

二国間交流事業 共同研究報告書

令和4年4月1日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[代表者所属機関・部局]
北海道大学・大学院工学研究院
[職・氏名]
教授・大橋 俊朗
[課題番号]
JPJSBP1 20199903

- 事業名 相手国: スペイン (振興会対応機関: OP) との共同研究
- 研究課題名
(和文) 磁気ナノビーズを用いた内皮細胞メカノトランスダクション機構の解明
(英文) Investigation of Endothelial Mechanotransduction Mechanism by using Magnetic Nanobeads
- 共同研究全実施期間 2019 年 4 月 1 日 ~ 2022 年 3 月 31 日 (3 年 0 ヶ月)
- 相手国代表者(所属機関・職・氏名【全て英文】)
University of Zaragoza・Professor・Ricardo Manuel Ibarra
- 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,770,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,870,000 円
	2年度目執行経費	1,900,000 円
	3年度目執行経費	円

- 共同研究全実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	3 名
相手国側参加者等	3 名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

- 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1 年度目	2	1	0 (0)
2 年度目	0	0	0 (0)
3 年度目	0	0	0 (0)
4 年度目			(0)

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 本委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入: 相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は本委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流実績の概要・成果等

(1)研究交流実績概要(全期間を通じた研究交流の目的・研究交流計画の実施状況等)

細胞は周囲の力学環境に適応して自らの形態および機能を変化させることが知られている。これは細胞が力学刺激を感知・伝達し生化学的信号に変換しているためでありこの機構はメカノトランスダクションと呼ばれている。細胞のメカノトランスダクションは生体の生理・病理に深く関わることからそのメカニズムを知ることは非常に重要であるが、力学刺激がどのような経路で生化学信号に変換されているのかについて今なお未解明の部分が多い。例えば、血管内皮細胞はアテローム性動脈硬化症の発生に深く関与していることが知られており、血流に応答して血流方向に伸長・配向することから盛んに研究が行われてきたがメカノトランスダクション機構の全容は明らかではない。そこで本研究の目的は、磁気ナノビーズ技術を高度に駆使して流れ刺激に対する内皮細胞の力学伝達経路の推定を新しい視点で探求するものである。流れせん断応力に対する内皮細胞の力学受容体候補として膜タンパク質、細胞骨格、細胞接着斑、細胞間接着部位などが挙げられてきた。近年では、内皮細胞表面に突出する直径 0.2 μm 、長さ数 μm ～十数 μm 程度の線状の一次繊毛 (Primary cilium) が力学刺激の感知に深く寄与していることが指摘されている。このように、力学受容体について様々な候補が提案されているが、力学伝達経路については不明な点が多く残されている。これは“流れ”という細胞全体に負荷されるグローバルな力学刺激が実際に細胞のどの部位に力学刺激として伝達され、そこで生化学信号に変換されているのか、についての理解が不足しているためである。本申請課題では、磁気ナノビーズ技術およびマイクロフレイディスク技術により内皮細胞に力学刺激を負荷する部位を空間的に制御し、内皮細胞の流れ負荷応答のメカニズムを新しい視点で探求するものである。日本側研究代表者大橋がこれまでに従事してきた流れ負荷内皮細胞実験技術、マイクロフレイディスク技術および相手国研究代表者 Prof. Ibarra より新たに導入する磁気ナノビーズ技術を高度に融合させ、流れ負荷刺激を模擬して磁気ナノビーズにより力学刺激部位を空間的に制御することにより、流れ負荷によるメカノトランスダクション機構を検討するものである。流れを負荷せず磁気ナノビーズによる力学刺激によりあたかも流れ刺激が加わったかのように内皮細胞が応答し、伸長・配向といった形態変化を示すことが観察されるのであれば、流れを負荷した内皮細胞の力学伝達経路の解明がさらに進むことと期待される。研究期間を通して、基盤となる磁気ナノビーズ導入実験の確立を行い、力学刺激部位として、1) Primary cilium, 2) 細胞膜表面および 3) 細胞内部の 3 箇所の中で 1)および 2)を集中的に実施した。磁気ピンセットによる磁場負荷により Primary cilium に力学刺激を負荷した結果、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が確認された。また、流れ負荷においても同様にカルシウム応答が確認されたことから Primary cilium はメカノセンサとして機能していることが強く示唆された。また、Primary cilium の変形から力学特性を計測できる可能性が示唆されたため、Primary cilium の力学特性計測という新しい研究展開も図った。さらに、上記 2)の実験を応用することで内皮細胞表面に存在する Glycocalyx layer の力学特性計測が可能であることが見出されたため新たな研究課題として取り組んでいる。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

従来、内皮細胞の流れ負荷実験はミリメートルスケールの平行平板型フローチャンバを用いてマクロな流れ場を実現することで行われてきた。しかしながら、このようなミリメートルスケールの流れ場は細胞といったマイクロメートルスケールと比べて、はるかに大きな空間スケールであるため、細胞表面全体に対するグローバルな力学負荷として捉えることはできるが、細胞に対するローカルな力学場として定量化することは難しい。そこで本申請課題では、Prof. Ibarra の有する磁気ナノビーズを用いて内皮細胞の流れ負荷応答を模擬的に実現することで内皮細胞の流れに対する力学応答伝達機構を解明しようとするものであり、このようなアプローチは申請者らの知る限り国内外で報告はない。特に Primary cilium が力学刺激の感知に深く寄与していることが指摘され、Primary cilium の存在は動脈硬化症を抑制

