

研究報告書

「細胞運動・機能を操作するナノ・マイクロメカニカルシステムの構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 木戸秋 悟

1. 研究のねらい

生体内における細胞の形態・運動性・機能は、その細胞の属する組織が感受する種々の静的ないし動的な力学環境(生体力学場)により重要な調節を受ける。細胞外力学環境の設計・制御は、細胞行動と機能の制御とともに適切な組織形成誘導の基礎として、再生医工学用人工基材(骨格基材や人工細胞外マトリックス等)の開発における主要課題の一つとなっている。この課題においては、人工基材における細胞外力学環境の微視的レベルでの設計と、その結果誘導される細胞行動・機能調節および組織の力学応答との間の関係を系統的に把握することが必要である。一方、その把握のための、細胞自体、人工基材、および細胞-人工基材間相互作用各々の力学的特性のナノレベルでの定量的理解は不十分であり、細胞外力学環境の微細設計・分子設計の定量的指針に関しては、ごく限られた知見しか得られていないのが現状である。

本研究課題では、細胞、人工基材、および細胞-人工基材間相互作用のメカノバイオロジーの定量的理解の拡充と、細胞外力学環境の微細設計(ナノ・マイクロメカニカルデザイン)とそれによる細胞行動の制御を目的とした。具体的には、細胞のメカノタクシス挙動に着目した。メカノタクシス(mechanotaxis)は細胞が周囲組織のより硬い領域を指向して移動する性質(機械的走性)であり、基材表面に固定された走化性因子指向性のハプトタクシス(haptotaxis)とともに、細胞運動制御の方法の一つとして近年注目されつつある。メカノタクシスの方向や移動速度等を定量的に制御し得る二次元あるいは三次元の人工基材の力学環境条件を明らかにし、その微細設計・分子設計の指針に応用した。また細胞運動を定量的に制御し得る材料は、細胞運動の分子メカニズムの系統的研究のための画期的プラットフォームとなり得る。そのようなナノバイオメカニズム解明のための新しいナノ・マイクロメカニカルシステムを開発し、細胞運動研究の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係を解析し、材料の精密設計に基づくメカノバイオロジー研究の展開を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞はそれらが生着する組織環境の生物学的、化学的、機械的条件に依存した接着伸展形態の動的応答性、すなわち運動性を示す。細胞運動は生体組織における様々な生理学的・病理学的過程に重要な役割を有しており、そのメカニズムの理解と制御技術の確立は、細胞分子生物学における学術的基礎からバイオテクノロジー・生体材料設計等の医用工学分野への応用展開も含む重要課題の一つである。従来、細胞運動の制御には、液性因子濃度勾配により誘導されるケモタクシスや、表面固定化接着因子等の密度勾配への応答性であるハプトタクシスなど指向性運動特性が活用されてきている。これに対し、私は独自に細胞接着性ゲルの表面弾性率分布のマイクロパターンニング技術を開発し、細胞の硬領域指向性

運動として知られるメカノタクシスの制御条件を世界に先駆けて確立した¹⁻²⁾。本課題ではその技術をさらに展開し、細胞運動を自在に制御する微視的材料力学場(ナノ・マイクロメカニカルシステム)の系統的設計およびメカニズム研究とともに、これを利用した新規の細胞機能操作材料の開発を行った。具体的には、1)細胞運動を整流化する微視的培養力学場の構築、2)よく定義された培養力学場における細胞の接着牽引力ダイナミクスの系統的解析、3)間葉系幹細胞の分化フラストレーションの発見、の3点の成果をあげている。特に成果3は、幹細胞の未分化保持材料としての応用可能性が強く期待され、新しい幹細胞操作材料の開発に貢献するものである。

(2) 詳細

1) ファイマンラチェット型非対称弾性勾配ゲルによる細胞運動の整流化

メカノタクシスの誘導条件の本質は、細胞一体の接着面で弾性率が急峻かつ不連続的に増加する弾性境界の導入にある¹⁻²⁾。このことはメカノタクシスが弾性境界においてのみ局所的に誘導される走行性であることを意味し、材料表面上での長距離にわたる細胞運動制御への応用の際には多数の弾性境界の機能的配置設計が必要となる。この課題に対して本項目では、鋸型の非対称弾性勾配を連続的に有するマイクロパターンングゲルを設計し、細胞運動の整流化の誘導について検討を行った(図1)。光硬化性スチレン化ゼラチンゲル表面の弾性率分布を光リソグラフィ的にパターンング

