのアクチン細胞骨格は、均質な構造ではなく配向を有した特徴的な構造を有している。したがって伸展刺激を与えた場合にも細胞内において不均一なひずみ分布が生じると予想される。また、伸展刺激負荷によるアクチン細胞骨格の構造リモデリングも細胞全体で均一に開始されるわけではなく、局所的に生じ始めることが知られている。そこで、アクチン細胞骨格のひずみ分布と構造リモデリングの起点との対応について明らかにする。さらに、アクチン細胞骨格の構造リモデリングが進行するとアクチン細胞骨格の配置が変化するため、それに伴いひずみ分布も変化すると予想される。この変化していくひずみ分布の動態と構造リモデリングの進行の動態とを対応づけながら検討することで、細胞内におけるアクチン細胞骨格の力学状態とその構造リモデリングとの間の関連性について考察する。

4. 研究成果

本研究課題では、独自に開発した細胞伸展 MEMS デバイスを用いて、ストレッチ刺激を受ける細胞の高時間・空間分解能でのその場観察を達成した。また、遺伝子導入によるアクチン細胞骨格の蛍光標識技術を用いて、ストレッチを受けた際の細胞内アクチン細胞骨格の変形動態を可視化した。

研究の結果、単軸のストレッチ刺激を受ける細胞内のアクチンストレスファイバーに生じる軸ひずみの分布は均一ではなく、細胞接着基質の均一変形場とは一致しないことを見出した。また、繰り返し伸縮を付与した場合のアクチンリモデリングについて、アクチン線維の脱重合が活発に行われる領域が細胞輪郭部に局在する可能性を見出した。

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 1 件)

Katsuya Sato, Yuki Ogawa, Shin-ichi Ito, Shoichiro Fujisawa and Kazuyuki Minami, Strain magnitude dependent intracellular calcium signaling response to uniaxial stretch in osteoblastic cells, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol.10, No.3, 2015, 査読有り
DOI: 10.1299/jbse.15-00242

〔学会発表〕(計 4 件)

“ In situ observation and measurement of actin cytoskeletal deformation in uniaxially stretched osteoblast-like cells ”, Katsuya Sato, Kenta Nunobiki, Shoichiro Fujisawa, Tasuku Nakahara and Kazuyuki Minami, 日本生体医工学会生体医工学シンポジウム2016, 2016 Sep., 17-18, 旭川市大雪クリスタルホール(北海道旭川市)

” ひずみ勾配場を有する伸展刺激付与のためのストレッチチャンバーの開発 ”, 山本 大貴, 藤澤 正一郎, 佐藤 克也, 日本機械学会中国四国支部第 54 期総会・講演会, 2016 Mar., 9, 愛媛大学(愛媛県松山市)

” 繰り返しひずみ付与による骨芽細胞の形状変化と細胞内ひずみ分布の経時観察 ”, 高橋 恒紀, 福岡 諒, 南 和幸, 伊藤 伸一, 藤澤 正一郎, 佐藤 克也, 日本機械学会第 26 回バイオフロンティア講演会, 2015 Oct., 2-3, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市)

” 引張り付与時における単一細胞レベルでの細胞内ひずみ分布の計測 ”, 布引 健太, 宮崎 裕孝, 福岡 諒, 南 和幸, 伊藤 伸一, 藤澤 正一郎, 佐藤 克也, 第 25 回バイオフロンティア講演会, 2014 Oct., 3-4, とりぎん文化会館(鳥取県鳥取市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)
徳島大学・大学院理工学研究部・講師
研究者番号：10403651

(2) 研究分担者

南 和幸 (MINAMI, Kazuyuki)
山口大学・大学院創成科学研究科・教授
研究者番号：00229759

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()