



骨芽細胞の力覚機構におけるアクチン細胞骨格の役割およびその構造再構築に関するバイオメカニクス

佐藤, 克也

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Date of Publication)

2009-12-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3271

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003271>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

骨芽細胞の力覚機構におけるアクチン細胞骨格の役割
およびその構造再構築に関するバイオメカニクス

平成17年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

佐藤 克也

目次

第1章 緒論	1
1.1 細胞バイオメカニクス	1
1.1.1 細胞の構造と細胞骨格	2
1.1.2 細胞力覚機構	8
1.1.3 刺激伝達経路としてのアクチン細胞骨格	9
1.1.4 アクチン細胞骨格の構造とその形成過程	11
1.2 骨芽細胞のバイオメカニクス	15
1.2.1 骨のリモデリングにおける骨芽細胞の役割	15
1.2.2 力学刺激に対する骨芽細胞の応答	17
1.3 本論文の目的と構成	19
1.3.1 目的	19
1.3.2 工学的意義	19
1.3.3 本論文の構成	21
第2章 構造体としてのアクチン細胞骨格が力学刺激応答特性に及ぼす影響	23
2.1 緒言	23
2.2 実験方法	24
2.2.1 実験の概要	24
2.2.2 観察試料の作成と観察方法	24
2.2.3 力学刺激の負荷方法	26
2.3 実験結果	28
2.3.1 アクチン細胞骨格構造の量	28
2.3.2 力学刺激に対する細胞のカルシウム応答	31
2.3.3 アクチン細胞骨格量の違いによる細胞の応答特性の変化	33
2.4 考察	35
2.4.1 力学刺激負荷手法の特徴	35
2.4.2 ニードルの直接押し込みによる細胞損傷の可能性	36
2.4.3 Cytoshalasin D の細胞活性への影響	37

ii 目次

2.4.4	アクチン細胞骨格の細胞力覚機構における役割	37
2.5	結 言	39
第3章	アクチン細胞骨格の構造的特徴が力学刺激応答特性に及ぼす影響	41
3.1	緒 言	41
3.2	実験方法	42
3.2.1	実験の概要	42
3.2.2	観察試料の作成と観察方法	43
3.2.3	力学刺激の負荷方法	43
3.3	実験結果	45
3.3.1	力学刺激に対する細胞のカルシウム応答	45
3.3.2	力学刺激に対する応答の刺激方向依存性	51
3.4	考 察	55
3.4.1	カルシウム応答を引き起こす変形量の生理的意味	55
3.4.2	カルシウム応答を引き起こす変形量の閾値と刺激方向依存性	55
3.4.3	刺激方向依存性を生み出す機構のモデル化	56
3.4.4	刺激方向依存性の細胞機能における役割	57
3.4.5	細胞機能の人為的制御への可能性	58
3.5	結 言	58
第4章	力学刺激に対するカルシウム応答を誘起する細胞構造変形量の評価	61
4.1	緒 言	61
4.2	実験方法	63
4.2.1	実験の概要	63
4.2.2	観察試料の作成と観察方法	64
4.2.3	力学刺激の負荷手法	64
4.2.4	細胞膜の変形量の解析手法	66
4.3	実験結果	68
4.3.1	局所変形負荷に対する骨芽細胞のカルシウム応答	68
4.3.2	カルシウム応答発生時における細胞膜の局所変形量	71
4.4	考 察	74
4.4.1	カルシウム応答を誘起する細胞膜変形量の物理的意味	74

4.4.2	カルシウム応答の刺激方向依存性を生み出す機構	74
4.4.3	細胞が感知する力学刺激の物理量	75
4.5	結 言	76
第5章	選択的張力解放に伴うアクチン細胞骨格の局所的脱重合	77
5.1	緒 言	77
5.2	実験方法	79
5.2.1	実験の概要	79
5.2.2	観察試料の作成と観察方法	80
5.2.3	焦点接着の局所的解除方法	80
5.3	実験結果	84
5.3.1	局所収縮による張力解放に伴うアクチン細胞骨格の構造変化	84
5.3.2	張力解放を伴わない場合のアクチン細胞骨格の構造変化	87
5.4	考 察	90
5.4.1	アクチン細胞骨格の動的安定性への張力の影響	90
5.4.2	アクチン細胞骨格の再構築機構における細胞内張力の役割	91
5.4.3	張力解放にともなう脱重合開始の物理的意味	91
5.5	結 言	92
第6章	アクチン細胞骨格の再構築を開始するひずみ量の評価	93
6.1	緒 言	93
6.2	実験方法	94
6.2.1	実験の概要	94
6.2.2	観察試料の作成と観察方法	96
6.2.3	単軸ひずみ負荷装置	97
6.2.4	ストレスファイバーの軸方向ひずみ量の評価	98
6.3	実験結果	101
6.3.1	圧縮ひずみ負荷に伴うストレスファイバーの構造変化	101
6.3.2	脱重合開始と軸方向ひずみ量との関係	103
6.4	考 察	104
6.4.1	アクチン細胞骨格の動的安定性における軸方向ひずみの重要性	104
6.4.2	脱重合を誘起するひずみ量の閾値の物理的意味	104

6.4.3	アクチン細胞骨格の再構築とひずみ量の関係	105
6.5	結 言	106
第7章	結 論	107
付録 A	原子ビームを用いた細胞接着制御の試み	113
A.1	緒 言	113
A.2	実験方法	115
A.2.1	基板表面の改質方法	115
A.2.2	観察試料の作成と観察方法	117
A.3	実験結果	118
A.3.1	材料基板表面の改質結果	118
A.3.2	細胞接着の観察	120
A.4	考 察	123
A.4.1	原子状酸素ビーム照射による影響	123
A.4.2	基板表面におけるパターン状の改質領域への細胞接着	123
A.5	結 言	124
付録 B	関連学術論文・学術講演	125
B.1	学術論文	125
B.2	国際会議	126
B.3	国内学術講演	127
	参考文献	129
	謝辞	139

第1章

緒 論

1.1 細胞バイオメカニクス

バイオメカニクスとは、生体の構造と機能の関係、あるいは、それらと生理学的機構との関連を力学的に理解しようとする研究分野である [Fung, 1990]. すなわち、生体は、力学的にはどのように理解することができるのか、あるいは、力の作用が、生体にどのような影響を与えるかを明らかにすることであると言える。これらの問いに対する答えを導くためには、生体内における様々な現象に対して、連続体力学や流体力学、熱力学などの種々の力学を適切に適用することが必要となる。力学的観点から対象を理解しようとする場合、どのような力学を適用するかに関わらず、その対象の構造を考慮することが不可欠である。そのため、生体を対象とするバイオメカニクスにおいても、まず、生体の構造に着目することが重要となる。生体の構造は、多数の階層性を有しているため、バイオメカニクスにおいても、それぞれの階層を対象としたアプローチが存在する。その中で、生体を構成する基本単位としての細胞を対象とした研究が、細胞バイオメカニクスである。

細胞は、生体の基本的な構成単位であり、生体一個体のマクロなレベルで見た複雑な生体機能についても、要素還元論的には、生体を構成する器官、組織、さらにはそれらを構成する細胞へとその素過程を求めることができる。さらに、細胞そのものに着目した場合、細胞内では、多岐にわたる生化学反応が生じており、それらの反応により、代謝やシグナル伝達などの細胞機能が発現されている。そのため、細胞への理解を深めようとする分野においては、生化学的手法を駆使したアプローチを中心として、細胞機能の解明を目指した取り組みが盛んに行われている。また、測定機器や解析手法などの急速な進歩に伴い、細胞の機能や機構に関する新たな発見が数多くなさ

2 第1章 緒論

れ、膨大な知見が蓄積され続けている。その端的な成果は、各種生物のゲノム解読とそのデータベース化として見ることができ、ヒトについても、その全配列の解読完了が宣言されている [The International Human Genome Mapping Consortium, 2001]。その結果、ゲノムから作られるタンパク質とその機能の解明が次なる重要な課題であるとの提案がなされている。基本的に細胞内の生化学反応は、タンパク質の相互作用から構成されている。そのため、それらの相互作用を明らかにすることは、主として生化学反応により実現されている細胞機能を明らかにする上で本質的である。現在、分子生物学的研究が盛んに行われ、その成果として、外部から加わる刺激に対する細胞の応答機構についても、入力と出力の間をつなぐ複雑な生化学的シグナリング・カスケードの全体像が徐々に明らかにされようとしている [Alberts et al., 2002]。

その一方で、細胞においても、あるいは、タンパク質の相互作用においても、機能の発現が、機械要素と同様にそれらの構造と密接に関わっている。多種多様な細胞機能の発現に際して、細胞構造のダイナミックな変化を伴う場合が数多く存在する。また、タンパク質の相互作用によるシグナル伝達を考えた場合にも、タンパク質の構造変化が、そのトリガーや調整因子として機能している例が数多く存在する。さらに、細胞に対する上位階層である器官や組織が、その機能を適切に発現する上でも、単一細胞、あるいは細胞群レベルでの形態や構造が適切に形成されることが不可欠である。したがって、細胞機構の解明を目指す上では、生化学シグナリング・カスケードの全体像を明らかにすることに加えて、それらの各要素を組み合わせた動的なシステムとして系を再構成するために、その構造変化や構成要素の時空間上でのダイナミクスを考慮する取り組みが重要となる。特に、構造・形態の変化、あるいは要素の空間的な局在の変化などは、本質的に力学的因子の場と切り離して考えることが不可能である。したがって、力学的観点に立ち、それらを取り扱うために適切な力学を駆使するアプローチが重要であると言える。

1.1.1 細胞の構造と細胞骨格

力学的観点から細胞の様々な機能にアプローチする場合、まず、その構造に着目することが重要である。動物細胞の構造概要図を図 1.1 に示す。動物細胞は、外環境との境界として細胞膜 (cell membrane) を有し、その内部に核膜に囲まれた細胞核 (nucleus)、および細胞小器官 (organelle) が存在している。細胞膜それ自体は、図 1.2 に示すように、リン脂質を主成分とする脂質二重膜 (lipid bilayer) であり、その厚さは約 5 nm 程

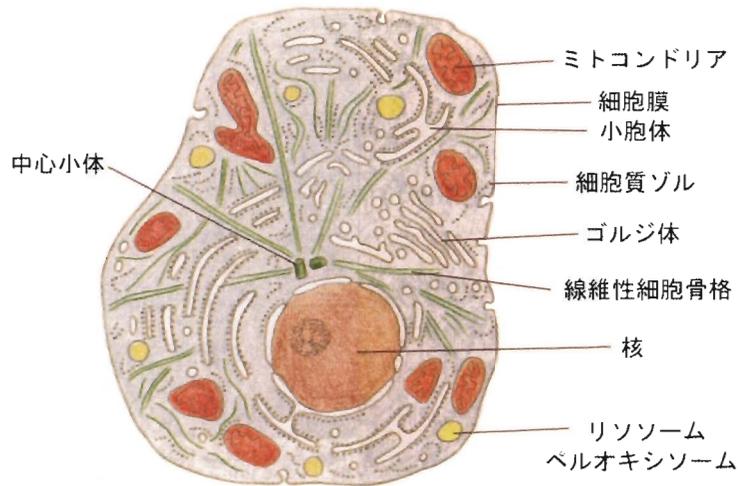


図 1.1 動物細胞の構造概要図 [Alberts et al., 2002 より]

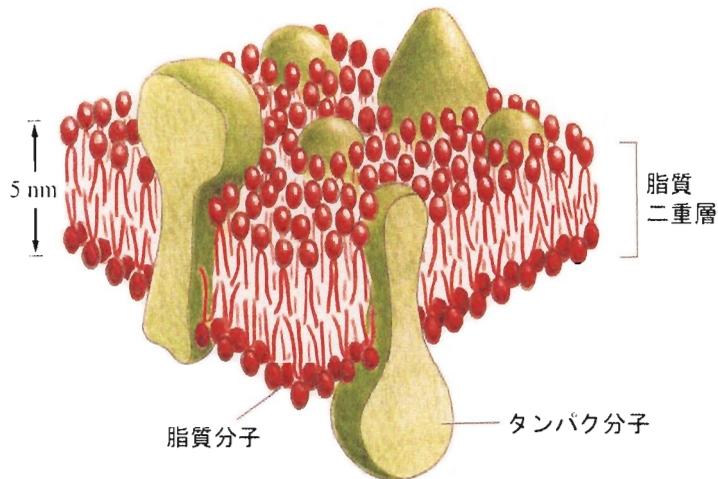


図 1.2 細胞膜の構造概要図 [Alberts et al., 2002 より]

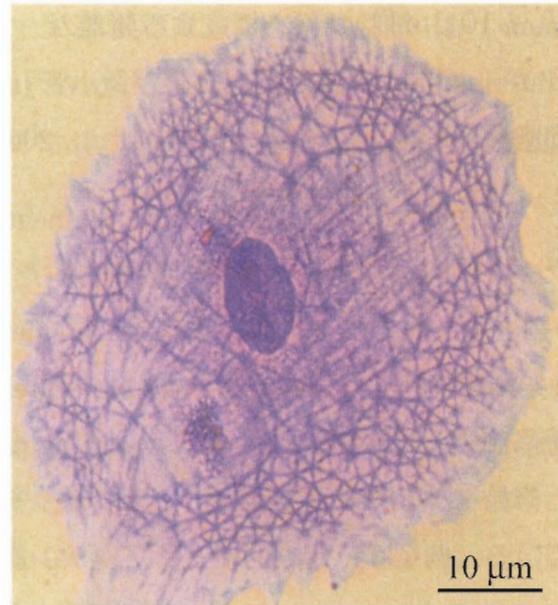
度であるとされ、非常に柔軟な構造物である。また、細胞小器官は、それぞれが固有の機能を有し、細胞内で協調的に働くことで細胞の活動を支えている。

これら細胞を構成する要素の中で、構造体として特に着目すべきは、線維性細胞骨格 (fibrous cytoskeleton) と呼ばれる構造群である。細胞骨格の観察例を図 1.3 に示す。図 1.3(a) は、培養細胞を固定し、coomassie blue (ほとんどのタンパク非特異的に染色する色素) で染色したものを観察した画像である。このように、細胞内全体に多様な線維状構造が存在していることが確認できる。さらに、図 1.3(b) は、本論文で取り

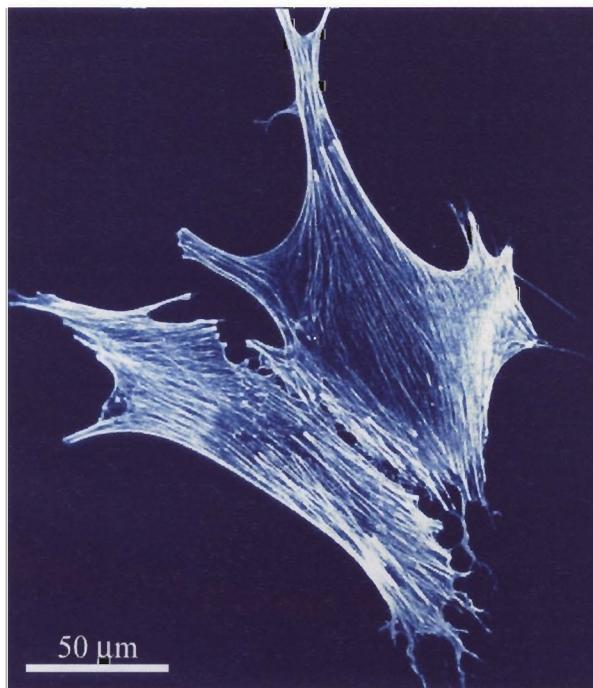
4 第1章 緒 論

上げる骨芽細胞様細胞 (osteoblast-like cell) のアクチン細胞骨格 (actin cytoskeleton) の観察例である。同図は、細胞の固定後、rhodamine-phalloidin (アクチンフィラメントを特異的に染色する色素) で染色したものを観察した画像である。このように、骨芽細胞様細胞では、細胞内で配向性を有したアクチン細胞骨格の密な構造が形成されている。

細胞が、その存在する組織などの種類に応じた適切な構造を形成・維持する上で、これらの細胞骨格と呼ばれるタンパクフィラメントから構成される構造が、その役割を担っている。これらのフィラメントから形成される構造が、細胞に機械的強度を付与し、その形態維持に支配的な影響を与え、さらに、様々な細胞機能において重要な役割を果たしている。したがって、力学的観点から細胞構造に着目し、細胞機能の解明を目指す上では、細胞の力学要素として構造を支える細胞骨格が非常に重要となる。



(a) 細胞骨格 (Coomassie Blue 染色)
[Alberts et. al., 2002より]



(b) 骨芽細胞様細胞のアクチン細胞骨格
(rhodamine-phalloidin 染色)

図 1.3 細胞骨格

6 第1章 緒論

細胞骨格は、三種類の代表的なタンパクフィラメントから構成されている。アクチンフィラメント (actin filament) は、細胞骨格を構成する要素の一つであり、その他には、中間径フィラメント (intermediate filament), および微小管 (microtubule) が存在し、それぞれが異なった細胞機能を担っている [Alberts et al., 2002].

アクチンフィラメント： アクチンフィラメント (actin filament) は、図 1.3 に示すように、主として球状アクチン (G-actin) が重合して構築された直径約 5 nm の線維状アクチン (F-actin) (分類上マイクロフィラメント (microfilament) とも呼ばれる), および、線維状アクチンを架橋するリンカータンパク (linker proteins) からなり、その他には、それらの複合体を修飾する結合タンパク質 (associating proteins) が含まれている。リンカータンパクと修飾タンパクの種類により、アクチン細胞骨格は、様々な形態をとることが知られている。例えば、比較的ゆるくアクチン線維を架橋する α -アクチニン (α -actinin) と Type-2 ミオシン (myosin-II) を含むアクチン細胞骨格は、ストレスファイバー (stress fiber) を形成する。特に骨芽細胞では、細胞内に配向性を有した、比較的太いバンドルを形成する。また、フィラミン (filamin) を主とする場合には、細胞膜直下に非常に微細なネットワーク構造を形成し、細胞膜の裏打ち構造として機能している。

アクチン細胞骨格の主要な役割として、(1) 細胞骨格要素として細胞に機械的強度を付与する、(2) 細胞運動における駆動力を発生させる、および(3) 細胞分裂などの細胞形状変化を生み出すことが知られている。これらアクチン細胞骨格の機能において、いずれの場合においても、アクチン細胞骨格は、その機能と密接に関連した構造形態をとり、さらに、アクチン分子そのものとその複合体からなる構造のダイナミクスが、様々な機能発現において非常に重要である [Bray, 2001].

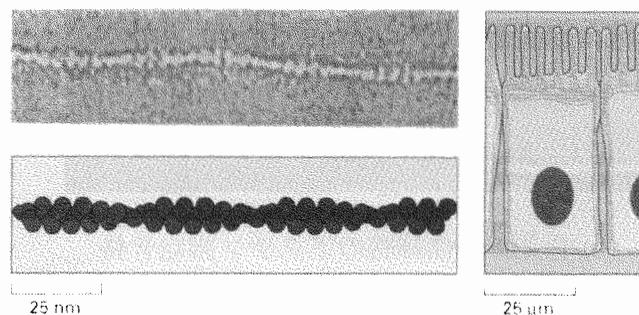


図 1.4 アクチンフィラメント [Alberts et al., 2002 より]

中間径フィラメント： 中間径フィラメント (intermediate filament) は、図 1.5 に示すように、後述する微小管とアクチンフィラメントの中間の太さを有する線維であり、直径約 10 nm 前後のタンパクフィラメントからなる。その構成は、各種細胞に共通に見られるラミン (lamin) に加えて、特定の組織に特異的に見られるビメンチン (vimentin) (結合組織)、ニューロフィラメント (neurofilament) (神経)、デスミン (desmin) (筋肉) などが知られている。核膜と細胞膜を結合したり、細胞質中に網目状のネットワーク構造を形成し、細胞に機械的強度を付与する役割を担っている。

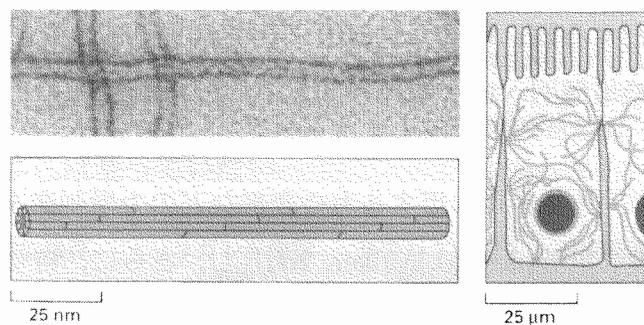


図 1.5 中間径フィラメント [Alberts et al., 2002 より]

微小管： 微小管 (microtubule) は、図 1.6 に示すように、直径が約 25 nm の中空構造を有するタンパクフィラメントであり、チューブリン (tubulin) からなる。チューブリンには、 α チューブリンと β チューブリンがあり、これら二つのチューブリンが会合したものが、さらに 13 個集まり、リングを形成する。このリングが管状構造を形成したものが、微小管である。微小管は、細胞内において、核近くの中心小体周囲に存在する微小管形成中心から放射状に伸びる構造を有しており、細胞内小器官の位置の固定、細胞内の能動輸送、および有糸分裂の際に染色体を分離させる役割などを担っている。

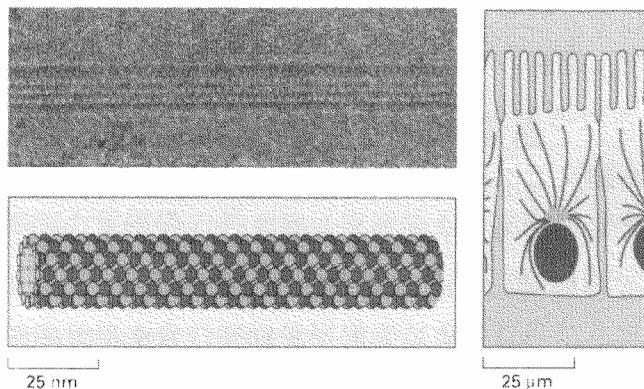


図 1.6 微小管 [Alberts et al., 2002 より]

1.1.2 細胞力覚機構

細胞バイオメカニクスの観点から、細胞構造に着目し、細胞機能との関連について検討する場合、多くの細胞の中でも、特に、力学的負荷や力学環境の変化を受ける組織内に存在する細胞が、研究の対象として取り上げられる。これらの組織は、力学環境の変化に対して、リモデリングにより組織の機能が調整されていることが知られている [Fung, 1990]。この組織レベルでの変化は、組織を構成する細胞が力学刺激を感知し、その構造・形態や活動を変化させた結果として生じる。そのため、細胞の形態と機能を理解しようとする際、特に力学的因子がそれらに与える影響を検討することが重要となり、その機構解明へのアプローチにおいて、細胞バイオメカニクスが有用である。

本論文では、細胞が、外部から作用する力や変形などの力学刺激を感じとり、生化学的なシグナルへと変換 [Gillespie and Walker, 2001] し、さらに、自らの活動を変化させるまでの機構全体を「細胞力覚機構 (mechano-sensing mechanism)」と定義する。この細胞力覚機構については、本論文で取り扱う骨芽細胞のみならず、血管内に存在する血管内皮細胞 (endothelial cell) や関節軟骨内に存在する軟骨細胞 (chondrocyte) などが研究対象として取り上げられており [Sokabe et al., 1997; Millward-Sadler and Salter, 2004]、力学刺激により活性化される様々な生化学シグナリング・カスケードが提案されている。代表的なシグナルとしては、力学刺激の負荷により、細胞内における cAMP や Ca^{2+} の濃度上昇が生じることなどが知られている [Reich et al., 1990; Cohen et al., 1997; Jacobs et al., 1998; Rosales et al., 1997]。これらの生化学シグナルは、カスケード下流に位置する PKA や PKC などのシグナルを活性化し、結果として、様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。

力学刺激により活性化されるシグナリング・カスケードの全体像が、徐々に明らかにされつつある一方で、細胞力覚機構においては、力や変形などの力学刺激が、生化学シグナルへと変換されるまさに細胞力覚機構の最上流部に位置する受容機構の理解が不可欠である。本論文では、この機構を「力学刺激受容機構 (mechano-reception mechanism)」と定義する。この力学刺激受容機構については、未だ不明な点が多いが、その中で、力学刺激受容機構の構成要素の候補として挙げられている要素の一つに、伸展活性 (stretch activated: SA) チャネル (または、力学刺激依存チャネル) がある [Guharay and Sachs, 1984; Kanzaki et al., 1999]。SA チャネルは、図 1.7 に示すように、細胞膜上に存在していると考えられており、骨芽細胞においてもその存在が報告

されている [Duncan and Mislser, 1989; Ypey et al., 1992]. また, SA チャネルは, 他の膜電位依存やリガンド依存のチャネルとは異なり, 細胞膜に作用する張力により直接的に活性化されると言われている. したがって, 細胞が力学刺激を感知する上では, 細胞構造に作用する力や変形などが, SA チャネルなどの力学刺激受容機構へと伝達されることが重要であると考えられる. しかしながら, その一方で, SA チャネル活性の評価は, パッチクランプ技術を用いて行われており [Sokabe et al., 1991], 電位変化測定の際には, 細胞膜および細胞膜直下の細胞骨格のみが取り出されて実験が行われているとよい. そのため, 細胞に実際に力学的刺激が負荷された場合, その刺激情報が, 物理的にどのように伝達され, さらに, その伝達された刺激情報が, どのような力学刺激受容機構を介して生化学シグナルへと変換されているかについての直接的な解明をもたらすには至っていない.