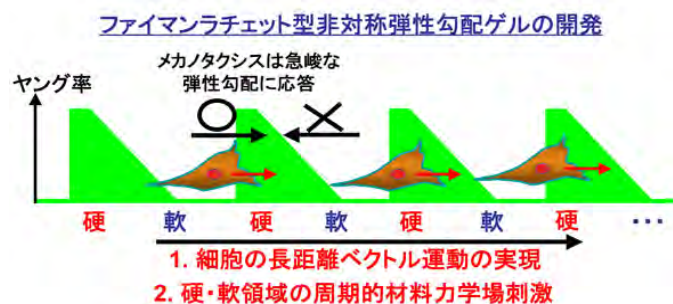


図1. 非対称弾性勾配ゲルを用いた細胞の長距離ベクトル運動制御

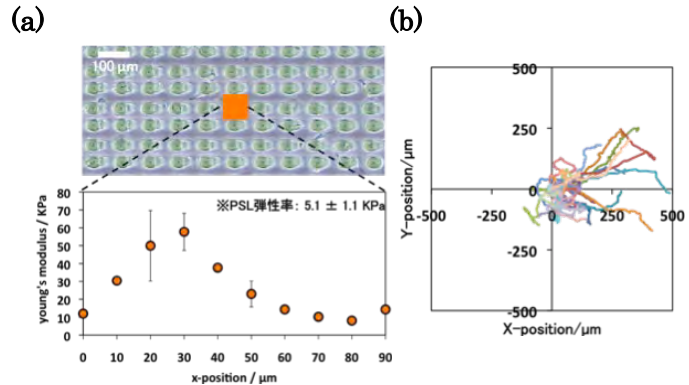


図2. a) PSLを導入した鋸型非対称弾性勾配パターンングゲルの位相差顕微鏡像および単位パターンの弾性率分布。b) 3T3線維芽細胞の24時間培養時における移動軌跡

し、細胞運動の長距離整流化を可能とする非対称弾性勾配場の条件探索を行ったところ、約10 kPaの低弾性率領域と約60 kPaの高弾性率領域間を約30 μm幅で急峻に上昇し、約60 μm幅で緩慢に減衰する非対称な弾性率分布が90 μmおきに繰り返された非対称弾性勾配ゲルに、約5 kPaの交差軟領域PSLを導入した系が最もよく整流化を誘導することがわかった(図2)。細胞培養基材表面に非対称弾性勾配分布を設計することにより、細胞運動の長距離整流化が可能となることが示唆された(投稿中)。

2) 弾性勾配ゲル界面における細胞接着牽引力分布の局所ダイナミクス解析

メカノタクシスを誘導する弾性境界条件を確立した上で、メカノタクシスのメカニズムの検討を行った。接着系細胞のアメーバ様運動における運動方向の決定は一般に、一体の細胞内に前進方向と後退方向の極性が形成されることに始まる。弾性境界近傍で運動する細胞の前進・後退領域の極性決定に
関与するメカニカルな要因として、細胞接着班のサイズと分布、および収縮性細胞骨格から接着班に伝達され基材へと負荷される接着牽引力の分布のダイナミクスに着目した。メカノタクシスが起る際の接着牽引力の挙動を牽引力顕微解析法により調べたところ、運動極性の決定に基材弾性率に依存した牽引力の経時的变化が強く関与している様子が可視化された(図 3)。すなわち、軟領域に侵入した細胞の一部領域においては牽引力の顕著な低下(図 3-⑤⑥)が、硬領域に侵入した細胞領域ではその顕著な増大(図 3-⑦⑧)がそれぞれ引き起こされ、特に牽引力の減少した領域の接着は不安定となり、硬領域での接着よりも速く仮足の退縮が誘起される。その結果、硬領域への細胞体全体のシフトが起こることにより、メカノタクシス挙動が発現するという機構が示唆された。

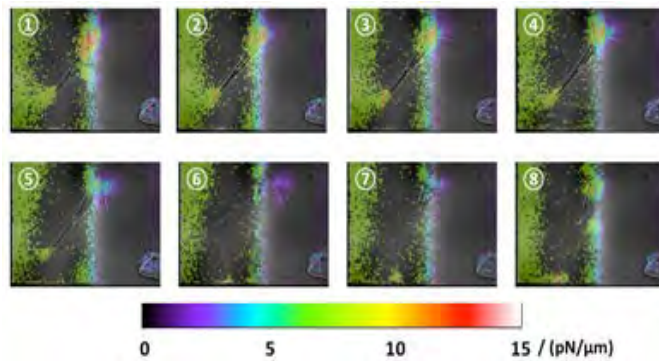


図 3. 弾性境界近傍で運動する 3T3 線維芽細胞の接着牽引力ダイナミクス

3) 微視的培養力学場設計に基づく幹細胞分化フラストレーションの誘導

幹細胞フラストレーション仮説とは、硬・軟領域を微細パターン化したゲル上で間葉系幹細胞 MSC に硬軟領域間の非定住培養を行った場合、特定の系統への分化誘導が抑制されてその未分化状態が維持される可能性について、私が独自に提唱している理論である。MSC は培養床の弾性率に依存して異なる細胞種へ分化することが知られており、もし硬・軟領域のいずれかに一定時間以上定住すると特定の系統への分化方向の決定が起こるが、硬・軟領域をランダムあるいは周期的に経験させると MSC の系統決定がブロックされるものと予想

