

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506009

研究課題名(和文) 培養動物細胞における重力感知・応答機構の解析

研究課題名(英文) Initial step of gravity sensing in cultured animal cells

研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI, Takeshi)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40402565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞は単独で微小重力環境を感知応答するが、その分子機構はよくわかっていない。核やミトコンドリアのような比重の大きいオルガネラに対する重力作用の消失が出発点であると考えられているが、その出発点を細胞がどのように感知して応答反応に結びつけているか不明である。我々は、3Dクリノローテーションを用いた実験や、「きぼう」実験棟での宇宙実験より、間葉系幹細胞は転写因子制御分子である YAP/TAZ の活性変化を介して重力変化を感知していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have cleared that individual cells can sense microgravity. However, this sensing mechanism remains largely unknown. We hypothesize that in response to altered gravity, the tension generated in SFs are altered, and that it cause gravity-dependent cellular responses. To verify it, we examined the substrate rigidity-dependent responses of mesenchymal stem cells (MSCs) under simulated microgravity. It is known that MSCs could change rigidity-dependently the tension in SFs to induce the rigidity-dependent responses. Actually at 1 g MSCs cultured on the soft substrate which could weaken the SF tension, decreased osteoblastic differentiation compared with those on the stiff substrate. However, the rigidity-dependent responses of MSCs were not found under simulated microgravity. These results suggest that stimulated microgravity could weaken the SF tension of MSCs even on the stiff substrate and that changes in the SF tension may mediate the gravity sensing of MSCs.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：宇宙生命科学 微小重力 動物細胞 細胞力覚

1. 研究開始当初の背景

宇宙空間に滞在した宇宙飛行士や飼育した動物など、微小重力環境においた生体には、筋萎縮・骨量減少・循環不良などの生理的変化が生じる。この原因の一つは、重力の方向に沿った質量分布に起因するマクロな荷重勾配の消失である。実際、長期の寝たきりで類似の症状が出ることはよく知られている。しかし、微小重力環境ではより深刻な症状がより早く生じる。この原因として、宇宙空間で生じる筋萎縮や骨量減少には、個体・組織レベルに加えて、細胞レベルの微小重力環境への応答反応が関与している可能性が考えられている。実際、微小重力環境におかれた培養筋細胞でも萎縮が生じ、培養破骨細胞の分化や活性の促進が見られる。筋芽細胞や破骨細胞のほかにも種々の培養細胞を用いた宇宙実験において微小重力暴露に対して細胞の形態や機能が変化すると観察事例が多数報告されており、細胞単独で重力を感知する機構を普遍的に持っていると考えられる。しかし、その仕組みの詳細については未だ不明な点が多い。細胞内で比重の大きい核やミトコンドリアを起点とする何らかの仕組みが関与するとの示唆はあるものの、検証可能な科学的仮説は存在しない。

これまで、我々は細胞の力覚機構に関する研究を進め、真核生物の細胞の力覚センサーの実体として細胞内骨格と接着斑、そして機械刺激受容(MS)チャンネルからなる複合体を見出してきた。外部より機械刺激を与えると、ストレス線維がその力を伝達し接着斑近傍のMSチャンネルが開口し、力学情報を化学シグナルへ変換したのである。我々はその考えを発展させ、細胞がその複合体を能動的に用いて足場の硬さを調べている可能性を報告した。我々がものの硬さを調べるように、細胞もストレス線維の張力を利用し接着斑を介して基質を引っ張り、返ってくる力によって足場の硬さを知るのである。その際、MSチャンネルにより化学シグナルに変換すると考えられる。ところで、比重の大きな核やミトコンドリアは、微小管のみならず、ストレス線維にもアンカー分子を介して繋がっている。従って、それらのオルガネラに対する重力作用が変化すると、相互作用しているストレス線維の張力に影響を与える可能性がある。これを基に細胞の重力感知機構として「重力変化がミトコンドリアなどの比重の重いオルガネラを媒介に細胞骨格に伝わって細胞骨格の張力が変化し、細胞がその張力変化をMSチャンネルなどを介し感知する」という作業仮説に到達した(図1)。この仮説は、細胞の微小重力環境下での反応が細胞骨格の張力を緩めた状態(例えば、軟らかい基質上での培養)と類似していることや、細胞骨格の弛緩やMSチャンネル活性阻害といった我々の薬理的な予備実験の結果からも支持されている。