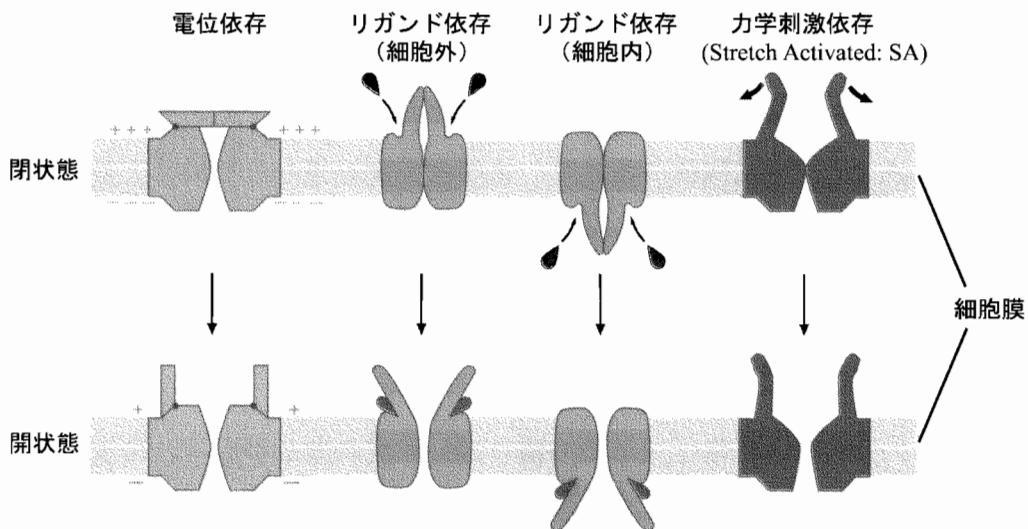


図 1.7 イオンチャネル [Alberts et al., 2002 より]

1.1.3 刺激伝達経路としてのアクチン細胞骨格

上述のように, 細胞力覚機構の最上流に位置する力学刺激受容機構が機能するためには, 細胞構造に作用する力や変形が, 受容機構へと伝達されることが重要である. その中で, アクチン細胞骨格を含む細胞骨格構造が重要な役割を果たしている可能性が提案されている [Duncan and Turner, 1995]. アクチン細胞骨格は, 図 1.8 および 1.3(b) に示したように, 細胞内でネットワーク構造を形成するのみでなく, 接着細胞におい

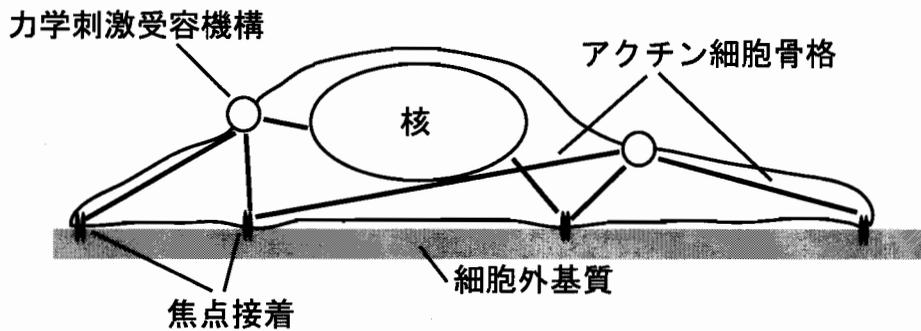


図 1.8 アクチン細胞骨格と焦点接着の模式図（側面図）

では、細胞外基質との接着を担う受容タンパクとして知られるインテグリン (integrin) を主とする焦点接着斑 (focal adhesion complex) に対して、アクチンフィラメントの一端が結合しており、主要な構造要素として働いている。したがって、力や変形が細胞に与えられた場合、それらの力学刺激は、直接的に焦点接着斑、およびそれに結合するアクチン細胞骨格へと作用する。そのため、アクチン細胞骨格と焦点接着斑からなる細胞骨格系が、細胞力覚機構において、重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、その重要性が指摘される一方で、実際に力学刺激が負荷された際、これら細胞骨格系に作用する力や変形などについて、詳細に取り扱った研究例は少なく、Ingber ら [2003a; 2003b] によるテンセグリティモデル (tensegrity model) など、仮説的な提案がなされているにすぎない。

さらに、アクチン細胞骨格は、単軸の繰り返し伸展刺激や細胞外液の流れによるせん断応力刺激などの方向性を有した力学刺激に対して、その構造が動的に再構築されることが知られている [Buckley et al., 1998; Wang et al., 2000; Chen et al., 2000; Neidlinger-Wilke et al., 2001]。アクチン細胞骨格が、細胞力覚機構において重要な役割を担っている可能性を考慮すると、この再構築現象が、力学刺激に対する応答の結果として生じているものか、あるいは、合目的的に行われているように捉えられる細胞機能の一部であるかの如何に関わらず、その機構の解明が、細胞力覚機構に関する新たな知見をもたらす可能性が十分にあると言える。

これら上述の細胞骨格構造と細胞力覚機構との関連を明らかにするためには、構造に作用する力と変形を力学的観点から取り扱うことが不可欠であり、細胞バイオメカニクスとして取り扱うべき課題であると言える。

1.1.4 アクチン細胞骨格の構造とその形成過程

本項では、本研究で着目しているアクチン細胞骨格の構造、および、その形成機構について述べる。

アクチン細胞骨格の形成機構： アクチン細胞骨格は、第1.1.1項で述べたように、主として、アクチン分子が重合したアクチンフィラメントからなる。アクチンフィラメントは、球状アクチンが重合してフィラメント状構造を形成した線維状タンパクである。その構造は、静的なものではなく、図1.9に示すように、常に重合 (polymerization)、あるいは脱重合 (depolymerization) を繰り返す動的な構造である。このアクチンの重合・脱重合が、バランスよく調整されることにより、細胞内でアクチン細胞骨格の構造が、ダイナミックに再構築される。例えば、アクチンの重合・脱重合を調整する一つの因子として、ATPが挙げられる。ATPと結合したATP-アクチンは、アクチンフィラメントの端に結合しやすく、次々と重合反応が生じる。ATPが加水分解されADPとなるよりも早く別のATP-アクチンが結合する状況では、アクチンフィラメントの端にATPキャップが形成され、フィラメントは伸長する。一方、モノマーアクチンの濃度が低下するなどの原因により、さらなるATP-アクチンの結合よりも、ATPの加水分解が早く生じるようになると、上述のATPキャップは消失し、フィラメントは脱重合により短くなる。

アクチンフィラメントの動的な重合・脱重合に加えて、アクチンフィラメントは、細胞内において多様な結合タンパクの修飾を受け、図1.10に示すように、非常に多様な

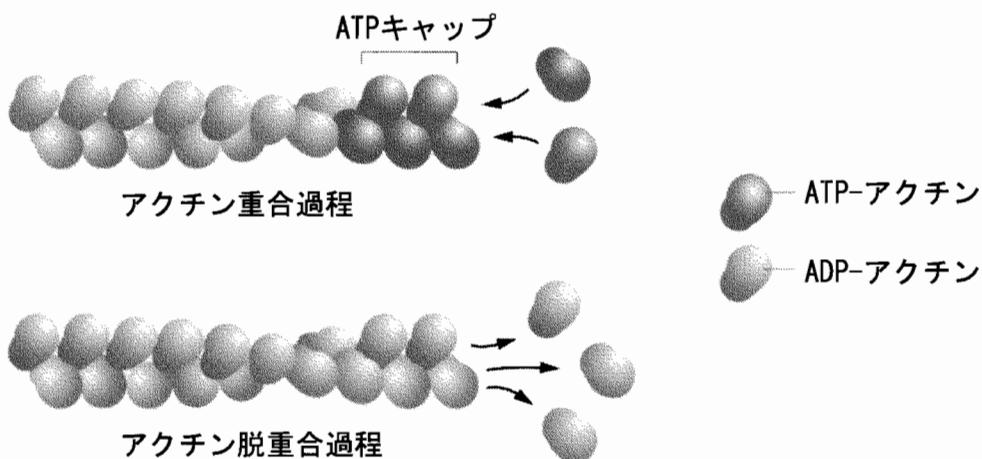


図1.9 アクチンフィラメントの重合・脱重合 [Bray, 2001 より]

構造を形成している。例えば、細胞皮層 (cell cortex) においては、フィラミンによって架橋され、密なネットワーク構造を形成する。あるいは、糸状仮足 (filopodia) においては、ヴィリン (villin) やフィンブリン (fimbrin) などにより架橋され、アクチンフィラメントの方向が揃った密なバンドルを形成する。これら架橋タンパクに加えて、キャッピング・タンパク (capping protein) や切断タンパク (severing protein)、モノマーアクチンに結合するタンパク (monomer-sequestering protein) などによっても、アクチンフィラメントの構造形成が調節されている。

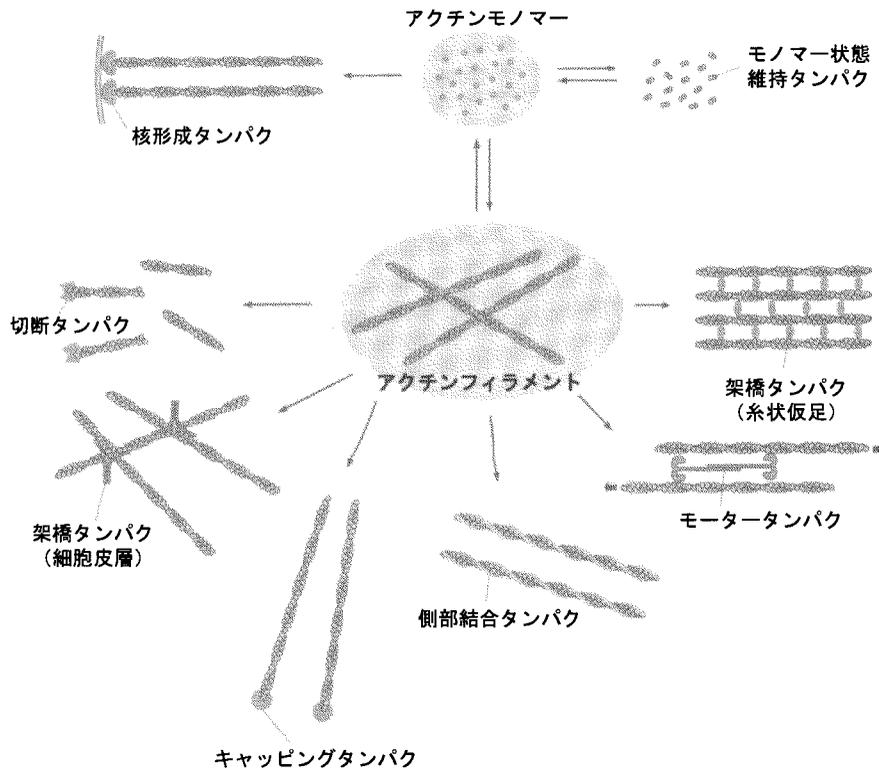


図 1.10 多様なアクチンフィラメント構造の模式図 [Bray, 2001 より]

焦点接着を含むアクチン細胞骨格構造： アクチン細胞骨格の中でも、特に細胞力覚機構の構成要素候補としてあげられている構造が、焦点接着を含むアクチン細胞骨格構造である [Duncan and Turner, 1995]. 焦点接着は、接着細胞が細胞外基質と接着する際、細胞膜と細胞外基質が接触している箇所に形成される。特に、骨芽細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞などは、細胞外基質と細胞底面全体が接着しているわけではなく、図 1.8 および 1.11 に示すように、細胞は、細胞底面に存在する複数の焦点接着を介して、局所的に細胞外基質に接着している。また、図 1.12(a) に示すように、この焦点接着が、細胞外基質に対するアンカーの役割を果たし、さらに焦点接着同士を結ぶようにアクチン細胞骨格が形成されることにより、細胞は細胞外基質上で自らを固定し、その形態を安定させている。さらに、焦点接着の構造に着目すると、焦点接着は、図 1.12(b) に示すように、複数のタンパクからなる複合体により構成されている。主には、細胞外基質と直接接触し接着を担うドメイン、細胞膜を貫通するドメイン、および、細胞内においてアクチン細胞骨格と直接的に連結するドメインなどが存在し、複数のタンパクがそれぞれの役割に応じて、三次元的な構造を形成していると考えられている。

このように、焦点接着を含むアクチン細胞骨格は、接着細胞が細胞外基質上に接着し構造形態を維持する上で支配的な役割を担っている。そのため、基質の変形、あるいは細胞外液の流れなどが、力学刺激として細胞に負荷された場合、そのいずれの場合においても、力や変形はこの焦点接着を含むアクチン細胞骨格に作用する。そのため、力学的観点から細胞力覚機構の解明を目指す上では、この焦点接着を含むアクチン細胞骨格構造に着目することが不可欠である。

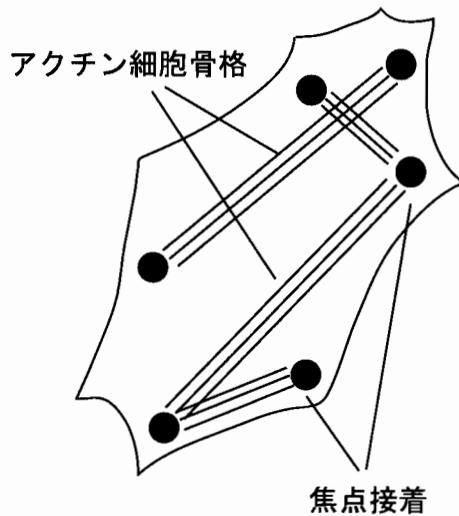


図 1.11 焦点接着とアクチン細胞骨格

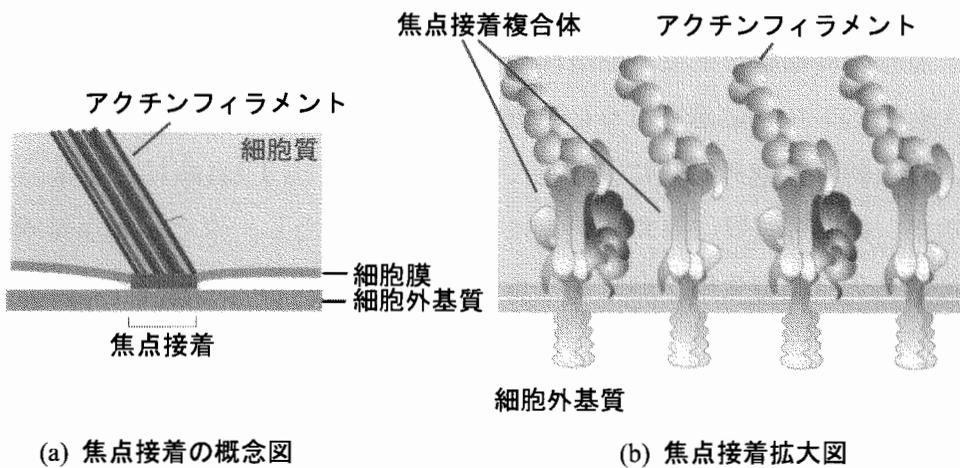


図 1.12 焦点接着構造の拡大模式図 [Bray, 2001 より]

1.2 骨芽細胞のバイオメカニクス

本論文では、数多くの細胞の中でも骨芽細胞 (osteoblast) に着目し、細胞バイオメカニクスの観点から、その細胞機能の解明を目指す。第 1.1.2 項でも述べたように、細胞バイオメカニクスが取り扱うべき対象は、その構造や機能の調整において力学因子が重要な調整因子となっている組織中に存在する細胞である。特に骨芽細胞は、骨形成の中心的役割を担う細胞であり、骨のリモデリング (bone remodeling) が、力学環境の変化により大きな影響を受けていることから、その活動が周囲の力学環境の変化から受ける力学刺激により調節されていると考えられている。そのため、その機能や機構の解明を目指す場合、細胞バイオメカニクスの観点からのアプローチが有用であると考えられる。

1.2.1 骨のリモデリングにおける骨芽細胞の役割

骨のリモデリング： 骨の主要な機能の一つとして、骨格系の形成、体重の支持、重要な器官・組織の保護等、構造体としての機能が挙げられる。この役割を果たす上で、骨は、荷重や変形などの力学環境の変化に対して、動的にリモデリングされることが知られている [Cowin, 1993]。この現象は、端的には、運動による負荷の増加に対する骨量の増加、あるいは、宇宙飛行士に見られるように、無重力状態での負荷の減少に対する骨量の減少として観察される。この骨組織のリモデリングは、「骨は外的、内的な機械的負荷に対して、その外部、内部の構造を変化させることにより適応する。」とする Wolff の法則 (Wolff's law) [Wolff, 1892] として知られている。

巨視的に見た骨の形態変化は、微視的レベルで見ると、既存の骨の吸収 (resorption) と新たな骨の形成 (formation) という二つの過程がバランスよく行われる結果として生じていると捉えることができる。これら骨の吸収と形成という代謝活動は、そのタイムスケールが数週間から数ヶ月に及ぶため、見かけ上、骨は静的な構造として見られることが多い。しかしながら、微視的に観察すると形成と吸収がカップリングした代謝活動が常に営まれている。

骨のリモデリングは、骨構造全体で同時に進行するのではなく、微視的に見て形成と吸収がカップリングして行われている BRU (bone remodeling unit)、あるいは BMU (basic multicellular unit) と呼ばれる領域で行われている。微視レベルで見た骨のリモデリング過程の模式図を図 1-13 に示す。この BRU、BMU は、骨吸収を担う破骨細胞

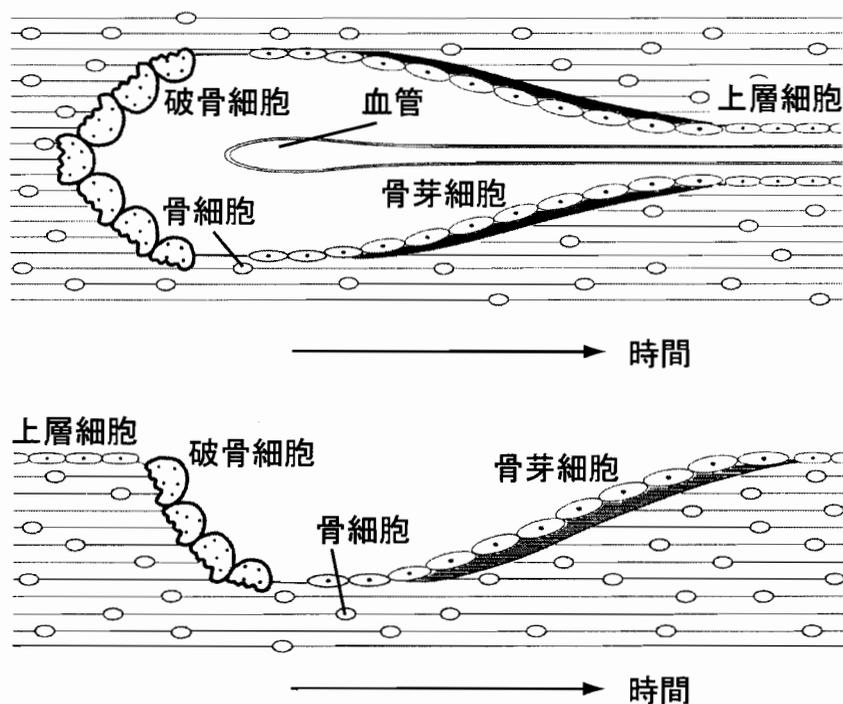


図 1.13 骨のリモデリング過程の模式図 [林ら, 2003 より]

(osteoclast), 骨形成を担う骨芽細胞, および, 新たに形成された骨から構成されており, 皮質骨 (cortical bone) 表面 (骨膜面, 骨内膜面), 皮質骨内部のハバース管内表面, および, 海綿骨 (cancellous bone) 内部の骨梁 (trabecula) 表面に存在している [Parfitt, 1994]. BRU の大きさは, 皮質骨においては, 長さ約 $400 \mu\text{m}$, 幅約 $200 \mu\text{m}$ であり, その内部では, 先端で破骨細胞が骨吸収を行い, カッティングコーンを形成しながら進行していく. その一方で, 骨芽細胞が, 破骨細胞が骨を吸収した箇所新たな骨を形成しながら進む. その結果として, 例えば犬の場合では, BRU は $40 \mu\text{m} / \text{day}$ 程度のスピードで骨表面を移動していくと考えられている [Jaworski and Lok, 1972].

