

研 究 報 告 書

「生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：原田 伊知郎

1. 研究のねらい

体の臓器や組織の機能主体は細胞である。しかし、単に様々な種類の細胞が塊となつて一つの臓器が構成されているわけではない。細胞は細胞外マトリクスと呼ばれる巨大な分子からなる足場に接着し、それによって整頓された形で存在している。コラーゲンも代表的な細胞外マトリクスの一つである。細胞外マトリクスは組織や細胞をつなぐ単なる糊のような存在であると思われていたが、近年、細胞はインテグリンと呼ばれるレセプターを介して様々なマトリクス分子に接着・認識することで本来の機能を発揮していることが明らかにされてきた。加えて、細胞は同一のマトリクスに接着していても、その足場の固さをも認識して、増殖・分化・移動などの機能を調整していることが明らかになってきた。細胞は足場との接着点に常に力を加え、その力に対してどの程度マトリクスが変形するのかという物理的な情報を取得していると考えられている。

現在までこのような足場の固さを認識する分子センサーモデルが考案されているもののその具体的な機構については明らかにはなっていない。また、足場の固さ依存的に特異的に活性化する分子機構の存在についても見出されていない。足場の物性が異なるときに観察される分子挙動としてもっとも顕著なことは、接着点に局在化する分子の集合・解離の速さが著しく異なるということであり、それらの平均的な活性化量については大きな変化として検出されない。本研究では、そのような分子の動的挙動に着目し、それら分子の「局在・解離の“ゆらぎ”がセンサーになっているのではなか」という作業仮説を出発点に、細胞が周辺環境の物性を認識する機構の解明を目指した。

細胞が力や歪みのような物理情報をどのように化学的な情報へと変換しているのか、メカニズムの解明をもっとも困難にしているのは、“細胞の力”という物理情報と生化学的な知見との対応である。そこで本研究では、細胞が接着点にかける力と接着点に關与する分子との関係を明らかにするために、光ファイバーを歯ブラシのようにポストをアレイ化したマイクロ加工培養基板を創製し(図 1)、細胞が接着点にかける力の大きさと、そこに局在するシグナル分子との相関関係から、細胞が足場の物性をどのように検出・認識しているのかを明らかにすることを目標とした。