加えて、我々は転写活性化補助因子であ

る YAP/TAZ 分子の活性が模擬微小重力環境において有意に低下することを見出している。YAP/TAZ は、Hippo シグナル系において各種転写因子とともに細胞の分化を制御する。また、最近、細胞の力覚刺激において重要な役割を担うことが報告された。YAP/TAZ 分子が微小重力環境下での細胞の分化制御に関与している可能性は高く、模擬微小重力環境下でのその活性抑制は6~12時間内に開始しているため、上記仮説を検証する上で、細胞の重力感知の初期反応に対する良い指標となりうる。申請者は、これまでに YAP/TAZ の活性は細胞骨格の張力やMSチャンネル活性とも関連していることを確認している。

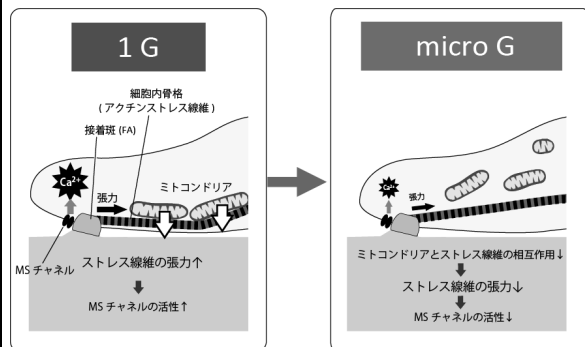


図1. 細胞の微小重力環境の感知のモデル図

地上(1g)では、細胞内骨格であるストレス線維に、線維自身が生み出す張力、比重が比較的大きいミトコンドリア等との相互作用による力(重力作用)、足場の硬さが働きバランスを保っている(左)。しかし、微小重力環境(μ G)では、ミトコンドリアなどから受ける張力が変化する。その情報は細胞膜の裏打ち構造を介してMSチャンネルに伝わり、 Ca^{2+} シグナルが変化して、細胞が骨格の張力変化を感知すると考えられる(右)。

2. 研究の目的

最近の宇宙実験により、個々の培養動物細胞が微小重力環境を感知し応答することが分かってきた。しかし、そのメカニズムの詳細は不明である。本研究では、この課題に挑戦し「重力変化は比重の重い細胞内器官を介して細胞内骨格の張力に影響を与え、細胞の初期応答を引き起こす」という仮説を検証し、動物細胞が微小重力環境を感知する仕組みを分子レベルで明らかにすることを目的とした。特に、MSチャンネルと転写活性化補助因子 YAP/TAZ に注目して、感知応答反応におけるそれらの役割と上流経路を解析した。その際には、申請者が参画している国際宇宙ステーション「きぼう」における宇宙実験プロジェクトを利用し、細胞の重力感知/応答機構に関わる分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

「重力変化がミトコンドリアなどの比重の重いオルガネラを媒介に細胞骨格に伝わり、

細胞骨格の張力が変化し、その張力変化を MS チャネルなどを介し細胞が感知する」という作業仮説を、間葉系幹細胞 (MSC) を用いて検証した。具体的には、下記の項目に注目して、3D クリノスタットによる模擬微小重力環境下の実験を進め、ISS「きぼう」での宇宙実験では、主に、模擬実験での結果の裏付けデータを取得した

(1) 細胞を培養する足場の硬さを変えることにより、細胞骨格の張力を修飾し、細胞の重力感知・応答反応への影響を解析した。また、細胞骨格の張力を薬理的に増強し、その効果を解析した。予備的な結果として、細胞骨格の張力を抑えた場合、微小重力環境下と類似した反応が観察されている。逆に、細胞骨格の張力を亢進させた場合、細胞の応答反応が抑えられるか、検討した。