上述のように, 巨視的レベルで観察される骨量の増減や, 外形状の変化なども, 微視的レベルにおける細胞群の代謝活動の結果として生じている. そのため, 骨のリモデリング機構を明らかにするためには, その素過程としての細胞活動に着目することが重要であると言える. 特に, 力学環境の変化が骨リモデリングに与える影響を検討する場合, そのリモデリングにおいて中心的役割を担う骨芽細胞の力学刺激に対する応答特性を明らかにすることが重要であると考えられる.

骨芽細胞の役割: 骨芽細胞は, 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) 由来の細胞

であり、骨形成の中心的役割を担っている。通常、骨芽細胞は、骨表面、あるいは骨基質中のオステオン (osteon) の内表面等のエンベロープ [Frost, 1966] に存在し、複数の骨芽細胞が協調的に骨形成活動を行っている。骨形成活動においては、骨芽細胞自身が骨基質となるタンパク質を分泌し、さらにその石灰化 (calcification) を行っている。さらに、骨芽細胞は、様々な全身性、あるいは局在性の制御因子によってその活動を調節されており、同時に、周辺の破骨細胞や間質細胞と協調的な骨代謝を営むためのシグナル伝達を行っている [Cowin et al., 1991]。したがって、骨芽細胞が、骨の代謝において、その調整役としての重要な役割を担っていると考えられている。

前述のように、骨のマクロレベルで観察される構造変化は、その素過程となるミクロレベルで見ると、骨芽細胞と破骨細胞を中心とする細胞群の代謝活動、つまり骨形成と骨吸収の局所的な平衡の変化から生じる結果として捉えることができる。したがって、力学環境の変化、すなわち、力や変形といった力学的刺激が、骨芽細胞や破骨細胞の活動活性を調整する因子の一つとして働いていると考えられている。マクロレベルから見た骨代謝は、非常に多様な因子が関与する複雑な系からなり、要素還元論的な細胞レベルでの力学的刺激に対する応答を理解するのみでは、その系全体を明らかにすることはできない。しかしながら、複雑なシステムをマクロレベルから素過程へと掘り下げるアプローチと、素過程レベルからさらに上部階層レベルへと積み上げるアプローチの双方が相補的に行われることは、非常に有用であると考えられ、細胞レベルでの力学的刺激に対する細胞の応答機構を明らかにすることの意義は大きい。

1.2.2 力学刺激に対する骨芽細胞の応答

組織レベルで観察される力学環境の変化に対する骨の応答、すなわち、力学的負荷の増加に対する骨形成の促進、あるいは、力学的負荷の減少に対する骨吸収の促進という現象は、細胞レベルでは、それぞれ、骨芽細胞の活性化、および破骨細胞の活性化と結びつけて考えることができる。生体外 *in vitro* での実験においても、これらの状況を再現する実験系の構築が望まれるが、力学刺激の減負荷は、宇宙環境、あるいは自由落下での微小重力状態を用いる実験系 [Westerlind and Turner, 1995] 以外には、実験系が確立されておらず、主として行われている実験は、細胞に対して外部から力学刺激を負荷する、すなわち、増負荷を行う実験系が用いられている [Brown, 2000]。

力学刺激に対する骨芽細胞の応答については、*in vitro* の実験系において様々な検討がなされており、力学刺激の負荷に対して、活性化、あるいは抑制される様々な生化学

シグナルが明らかにされている。これらの実験系では、骨芽細胞が接着、伸展している培養基質を変形させることにより、細胞に変形および力を負荷する手法 [Binderman et al., 1988; Jones et al., 1991]、細胞外液を介して静水圧の変動を負荷する手法 [Ozawa et al., 1990]、あるいは、細胞培養液に流れを発生させることで、細胞にせん断応力を負荷する手法 [Reich and Frangos, 1993] などがある。

これらの力学刺激の負荷に対して、骨芽細胞は、増殖率の増加、細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の上昇、cAMP の増加 [Binderman et al., 1988]、c-fos の発現促進 [Pavalko et al., 1998] など様々な応答を示すことが報告されている。骨芽細胞が力学刺激を感知し、自らの細胞内生化学シグナルへと変換する機構を有していることは、これらの報告例からも明らかである。その一方で、細胞が刺激として感知している情報が、変形（ひずみ）であるのか、あるいは、力（応力）であるのか、という点については、未だ議論が行われている段階であり、十分明らかにされていない。例えば、荷重の負荷により、骨組織自体に生じるひずみが、骨基質表面上に存在する骨芽細胞に刺激として感知されているとする説 [Duncan, 1995]、これに対して、荷重負荷により、骨組織に生じる不均一変形に起因して発生すると考えられている組織（細胞外）液の流れが、細胞にせん断応力を発生させ、細胞はその応力を感知しているとする説 [Cowan and Weinbaum, 1998] などが存在する。

培養基質を変形させる実験系を用いる場合においても、細胞と培養液との相対的な動きにより、細胞表面にはせん断応力が生じていると考えられる。また一方で、培養液の流れによりせん断応力を負荷する実験系においても、流れ負荷により細胞構造自体に変形が生じていると考えられる。そのため、いずれの実験系を用いた場合にも、両者の要因を完全には分離して考慮できない。さらに、これまでの実験系では、多数の細胞に対して、ほぼ均一と見なせる力学刺激を負荷し、それに対する細胞応答を平均化して評価していると言える。このような手法は、制御された環境下における細胞の応答特性を評価する上で有用である。その一方で、力学刺激に対する細胞の応答機構そのものの解明を目指す上では、さらにミクロな階層である、単一細胞、あるいは、細胞内微細構造のレベルでの検討が必要不可欠である。なぜならば、力学刺激が細胞に作用した際には、細胞が感知する刺激が力であるか、変形であるかの如何に関わらず、細胞構造には力が作用し、変形が生じる。それら力や変形を、細胞内での生化学シグナルへと変換する機構を対象とするためには、細胞構造に作用する力や、生じる変形を取り扱うことが本質的に不可欠だからである。

1.3 本論文の目的と構成

1.3.1 目的

骨芽細胞の力学刺激に対する応答特性を評価することは、骨のリモデリング機構への理解を深める上で重要である。また、細胞力覚機構の解明は、骨芽細胞のみにとどまらず、細胞バイオメカニクスが取り組むべき重要な課題の一つである。そこで、本研究では、骨を形づくる骨芽細胞を対象として、細胞バイオメカニクスの観点から、そのアクチン細胞骨格に着目し、骨芽細胞の細胞力覚機構においてアクチン細胞骨格が果たす役割、および、力学刺激負荷に対するアクチン構造のダイナミクスを明らかにすることを目的とした。

1.3.2 工学的意義

細胞の構造と機能の関係、あるいは、それらと生理学的機構との関連を解明しようとする取り組みは、科学的な興味のみにとどまらず、医工学的観点から見た場合にも非常に重要である。医工学的観点から見ると、細胞の機能や構造の人為的な制御手法の確立が重要な課題である。なぜならば、例えば、近年、医工学技術の進歩を背景に急速に発展している再生医療工学 [Langer and Vacanti, 1993] においては、細胞の活動を制御し、目的とする組織固有の構造を形成させ、さらに組織として機能させることが必要となるからである。この再生医療工学への応用を目指した経験則に基づく試行錯誤的アプローチにより、ある一定の成果が期待される一方で、本質的には、細胞の機能や構造の人為的制御を行うためには、それらの機構解明が必要不可欠となる基礎である。そのため、医工学への応用においても細胞の構造と機能、あるいは機構との関連の解明を目指す細胞バイオメカニクスに基づくアプローチが重要である。

本論文では、骨芽細胞に着目し、その機能の中でも特に細胞力覚機構について、細胞バイオメカニクスの観点からアプローチすることを試みている。骨芽細胞は、骨形成の中心的役割を担う細胞であり、細胞力覚機構の解明は、その上位階層である骨のリモデリング機構の解明を目指す上での有用な知見もたらすことが期待できる。ここでは、骨のリモデリングと再生に着目し、それらの機構解明がもたらす医工学的な意義について述べる。

前述のように、再生医療工学が、生体臓器移植や人工代替臓器移植に加えて、第三

の医療技術として脚光を浴び、その実用化に向けた取り組みが盛んに行われている。再生医療工学においては、対象とする臓器を構成する細胞への分化誘導やその活動制御だけでなく、臓器としての機能発現のために、それぞれの臓器固有の構造を形成させることが必須となる [Langer and Vacanti, 1993]。特に、骨の再生を考える場合、構造体としての力学的機能が特に重要であり、その構造形成制御技術の開発が望まれる。そのため、骨を形成する骨芽細胞のレベルから人為的にその活動を制御することを目指し、細胞の基質への接着性制御などを試みた基礎研究が行われている (付録 A)。しかしながら、上述のように、骨の構造形成は、周囲の力学環境の影響を大きく受けており、細胞が活動する基質となるスカフォールドの設計のみでは、適切な構造形成の誘導は期待できない。したがって、力学環境の変化が骨の再生やリモデリングに与える影響を解明し、それらを適正に予測・評価することが重要となる。

さらに、再生医療工学への応用に加えて、既存の医療技術への応用を考える上においても、骨のリモデリング機構の解明は重要である。骨に欠損などが生じ、その機能が損なわれた場合、一般的にはギブス固定や創外固定などが用いられ、骨自身の自然な治癒を期待する手法が選択される。しかしながらその一方で、高齢化社会の到来を前にして、高齢者の骨折治療や人工大腿骨置換治療などへの需要が益々高まることが予想される。骨折治癒において高齢者を対象とした場合、代謝能力の低下から、骨自身の自然な治癒能力が不十分であることに加え、治療期間中は歩行などの運動が困難となり、その結果として、さらに骨の治癒が遅れる悪循環に陥る。また、人工大腿骨置換治療を考えた場合においても、現状では、短中期的には非常に良好な結果が得られる場合でも、長期的には大腿骨インプラントの挿入箇所によるゆらぎが生じるなどの理由から、再置換術が行われるケースが見られ、患者の負担を大きくしている。歩行や運動は、患者のQOL(quality of life)の向上をもたらす重要な要素であり、従来からの手法に替わる、あるいは従来からの手法を補完する要素技術への応用を目指した骨の再生・リモデリング機構解明への需要は高い。

また、医工学分野への応用のみならず、機械工学的観点から見た場合にも、骨の環境への適応能や、機械要素として捉えた場合の合理性などは、工学的に有用であり、そのリモデリング機構の理解が、構造の最適設計やスマートマテリアルの開発などへの新たな発想をもたらす可能性も十分考えられる。

1.3.3 本論文の構成

本論文では、まず、第2章から第4章において、骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格が果たす機能的役割、アクチン細胞骨格の構造的特徴が細胞の力学刺激応答特性に及ぼす影響、および、細胞のカルシウム応答を誘起する細胞構造の変形量について検討する。さらに、第5章、第6章では、構造体としてのアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の力学刺激応答特性に影響を与えているとの第4章までの結果を受け、アクチン細胞骨格そのものの構造再構築機構について検討する。方向性を持った力学刺激に対して、アクチン細胞骨格の構造が動的に再構築される現象について着目し、再構築が開始される力学量を明らかにし、さらに、それを定量的に評価することを目指す。

第2章では、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の力学刺激応答特性に与える影響について検討する。アクチン重合阻害剤を用いて、細胞内のアクチン細胞骨格を一旦脱重合させ、その後の回復過程における培養時間を制御することにより、細胞内に構造体として形成されるアクチン細胞骨格量を制御した細胞群を作成する。それぞれの細胞群に対して、同一の力学刺激を与え、それに対する細胞応答として、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を観察する。さらに、カルシウム応答を示す細胞の割合を評価することにより、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格の量が、骨芽細胞の力学刺激応答特性に与える影響について検討する。

第3章では、構造体としてのアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の細胞力覚機構において重要な役割を担うとする第2章の結果を受け、構造体としてのアクチン細胞骨格の構造的特徴が、骨芽細胞の力学的刺激応答特性に与える影響について検討する。骨芽細胞において、アクチンストレスファイバーのネットワーク構造が、細胞形状の長軸方向と一致した特徴的な配向構造を有していることに着目し、力学刺激として、ストレスファイバーの配向方向と変形を与える方向との相対的な角度、および変形負荷量を制御した刺激を与え、刺激負荷に対する細胞のカルシウム応答を観察する。定量的に制御された力学刺激に対する細胞の応答特性を評価することにより、アクチン細胞骨格の構造的特徴が、細胞の力学刺激応答特性に与える影響について検討する。

第4章では、局所的な力学的刺激を負荷した際に生じる、細胞構造の変形量を定量化する手法の提案を行う。第2章、第3章では、細胞に与える変形量を定量化する際、細胞に局所変形を負荷するために使用したマイクロニードルの変位量を用いて定量化を行っている。しかしながら、細胞に負荷する力学刺激とそれに対する細胞応答発生

との関連を明らかにする場合、刺激負荷により生じる細胞構造自身の変形量を定量化することが不可欠である。そこで、細胞構造の変形状態を観察するために細胞膜を蛍光標識し、さらに細胞内カルシウムイオンの濃度変化を測定するために、蛍光指示薬を導入した細胞を作成し、それらの蛍光を同時観察する実験系を構築する。また、得られる観察画像から、画像相関法を用いて細胞膜に生じる変位分布を測定し、その変位分布からひずみ分布を算出する手法を提案する。さらに、提案した手法を用いて、局所変形負荷に対する骨芽細胞のカルシウム応答の様子を高時間・空間分解能で観察し、細胞膜に生じる変形とカルシウム応答の発生起点との関連について検討する。

第5章では、力学環境の変化に伴うアクチン細胞骨格の再構築機構の解明を目指し、バイオメカニクスの観点から再構築を引き起こす力学因子について検討する。アクチン細胞骨格の再構築を調整する生化学的因子に加え、特に、力学的な調整因子の候補として提案されている細胞内張力に着目し、その張力が、アクチンストレスファイバーの動的安定性に与える影響について検討する。単一の骨芽細胞に対して、細胞外基質との接着を部分的に解除することで細胞に局所変形を生じさせ、細胞内に張力が解放されるファイバーと解放されないファイバーが共存する状態を作り出す実験系を構築する。これを用いて、対象とするストレスファイバーの張力を選択的に解放し、その後の構造変化を観察する。

第6章では、第5章の結果を受けて、張力解放に起因するストレスファイバー構造の再構築現象について、同構造の再構築が開始されるために必要な力学量を定量的に評価する。予め伸展させた状態の弾性シリコーンラバー基質膜上に骨芽細胞を播種し、その膜の引張りひずみを解放することで、細胞に対して圧縮ひずみを負荷し、細胞内ストレスファイバー構造に作用する張力を解放する実験系を構築する。張力解放後のストレスファイバー構造の変化を観察することで、再構築現象を引き起こすために必要なひずみ量を定量的に評価する。

最後に、第7章では、得られた結果をまとめ結論を述べる。

第2章

構造体としてのアクチン細胞骨格が力学刺激応答特性に及ぼす影響

2.1 緒言

骨は、力学環境の変化に対して、その構造や形態を適応的に変化させることが知られている [Currey, 1984]. このような骨のリモデリングは、骨の代謝を担う細胞群の活動が、力学環境の変化の影響を受けるためであると考えられており [Cowin and Weinbaum, 1998], 骨形成の中心的役割を担う骨芽細胞についても、これまでに、力学刺激に対する細胞応答を観察した報告が数多くなされている [Roelofs et al., 1995; Klein-Nulend et al., 1997; Smalt et al., 1997; Jacobs et al., 1998; Buckley et al., 1988; Fermor et al., 1998; Ziambaras et al., 1998]. しかしながら、細胞が力学刺激を感知し、それを細胞内シグナリングへと変換する機構については、未解明な点が多い.

力学刺激に対する骨芽細胞の応答の一つとして、細胞内カルシウムイオン濃度（以下、 $[Ca^{2+}]_i$ と略す）の変化が挙げられる. すなわち、力学刺激の負荷に対して、骨芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが報告されている [Jones et al., 1991]. この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、細胞内における重要な生化学的シグナルの一つであり、シグナリングカスケードの上流に位置している [御子柴ら, 1998]. すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に伴い、その下流に存在する他の様々な生化学シグナリングパスが活性化される. そのため、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は多種多様な細胞応答を生じさせる引きがねの役割を担っているとされている [御子柴ら, 1998]. したがって、細胞のカルシウム応答、すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化に着目することにより、刺激に対する細胞の応答をシグナリングカスケードの上流でとらえることが可能となる. そこで、本研究では、力学的刺激に対する細胞の応答特

性を評価するために、 $[Ca^{2+}]_i$ に着目し、その経時的变化を観察した。

骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格が、その構成要素として重要な役割を果たしているとの報告がある [Duncan and Turner, 1995]。力学的刺激が細胞に負荷された場合、アクチン細胞骨格やインテグリンを含む焦点接着などの細胞構造が変形する。細胞が力学刺激を感知する上では、この細胞構造に作用する力、あるいは変形が生化学的シグナルへと変換されることが必要である。そのため、その機構を明らかにするためには、本質的に細胞構造そのものに着目したアプローチが必要不可欠である。そこで、本章では、アクチン細胞骨格が構造体として組織化されていることが、骨芽細胞の細胞力覚機構において重要であるとの仮説のもと実験を行った。まず、細胞内のアクチンファイバー構造の量を段階的に制御した細胞群を作成した。次に、それぞれの細胞群に対してマイクロニードルを直接押し込み、その力学刺激に対して応答した細胞の比率を評価した。これにより、構造体としてのアクチン細胞骨格の量が、細胞の力学刺激応答特性に及ぼす影響について検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 実験の概要

実験手順の概要を図 2.1 に示す。まず、細胞を観察用ディッシュに播種し、カルシウム蛍光指示薬 Fluo 4 を細胞内に導入する。次に、アクチン重合阻害剤 cytochalasin D を添加した培地中にて 60 分間培養することで、細胞内のアクチンを脱重合させる。その後、cytochalasin D を洗い流し、通常培地中にて培養する。この時、アクチン細胞骨格を再重合させる時間をそれぞれ 15、45、および 75 分間とした細胞群を作成する。作成した細胞の一部を固定し、アクチン細胞骨格量の評価を行う。また、残りの細胞を用い、力学刺激の負荷に対する $[Ca^{2+}]_i$ の変化を蛍光観察する。

2.2.2 観察試料の作成と観察方法

細胞と培養条件： 実験には、理化学研究所バイオリソースセンターより入手した骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いた。この細胞を、FBS (ICN Biomedicals) を 10% 添加した α -MEM 培地 (ICN Biomedicals) にて、温度 37°C、湿度 100%、5% CO₂-95% air の環境下で培養した。実験では、直径 35 mm のガラスボトムディッシュ (Mat-Tek) に

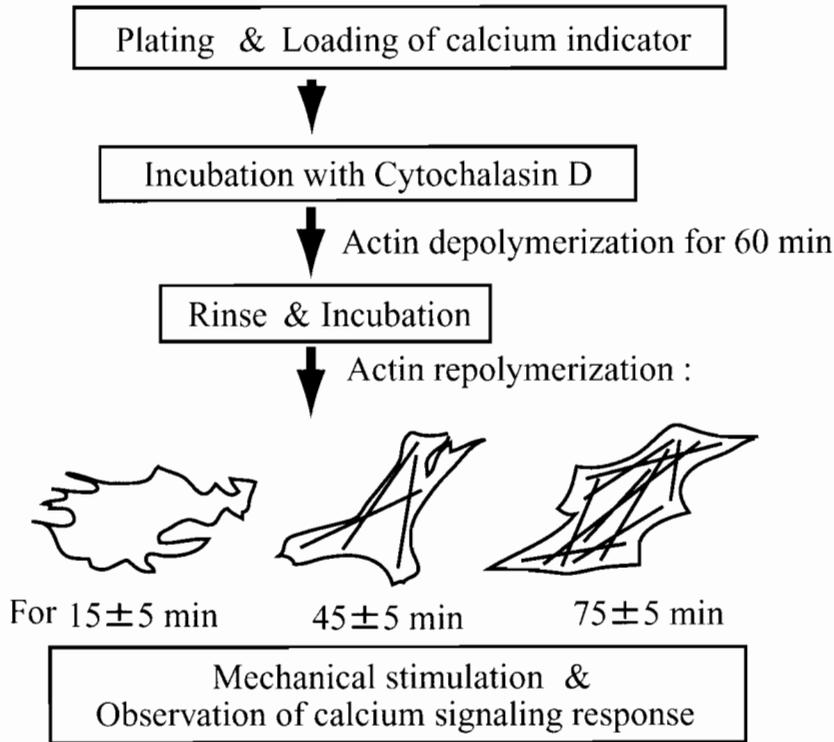


図 2.1 実験手順の概要

細胞を 7.5×10^4 / dish の密度で継代し、その後5時間培養したものを実験に用いた。

アクチン細胞骨格構造量の制御： 細胞内のアクチン細胞骨格の量を制御するため、まず、アクチン重合阻害剤である cytochalasin D (Calbiochem) を $50 \mu\text{M}$ の濃度で添加した培地中にて、60分間培養し、一旦、細胞内のアクチンファイバーを脱重合させた。その後、PBSでリンスすることで cytochalasin D を洗い流し、再び通常の培地中にて培養することにより、細胞内にアクチンファイバーを再重合させた。この時、再重合させる時間を調整し、細胞内に再構成されるアクチン細胞骨格の量を制御した。本実験では、再重合時間をそれぞれ、15、45、および75分間とした3つの細胞群を作成し、力学刺激に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を観察した。

アクチン細胞骨格構造量の評価： 再重合時間を調節した各細胞群における、アクチン細胞骨格の量を評価するため、同一の条件で作成した観察試料群の一部を用い、細胞内アクチンの蛍光標識と観察を行った。まず、paraformaldehyde (和光純薬) にて細胞を固定し、続いて、1% Triton-X (Amresco) にて脱膜処理を行った後、rhodamine-phalloidin (Molecular Probes) を用いて、ポリマーアクチンとしてファイバー構造を有

するF-アクチンのみを蛍光染色した。

アクチン構造の蛍光観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (MRC-1024/MP, Bio-Rad) を用い、60 倍の油浸対物レンズを使用した。画像は、ディッシュ底面から、細胞核上部までの水平面断層画像を $1.0 \mu\text{m}$ 間隔で取得した。取得した断層画像を画像処理を用いて重ね合わせることで、細胞内全体のアクチン細胞骨格を画像化し、その構造を評価した。