分化マーカーに対する免疫染色

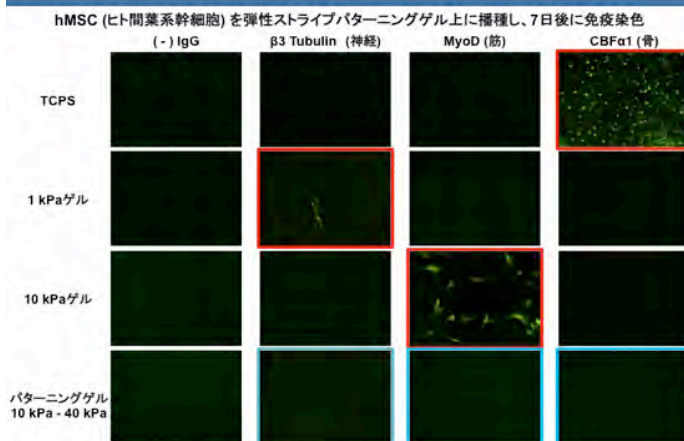


図 4. 10kPa および 40kPa の弾性率を有する 50 μm 幅の交互パターン上で 7 日間培養後の MSC に対する各種分化マーカー発現の評価。神経、筋、骨原系統へのいずれの分化も抑制されている(最下段)

される。この仮説を検証するため、50 μm幅の硬軟ストライプパターン(硬領域:50kPa, 軟領域:5kPa)を作製し、この上でのMSCの運動を一週間にわたり調べたところ、およそ2~3時間程の周期の硬軟領域間の非定住運動が誘導されることを確認できた。その後、MSCの幹細胞性を評価したところ、各種幹細胞マーカーの正常な発現および神経・筋・骨分化マーカーの明確な発現抑制が見られ、通常のプラスチックシャーレ上での培養に比べ、より良質の未分化状態を維持していることが明らかとなった(図4)。

4) 考察

以上のように本研究では、微視的培養力学場の系統的設計に基づく細胞運動と機能を操作する弾性基材の多用な可能性を開拓した。これらの成果の中で特に、異なる力学場間を強制的に移動させることで力学場シグナルの振動入力を駆動することによる間葉系幹細胞の分化フラストレーション現象の創発が確認されたことは、全く新規の発見である。そのメカニズムに関しては、ES細胞においてその幹細胞性の維持が転写因子Hes1の発現レベルの短周期振動特性と深く関わっている現象が示唆を与えるものとする。すなわち、遺伝子発現調節の上流に関わるHes1の振動がES細胞内でのその下流のタンパク質群の振動を誘起することが幹細胞性保持の要因となっているように、間葉系幹細胞においてもメカノシグナル入力という最上流刺激がその下流に続くメカノトランスダクション関連タンパク質群の振動を誘起することによってES細胞と同様の幹細胞性保持環境が細胞内に実現され得るものと考えられる。このような力学場刺激による幹細胞の分化制御のメカニズムは研究が始まったばかりで十分な知見は未だ確立されていないが、そのメカノシグナル伝達様式としては、『力学場依存的メカノセンサータンパク質活性のメカノアロステリック制御』→『接着斑構造リモデリング』→『細胞骨格構造制御による細胞内部応力の調節』→『細胞核の変形』→『核膜被層ラミナマトリックスに連結したクロマチンの高次構造制御』→『遺伝子発現調節』という流れが考えられている。これら各段階に関与する分子メカニズムが、幹細胞のメカノバイオロジーの領域で研究されているが、いずれの段階のシグナルタンパク質群の振動システムが幹細胞性保持に関わるか、今後の詳細な調査が必要である。