(2) 細胞の重力変化の感知機構を明らかにするために、働いていると考えられる分子の同定を進め、siRNA 法などを用いて、その働きを阻害・促進した際の影響を調べた。特に Hippo シグナル経路の中で機能する転写因子調節分子で、細胞の足場の硬さに依存して局在・活性が変化する YAP/TAZ に注目した。さらに、宇宙実験のサンプルを用いて、実際に YAP/TAZ のリン酸化状態・下流経路の活性化状態を解析し、応答反応の中での役割も解析した。

(3) 微小重力環境下において、重量感知を担うと予想するミトコンドリア、細胞骨格や接着斑の動態をイメージング解析に取り組んだ。宇宙実験において「きぼう」内に設置された蛍光顕微鏡を用いて、ミトコンドリア、細胞骨格や接着斑の動態をライブ・イメージング観察を試みた。

(4) ミトコンドリアなどのオルガネラと細胞骨格を繋ぐアンカー分子の機能を阻害し、その影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 作業仮説の検証を目的に、間葉系幹細胞を使い細胞の足場の硬さと細胞の模擬微小重力環境に対する応答反応の関連を検討した。その結果、1G 条件下では軟らかい足場 (ヤング率、10 ~ 15 kPa) に比べ硬い足場 (ヤング率、> 2 MPa) において骨分化が亢進したが、模擬微小重力環境下では、骨分化に対する足場の硬さの影響は見られなかった。さらに、国際宇宙ステーション「きぼう」実験棟における宇宙実験に参加し、間葉系幹細胞を使い細胞の足場の硬さと細胞の模擬微小重力環境に対する応答反応の関連を検討した。その結果、模擬微小重力環境下の予備実験の結果と同様、作業仮説を支持する結果が得られた (図 2)。すなわち、1g 環境下では、足場が硬いと MSC の骨分化が亢進していたが、微小重力環境下では、骨分化に対する足場の硬さの効果は失われていた。言い換えれば、硬い足場の上では、1g 群に比べ微小重力環境群では骨分化が抑えられていたが、

足場の硬さが軟らかいときには、微小重力環境下での骨分化の抑制が見られなかった。軟らかい足場では細胞内骨格があまり発達せず張力が低下することが知られていることから、微小重力環境の感知と細胞内骨格の張力の関連性が示唆された。実際、薬理的に細胞内骨格の張力を強めると模擬微小重力環境下における骨分化の抑制が回復した。以上の結果より、微小重力環境の感知と足場の硬さの感知のメカニズムに関連があることが示唆された。

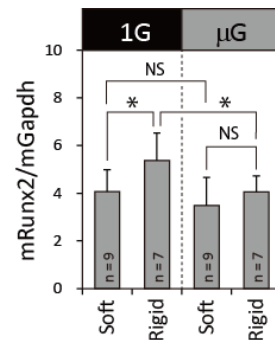
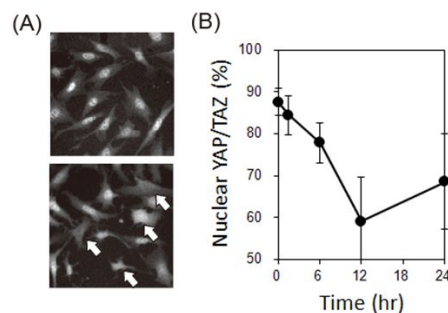


図 2. 微小重力環境 (μG) 下では、MSC の骨分化への足場の硬さの影響は消失した

硬い足場 (ヤング率 > 2 MPa) と軟らかい足場 (同 10 ~ 15 kPa) で培養した MSC の骨分化を誘導し、分化マーカー発現量を解析した。1G 条件下では硬い足場で骨分化が亢進したが、μG 条件下ではその効果は見られなかった。
*, p < 0.05. NS, not significant.