細胞内アクチン細胞骨格の量は、細胞内の蛍光輝度に基づいて評価した。本実験では、細胞内のアクチンファイバー構造は、一旦モノマーアクチンであるG-アクチンに脱重合される。その後、再びG-アクチンが線維構造を有するF-アクチンへと重合することで、ネットワーク状のファイバー構造へと再構成される。したがって、構造としての組織化が進展するほど、F-アクチンが増加する。本実験で蛍光標識に用いた rhodamine-phalloidin では、phalloidin がF-アクチンに特異的に結合するため、ネットワーク構造として組織化されたアクチンファイバーを選択的に蛍光染色することが可能である。ここでは、各細胞における細胞輪郭内のアクチン細胞骨格の平均蛍光輝度を算出することにより、細胞内で構造体として組織化されたアクチン細胞骨格の量を評価した。

[Ca²⁺]_i 変化の観察方法： 力学刺激に対する細胞の応答として、[Ca²⁺]_i の変化を観察した。カルシウムイオン感受性蛍光指示薬である Fluo 4 を用い、[Ca²⁺]_i の変化を蛍光輝度の変化として観察した。指示薬の導入は、細胞をガラスボトムディッシュに播種した後、Fluo 4-AM (Molecular Probes) を $6 \mu\text{M}$ 添加した培地中にて5時間培養することにより行った。

カルシウムイオンの観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (MRC-1024/MP, Bio-Rad) を用い、60 倍の油浸対物レンズを使用した。画像取得は0.9秒間隔で行った。観察平面は、ディッシュ底面から $2 \mu\text{m}$ 上方、一辺が $222 \mu\text{m}$ の正方領域とし、 512×512 pixels の解像度で、8 bit (256 段階) の輝度データとしてPCに記録した。

2.2.3 力学刺激の負荷方法

力学刺激として、単一の骨芽細胞にマイクロニードルを直接押し込むことで、局所的な変形を与えた。力学刺激負荷の概要図を図 2.2 に示す。まず、マイクロマニピュレーター (ONW-135, Narishige) を操作して、図 2.2(a) に示すように、マイクロニードルを細胞核直上近傍の細胞膜上へディッシュ底面に対して垂直に押し込んだ。ガラス

製ニードルの先端直径は、約 $10\ \mu\text{m}$ である。また、その先端は、押し込み、および変形を与えた際に細胞膜を傷つけることを防ぐため、ヒートポリッシングを行い、滑らかに加工した。ニードル軸とステージ面との角度は約 40° とし、ニードル先端をディッシュ底面から $2.0\ \mu\text{m}$ の位置で静止させた。この時、押し込み操作に対して細胞が応答を示さないことを確認した。その後、図 2.2(b) に示すように、ニードルを水平に移動させ、細胞膜上にてニードル先端を横滑りさせることで細胞に変形を与えた。本実験では、(図 2.2(c)) に示すように、ニードル先端の水平方向への変位量を $\delta = 8\ \mu\text{m}$ とし、ニードルの変位方向と細胞形状の長軸方向との角度を、 $\theta = 60 \sim 90^\circ$ とした。

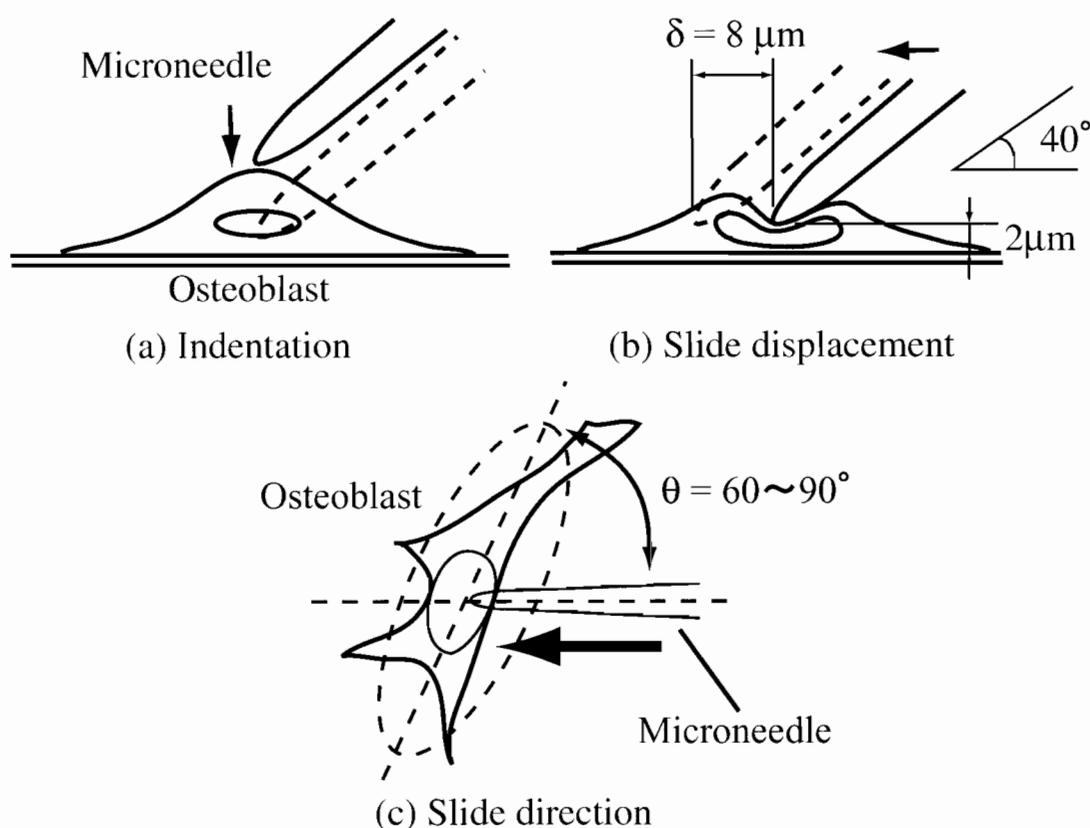


図 2.2 マイクロニードルの直接押し込みによる力学刺激負荷の概要図

2.3 実験結果

2.3.1 アクチン細胞骨格構造の量

まず、図 2.3 に、アクチン細胞骨格の量を制御した細胞における、アクチンファイバーの蛍光観察画像を示す。通常の細胞では、図 2.3(a) に示すように、細胞内で線維状アクチンが配向性を有する密なネットワーク構造を形成している。一方、cytochalasin D によりアクチンを脱重合させた後、15 分間再重合させた細胞では、図 2.3(b) に示すように、線維状アクチンの構造が観察されず、ネットワーク構造が失われている。脱重合後、45 分間アクチンを再重合させた細胞では、図 2.3(c) に示すように、細胞輪郭の周辺領域においてアクチンが再構成されており、線維状構造が観察される。しかしながら、細胞の中央領域では、通常細胞で観察されるような明瞭なネットワーク構造は再構成されていない。これらと比較して、75 分間再重合させた細胞では、図 2.3(d) に示すように、通常細胞と同様の線維状アクチンのネットワーク構造が再構成されている。

次に、それぞれの細胞群における、細胞内平均蛍光輝度の測定結果を図 2.4 に示す。同図のグラフに示すように、通常細胞では、細胞内の平均輝度は、 86.1 ± 14.4 (Mean \pm S.D.) である。一方、アクチンを脱重合させた後の再重合時間が 15 分間の細胞群では、アクチン細胞骨格が消失しているため、その平均輝度が、 45.8 ± 7.6 まで低下している。再重合時間 45 分間の細胞では、輪郭周辺に構造が再形成されているため、平均輝度は、 60.5 ± 15.7 まで回復している。さらに、再重合時間 75 分間の細胞群では、平均輝度は通常細胞と同程度の 85.6 ± 25.1 まで回復している。

細胞内の平均輝度と脱重合後の再重合時間との関連性を検定するために、一元配置の分散分析 (ANOVA) を行った。その結果、再重合時間に対して、平均輝度が有意 ($p < 0.01$) に増加することが認められた。また、Tukey の方法 [Zar, 1999] による多重比較を行った結果、再重合時間 15 分間と 45 分間の間、および 45 分間と 75 分間との間の平均輝度にそれぞれ有意な差異が認められた ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。これらの観察結果が示すように、アクチンファイバーを一旦脱重合させ、その後の再重合時間を調節することにより、アクチン細胞骨格の量を段階的に制御することが可能である。

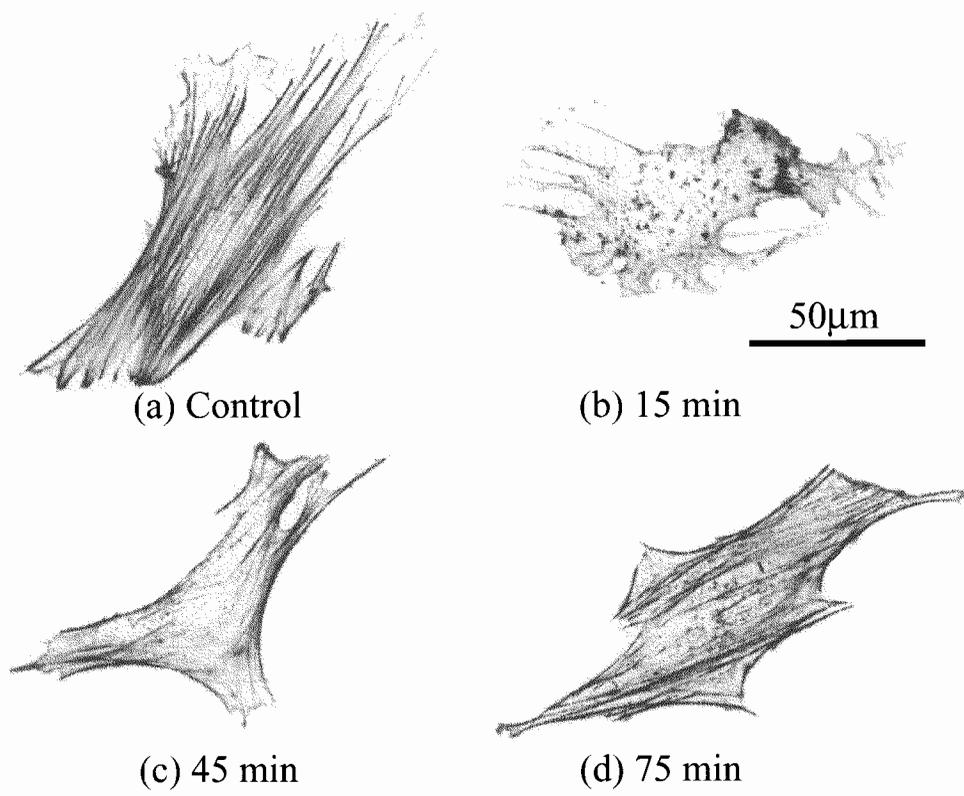


図 2.3 脱重合後の再重合時間により制御した細胞内アクチンファイバー構造の蛍光観察画像

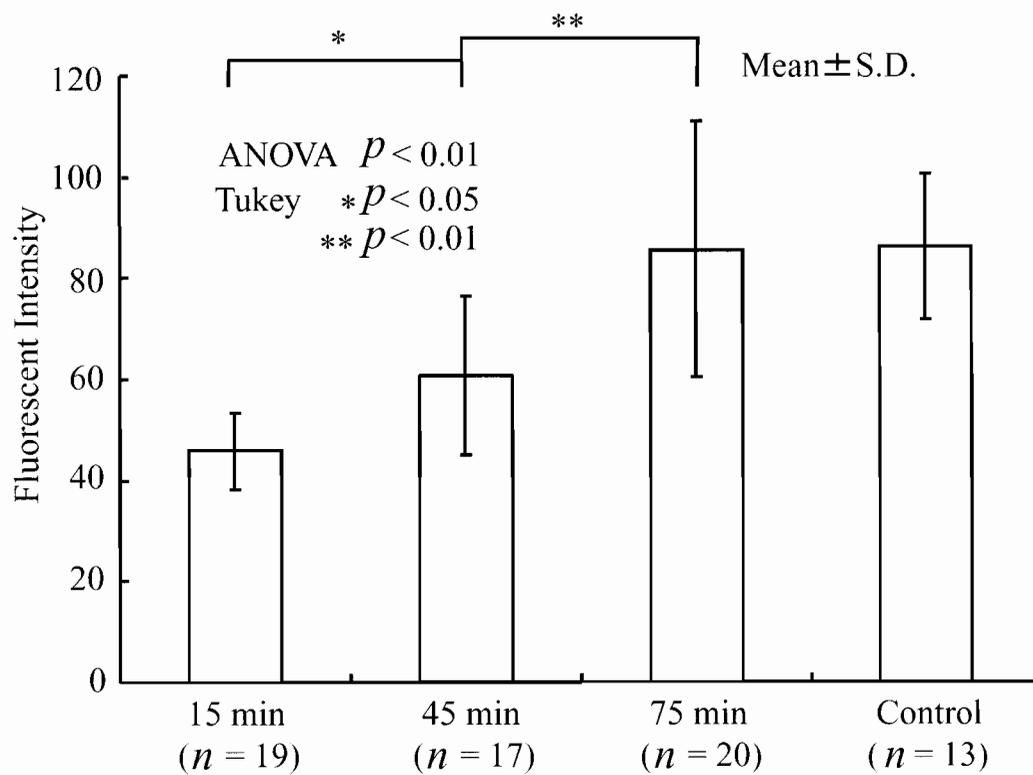


図 2.4 再重合時間の調整により制御したアクチン細胞骨格の細胞内平均蛍光輝度

2.3.2 力学刺激に対する細胞のカルシウム応答

単一細胞に対してマイクロニードルを直接押し込み、その先端を細胞膜上にて横滑りさせることで力学刺激として変形を与えた際に観察された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の蛍光観察画像の一例を図 2.5 に示す。また、細胞内の平均蛍光輝度値の時間変化を図 2.6 に示す。図 2.5 上段は、Fluo 4 の蛍光観察画像であり、 $[Ca^{2+}]_i$ の細胞内分布を示している。また、同図下段は、透過光画像であり、力学刺激を付加するマイクロニードルの先端部、および細胞を示している。ここで、図 2.6 中の (a) ~ (d) は、それぞれ、図 2.5 の各図に対応している。

図 2.5(a) は、刺激負荷前の状態を示しており、同図 (b) は、ニードルを細胞核直上付近にディッシュ底面に対して垂直方向へ押し込んだ直後の画像である。押し込みにより、ニードル先端が観察平面（底面から高さ $2 \mu\text{m}$ ）まで達したため、細胞膜との接点が発光画像中に白いスポットとして現れている（上段の白矢頭）。この状態では、図 2.5 および 2.6 に示すように、細胞内の蛍光輝度に変化は観察されず、細胞は応答を示していない。図 2.5(c) は、ニードルを図の左方向に水平移動 ($\delta = 8 \mu\text{m}$) させ、細胞に変形を与えた直後の画像である。図 2.6(d) に示すように、この直後に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が生じ、蛍光輝度が上昇した。この蛍光輝度の上昇は、刺激後、約 3 秒でピークに達し、図 2.5(d) に示すように、細胞核直上付近を中心として、細胞全体の輝度が高くなっていることが観察される。

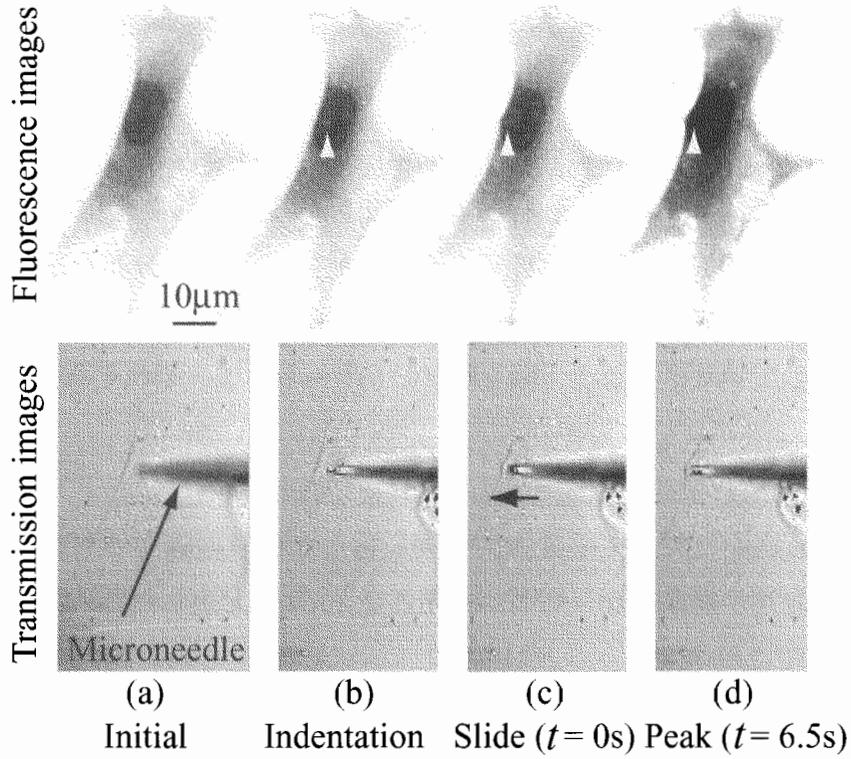


図 2.5 力学刺激に対する骨芽細胞カルシウム応答の観察画像（応答あり）

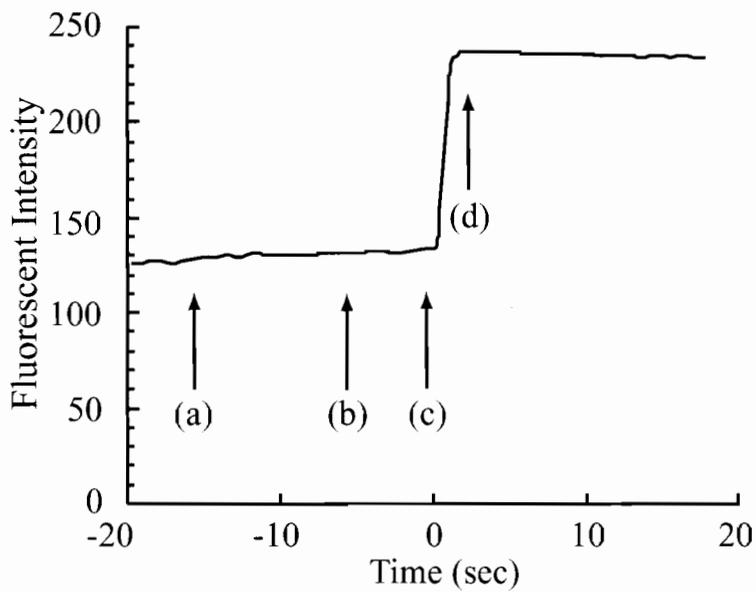


図 2.6 力学刺激の負荷に対する細胞内の平均蛍光輝度の変化（応答あり）

一方、同様の力学刺激を与えた細胞においても、前述のような $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示さない例も観察された。この場合の蛍光観察画像、および平均蛍光輝度値の一例を図 2.7 および 2.8 に示す。図 2.7 では、図 2.5 と同様に、上段に蛍光観察画像、下段に透過光画像を示している。また、図 2.8 の (a)~(d) は、それぞれ図 2.7 の各図に対応している。図 2.7 においても、細胞核直上付近に観察平面までマイクロニードルの押し込みを行い、細胞が応答を示さないことを確認した後、図中左方向へマイクロニードルを移動 ($\delta = 8 \mu\text{m}$) させ、細胞に変形を与えた。しかしながら、細胞に変形を与えた後にも細胞内の蛍光輝度の上昇は観察されず、細胞は応答を示していない。

2.3.3 アクチン細胞骨格量の違いによる細胞の応答特性の変化

以上のように、同様の力学刺激を定量的に与えた場合でも、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が明瞭に観察される細胞と、全く観察されない細胞が存在した。本実験では、明瞭な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の有無を、細胞応答の有無の判断基準として用い、細胞内のアクチン細胞骨格の量を制御した各細胞群について、力学刺激に応答した細胞の割合を調べた。

アクチン細胞骨格の量を制御しない control 細胞では、図 2.9 に示すように、力学刺激に対して 65.0 % (13/20) の細胞が応答した。一方、cytochalasin D によってアクチン細胞骨格を脱重合させた後の再重合時間が 15 分間のグループでは、同図に示すように、力学刺激に対して 15.0 % (3/20) の細胞が応答したのに対して、再重合時間を 45、および 75 分間としたグループでは、それぞれ、27.3 % (6/22)、54.5 % (12/22) の細胞が応答した。すなわち、再重合時間が長いグループほど、応答した細胞の割合が増加していることがわかる。そこで、アクチン細胞骨格の再重合時間を変数として、各細胞群の応答比率について χ^2 検定を行った結果、再重合時間と細胞の応答比率の間に有意な関連 ($p < 0.05$) が認められた。

