

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成20年度採択分

平成23年5月23日現在

研究課題名（和文） 細胞の力覚機構の解明  
研究課題名（英文） Study of Mechanisms of Cellular  
Mechanosensing

研究代表者

佐藤 正明 (SATO MASAOKI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授



研究の概要：我々の体を構成する細胞の多くは力を感じるセンサ「力覚」を有している。細胞に外力が負荷すると、これらのセンサが力学的刺激を生化学的信号へと変換し、その結果細胞の機能や形態に様々な変化が起こると考えられる。しかしながら、その機構については不明な点が多い。そこで本研究では、細胞に特異的に力学刺激を負荷する手法と最先端のバイオイメージング技術を融合した実験系を駆使して、力覚候補部位に備わる機能と、細胞の形態的応答に潜む原理あるいはこれらの時空間的關係について研究し、最終的には細胞力覚機構の解明を目指す。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・医用材料学

キーワード：バイオメカニクス、バイオイメージング、細胞外基質、細胞骨格、細胞内情報伝達、Rhoファミリー、ストレスファイバ

### 1. 研究開始当初の背景

力学的刺激を受けた細胞に起る応答として細胞内カルシウムなどセカンドメッセンジャの濃度上昇およびそれに続くシグナリングタンパク質の活性化といった一連の現象が知られており、既に多くの報告がある。これらは主として分子生物学、生化学などの立場からの研究であり、細胞内に普遍的に伝わる信号を想定したものである。しかしながら、これだけでは作用した力の方向に応じて細胞が応答するという結果を説明できない。細胞の形態を最終的に決定する因子は、細胞骨格の配向とそれを支える焦点接着斑の位置であり、それを制御しているのは細胞に作用する力を最小限に留めようとする細胞自身のダイナミックなフィードバック機構であると考え、我々は本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

我々の身体を構成する細胞の多くは力を感じるセンサすなわち「力覚」を有している。例えば、せん断応力負荷に対して内皮細胞は流れの方向に配向し、繰返し張力負荷に対して張力方向と直交する方向に配向する。しかしながら、作用する力に応じて細胞が配向を決定する機構については全く不明である。力を感知していると考えられる候補の小器官として、①細胞接着部位、②ストレスファイバ

バ、③細胞膜のチャネルやレセプタ等、が考えられるが、その力の感知がどのようにして細胞の最終的な形態変化につながるのか、その機構は明らかではない。そこで、本研究においては、①力覚部位の機能、②細胞の形態的応答原理を研究し、最終的には細胞の力覚機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

対象とする細胞として内皮細胞、筋細胞、骨細胞、線維芽細胞等を使用して下記の実験を実施した。

#### (1) 流れ負荷実験

独自に開発した平行平板型およびT型フローチャンバを使用して流れ負荷実験を行った。流れによるせん断応力や空間的せん断応力勾配を変化させることによって、細胞の形態的応答を顕微鏡で観察するとともに細胞内のシグナル伝達のイメージングやタンパク質の活性化などについて解析した。また、上記のフローチャンバに加えてマイクロピラー上に細胞を培養して流れ負荷条件下で細胞に発生する牽引力を計測できる装置を新たに開発し実験を行った。

#### (2) 張力負荷実験

本実験系では、2種類の負荷実験を行った。一つは、磁気マイクロビーズを細胞の膜に接着させ、新たに開発した磁気ピンセットによ

って細胞の局所に力を負荷する方法で、細胞内のアクチン、カルシウム、一酸化窒素の動態を解析した。他の一つは、伸縮膜上に細胞を播種して張力を負荷する方法で、細胞の形態変化に関する活性化因子の探索とその遺伝子の解析を行った。その他、自発的に収縮する筋細胞を使って収縮活動に関与するシグナル伝達系の解析も実施した。

#### (3) 単離ストレスファイバの動的制御実験

最初にビジュアルフィードバック制御機構を備える実験装置を開発し、ストレスファイバの長さや張力を自由に制御可能とした。この装置を使ってストレスファイバの多様な力学特性や力の感知機構に関する実験を行った。