(2) YAP/TAZ は細胞の足場が硬いと活性化・核内に移行し、軟らかいと細胞質に移行する傾向があることが知られている。この YAP/TAZ 分子の局在・活性化が、細胞を微小重力環境下においたときに変化するかどうか、検討した。その結果、細胞を 3D クリノスタットにより模擬微小重力環境下におくと、細胞を軟らかい足場で培養した時と同様に、YAP/TAZ 分子が核外へ移行する傾向が見られた。また、その反応は、3D クリノスタットに細胞をセットしてから 6 時間後にみとめられた。

図 3. 模擬微小重力環境に反応する YAP/TAZ



(A) 転写活性化補助分子の YAP/TAZ は活性化状態では核内に局在し (上)、不活性化により核外に移動する (下、矢印)、(B) 模擬微小重力環境下に細胞を移して 6 時間後には YAP/TAZ の核外への移行が見られた。

また、模擬微小重力環境においた MSC 細胞の YAP 転写活性をレポーターアッセイ法により測定し YAP 分子の活性を調べた。YAP - TEAD 複合体の転写活性をモニターするプロモーターアッセイを行った結果、模擬微小重力環境においた MSC に YAP 転写活性の低下が認められた。また、Western blotting 法により、細胞内の YAP 量とリン酸化 YAP (S127) 量を解析した。その結果、対照群の細胞と比べ模擬微小重力環境においた細胞にほとんど変化は見られなかった。従って、YAP 活性は細胞内局在の変化に依存すると考えられた (図 4)。YAP は Hippo 経路の Lats などによりリン酸化を受けて核外に移行することが知られている。しかし、模擬微小重力環境においた MSC において YAP のリン酸化量に関して変化は見られなかった (図 4)。従って、MSC を模擬微小重力環境下におくと、リン酸化ではない制御により YAP は核外へ移行し YAP シグナル活性が低下する、と考えられた。

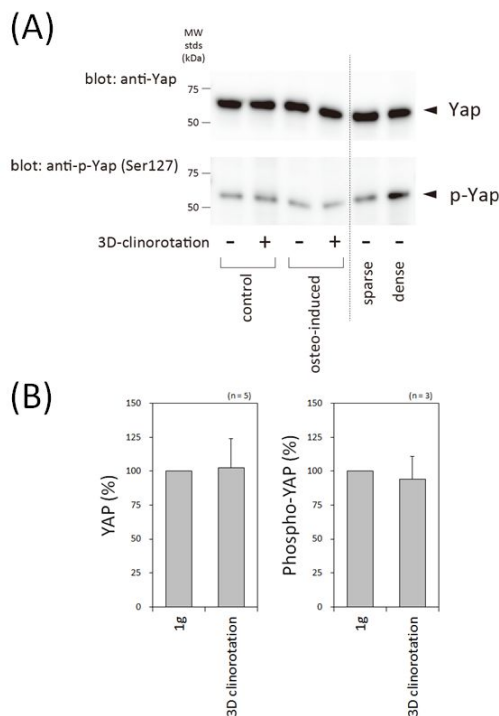


図4. 微小重力環境下においたMSCの細胞内 YAP 量とリン酸化 YAP 量 (Ser127) の Western blotting 解析

(A) 1g 環境下、あるいは、模擬微小重力環境下 (24 時間) で培養した MSC 抽出液をサンプルとし、抗 YAP あるいは抗リン酸化 YAP (Ser127) 抗体による Western blotting。(B) 各バンドの定量解析結果。模擬微小重力環境下においても YAP 量、リン酸化 YAP 量、いずれの変化も見られなかった。

また、国際宇宙ステーション内で培養した間葉系幹細胞においても、YAP 分子が核内に局在している細胞の割合が対照群より低下

していた。従って、YAP 分子の活性低下が細胞の微小重力環境感知におけるシグナル伝達経路である可能性が示唆された。

(3) 宇宙実験における細胞のライブ観察に関しては、カメラのブラックアウト、ラップトップのフリーズ、ダウンリンクの遅さ、等の原因から計画通りには行えず、特に、培養装置から取り出してから顕微鏡観察するまでに時間を要したため 1g 条件環境が失われ、1g 群の観察が行えなかった。

(4) 核やミトコンドリアとストレス線維を結ぶアダプター分子の発現抑制により核やミトコンドリアとストレス線維の相互作用を修飾し、細胞の模擬微小重力環境の感知への応答を解析した。その結果、間葉系幹細胞において、アダプター分子の発現抑制により、(模擬) 微小重力依存的な細胞内シグナルが失われることを見出した。従って、核やミトコンドリアとストレス線維の相互作用が、細胞の (模擬) 微小重力環境感知に関与している可能性が示唆された。