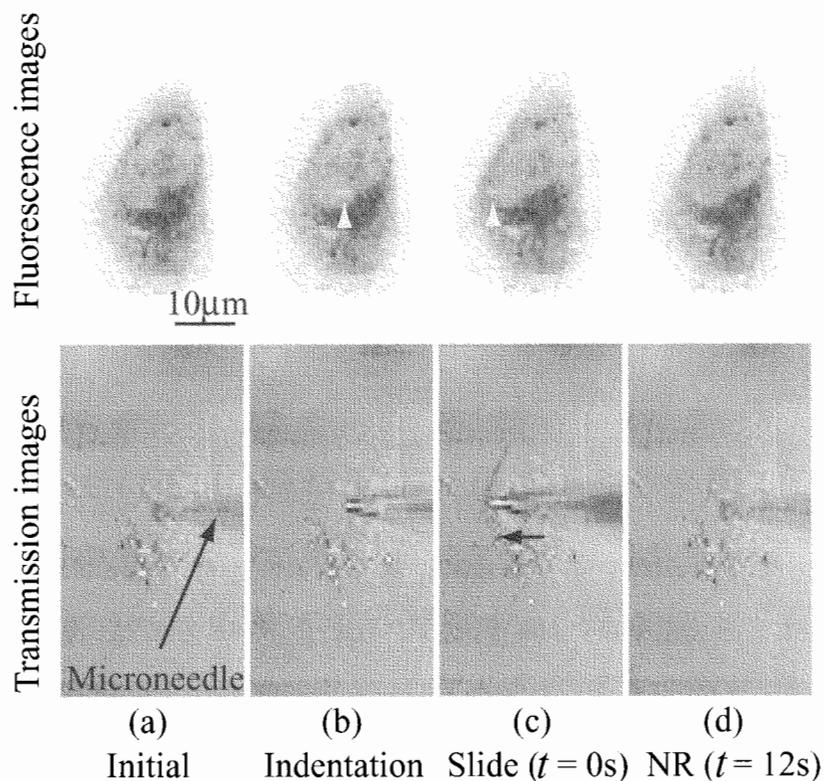


図 2.7 力学刺激に対する骨芽細胞カルシウム応答の観察画像（応答なし）

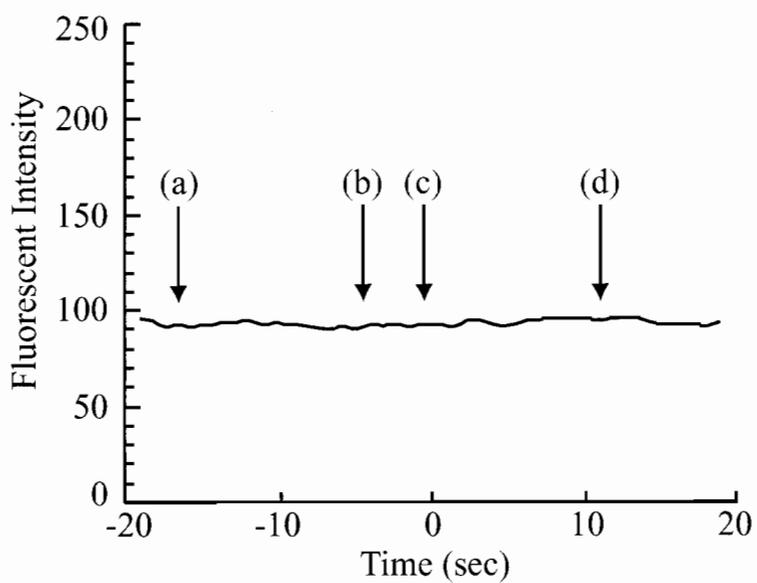


図 2.8 力学刺激の負荷に対する細胞内の平均蛍光輝度の変化（応答なし）

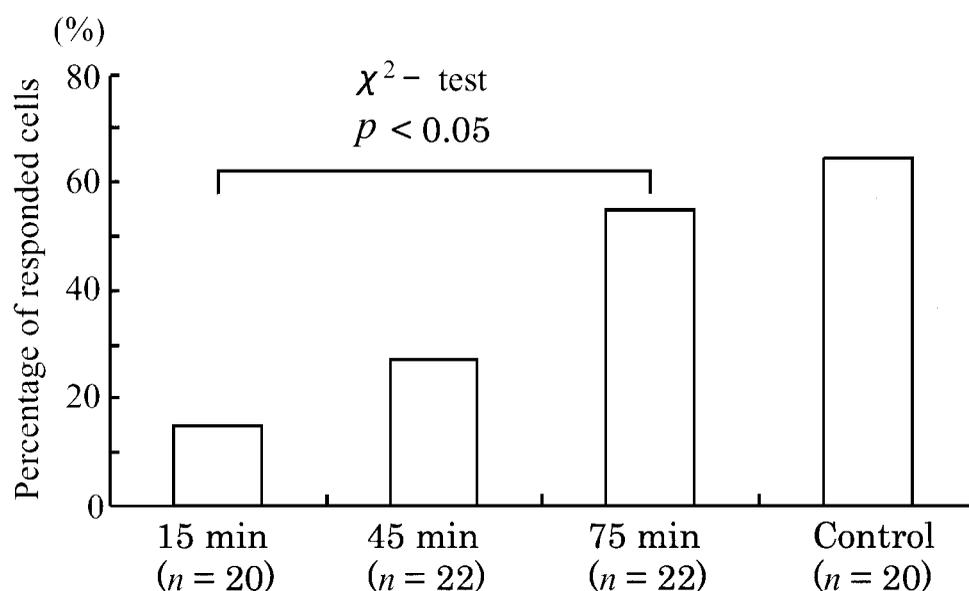


図 2.9 アクチンファイバー構造の組織化度を制御した細胞群における力学刺激に対する応答細胞の割合

2.4 考 察

2.4.1 力学刺激負荷手法の特徴

骨組織内において、骨芽細胞が受けると考えられる力学刺激としては、細胞の接着する基質に生じる変形、あるいは、それに伴い生じる細胞外液の圧力や流れによるせん断力などが挙げられる。したがって、これまでにも、細胞外基質を介したひずみの負荷、静水圧の負荷、細胞外液の灌流によるせん断応力の負荷などの手法を用いた応答観察実験が行われてきた [Brown, 2000]。これらの刺激負荷手法を用いた場合、細胞、または細胞群全体に対して比較的均一な力学刺激が与えられている。一方、本研究では、力学刺激として、ガラス製マイクロニードルを細胞に直接押し込み、細胞膜上でその先端を横滑りさせることにより変形を与えた。

骨芽細胞は、ギャップジャンクションなどを通じて、細胞間の情報伝達を行っていることが報告されており [Saunders et al., 2001]、例えば、細胞内カルシウムイオン濃度の変化についても、細胞間の情報伝達により、近隣の細胞に対してカルシウム応答が伝播し、細胞群が協調してその活動を調整していることが指摘されている [Xia and

Ferrier, 1992]. したがって, *in vitro*において, 多数の細胞群に対して力学刺激を与え, それらの細胞の応答を平均化して評価する実験系においては, 細胞応答における力学刺激の影響と細胞間情報伝達の結果として生じる影響とを分離して検討することが困難である. マイクロニードルを単一の骨芽細胞に直接押し込むことで力学刺激を与えることにより, これらの細胞間情報伝達から生じる影響を除外することが可能となる.

さらに, 細胞力覚機構の解明を目指し, 力学刺激に対する細胞応答を詳細に観察する上では, 単一の細胞レベルにおいて定量的に制御された力学刺激を与え, その応答を観察することが重要であると考えられる. 本実験で行ったマイクロニードルを用いた直接的な刺激負荷手法により, 細胞構造全体ではなく, 特定の部位に対して, 選択的に変形を与えることができる. 本実験系において, 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は, ニードル先端の近傍領域で局所的に発生し, その後, 細胞全体へと伝播する様子が観察された (図示せず). したがって, 力学刺激情報が $[Ca^{2+}]_i$ の上昇へと変換される機構が存在し, また, 活性化された部位もニードルにより変形を与えた領域に局在していると考えられる. そのため, 本研究で与えた直接刺激により, 力学刺激感知機構と細胞膜や細胞骨格などの細胞構造との関連をより直接的に検討することが可能である.

2.4.2 ニードルの直接押し込みによる細胞損傷の可能性

本実験では, ガラス製のマイクロニードルを骨芽細胞の細胞膜に対して直接押し込み, 変形を与えた. したがって, 細胞膜上でニードルを移動させた場合, 細胞膜を損傷する可能性がある. 実際に, 実験を行った細胞の中で, 細胞膜を損傷したと考えられる例が観察された. 細胞膜が損傷したと考えられる例では, マイクロニードルの移動に伴い, 蛍光指示薬 Fluo 4 の蛍光輝度の急激な上昇が観察された. 通常の細胞のカルシウム応答では, 蛍光輝度の上昇が観察された後, 蛍光輝度は徐々に減少し, 刺激負荷前のレベルに戻る. これに対して, 細胞膜を損傷したと考えられる場合では, Fluo 4 が細胞外へと散逸するため, 細胞内の平均蛍光輝度は, 刺激負荷前のレベルよりもさらに低く, バックグラウンドと同程度にまで減少した. したがって, 細胞膜の損傷の有無は, 刺激負荷後の蛍光輝度変化から識別することが可能であり, 細胞膜の損傷が生じたと考えられる細胞は, 実験結果データから除外した.

骨芽細胞は, サブコンフルエントの状態で紡錘形の形状で基質に接着・伸展しており, 長軸で約 100 μm 程度, 短軸で 50 μm 程度の大きさである. これに対して, 実験

に用いたマイクロニードル先端の直径は、約 $10\ \mu\text{m}$ であり、先端部はヒートポリッシングにより滑らかな状態に加工されている。したがって、ニードル先端と細胞膜との接触部は、細胞の大きさに対して十分に小さいと考えられる。観察された画像においても、図 2.5(b)、図 2.7(b) に示すように、観察平面まで押し込まれたマイクロニードルの先端の影が、画像中において白いスポットとして観察されている。このスポットの大きさからも、細胞の大きさに対して、マイクロニードルが十分に小さく、押し込みにより生じる変形もマイクロニードルの先端近傍に局所化していると考えられる。

2・4・3 Cytoshalasin D の細胞活性への影響

細胞の応答特性を検討する上で、cytochalasin D が細胞の応答特性に影響を与える可能性が考えられる。細胞機能において、アクチン細胞骨格が果たす役割を検討した実験として、cytochalasin D を用いた実験系がいくつか報告されている [Hara et al., 2001; Zanetti and Solursh, 1984]。これらの報告では、アクチン細胞骨格の有無が、筋芽細胞の分化に及ぼす影響、あるいは、伸展刺激負荷環境下における骨芽細胞の NO 産生能に及ぼす影響が検討されている。これらの報告例においても、cytochalasin D の使用による細胞機能の重大な障害の発生については報告されておらず、評価対象としているシグナル伝達の阻害の有無が報告されている。

また、cytochalasin D の作用機構は、アクチン重合端へのキャップ作用であるため、細胞膜や細胞構造が損傷を受け、その結果、細胞機能に障害が生じることはないと考えられる。さらに、cytochalasin D を用いずにアクチン細胞骨格を一旦脱重合させる実験系 [佐藤ら, 2003] を用い、その後の再重合過程を観察した場合においても、細胞内でアクチン細胞骨格が再重合される時間は、本実験と同程度である。したがって、これらのことから、本実験系においても、アクチンの再重合過程においては、通常の状態と同様にアクチンの再重合が進行しているものと考えられる。

2・4・4 アクチン細胞骨格の細胞力覚機構における役割

力学刺激に対して、骨芽細胞が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を示すことは、これまでも報告されている [Duncan et al., 1998; Hung et al., 1996]。骨芽細胞のカルシウム応答機構については、大別して、細胞膜上のカルシウムイオン・チャンネルを介した細胞外から細胞内への流入、および細胞内のカルシウムイオン・ストアからの放出の二つのメカニズムが知られている。いずれの場合においても、最終的には、細胞膜上に存在する機

械刺激受容性のチャンネル [Guharay and Sachs, 1984], あるいは他の未知のシグナル機構によって力学刺激が感知され, 生化学的なシグナルへと変換されることによりシグナル伝達が生じ, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が生じる点において同一であると言える.

骨芽細胞や軟骨細胞に対して, マイクロニードルの直接押し込みにより変形を与える実験系においても, 細胞膜上のイオンチャンネルのブロッカーを用いることにより, 刺激負荷に対するカルシウム応答が, 有意に抑制されることが報告されている [Xia and Ferrier, 1992; Guilak et al., 1994]. したがって, 本実験において観察された $[Ca^{2+}]_i$ 変化についても, 細胞膜上のチャンネルが活性化され, 細胞外からのカルシウムイオンの流入が生じた結果, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が発生している可能性が考えられる.

力学刺激情報を $[Ca^{2+}]_i$ の上昇へと変換する機構においては, これら機械刺激受容チャンネル等に加えて, アクチンファイバーなどの細胞骨格構造もその構成要素として重要な役割を果たしている可能性が指摘されている [Duncan and Turner, 1995]. また, アクチンファイバーが細胞骨格を形成する上で, アクチンファイバーのみならず, 接着タンパク質インテグリンも重要な役割を果たしている. 本実験系においては, マイクロニードルの押し込みから細胞応答を観察するまでの時間は, 数十秒のオーダーであり, 接着タンパク質インテグリンとニードル先端部との直接的な結合は考慮されていない. しかしながら, 直接的な結合が生じていないとしても, マイクロニードルが直接的にアクチンファイバーを変形させることにより, 結果として, インテグリン・レセプターが活性化される可能性も考えられる.

本研究では, 細胞内の構造体としてのアクチン細胞骨格の量を制御した細胞を作成し, 力学刺激に対する細胞の応答特性を評価した. その結果, アクチン細胞骨格の量が増加するほど, 同一の力学刺激に対して, より多くの細胞が応答を示し, より敏感に力学刺激を感知していることを示す結果が得られた. さらに, 細胞内のアクチン細胞骨格を脱重合により消失させた細胞においても, 比率は少ないながらも, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示す細胞が観察された.

これらの結果より, 構造体としてのアクチン細胞骨格は, 力学刺激に対するカルシウム応答機構において, 必ずしも直接的に関与する要素ではない可能性が考えられる. しかしながら, 細胞骨格として組織化された構造を形成することにより, 力学受容レセプター, あるいはチャンネルへと力学刺激情報を伝達する効率を高める, あるいは力学刺激情報を増幅する役割を担っている可能性を示唆していると考えられる.

2.5 結 言

本章では、骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格構造が果たす役割を明らかにすることを目的とし、同構造の量を制御した細胞群を用いて、力学刺激に対するカルシウム応答特性の検討を行った。その結果、構造体としてのアクチン細胞骨格の量が増加するほど、同じ力学刺激に対して応答する細胞の割合が増加し、より敏感に細胞が力学刺激を感知していることを示す結果が得られた。この結果から、アクチン細胞骨格構造が、骨芽細胞の細胞力覚機構において、力学刺激情報を伝達する効率を高める、あるいは増幅する役割を担っている可能性が示された。

第3章

アクチン細胞骨格の構造的特徴が力学刺激応答特性に及ぼす影響

3.1 緒言

前章では、細胞内のアクチンファイバー構造の量を制御した細胞群を作成し、力学刺激に対する細胞のカルシウム応答を観察することで、アクチンファイバー構造が力学刺激応答特性に及ぼす影響について検討した。その結果、アクチン細胞骨格が、細胞内で構造体として組織化されていることが、骨芽細胞が力学刺激を感知する上で、重要であることが明らかとなった。

この結果を受けて、構造体としての細胞骨格の特徴に着目する。骨芽細胞の形状は、紡錘形の極性を有しており、そのアクチン細胞骨格構造は、細胞輪郭形状の長軸方向に配向した特徴的なネットワーク構造を形成している。アクチン細胞骨格構造が、力学刺激感知特性に及ぼす影響を考慮すると、この特徴的なネットワーク構造の構造的特徴が、骨芽細胞の力学刺激応答特性に対しても影響を及ぼす可能性が考えられる。

本章では、骨芽細胞の力学刺激感知特性に対して、アクチン細胞骨格の構造的特徴が与える影響について検討した。単一の骨芽細胞に対して、ガラス製マイクロニードルを用いて細胞膜に直接押し込み、細胞膜上にて水平方向に移動させることで力学刺激を負荷し、それに対する細胞応答として、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した。実験結果から、まず、骨芽細胞が応答を示す力学刺激量を定量的に評価した。次に、アクチン細胞骨格構造の配向方向に対して、変形を与える方向を変化させ、力学刺激の方向が、細胞が刺激を感知する閾値に及ぼす影響について検討した。

3.2 実験方法

3.2.1 実験の概要

実験手順の概要を図 3.1 に示す。まず、細胞を観察用ディッシュに播種し、カルシウム蛍光指示薬 Fluo 3 を細胞内に導入する。次に、細胞に押し込むマイクロニードルの変位量、および変位方向を定義し、定量的に制御された力学刺激を細胞に負荷する。この時、力学刺激の負荷に対する $[Ca^{2+}]_i$ の変化を蛍光観察する。さらに、得られた実験結果から、異なる変形量、および変形負荷方向に対して、カルシウム応答を示した細胞の割合を検討することにより、定量的に制御された力学刺激に対する骨芽細胞の応答特性を評価する。

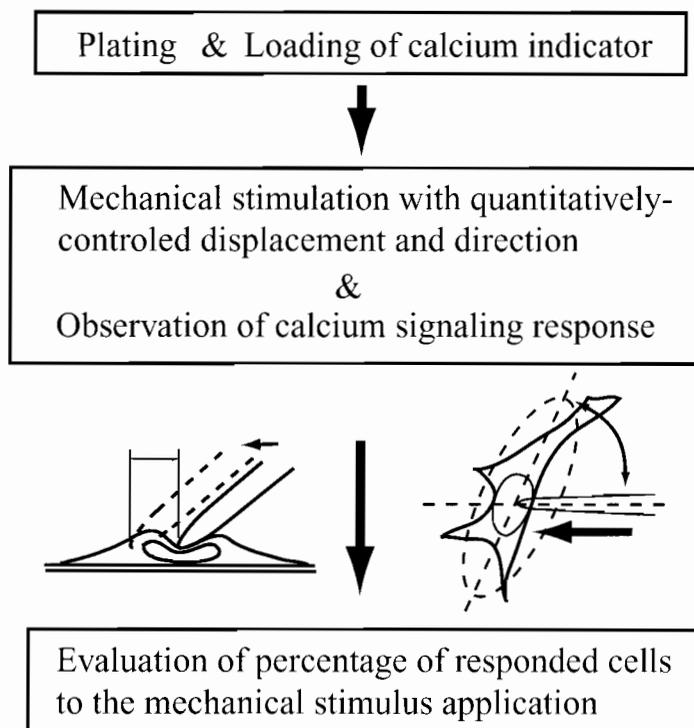


図 3.1 実験手順の概要

3.2.2 観察試料の作成と観察方法

カルシウムイオン蛍光指示薬の導入： 本実験では、直径 35 mm のガラスボトムディッシュに密度 10^5 cells / dish で播種した細胞を用いた。ガラスボトムディッシュに細胞を播種し、3時間の培養を行った後、カルシウムイオン蛍光指示薬の導入を行った。蛍光指示薬には Fluo 3 を用いた。FBS を添加していない α -MEM 培地に対して、Fluo 3-AM を $5 \mu\text{M}$ の濃度で添加し、同培地中にて1時間培養することで、細胞内に Fluo 3 を導入した。導入完了後、PBS にてリンスし、FBS を添加した通常の α -MEM 培地に入れ替えたものを実験に用いた。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の観察方法： $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (MRC-1024/MP, Bio-Rad) を用い、Fluo 3 の蛍光輝度の変化によって測定した。観察には 60 倍の油浸対物レンズを用い、観察領域は、ガラスボトムから $2 \mu\text{m}$ 上方の $222 \mu\text{m}$ 四方の正方領域とした。画像取得は 1.5 秒間隔で行い、取得した画像は、解像度 512×512 pixel、輝度値 8 bit の画像情報として PC に記録した。

3.2.3 力学刺激の負荷方法

単一の骨芽細胞に対して、ガラス製マイクロニードルを直接押し込むことにより、力学刺激を与えた。マイクロニードルは、マイクロピペットプラーを用いて作成した。先端部の直径は約 $10 \mu\text{m}$ であり、押し込みにより細胞膜を傷つけることがないように、ヒートポリッシングにより、なめらかな状態に加工した。このようにして作成したマイクロニードルを、液圧式の三次元マイクロマニピュレーター (MHW-103, Narishige) にディッシュ底面との角度が 40° になるよう取り付けた。

単一の骨芽細胞を観察した蛍光画像と透過光画像の合成画像を図 3.2 に示す。図中、画像左上に骨芽細胞があり、マイクロニードルの先端部が細胞中央部に向かっている。アクチン細胞骨格のネットワーク構造は、細胞形状の長軸方向に対して、平行方向に配向した特徴的な構造を有している。画像処理ソフトウェア (Image Pro Plus, Media Cybernetics) を用いて、細胞輪郭形状を近似する楕円を算出し、その楕円の長軸を細胞形状の長軸と定義し、さらに、アクチン細胞骨格のネットワーク構造の配向方向をファブリック楕円 [Cowin, 1985] を用いて算出した。これら二つの軸の相関性を検定したところ、統計的に有意に両者の方向が一致していることが示された ($p = 0.01, r = 0.83, n = 20$)。細胞形状の長軸方向とマイクロニードルの軸方向とがなす角度を、図 3.3 に示すように、刺激の負荷方向 θ として定義した。

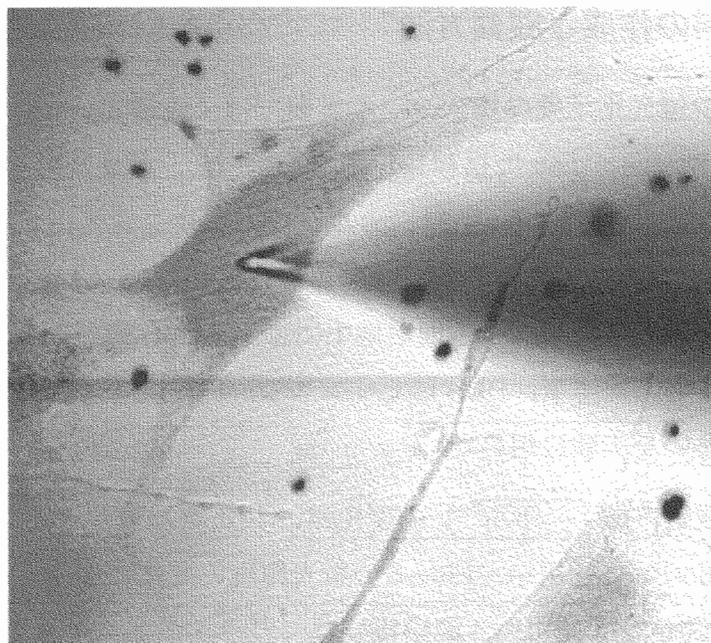


図 3.2 骨芽細胞, およびマイクロニードル先端部の観察画像

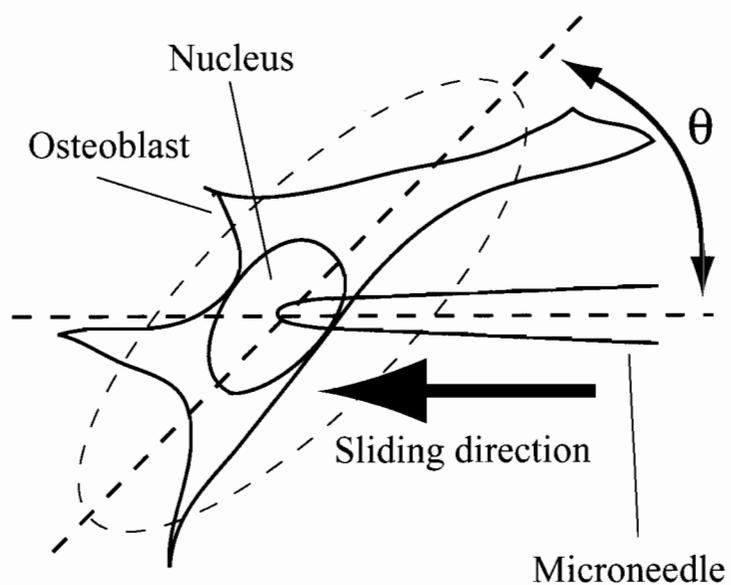


図 3.3 細胞の方向と刺激負荷方向との角度 θ の定義

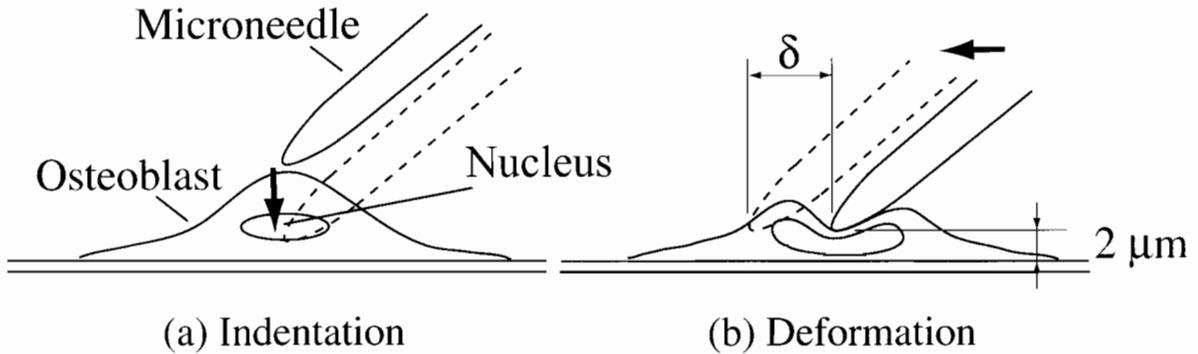


図 3.4 力学刺激負荷方法の概要図および変位置量 δ の定義

力学刺激負荷方法の概要を図 3.4 に示す。まず、図 3.4(a) に示すように、単一の骨芽細胞上方より、マイクロニードルを細胞核直上付近に鉛直方向に押し込む。この際、押し込み深さは、ガラスボトム表面から $2 \mu\text{m}$ 上方の観察平面までとした。なお、押し込み点における細胞の高さは、平均約 $6\sim 8 \mu\text{m}$ である。この状態でニードルを数秒間静止させ、細胞のカルシウム応答が発生しないことを確認する。