3. 今後の展開

本研究では、独自の弾性マイクロパターンニング材料と技術を応用して、細胞運動の系統的な操作材料の確立とともに、細胞運動と連動する力学場シグナルの振動入力システムの構築に成功した。最も重要な成果として、『幹細胞の分化フラストレーション』創発の実証に成功しつつある。この現象は幹細胞の未分化維持技術としての再生医療分野への応用可能性が期待されるが、一方そのような幹細胞操作のための基礎知見にとどまるものではないと考えている。すなわち、幹細胞性の本質は細胞内プロテオミクスの時空間振動ダイナミクスにあり、それが細胞のリプログラミングのメカニズムに深く関わる可能性を予想している。この視点から、次の展開として、iPS細胞のメカノバイオロジー挙動を調べる予備実験にも既に着手している。将来的には幹細胞性の起源～幹細胞内トランスクリプトーム・プロテオミクスの非線形振動システムダイナミクスの特質を明らかにする研究へと発展させていきたいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、ナノバイオメカニズム解明のための新しいナノ・マイクロメカニカルシステムを開発し、細胞運動研究の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係の解析、および材料の精密設計に基づくメカノバイオロジー研究の展開をねらいとした。このねらいに対し、本研究では、細胞運動の自在な操作を可能とする培養力学場設計技術を構築でき、細胞運動のメカノバイオロジー研究を系統的に進める上で役立つ弾性パターンニング材料の利用を提唱するとともに、革新的な成果として幹細胞の未分化保持材料の構築に着手することができた。当初に意図して研究のねらいはこれらの3方向で総合的に実現できたものと評価している。また、そのような成果ばかりでなく、本研究から一つの極めて重要な仮説が検証されつつある。『幹細胞の分化フラストレーション』であるが、この現象は単に幹細胞の未分化維持技術のための基礎にとどまるものではないと考えている。すなわち、幹細胞性の本質は細胞内プロテオミクスの時空間振動ダイナミクスにあり、それが細胞のリプログラミングのメカニズムに深く関わる可能性を予想している。将来的には幹細胞性の起源を明らかにする研究への発展性も生み出すことができたものと考えている。

5. 研究総括の見解

細胞行動の制御を目的として独自に開発した細胞接着性ゲルの表面弾性率分布のマイクロパターンニング手法により、細胞運動を制御する細胞機能操作材料の開発を行った。

主な成果として、1)細胞運動を整流化する培養力学場の構築、2)培養力学場における細胞の接着牽引力ダイナミクスの解析、3)間葉系幹細胞の分化フラストレーションの発見、の3点があげられる。

本研究で細胞運動を操作する弾性基材開拓のための有力な指針を示したこと、ならびに間葉系幹細胞の分化フラストレーション現象の創発が確認されたことは興味深い新発見である。前者は細胞運動の力学的側面と細胞内の生化学過程・シグナル伝達との関係を理解するための基本となる指針が本研究によって得られることを意味し、また、後者は幹細胞内トランスクリプトーム・プロテオームの非線形振動システムダイナミクスへの展開が可能であることを示しており、どちらも将来、細胞運動制御を可能にする重要な知見が得られたものと高く評価される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. S. Kidoaki*, Mechanics in cell adhesion and motility on the elastic substrates, <i>J. Biomech. Sci. Eng.</i> (2010), 5 , 218-228. |
| 2. T. Kawano and S. Kidoaki*, Elasticity boundary conditions required for cell mechanotaxis on microelastically-patterned gels, <i>Biomaterials</i> , (2011) 32 , 2725-2733. |
| 3. T. Kuboki, F. Kantawong, R. Burchmore, M.J. Dalby, S. Kidoaki*, 2D-DIGE proteomic analysis of mesenchymal stem cell cultured on the elasticity-tunable hydrogels, <i>Cell Structure and Function</i> , (2012) 37 ,127-139. |
| 4. M. Horning, S. Kidoaki, T. Kawano, K. Yoshikawa, Rigidity-matching between cells and the extracellular matrix leads to the stabilization of cardiac conduction, <i>Biophys. J.</i> (2012) 102 , 379-387. |

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)



1. S.Kidoaki, “Mechanobio-materials”: design of micropatterned elastic gels to control cell mechanotaxis and motility-related functions, 第 48 回生物物理学会年会, 2010 (招待講演)
2. 木戸秋 悟, 細胞運動・機能を操作する微視的培養力学場設計 表面科学 (2010) 31, 307-312.
3. 木戸秋 悟, メカノバイオマテリアル:細胞のメカノバイオロジーを操作する材料力学場設計 高分子 (2011) 60, 302-305.
4. 木戸秋 悟 “細胞の挙動を操作する微視的培養力学場の設計” 石原一彦、埴隆夫、前田瑞夫編集『バイオマテリアルの基礎』(第 4 章 3)、日本医学館, 2010(分担執筆).
5. 木戸秋 悟, メカノバイオマテリアル:細胞運動・機能を操作する微視的培養力学場設計, 第 60 回高分子討論会, 2011 (招待講演)