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 5 件)

Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M: Identification of Mefflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells. *Sci. Rep.* 6: 22288, 2016. (査読有)

Sokabe M, Sawada M, Kobayashi T: Ion channels activated by mechanical forces in bacterial and eukaryotic cells. *Subcell Biochem.* 72: 613-626, 2015. (査読無)

小林 剛, 曾我部正博: 骨と筋におけるメカノセンシングとメカノシグナリング. *THE BONE.* 29: 255-263, 2015. (査読無)

Ito G, Kobayashi T, Takeda Y, Sokabe M: Proteoglycan from salmon nasal cartilage promotes in vitro wound healing of fibroblast monolayers via the CD44 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456: 792-798, 2015. (査読有)

曾我部正博, 澤田康之, 小林 剛: 機械受容チャネルのメカノトランスダクション機構. *細胞工学.* 33: 934-943, 2014. (査読無)

[学会発表] (計 12 件)

小林 剛, 橋爪藤子, 田中瑞奈, 丸山昭洋, 東端 晃, 矢野幸子, 成瀬恵治, 二川 健, 曾我部正博 「模擬微小重力環境においた

間葉系幹細胞の YAP/TAZ の活性化抑制」
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
田中瑞奈、齋木貴博、島本祐哉、曾我部正博、小林 剛 「ストレス線維の張力低下により誘導された接着斑解体におけるエンドサイトーシスの役割」 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Sokabe M, Kobayashi T “Possible Mechanisms for Gravity Sensing in Single Cells” 11th Asian Microgravity Symposium (AMS2016) Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Oct. 27, 2016.

Kobayashi T, Tanaka M, Hashizume T, Higashibata A, Yano S, Nikawa T, Sokabe M “Loss of Rigidity Sensing of Mesenchymal Stem Cells under Microgravity” 11th Asian Microgravity Symposium (AMS2016) Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Oct. 26, 2016.

Kobayashi T, Sokabe M “Initial Step of Gravi-Sensing in Mesenchymal Stem Cells” the 13th Korea-Japan Joint Seminar on Space Environment Utilization Research Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Oct. 25, 2016.

Kobayashi T, Sokabe M “Cellular Active Touch Sensing of Substrate Rigidity” 5th Nagoya Biomimetics International Symposium, Nagoya institute of Technology, Nagoya, Aichi, Oct. 21, 2016.

小林 剛、橋爪藤子、田中瑞奈、丸山昭洋、東端 晃、矢野幸子、成瀬恵治、二川 健、曾我部正博 「微小重力環境における間葉系幹細胞の YAP/TAZ の活性化抑制機構」 日本宇宙生物科学会第 30 回大会 2016 年 10 月 15 日 愛知医科大学(愛知県長久手市)

小林 剛、橋爪藤子、東端 晃、矢野幸子、二川 健、曾我部正博 「細胞の微小重力感知におけるストレス線維の張力の関与」 BMB2015 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

小林 剛、曾我部正博 「動物細胞における微小重力環境センシング機構」 日本宇宙生物科学会第 29 回大会 2015 年 9 月 26 日 帝京大学板橋キャンパス(東京都板橋区)

小林 剛、曾我部正博 「細胞メカニクス・システム：アクティブタッチによる基質の硬さ感知」 第 63 回高分子討論会 2014 年 9 月 24 日 - 26 日 長崎大学(長崎県長崎市)

小林 剛、橋爪藤子、東端 晃、矢野幸子、二川 健、曾我部正博 「細胞の微小重力感知におけるストレス線維の張力の関与」 第 28 回日本宇宙生物科学会大会 2014 年 9 月 22 日 - 23 日 大阪府立大学(大阪府大阪市)

Kobayashi T, Sokabe M “Roles of stress fiber tension in gravity sensing of mesenchymal

stem cells” International Symposium on Mechanobiology 2014, Okayama University J-Hall, Okayama, Okayama, May. 20-23, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

[http:// www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI, Takeshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 40402565