次に、図 3.4(b) に示すように、水平方向にマイクロニードルを速度 $10 \mu\text{m} / \text{sec}$ で移動させ、細胞に変形を与える。この時に、マイクロニードルの変位置量を力学刺激の大きさ δ として定義した。したがって、細胞に与えられる変形を図 3.3 に示した刺激方向の角度 θ 、および、この変位置量 δ の二つにより定量的に評価した。

3.3 実験結果

3.3.1 力学刺激に対する細胞のカルシウム応答

マイクロニードルを単一細胞に対して直接押し込み、その先端を細胞膜上にて横滑りさせることで力学刺激として変形を与えた際に観察された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の蛍光観察画像の一例を示す。図 3.5(a) は、刺激負荷前の骨芽細胞の蛍光画像を示している。図 3.6 は、細胞の平均蛍光輝度の時間変化を示したグラフであり、グラフ中の矢印 (a)~(d) は、それぞれ図 3.5(a)~(d) の画像を取得した時点に対応している。細胞に対して、マイクロニードルを鉛直方向に押し込み、ガラス底面から $2 \mu\text{m}$ の位置にニードル先端

が達すると、図 3.5(b) 中の白矢印にて示すように、先端部をスポット状の影として観察することができる。この状態でニードルを静止させ、細胞がカルシウム応答を示さないことを確認した。次に、この例ではマイクロニードルを $\delta = 8 \mu\text{m}$ 水平方向に平行移動させ、細胞に変形を与えた。また、ニードルを移動させた瞬間を $t = 0 \text{ sec}$ とした (図 3.5(c))。マイクロニードルを移動させ、細胞に変形を与えた直後に、ニードル先端部近傍において Fluo 3 の蛍光輝度が上昇し、その輝度上昇が細胞内全体へと伝播した。細胞内の平均蛍光輝度値は、変形負荷後 $t = 12 \text{ sec}$ (図 3.5(d)) にピークに達し、その後、変形負荷以前のレベルにまで徐々に減少した。実験中、マイクロニードルは、細胞内の蛍光輝度上昇が確認された時点で上方へ引き上げ、細胞から離れた。

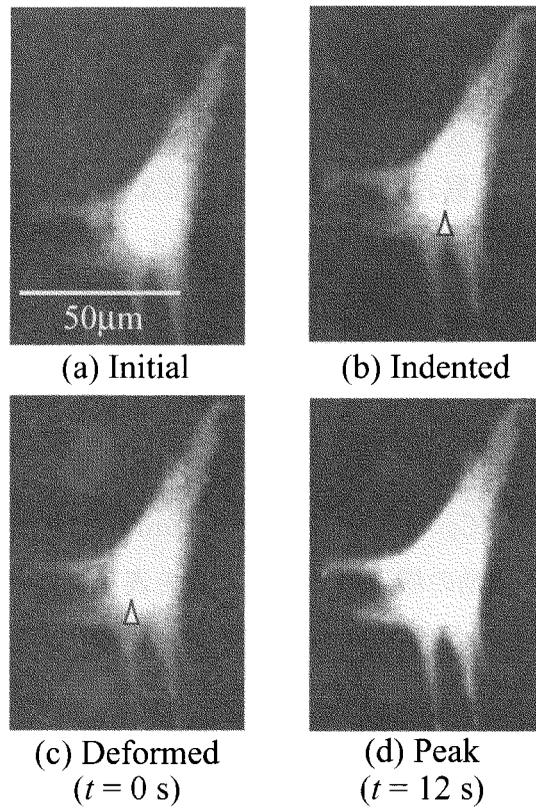


図 3.5 変形負荷による細胞内カルシウムイオン濃度変化の様子（応答あり）

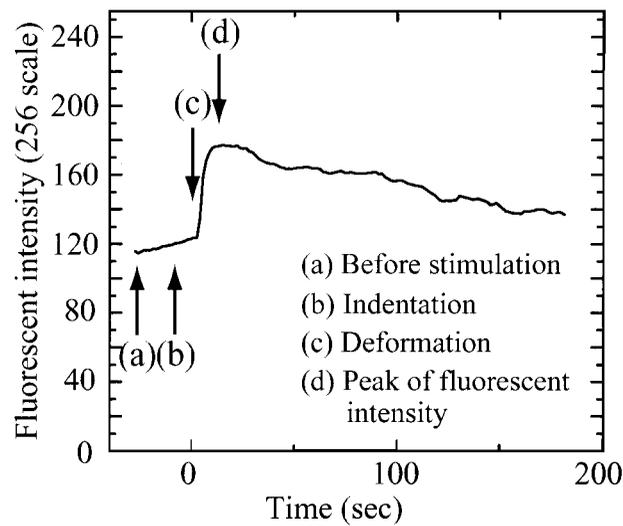


図 3.6 変形負荷時における細胞内の Fluo 3 の平均蛍光輝度変化（応答あり）

上述のような一過的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、力学刺激に対する骨芽細胞の典型的な応答の一つである。しかしながら、その一方で、全ての細胞がマイクロニードルの押し込みによる力学刺激負荷に対してカルシウム応答を示したわけではなく、刺激負荷に対して応答を示さない細胞も観察された。その例を図 3.7, および 3.8 に示す。この例では、図 3.5, および 3.6 に示した場合と同量の変形 ($\delta = 8 \mu\text{m}$) を与えたにも関わらず、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察されなかった。図 3.8 は、細胞内の平均蛍光輝度の時間変化を示したものであり、図中の矢印 (a)~(e) は、それぞれ図 3.7 に示した画像 (a)~(e) を取得した時間に対応している。図 3.7(a), および (b) は、刺激負荷前と鉛直方向への押し込み完了時点での蛍光画像を示している。この後、マイクロニードルを水平方向に移動させる瞬間を $t = 0 \text{ sec}$ として、ニードルを $\delta = 8 \mu\text{m}$ 移動させ、細胞に変形を与えた (図 3.7 (c))。ニードルの移動の様子は、先端位置を表すスポット (白矢印) が、左方向へ移動していることからわかる。しかしながら、変形負荷後も、図 3.7(d), および図 3.8 に示すように、蛍光輝度の上昇は観察されなかった。ここで、細胞が力学刺激に対して応答する能力を有していることを確認するために、 $t = 20 \text{ sec}$ の時点において、図 3.7(d) の状態からさらに $\delta = +10 \mu\text{m}$ だけ多く変形を与えた。その結果、蛍光輝度の上昇が観察され、この細胞が力学刺激に対する応答性を有するが、 $\delta = 8 \mu\text{m}$ の刺激に対しては応答しなかったことが確認された。

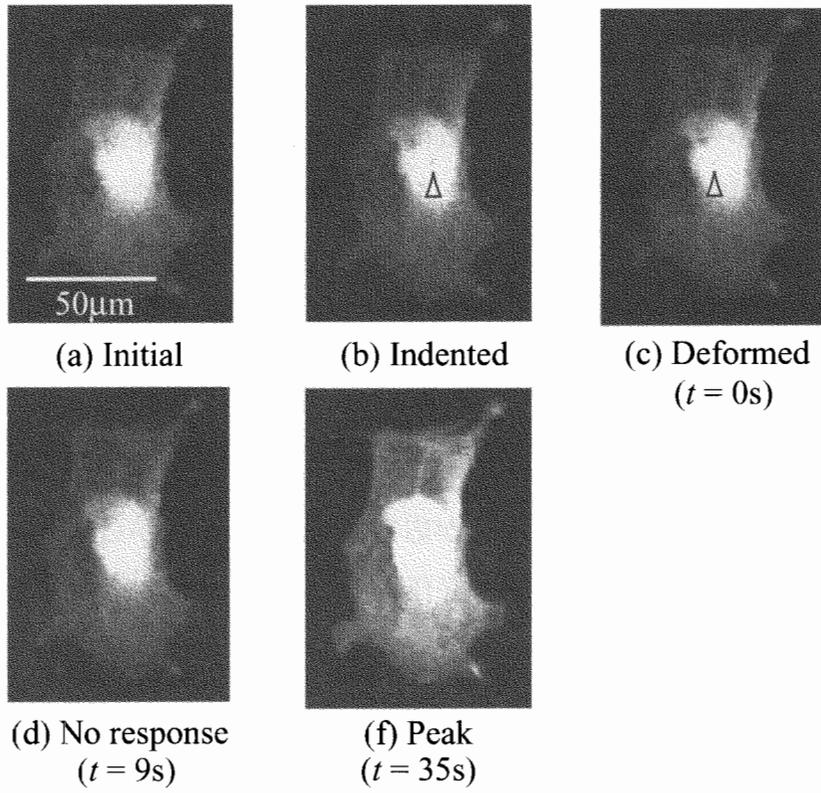


図 3.7 変形負荷による細胞内カルシウムイオン濃度変化の様子（応答なし）

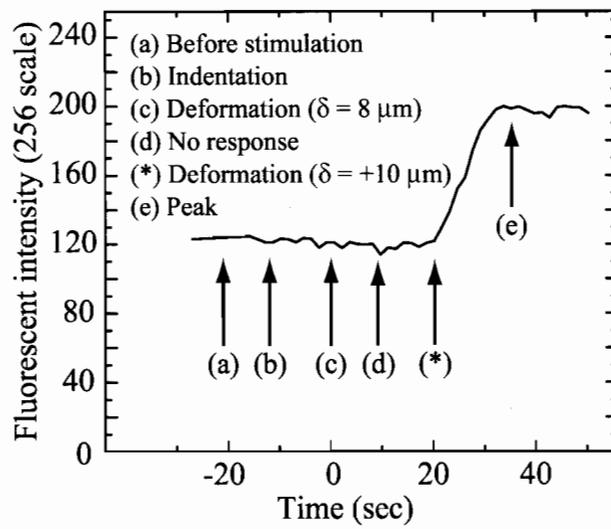


図 3.8 変形負荷時における細胞内の Fluo 3 の平均蛍光輝度変化（応答なし）

このように、マイクロニードルの押し込みにより、骨芽細胞に力学刺激として局所変形を与えた場合、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の応答を示す細胞と示さない細胞が観察された。そこで、細胞のカルシウム応答における、変形負荷量の影響を検討するために、ニードルの変位量 δ を $2 \mu\text{m}$ から $12 \mu\text{m}$ まで、 $2 \mu\text{m}$ 間隔で変化させ、骨芽細胞のカルシウム応答を観察した。その結果を図 3.9 に示す。このグラフでは、横軸に与えたニードルの変位量 δ をとり、縦軸に各変位量 δ におけるカルシウム応答を示した細胞の割合 P を示したものである。実験に用いた細胞数は、 $n = 39$ であり、細胞の長軸に対して変形を与える方向の角度は、 $\theta = 60 \sim 90^\circ$ とした。グラフに示すように、比較的小さい変位量 $\delta = 2 \sim 6 \mu\text{m}$ では、応答する細胞は観察されなかった。しかしながら、 $\delta = 8 \mu\text{m}$ 以降、与える変位量を大きくすると、カルシウム応答を示す細胞の割合も増加し、最終的に、 $\delta = 12 \mu\text{m}$ では、80%の細胞が応答した。この結果から、骨芽細胞が力学刺激を感知し、応答する刺激量に閾値が存在し、その閾値を超えた刺激に対してのみ応答することが示された。

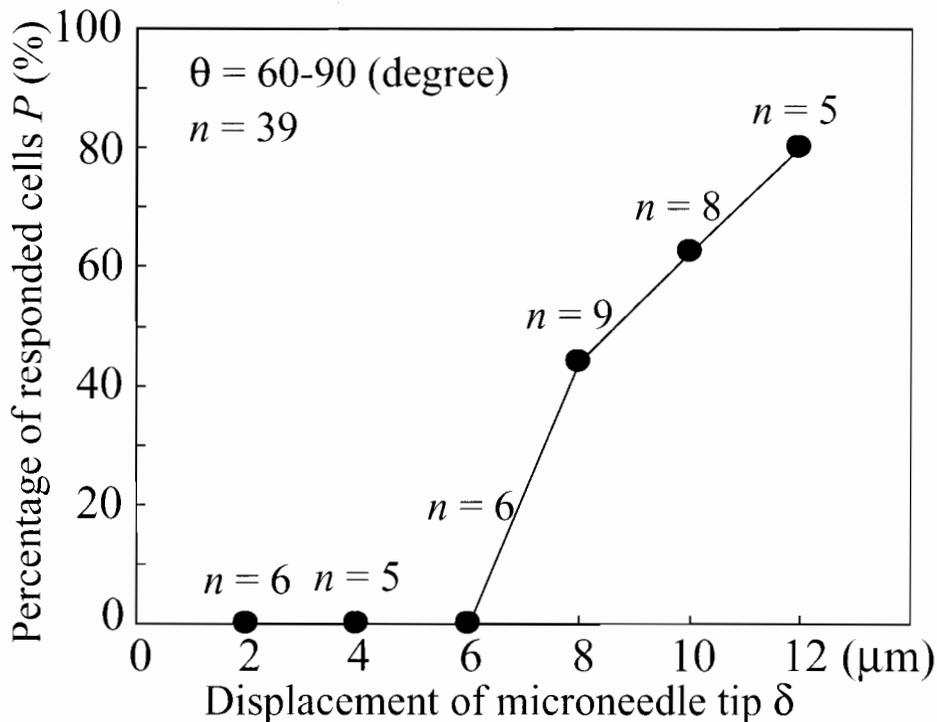


図 3.9 力学刺激負荷に対して応答した細胞の割合

3.3.2 力学刺激に対する応答の刺激方向依存性

前項で述べた実験結果より、骨芽細胞が力学刺激を感知し、応答する刺激の大きさに閾値が存在することが示された。構造体としてのアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の力学刺激感知機構において重要な役割を担っていると考えると、その構造的特徴が細胞の力学刺激応答特性に影響を与えている可能性が考えられる。そこで、細胞形状の長軸方向に配向した特徴的構造を有する骨芽細胞のアクチン細胞骨格に着目し、その構造異方性が、骨芽細胞の力学刺激を感知する特性に与える影響について検討した。本実験では、アクチン細胞骨格の配向方向に対して、変形を与える方向 θ を変化させ、骨芽細胞が力学刺激を感知する変形量の閾値に刺激方向依存性が存在するかどうかを検討した。

変形を与える方向 θ により、実験に用いた細胞群を、三つのグループに分けた。それぞれのグループは、グループA(◆： $\theta = 0 \sim 30^\circ$, $n = 35$)、グループB(■： $\theta = 30 \sim 60^\circ$, $n = 35$)、およびグループC(▲： $\theta = 60 \sim 90^\circ$, $n = 39$)である。図 3.10 にそれぞれのグループにおいて、力学刺激に対して応答を示した細胞の割合 P を示した。グラフに示すように、比較的小さな変位量である $\delta = 2 \sim 6 \mu\text{m}$ では、全てのグループにおいて応答を示す細胞は観察されなかった。一方、 $\delta = 8 \mu\text{m}$ では、グループAでは応答を示す細胞が存在しなかったのに対して、グループB、グループCでは、それぞれ25%、44%の細胞が刺激負荷に対して応答した。さらに、 $\delta = 10 \mu\text{m}$ では、グループA~Cでそれぞれ、14%、50%、63%の細胞が応答した。これらの結果から、全てのグループにおいて、マイクロニードルの変位量 δ が大きくなるほど、より多くの細胞が応答することが示された。さらに、 $\delta = 8$ 、および $10 \mu\text{m}$ のグループにおいては、変形を与える方向 θ が大きくなるほど、同一量の変形に対しても応答を示す細胞の割合が増加している。この結果は、骨芽細胞の力学刺激に対する応答特性が、変形量の大きさに加えて、変形を与える方向、すなわちアクチン細胞骨格の配向方向によっても影響を受けることを示していると考えられる。

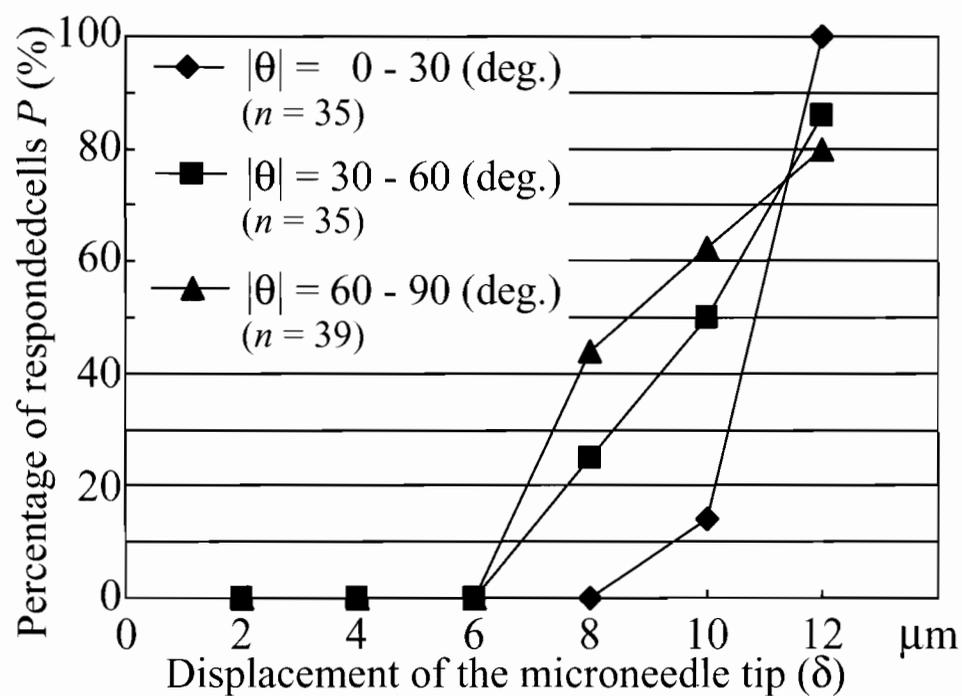


図 3.10 刺激負荷に対して応答する細胞の割合と刺激負荷方向との関係

力学刺激に対する応答特性の刺激方向依存性について、さらに詳細に検討するため、変形負荷に対して応答を示した細胞の割合 P を、変形を与える方向 θ に対してプロットした。そのグラフを図 3.11 に示す。同図では、 $\delta = 8, 10, 12 \mu\text{m}$ のそれぞれの変位量の場合について、横軸に変形を与える方向 θ 、縦軸に応答を示した細胞の割合 P を示している。ここで、応答割合 P は、幅を 10° として移動平均をとり、これを 5° 間隔でプロットしている。

図 3.11(a) は、変位量 $\delta = 8 \mu\text{m}$ を与えた際、変形を与える方向 θ に対する応答を示した細胞の割合 P をプロットしたものである。グラフにおいて、 θ と P に関して線形近似を行い、相関係数を求めたところ、 $r = 0.68$ となり、これらが有意に相関を持つことが示された ($p < 0.01$)。また、変位量 $\delta = 10 \mu\text{m}$ においても、図 3.11 (b) に示すように、線形近似の結果、 θ と P の間には有意な相関が認められた ($r = 0.61, P < 0.02$)。これらの二例に対して、図 3.11(c) に示す、変位量 $\delta = 12 \mu\text{m}$ の場合では、変形負荷に対して、ほとんどの細胞が応答を示しているため、 θ と P との間に有意な相関は認められない。

これらの結果から、骨芽細胞が力学刺激を感知し、応答する変形量の閾値に刺激方向依存性が存在することが示唆される。このことは、アクチン細胞骨格のネットワーク構造の配向方向に対して、変形の負荷方向が変化した場合、骨芽細胞の力学刺激に対する感知特性の感度が増加することを示していると考えられる。