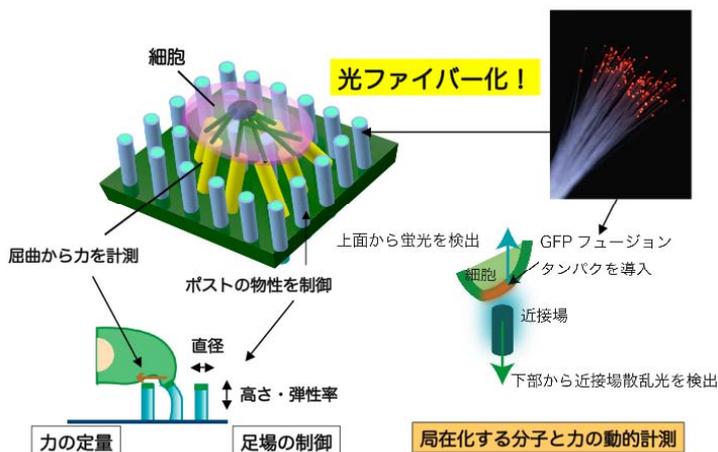


図1 本研究のねらい。細胞の力と接着点局在分子の動的挙動を同時計測する培養基板を開発し、周辺物性環境認識システムを動的モデルとして考察する。

2. 研究成果

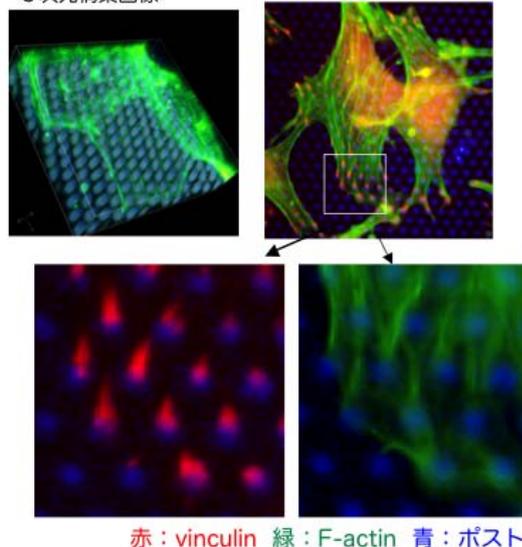
(1) 計測手法の確立

細胞が接着点にかける力の大きさと、そこに集結するシグナル分子局在の時間変化との相関関係を検出する方法として、新しいタイプの微細加工培養基板の開発を試みた。現在まで、様々なマイクロパターン培養基板が開発されている。しかし、本研究の目的を達成するためには現在まで開発されているものに加え、1. 足場となるポスト自体の固さが可変可能、2. 蛍光分子の観察が可能、3. 細胞が分泌する細胞外マトリクス等の非特異的吸着がない、という条件を満たすものでなくてはならない。そこで、本研究では屈折率の高い水ゲルを、直接基板となるカバーガラスから林立させた培養基板の開発を試みた。水ゲルであれば原料となる架橋剤の仕込み量を変えることで固さの調整が可能であり、タンパク質の非特異的吸着を回避できる。また、ガラスから直接ポストを林立させることで、ポスト一つ一つを光ファイバーのような光源とし、接着点のみの蛍光分子局在の観察が期待できる。しかし、鋳型を用いる従来のマイクロパターン基板の作製方法では柔らかい水ゲルを直接ガラス上へ林立させることは難しい。そこで、本研究では2光子励起重合法という重合技術を用いることで、新しいタイプの培養基板の作製を行った。2光子励起重合法による水ゲル重合の一般的な方法はないため、様々な光重合開始剤と素材となるモノマー、及び架橋剤との組み合わせによる材料選定を行った。その結果、水溶液中のモノマーを重合させるためには、架橋剤と数種類の光重合剤の組み合わせが存在することが明らかになった。水溶液のまま光照射によって重合できる水ゲルは、培養液のような塩濃度中においても透明であり、加えて高い屈折率を有していることも分かった。ポストの形状は高さ5~10 μm 、直径1~2 μm の高アスペクト比のものが作製可能であった。また、本技術によって作製した培養基板上において細胞の培養も可能であり、ポスト先端に細胞が接着することが分かった(図2)。

(2) 細胞の力計測と局在分子観察

力の計測方法は、作製したポストの形状、及び弾性率を原子間力顕微鏡にて計測し、理論値による算出を行った。この方法では、ポスト先端部位の変位を画像解析により計測することで力を算出するため、リアルタイムで計測することが可能である。この一連のプロセスを自動処理するプログラムを作製することで、細胞の力の動的変動を計測することが可能になった。しかし、計測されたものは作製した基板評価に基づく間接的な算出であったため、直接細胞が力をかけた様子を実験的に再現することで、ポストの屈曲と力の関係を実測する必要性があり、今後の課題である。また、実際に計測するものは「ポストの変形」であり、力がかかってもそれらが釣り合っている場合については判定ができない。このことは、領域会議でも議論された力の計測の本質的な問題点である。現時点では、細胞が接触しているポスト全ての変形量から予測できるのではないかと考えているが、その理論的予測についても今後の課題である。

共焦点顕微鏡による
3次元構築画像



赤：vinculin 緑：F-actin 青：ポスト

図2 開発した水ゲル3次元パターンニング培養基板上の線維芽細胞培養結果。細胞はポストの先端に接着点分子複合体を形成して力をかける様子が観察された。

作製した培養基板を光ファイバーのような光源として用いることも可能であることが確認された(図3)。図に示すように、アクチンファイバーが集結するところにのみ強い蛍光が観察された。このような光ファイバー型としてのリアルタイム計測について現在行っている。

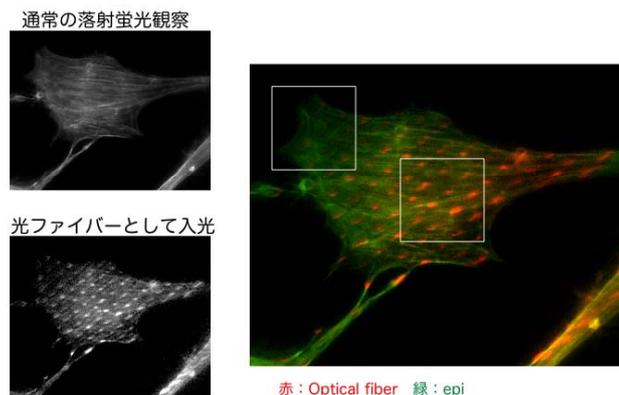


図3 開発した培養基板を光ファイバーとして観察。GFP-actinを導入し全反射蛍光顕微鏡によって観察した結果、接着点のみの観察が可能であった。

(3) 蛍光タンパク質導入の検討

細胞内タンパク質のリアルタイムイメージングでは蛍光タンパク質を付加した分子を導入するのは一般的な方法である。しかし、細胞外マトリクスとの接着点に局在化する分子の発現量は、分子複合体の形成・解離のキネチクスに影響を与える可能性が考えられる。このため本研究の開始と同時に、様々な分子の過剰発現による細胞移動などの影響について検討を行ってきた。その結果、接着点局在分子である vinculin, focal adhesion kinase, talin は分子複合体形成のキネチクスに影響を与えてしまうことが分かった。また paxillin, zyxin のようにそれらの発現量の大小に対して、キネチクスに大きな影響を与えないアダプタータンパク質も存在することが分かった。このような分子を複合体マーカーとして力の同時計測が可能であると考えられる。また、これらの予備的検討中において、細胞が発揮する力に依存して分解を受ける分子が存在し、その分解プロセスが分子複合体形成プロセスにおいて重要な役割を果たしているということが、予期せぬ結果として得られた(現在投稿準備中)。