するという新しい知見も報告されているが、Primary cilium に選択的に力学刺激を加えて変形を加えた際の細胞内の力学伝達経路を研究した例は皆無である。初年度は、力学刺激部位として Primary cilium および細胞膜表面に対し、磁気ナノビーズを付着させ外部刺激により細胞の応答を観察した。その結果、磁気ピンセットによる磁場負荷により Primary cilium を変形させると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が確認された。また、流れ負荷においても同様にカルシウム応答が確認されたことから Primary cilium はメカノセンサとして機能していることが確認された。また、力学刺激に対する変形から Primary cilium の力学特性が計測できる、また上記の実験を応用することで内皮細胞表面に存在する Glycocalyx layer の力学特性計測が計測できる、ことが次々と見出されたため新たな研究展開も図っている。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

スペイン側研究代表者である Prof. Ibarra は化学工学をバックグラウンドに持ち、基礎的研究として磁気に関する応用物理学的研究や応用研究として磁気ナノビーズを用いた神経細胞の成長誘導に関する研究などを推進しており当該分野の世界的な研究者である。蛍光標識磁気ナノビーズの作製には高度な化学合成に関する技術を必要とするが Prof. Ibarra の研究グループには豊富な経験を積んだ研究者が揃っており、Prof. Ibarra を含めたグループメンバーと研究交流を行いながら共同研究を推進する意義は大変大きい。一方、日本側共同研究代表者の大橋はこれまで細胞バイオメカニクスおよび細胞メカノバイオリジー研究で多くの実績を積んできている。例えば、内皮細胞や軟骨細胞の力学応答シグナル伝達経路の解明に関する研究に長年にわたり従事してきた。近年では、内皮細胞表面に突出する Primary cilium が力学刺激の感知に深く寄与していると示唆されていることに強い関心を持ち研究展開を図ってきた。したがって、日本側とスペイン側の研究グループは細胞の工学的応用研究といった共通の研究スタイルを持っているものの、本申請課題で主となる細胞バイオメカニクス実験技術において全く異なる専門技術を有するため、双方の技術を融合させることで本研究課題の推進が可能となった。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

近年、日本をはじめ韓国、中国、台湾、香港およびシンガポールでは欧米の大学・研究機関との共同研究体制を次々と打ち出しており、それに比例してアジア諸国の学術領域におけるプレゼンスも高まっている。このような状況の中で、スペインとの共同研究は日本と欧州との学術交流の点においてその意義は大きいと考えられる。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取り組み、成果)

本申請課題の推進において日本側では博士後期課程学生2名が主体となった。担当学生はその後のキャリア展開を視野に入れ、共同実験および研究打ち合わせに参加し国際共同研究の遂行能力を養ってきた。Mr. Mazlee Bin Mazalan は Malaysia からの国費留学生であり Universiti Malaysia Perlis で講師の職位にある。現在は、博士課程を修了・帰国し、Universiti Malaysia Perlis にて教員としてのキャリアを続け研究者として当該領域の発展に貢献し続けている。Mr. Dung Tien Do はベトナムからの国費留学生であり、現在も引き続き博士号の取得を目指しているが、取得後は母国の大学に教員として勤務することを希望しておりベトナムにおいて当該領域の研究を先導していきたいとの希望を強く持っている。研究室内においては、本申請課題の研究を推進する上で、修士課程学生や学部過程学生に対する研究指導を行っており、そのような機会を通して大学教員としての教育・研究に必要な素養を育みつつある。

(6)将来発展可能性(本研究交流事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本研究から得られる知見は内皮細胞の流れに対する力学応答の理解を一層深めるものであり、それは

即ち動脈硬化症など内皮細胞が関連した血管疾患の発生・発達の機序の解明そして診断技術の開発に貢献することが期待される。また、本申請内容は細胞の力学応答研究において新たな実験技術となり得る研究手法を提案・開発するため、細胞バイオメカニクス of 新しい基盤技術として当該分野の発展に大きく資することができると考えられる。実際に、本申請課題の計画で当初予定していなかった **Primary cilium** および **Glycocalyx layer** の力学特性計測が可能であることが見出されたことは新しい細胞バイオメカニクス実験技術として今後の発展が期待される。以上の通り、医療福祉分野および生体医工学分野に還元できるメリットは大きいと言える。将来的には引き続き共同研究体制を維持しながらより臨床に役立つ知見を提供すべく、細胞の力学刺激に対する応答能を亢進させる薬剤や生化学的因子を用いた研究に進めていきたいと考えている。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記述してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞、産業財産権の出願・取得など

本事業における共同研究を基盤として、2019 年度に日本学術振興会国際共同研究加速基金（国際共同研究強(B)）に応募を試みたところ 2019 年 10 月に採択を受けた。国際共同研究強(B)においては、本共同研究の枠組みに加えて米国の研究者が参画しており、さらなる研究の展開を視野に入れて研究を推進している。