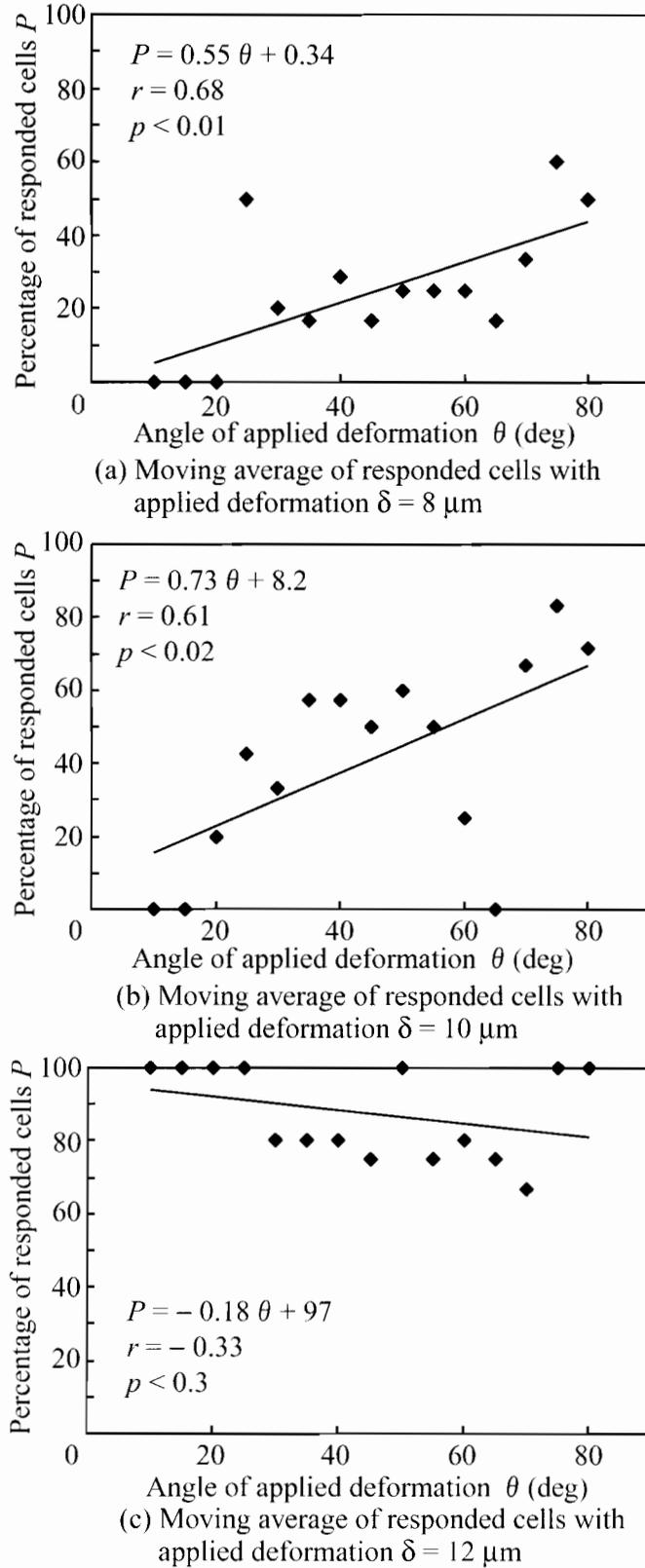


図 3.11 力学刺激負荷に対する細胞の応答割合の刺激方向依存性

3.4 考 察

3.4.1 カルシウム応答を引き起こす変形量の生理的意味

本実験の結果において、マイクロニードルの直接押し込みにより変形を与えた場合、比較的小さい変位量 δ では、カルシウム応答を示す細胞は観察されなかったが、与える変位量が大きくなるにともない、応答を示す細胞の割合も増加した。この負荷する変位量の大きさに対する応答依存性は、骨芽細胞が感知する力学刺激量に閾値が存在することを示唆している。さらに、このことは、組織レベルで見た骨のリモデリングが、骨に作用するひずみの大きさに依存し、ある閾値を超えたひずみが負荷された場合にリモデリング平衡が変化するという現象 [Rubin and Lanyon, 1985; Frost, 1987] のメカニズムに対して、細胞レベルからの説明を与えるものであると考えられる。

しかしながら、その一方で、この *in vitro* の実験系で細胞に与えた変位量 δ を直接的にこれらのひずみ量と対応づけて評価することは困難である。なぜならば、本実験系では、微細なマイクロニードルを細胞に対して直接押し込むことで変形を与えているため、細胞構造に生じる変形は、マイクロニードル先端の接触部分近傍に局在し、複雑かつ不均質であると考えられるためである。したがって、骨に生じるひずみに起因して、骨表面に存在する骨芽細胞が受けると考えられるひずみと直接的に対応づけることは出来ない。そのため、*in vivo* での実験の報告例との定量的な比較を行うためには、本実験系で与えたひずみ、あるいは応力を定量的に測定する手法の開発が必要となる。

3.4.2 カルシウム応答を引き起こす変形量の閾値と刺激方向依存性

骨芽細胞において、アクチン細胞骨格は、細胞形状の長軸方向に対して平行な方向に配向した特徴的な構造を有している。また、この細胞骨格構造は、細胞力覚機構において重要な役割を果たしていると考えられている [Meazzini et al., 1998]。

この二つの観点から、本実験では、骨芽細胞の力学刺激応答特性が、アクチン細胞骨格の構造的特徴、すなわち配向方向により変化すると仮説を立て、実験を行った。そして、実験の結果、ニードルの変位量 $\delta = 8$ 、および $10 \mu\text{m}$ の場合には、細胞形状の長軸方向に対して、ニードルを移動させる方向を変化させた場合、骨芽細胞のカルシウム応答に刺激方向依存性が存在することが示された。しかしながら、その一方で、

変位量 $\delta = 12 \mu\text{m}$ の場合には、刺激方向依存性は認められなかった。この結果は、骨芽細胞の力学刺激を感知し、カルシウム応答を示す刺激量の閾値が、およそ $\delta = 10 \mu\text{m}$ 程度であることを示唆していると考えられる。そのために、それよりも大きな変位量 $\delta = 12 \mu\text{m}$ では、ほとんど全ての細胞が応答するため、刺激方向依存性が認められなかったと考えられる。したがって、変位量 $\delta = 8$, および $10 \mu\text{m}$ においては、変形を与える方向が、アクチン細胞骨格構造の配向方向と対応している細胞形状の長軸に対して直角に近づくほど、細胞はより敏感に変形負荷を感知し、カルシウム応答を示した。この結果から、力学刺激に対する骨芽細胞のカルシウム応答の特性に刺激方向依存性が存在することが示唆される。

さらに、Neidlinger-Wilkeら [2001] は、細胞外基質の繰り返し伸展刺激に対する、細胞の配向現象に関して、細胞の配向には、負荷されるひずみそのものの大きさよりも、細胞形状の長軸方向に作用するひずみ成分の大きさが重要であると報告している。この実験結果も、本実験の結果から示された骨芽細胞のカルシウム応答における刺激方向依存性の存在を指示するものであると考えられる。

3.4.3 刺激方向依存性を生み出す機構のモデル化

バイオメカニクスの観点から、力学刺激に対する骨芽細胞のカルシウム応答特性の刺激方向依存性を考える上では、その機構に関するモデルを検討することが必要である。

第一の仮説として、アクチン細胞骨格のネットワーク構造の配向方向により、細胞膜のみかけの剛性が異なる可能性が考えられる。アクチン細胞骨格は、細胞膜直下にネットワーク構造を形成し、細胞全体に機械的強度を付与する役割を担っている。そのため、その構造が配向性を有する場合、見かけの剛性に異方性が生じる。マイクロニードルの押し込みにより局所変形を与えた場合、膜の局所剛性が方向に依存して異なる場合には、同一量のマイクロニードルの変位量 δ に対しても、実際に細胞膜に生じる変形量は異なるため、細胞の見かけの力学刺激感知感度に刺激方向依存性が存在するように観察されると考えられる。

第二の仮説として、アクチン細胞骨格それ自体が、細胞力覚機構において直接的に役割を果たしている可能性が考えられる。アクチン細胞骨格それ自体に作用する引張変形が、力学刺激を感知する上で重要であると仮定した場合、マイクロニードルの直接押し込みによって変形を与えた際、ファイバーに生じる軸方向の引張変形は、マイクロニードルの移動方向とファイバーの方向とにより幾何学的に決定される。したがっ

て、同一のニードル変位量に対しても、アクチンファイバーの配向方向と変形を与える方向によって、ファイバー自体に生じる軸方向の変形量が変化し、その結果、刺激方向依存性が生じると考えられる。

3・4・4 刺激方向依存性の細胞機能における役割

細胞は、流れによるせん断応力や基質の伸展変形などの方向性を有する力学刺激に対して、特定の方向に配向するようにその形態を変化させる。このような細胞応答は、血管内皮細胞において様々な研究が行われており、流れの負荷に対する細胞応答 [Levesque and Nerem, 1985] や、基質の伸展変形負荷に対する細胞応答 [Shirinsky et al., 1989; Naruse et al., 1998; Wang et al., 2001a] などが報告されている。

これら血管内皮細胞の例と同様に、骨芽細胞についても、基質の伸展変形負荷に対して、細胞形状の配向方向が変化することが報告されている [Wang et al., 2000; Neidlinger-Wilke et al., 2001]。これらの細胞において、細胞形状や細胞構造は、細胞がその機能を発現する上で重要な役割を果たしていると考えられている。細胞形状の形成では、細胞外基質との接着を担うインテグリンなどの接着タンパク質、その接着タンパク質に結合して細胞内にネットワーク構造を形成するアクチンファイバーに代表される細胞骨格タンパク質が、非常に重要な役割を果たしている [Wang et al., 2001b]。これら細胞骨格や焦点接着などの力学要素は、細胞内におけるその構成や分布が変化することにより、細胞形状のリモデリングに関わっていると考えられている [Sokabe et al., 1997]。しかしながら、力や変形といった方向性を有した力学刺激を、細胞がどのように感知しているのか、また、これらの力学刺激が、どのようにして極性を有した力学要素の配置へと変換されるのかについては、未だ明らかでない。その一方で、細胞が方向性のある力学刺激に対して動的にその形状を変化させるためには、方向性のある力学刺激を感知し、その刺激に対して、極性を有する焦点接着の配置や配向した細胞骨格を構築する何らかの機構が必要不可欠である。

本実験の結果により示された、骨芽細胞における、マイクロニードルの直接押し込みによる局所変形負荷に対するカルシウム応答の刺激方向依存性は、アクチン細胞骨格の力学刺激感知機構への関与を示唆するだけでなく、力学刺激に対する細胞形状のリモデリング機構解明への示唆を与えるものであると言える。

3.4.5 細胞機能の人為的制御への可能性

第1章の緒論においても述べたように、骨の主要な機能の一つは、構造体としての力学的機能であり、その構造は、周囲の力学環境から大きな影響を受けている。再生医療において、骨の再生を考える上では、その構造形成過程への力学環境の影響を考慮することが必要となる。本章の実験結果から、骨芽細胞の力学刺激への応答特性に刺激方向依存性が存在すること、および、それがアクチン細胞骨格の構造的特徴からもたらされている可能性が示唆された。このことは、力学刺激に対する骨芽細胞の応答を人為的に制御できる可能性を示すものである。付録Aにて示すように、細胞が接着する基板表面に対して、接着タンパクを修飾、あるいは、微細構造を創成することで、細胞の接着性を制御する研究が行われている。細胞群レベルでの細胞接着性制御のみではなく、単一細胞レベルで接着性を制御することができれば、細胞内構造の形態を人為的に誘導できる可能性がある。すなわち、アクチン細胞骨格は、その一端を焦点接着を介して細胞外基質へと連結しているため、その接着部の空間的分布を制御することにより、アクチン細胞骨格の構造を任意の形態に誘導できると考えられる。このような技術を、再生医療に用いられるスカフォールドの微細構造設計に取り入れることで、骨芽細胞の力学刺激に対する応答特性を考慮し、骨の構造形成を制御することが期待できる。

3.5 結 言

本章では、構造体としてのアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の細胞力覚機構において重要な役割を果たしているとの第2章の結果を受け、アクチン細胞骨格の構造的特徴が、骨芽細胞の力学刺激への応答特性に影響を与えるとの仮説を立てて実験を行った。本実験では、骨芽細胞において、細胞形状の長軸と平行な方向に配向したアクチン細胞骨格の構造的特徴に着目した。アクチン細胞骨格構造の配向方向に対する力学刺激負荷方向、および変形負荷量を変化させ、それに対する細胞のカルシウム応答を観察した。その結果、まず、骨芽細胞がカルシウム応答を示す変形量の大きさに閾値が存在することが示された。さらに、アクチン細胞骨格構造の配向方向に対して、垂直な方向に変形を与えた場合、水平な方向に変形を与えた場合と比較して、細胞がより敏感にカルシウム応答を示す結果が得られた。このことから、構造体として組織化され

たアクチン細胞骨格の構造的特徴が，骨芽細胞の力学刺激応答特性に影響を与えており，細胞の応答特性に刺激方向依存性が存在する可能性が示された。

第4章

力学刺激に対するカルシウム応答を誘起する細胞構造変形量の評価

4.1 緒言

第2章、および第3章では、アクチン細胞骨格構造が、力学刺激に対する骨芽細胞のカルシウム応答特性に及ぼす影響について検討してきた。これらの実験結果より、骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格が構造体として組織化されていることが重要であり、さらに、その構造的特徴が、細胞の力学刺激応答特性に影響を与えていることが示された。

しかしながら、これまでの実験系においては、細胞に負荷する力学的刺激量は、細胞に押し込むマイクロニードルの変位量 δ を用いて評価されてきた。細胞に対して、マイクロニードルを鉛直方向に直接押し込み、細胞膜上にて水平方向に横滑りさせることで変形を与える場合、ニードル先端と細胞膜との間に結合は生じておらず、粘弾性的な摩擦力により変形が負荷されていると考えられる。そのため、変位量 δ を用いて評価した場合、細胞膜、および細胞膜に結合しているアクチン細胞骨格に生じている変形量の相対的な比較を行うことは可能ではあるが、絶対的な変形量として評価することはできない。その一方で、骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格構造が果たす機能的役割を力学的観点からさらに詳細に解明することを目指す上では、例えば、細胞のカルシウム応答が生じる際のアクチン細胞骨格やその他の細胞構造のおかれている力学状態を定量的に評価することが必要不可欠である。

細胞構造に生じる変形量を定量的に評価する手法として、Barbeeらは、細胞膜上に微細な蛍光ビーズを接着させ、そのビーズの変位分布から細胞膜に生じるひずみを算

出す手法を用い、柔軟な基質上に播種した血管平滑筋細胞に対して、基質に等方的な変形を生じさせることで変形を与えた場合、細胞膜には細胞外形状に依存した不均質なひずみが生じることを報告した [Barbee et al., 1994]. また、Vande Geest らは、細胞が接着した柔軟な基質に変形を生じさせることで細胞に変形を与える装置 (Flexercell, Flexcell International Corporation) を用いた場合に基質膜上に生じるひずみ場を詳細に検討することで、細胞に負荷される変形量を定量的に評価することを試みた [Vande Geest et al., 2004]. これらの報告例では、細胞が接着している基質を変形させることで、細胞に対して変形を負荷する方法が用いられている。これに対して、本研究では、マイクロニードルを単一の細胞に直接押し込み、細胞膜上にて横滑りさせることで変形を負荷する方法を用いている。この方法を用いて細胞に対して変形を与えた場合、変形は、ニードルと細胞膜との接触点近傍に局在していると考えられ、接着基質を介して細胞に変形を与える実験系と比較して、細胞構造にはより不均質なひずみ場が生じていると考えられる。Barbee らが用いた接着ビーズの変位を測定する方法により細胞膜に生じるひずみ場を測定した場合、得られる変位場の空間分解能は、細胞膜に接着しているビーズ間の距離に依存する。そのため、実際に細胞膜上に生じる不均質なひずみ場に対して十分な精度で評価できない可能性が考えられる。

そこで、本章では、マイクロニードルの直接押し込みにより、細胞に変形を与える実験系において、変形負荷時に細胞に生じる変形量を定量的に評価する手法の提案を行う。本実験では、マイクロニードルを直接押し込む細胞膜を蛍光標識し、変形負荷時におけるひずみ分布を観察画像から算出する。また、細胞内カルシウムイオンについても蛍光標識を行い、細胞膜の変形挙動と同時観察することにより、力学刺激に対する骨芽細胞のカルシウム応答が生じる際の細胞膜の変形量を定量的に評価する。

4.2 実験方法

4.2.1 実験の概要

実験手順の概要を図 4.1 に示す。まず、細胞を観察用ディッシュに播種し、カルシウム蛍光指示薬 Fluo 4 の細胞内への導入、および蛍光色素 Vybrant DiI による細胞膜の蛍光標識を行う。次に、上述のようにして作成した細胞に対して、力学刺激を負荷し、この時生じる $[Ca^{2+}]_i$ の変化と細胞膜の変形とを同時観察する。また、得られた観察画像を解析することにより、細胞膜上のひずみ分布を算出し、 $[Ca^{2+}]_i$ の局所的な上昇が発生した点におけるひずみ量を定量的に評価する。

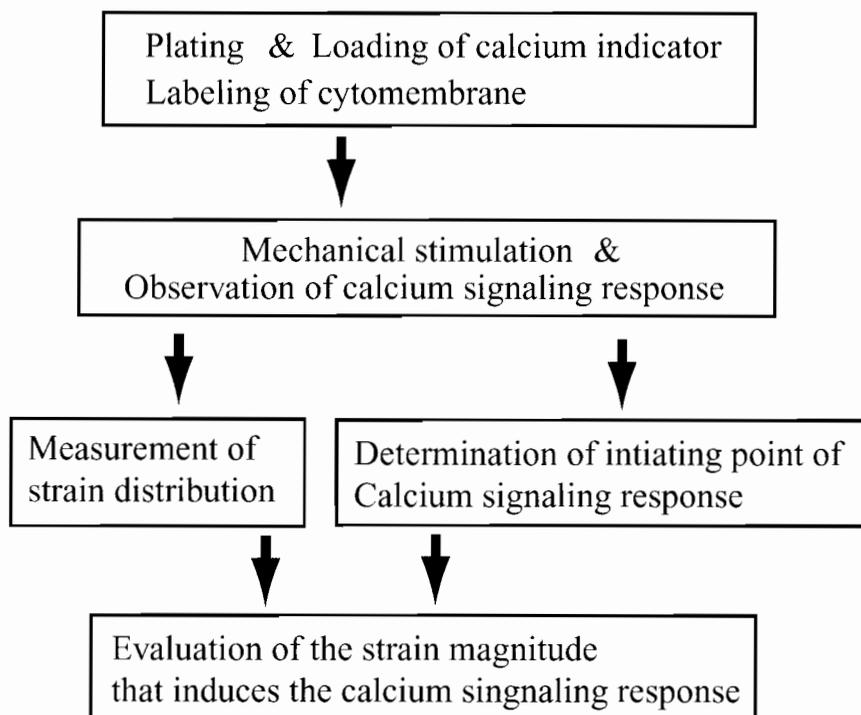


図 4.1 実験の概要

4.2.2 観察試料の作成と観察方法

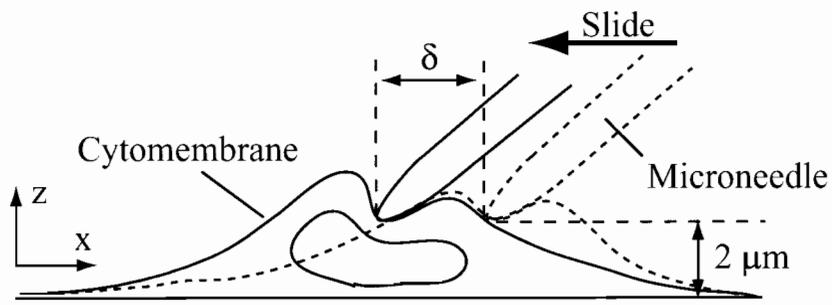
細胞膜の蛍光標識とカルシウムイオン蛍光指示薬の導入： 本実験では、直径 35 mm のガラスボトムディッシュに密度 10^5 cells / dish で播種した細胞を用いた。ディッシュへの細胞播種後、24 時間培養した時点で細胞膜と細胞内カルシウムイオンの蛍光標識を行った。まず、Vybrant DiI (Molecular Probes) を $5 \mu\text{M}$ 添加した Opti-MEM (GIBCO) 中にて、 37°C で 5 分間培養した後、PBS で 3 回リンスし、細胞膜を蛍光標識した。次に、Fluo 3-AM (同仁化学研究所) を $6 \mu\text{M}$ 添加した Opti-MEM 中にて、 25°C で 20 分間培養し、細胞内カルシウムイオンを蛍光標識した。その後、再度 PBS によりリンスし、培地を α -MEM に入れ替えたものを実験に用いた。

細胞膜と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の観察方法： 細胞膜、および細胞内カルシウムイオンの蛍光観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いた。その際、蛍光観察画像、および透過光観察画像は、ガラスボトムから $2 \mu\text{m}$ 上方、マイクロニードル先端付近の縦 $23.4 \mu\text{m}$ 、横 $72.0 \mu\text{m}$ の領域を約 0.25 秒間隔で画像取得し、8 bit 階調の輝度データとして PC に記録した。

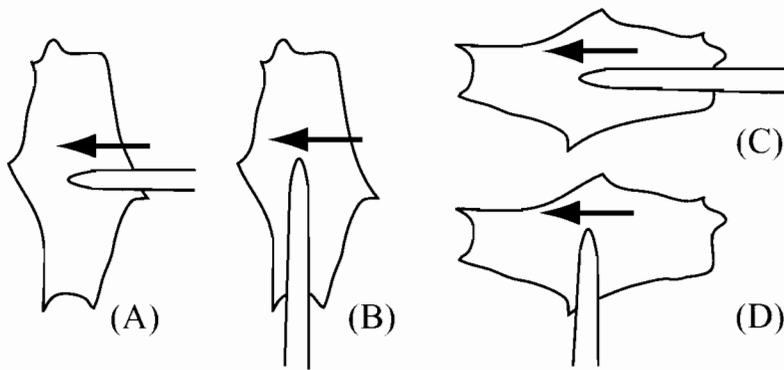
4.2.3 力学刺激の負荷手法

単一の細胞に対する力学刺激として、先端直径が約 $10 \mu\text{m}$ のガラス製マイクロニードルを直接押し込み、変形を与えた。マイクロニードルの操作は、顕微鏡に固定された三次元水圧式マイクロマニピュレーター (ONW-135, Narishige) を用いて行った。まず、図 4.2(a) に示すように、ニードル先端を細胞核直上付近でディッシュ底面から $2.0 \mu\text{m}$ の位置まで鉛直に押し込んだ。次に、ニードルを細胞膜上にて水平方向に移動させ、変形を与えた。この時、ニードルの先端の変位量を δ として定義した。

ニードルの取り付け方向、および移動方向を細胞形状の長軸方向に対して変化させ、細胞に変形を与えた。すなわち、ニードル先端の軸方向が、細胞形状の長軸に対して垂直な場合と平行な場合のそれぞれの場合において、図 4.2(b) 中の (A) および (B) のように、細胞形状の長軸方向に対して垂直な方向と、(C) および (D) のように、細胞形状の長軸方向に対して平行な方向にニードルを移動させ、変形を与えた。



(a) Schematic of mechanical stimuli application (Side view)



(b) Relation of relative angle between cell axis and microneedle, and sliding direction of microneedle (Top view)

図 4.2 力学的刺激負荷方法の概要図

4.2.4 細胞膜の変形量の解析手法

マイクロニードルを細胞膜に直接押し込み、細胞膜上で水平方向に移動させることで生じる細胞膜上での局所変形量の分布を画像解析により算出した。まず、画像処理ソフトウェア (Flow - Vec32, ライブラリー) を用い、画像相関法により、変形負荷前後における変位量分布を求めた。画像相関の算出においては、観察画像中に 10 pixel 間隔の格子点を設定した。また、格子点を中心とする辺長 15 pixel の正方領域を探索領域として設定し、各格子点の変位を算出した。次に、図 4.3 に示すように、各格子点を節点として、画像の解析対象領域を三角形要素に分割し、要素内の変位分布を式 4.1 により線形近似した。ここで、解析する画像の水平方向を x 軸、縦方向を y 軸と定義した。また、未知となっている定数 $a_0 \sim a_2$ 、および $b_0 \sim b_2$ は、変形負荷前と負荷後の画像から得られる各節点の変位 u_x, u_y を式に代入することで決定した。

$$\{u\} = \begin{Bmatrix} u_x(x, y) \\ u_y(x, y) \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} a_0 + a_1x + a_2y \\ b_0 + b_1x + b_2y \end{Bmatrix} \quad (4.1)$$