#### 4. これまでの成果

##### (1) 流れ負荷実験に基づいた細胞の応答機構

① 流れ負荷時に内皮細胞が変形している様子をリアルタイムに観察できるシステムを開発し、細胞内のひずみ分布も解析した。この技術を使って細胞内のストレスファイバに発生するひずみの計測にも成功した。

② T型チャンバを新たに開発し、細胞間接着部位に力を作用させ、この部位の力覚機能の可能性を明らかにした。

③ PDMS製マイクロピラーアレイ上に内皮細胞を培養し、流れを負荷しながら細胞牽引力の変化を計測することに成功し、形態変化と共に牽引力がダイナミックに変化していく様子を詳細に捉えた。

##### (2) 張力負荷実験に基づいた細胞の応答機構

① 細胞の局所に力学刺激を与えるための磁気ピンセットを開発した。

② 単離骨細胞の力学刺激に対するカルシウム応答および一酸化窒素産生挙動を観察する *in vitro* 実験系を確立し、局所的な刺激に対するそれらの応答の時間的変化と空間的局在の特性を明らかにした。

③ 繰返し伸展刺激による内皮細胞の極性転換と細胞内アクチン骨格の再構築に関与する Rho ファミリーの活性化因子 (Rho-GEF) の網羅的探索を行った結果、GEF-H1 を含む複数の遺伝子の同定に成功した。

##### (3) 細胞力学応答プロセスにおける細胞内シグナルの分子イメージング

① 力学刺激負荷時の細胞内のシグナル伝達をライブイメージングによって観察する技術を開発し、RhoGTPase の活性状態変化を FRET 観察することに成功した。

② 独自に開発した「運動できる培養筋細胞系」を利用することにより、生体筋では解析が難しかった収縮活動依存性の「細胞内シグナル伝達系活性化」から「機能遺伝子の発現」に至る過程を分子レベルで解明した。

##### (4) ストレスファイバの力覚に果たす役割

細胞は自らが受けた「力」をいつまで生

学量に変換し続けるかは、これまで説明されていなかった。これを説明する「力」のホメオスタシスの分子メカニズムを提案した。

#### 5. 今後の計画

これまでに細胞に対する力負荷による形態的応答解析のための実験装置の開発を終え、これらの装置を使用したデータの取得も70%近く進んでいる。実験結果として当初より想定していた力覚候補部位の内、細胞間接着部位、焦点接着斑、ストレスファイバ自身は、力学負荷条件に依存して果たす役割の大小があるものの、いずれも等しく機能している可能性がある。

以上の点から、現在細胞の力感知のシグナル伝達系として仮説を立てている内容を実験的に検証する作業に力を注ぐ。細胞の形態変化に関しては葉状仮足の形成、焦点接着斑の再配置、ストレスファイバの形成という過程をたどり、この過程に Rho ファミリーが関与していることは明らかである。Rho ファミリーの活性化因子やそのシグナル伝達系に焦点を絞り、網羅的かつ個別に確実に成果が得られる方策によって検討を進める。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

(1) Y. Ueki, N. Sakamoto and M. Sato: Direct measurement of shear strain in adherent vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394, 94-99, 2010.

(2) T. Adachi, Y. Kameo and M. Hojo: Trabecular bone remodelling simulation considering osteocytic response to fluid-induced shear stress. *Phil. Trans. Roy. Soc. A* 368, 2669-2682, 2010.

(3) T. Tsuji, Y. Ohta, Y. Kanno, K. Hirose, K. Ohashi and K. Mizuno: Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 3590-3600, 2010.

上記雑誌論文(1)の研究が2010年の「Faculty of 1000 Medicine」に選定された。この内容は同年3月のNHK仙台放送「てれまさむね」で報道されると共に5月のNature Web特集記事でも紹介された。本研究主題と関連した安達らの論文が2011年4月にNature誌(472巻)に掲載された。

ホームページ

<http://www.biomech.mech.tohoku.ac.jp/satolab/home.html>