3. 今後の展開

細胞の足場に対する物性認識システムは単に正常な機能を維持するだけでなく、創傷治癒や様々な疾患、癌細胞の移動など病態に関わる現象に関与することが多い。今後は開発した細胞の物性認識計測方法を用いることによって、様々な生理機能との関わりについて応用展開するとともに、細胞が発揮する力がどのように化学的な情報へと変換していくのか、その一般的なシステムについて明らかにしていきたい。

4. 自己評価

本研究開始当初の出発点は培養基板を用いることで細胞が発揮する力と分子複合体形成のキネチクスの同時動的計測が前提であったが、予想以上に計測技術の確立に多くの時間を費やしてしまい、具体的な分子モデルの追求には至らなかった。しかし、本研究を通して、細胞が発揮する力の動的な変動に対して接着点に形成される分子複合体の動的変動は著しく速いことが明らかになり、本研究のねらいであった、分子複合体形成過程そのものにセンシング機構の実体があることが示唆された。研究開始時と比較し、現時点における接着点からのシグナル伝達について、その動的な変動が注目されるようになってきている。そのようななかにおいて、本研究で達成した力と分子の同時動的計測技術は、今後物性認識メカニズムの解明に大きく貢献できると考えている。また、開発した培養基板は作製に非常に特殊な技術が必要であるものの、細胞を観察し計測するためには特殊な技術を必要としない汎用性の高いものとすることができた。今後はその汎用性を生かし、細胞の機械的なパラメータと生理的機能を関連づけることによって、生理機能の新しい計測技術への応用展開も目指したい。

5. 研究総括の見解

細胞が接着点にかける力と接着点に関与する分子との関係の解明に向けてのユニークな系の確立ができた。今後、本技術を利用して、足場の物性を認識する仕組みの理解が進むことが期待出来、楽しみである。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Yamaki K, Harada I, Goto M, Cho CS, Akaike T., Regulation of cellular morphology using temperature-responsive hydrogel for integrin-mediated mechanical force stimulation., <i>Biomaterials</i> . 30 (7), 1421-7 (2009)
2. Machida S, Watanabe-Nakayama T, Harada I, Afrin R, Nakayama T, Ikai A., Direct manipulation of intracellular stress fibres using a hook-shaped AFM probe., <i>Nanotechnology</i> . , 21 (38), 385102-8 (2010)
3. Watanabe-Nakayama T, Machida S, Harada I, Sekiguchi H, Afrin R, Ikai A., Direct detection of cellular adaptation to local cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy. <i>Biophys J.</i> , 100 (3), 564-72. (2011)

(2)特許出願

なし。

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

- ・原田伊知郎、八巻和正、赤池敏宏“Force dependency of generation and annihilation behavior of molecular complex at Extracellular matrix adherence point.” 第61回 日本細胞生物学会大会(2009.6)
- ・原田伊知郎、赤池敏宏第”Analysis of Mechanical Interaction between Cell- Extracellular Matrices by 3D micro patterned culture substrate.” 46回日本生物物理学会年会(2008.12)
- ・原田伊知郎、八巻和正、赤池敏宏”Quantitative analysis of focal adhesion turnover dependent on elastic property of the ECM.”第62回日本細胞生物学会大会(2010.5)

招待講演

- ・Ichiro Harada “Fabrication of Microneedle Arrayed Substrate for Regulation and Analysis for Cell- ECM Mechanical” Interaction.International Symposium on Engineering Micro-/Nano-Materials based on Self-Assembling and Self-Organization (ISEM2008 Returns)(2008.12)
- ・原田伊知郎「マイクロ加工培養基板を用いた細胞と細胞外マトリクスとの力学的相互作用の解析」第8回日本再生医療学会総会(2009.3)
- ・原田伊知郎「生体内細胞の力学環境場に対する応答性」第55回低温生物工学会(2010.7)

国内学会誌・総説等

- ・原田伊知郎、赤池敏宏 「細胞機能の力学的制御と細胞外マトリクス工学」生体の科学 第59巻 第2号
- ・原田伊知郎 「弾性体としての細胞外マトリクスと細胞機能の力学的相互作用」再生医療 2008 Vol5 No2 pp32-37
- ・原田伊知郎 培養基盤表面のナノ・マイクロ加工技術による細胞の環境物性制御 遺伝子医学 MOOK 別冊 第2章2節 (2009)