上述の方法を用いて、変形負荷前からカルシウム応答発生までの間の各時刻における取得画像に対して変位分布を導出し、それらの増分を足し合わせ、最終的な変位分布を算出した。さらに、変形負荷前における三角形要素の面積 A_0 、および、カルシウム応答発生時点での三角形要素の面積 A を用いて変形負荷前後における細胞膜の変形量を、式 4.2 のように面積変化率

$$\varepsilon_{A_0} = \frac{A - A_0}{A_0} \quad (4.2)$$

として定義した。

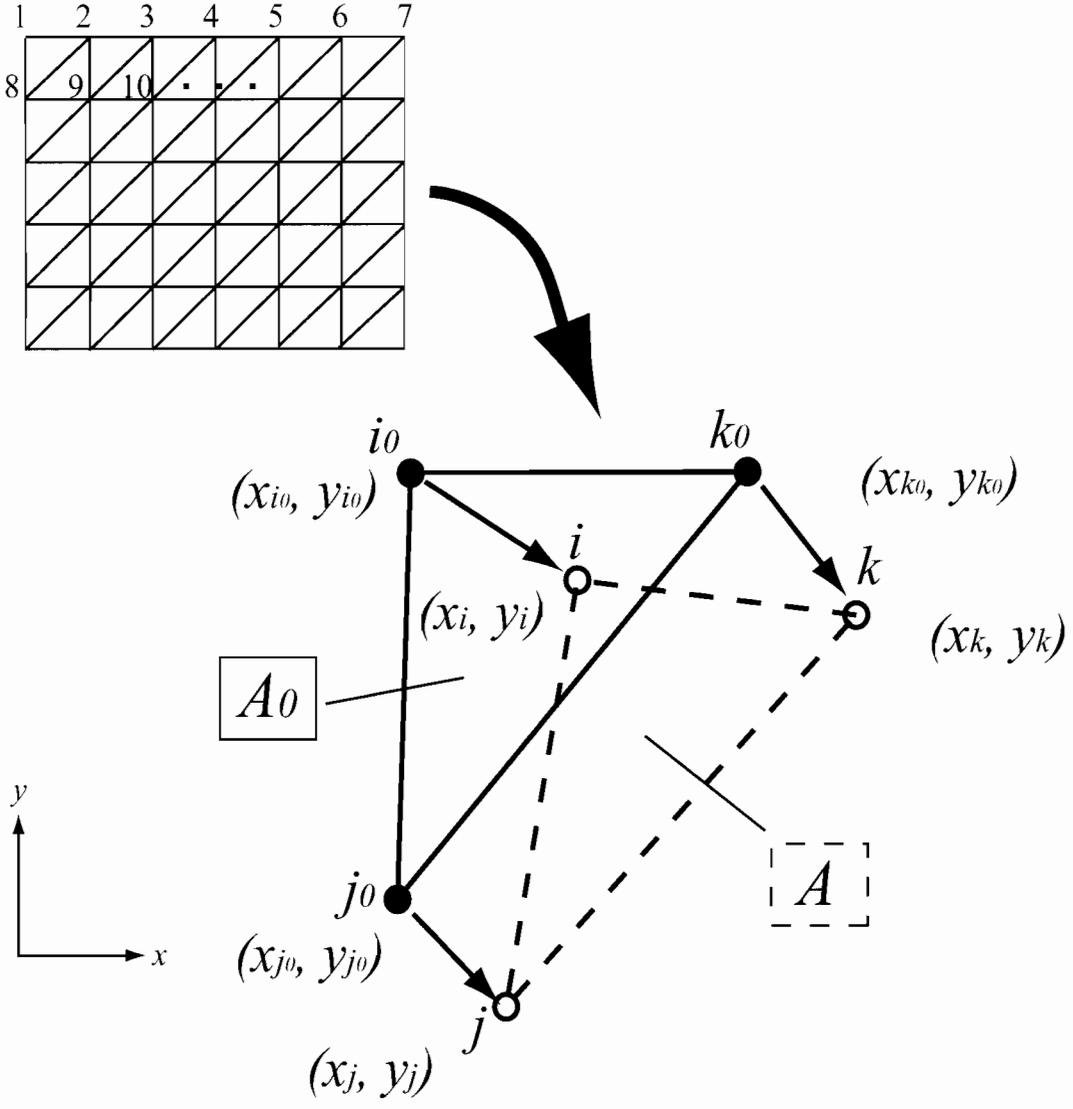


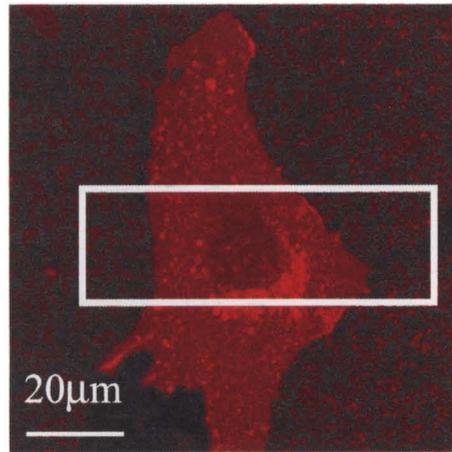
図 4.3 変形量 (面積ひずみ) の定義

4.3 実験結果

4.3.1 局所変形負荷に対する骨芽細胞のカルシウム応答

局所変形負荷による骨芽細胞のカルシウム応答を観察した様子を図 4.4 に示す。図 4.4(a) は、観察した細胞の細胞膜蛍光観察画像の全体像を示している。さらに、図中の白線で囲んだ領域を拡大した画像を、図 4.4(b) ~ (d) に示している。なお、図 4.4(b) は、細胞膜の蛍光画像、図 4.4(c) は、細胞内カルシウムイオンの蛍光画像、図 4.4(d) は、透過光画像をそれぞれ示している。ここで、マイクロニードルを移動させる直前を $t = 0 \text{ sec}$ とした。この観察例では、図中縦方向に伸展している細胞に対して、垂直となるようマイクロニードルを設置し、押し込みを行った後、図中左方向へと移動させることで変形を与えた。図に示すように、マイクロニードルを細胞膜上にて移動させることで細胞に局所変形が生じ、時刻 $t = 1.51 \text{ sec}$ の時点でマイクロニードル先端部近傍において、局所的な蛍光輝度の上昇が発生した。その後、時刻 $t = 2.27 \text{ sec}$ の時点では、蛍光輝度の上昇した範囲が、周囲の領域へと広がっている。このように、マイクロニードルを用いて細胞に局所変形を与えた場合、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇による蛍光指示薬の輝度上昇が局所的に発生し、その後、細胞内へと伝播する様子が観察された。

次に、この局所的な輝度上昇について詳細に検討する。図 4.5 は、図 4.4 と同じ細胞における、細胞内カルシウムイオンの蛍光画像を示したものである。図中、上段に蛍光画像、下段に図 4.5(a) 中に破線で示した領域の蛍光輝度分布を示したグラフを示している。また、図中の白矢印は、マイクロニードルの先端位置を示している。この観察例においては、図 4.5(a)、および (b) に示すように、 $\delta = 0 \sim 8.3 \mu\text{m}$ の間では、蛍光輝度の上昇は観察されず、細胞はカルシウム応答を示していない。その後、 $\delta = 9.7 \mu\text{m}$ を与えた時点で、図 4.5(c) に示すようにマイクロニードル変位方向前方のニードル先端部近傍において局所的な蛍光輝度上昇が発生し、さらに、図 4.5(d) に示すように、蛍光輝度上昇が細胞内へと伝播していることがわかる。



(a) Entire image of observed cell
(Cytomembrane labeled by Vybrant DiI)

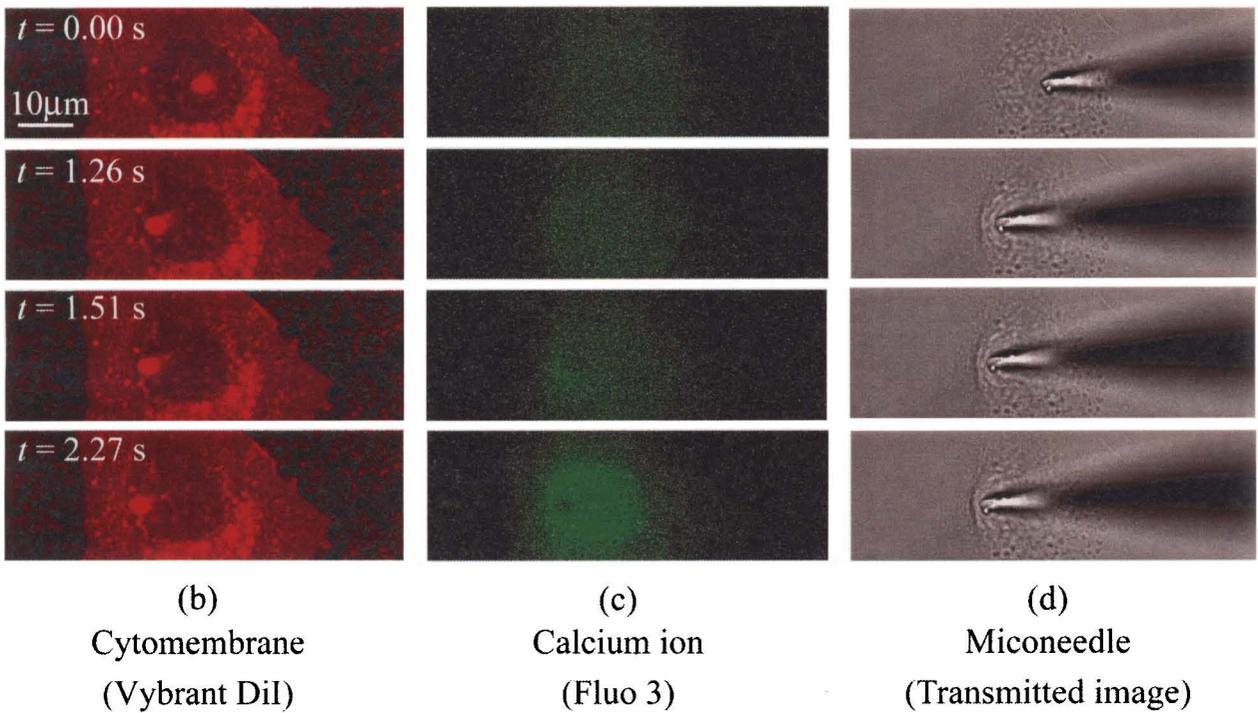


図 4.4 ニードルの移動に伴う細胞の局所変形とカルシウムイオン濃度上昇の様子

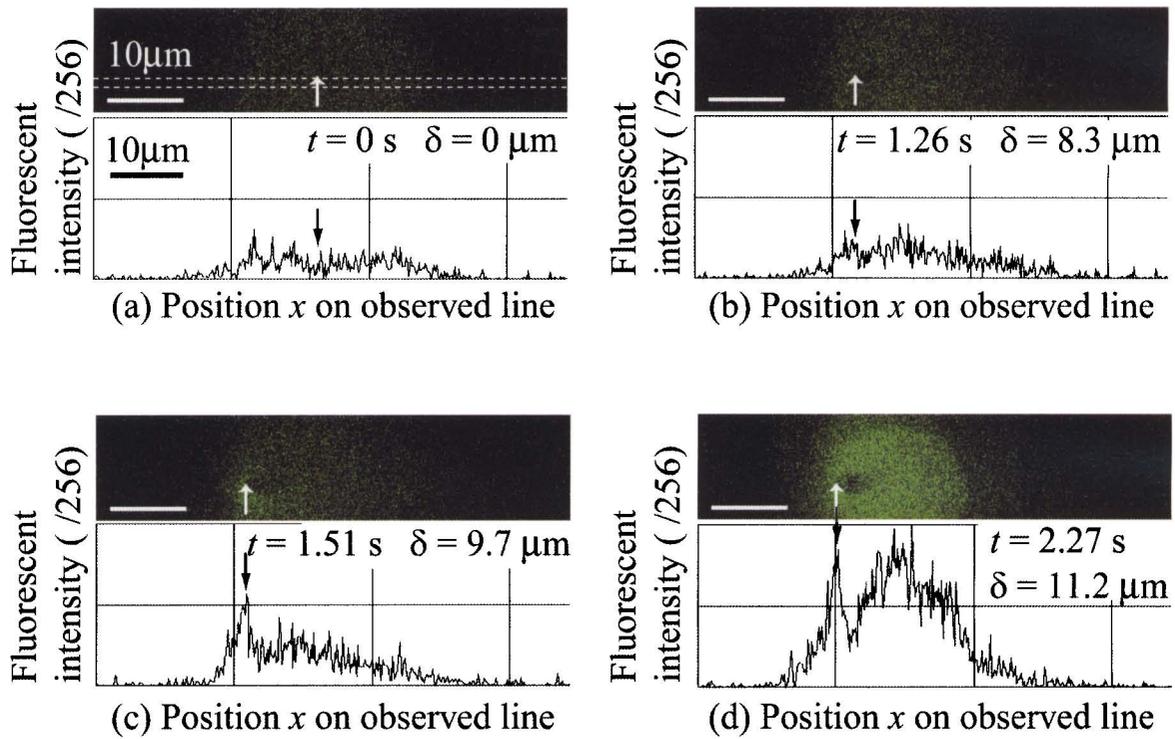


図 4.5 変形負荷による細胞内カルシウムイオンの局所的な蛍光輝度上昇

4.3.2 カルシウム応答発生時における細胞膜の局所変形量

局所変形負荷後の細胞膜の蛍光画像を図 4.6(a) に示し、前節で述べた手法を用いて算出した面積ひずみ ε_A の分布図、および局所的な蛍光輝度上昇の発生時点における平均蛍光輝度分布図を図 4.6(b) に示す。図中、白矢印はマイクロニードルの先端の位置を表しており、ニードルの変位方向前方の領域 A には、圧縮のひずみが、また、変位方向後方の領域 B には、引張りのひずみが生じていることがわかる。また、図 4.6(b) の ε_A の分布図と平均蛍光輝度分布図との比較から、局所的な蛍光輝度の上昇点においても、圧縮のひずみが生じていることがわかり、その大きさは、 $\varepsilon_A = -0.80$ であった。

このように、細胞に生じる局所変形の分布と細胞内カルシウムイオンの蛍光輝度変化を取得した画像から解析することで、細胞のカルシウム応答が発生する際の変形状態を定量的に評価することが可能である。

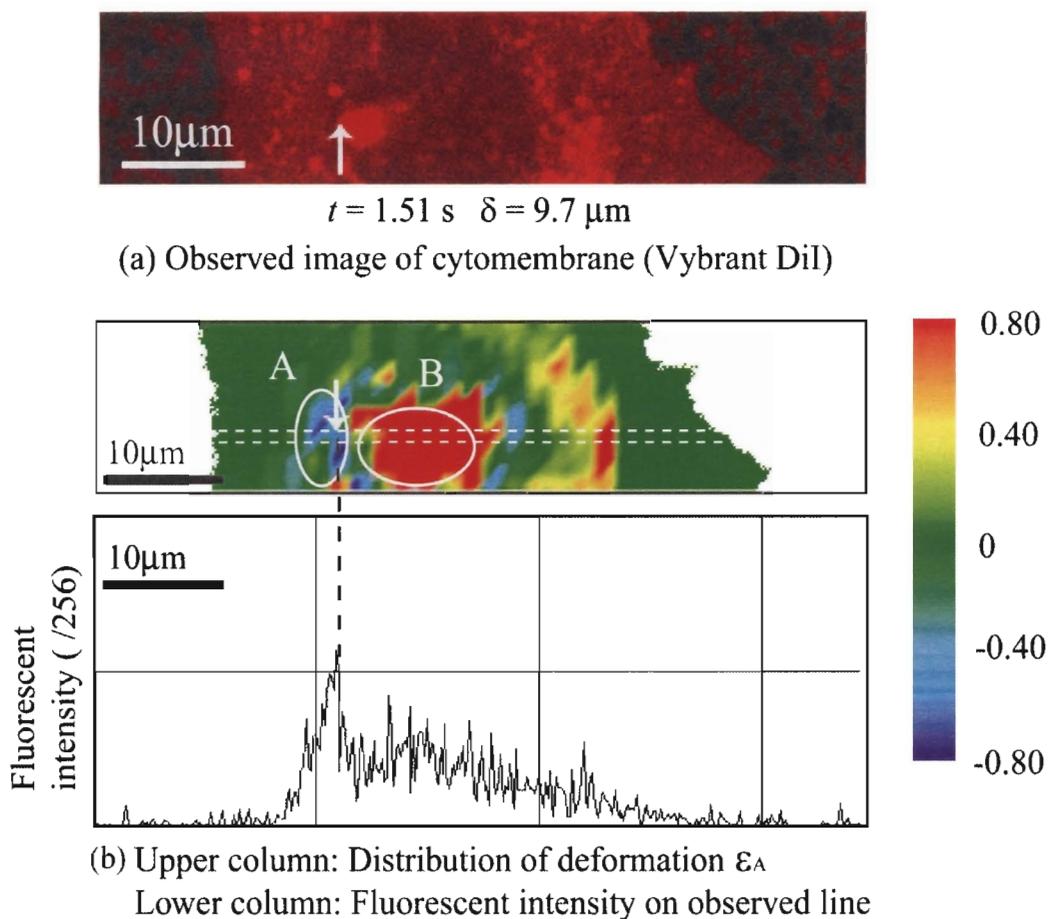
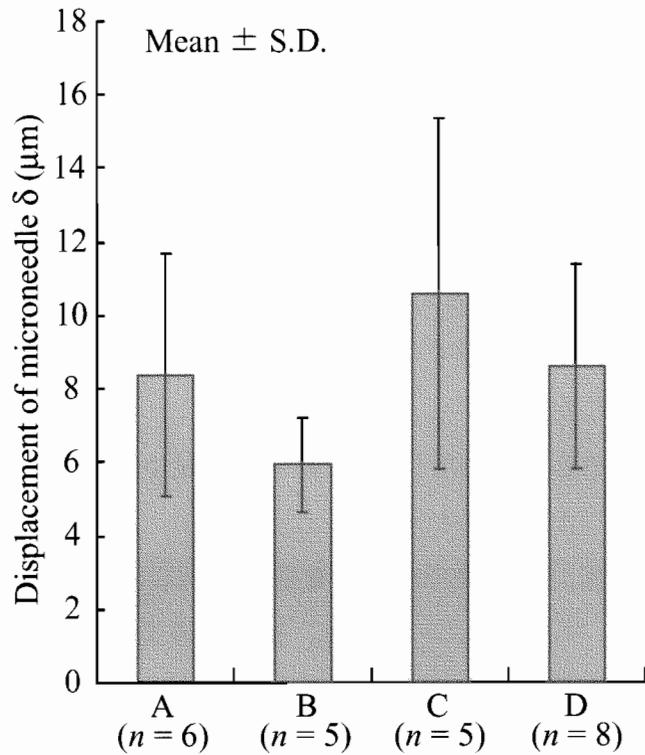


図 4.6 細胞膜に生じた変形量の分布とカルシウムイオン濃度上昇発生点との関係

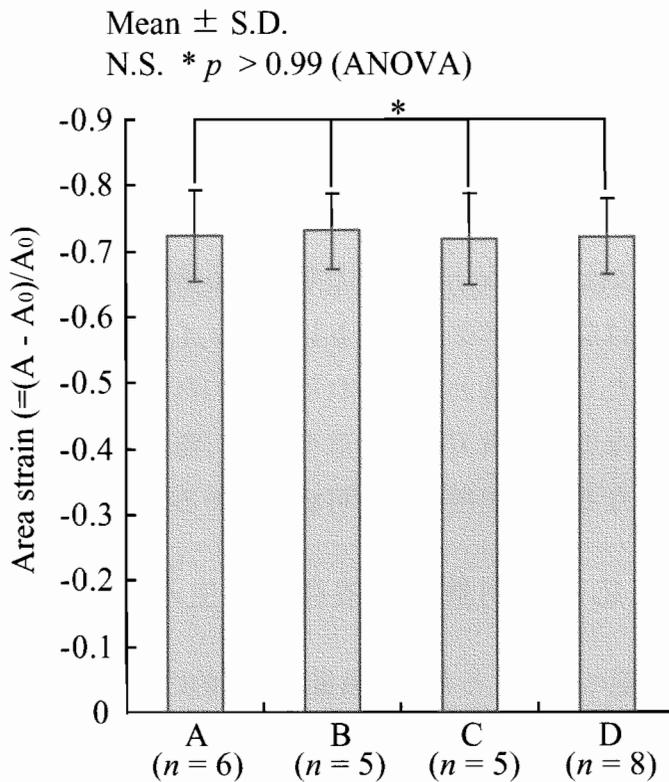
次に、この手法を用いて、図 4.2(b) に示した (A) ~ (D) のそれぞれの場合における、カルシウム応答を誘起する細胞膜の変形量について評価した。

まず、図 4.7(a) は、(A) ~ (D) のそれぞれの変形負荷方法において、細胞のカルシウム応答が生じた時点でのマイクロニードルの変位量 δ の平均値を示したグラフである。まず、細胞形状の長軸方向に対して、長軸方向に対して垂直な方向に移動させる場合 ((A), (B)) と、平行な方向にニードルを移動させる場合 ((C), (D)) とを比較する。グラフから、(C), (D) の方が、(A), (B) よりもより大きな変位量 δ でカルシウム応答が発生している。この結果は、第3章で述べた細胞応答の刺激方向依存性を示すものである。次に、細胞形状の長軸方向に対するニードルの移動方向は同じで、ニードルの設置方向が異なる場合について比較する。細胞形状の長軸方向に対して、ニードルを直角に移動させる場合 ((A), (B))、および、平行に移動させる場合 ((C), (D)) のどちらにおいても、ニードルを軸方向と直角の方向にニードルを移動させる場合 ((B), (D)) の方が、ニードルの軸方向と平行に移動させる場合 ((A), (C)) よりも小さな変位量 δ でカルシウム応答が発生している。

これに対して、図 4.7(b) は、図 4.2(b) に示した (A) ~ (D) のそれぞれの変形負荷方法において、細胞のカルシウム応答が生じた時点での面積ひずみ ε_A を示したグラフである。グラフから、図 4.7(a) で示した δ を用いて評価した場合と異なり、(A) ~ (D) のいずれの場合においても、ほぼ同一の変形量 ε_A でカルシウム応答が発生していることがわかる。今回の実験において、骨芽細胞がカルシウム応答を示す細胞膜の面積変化率は、 $\varepsilon_A = -0.72$ と見積もられた。



(a) Groups of stimulus applying method
(Set up direction and sliding direction)



(b) Groups of stimulus applying method
(Set up direction and sliding direction)

図 4.7 カルシウム応答発生に必要な力学量と刺激方法との関係

4.4 考察

4.4.1 カルシウム応答を誘起する細胞膜変形量の物理的意味

力学的刺激に対する骨芽細胞のカルシウム応答機構においては、伸展活性 (SA) チャネルの関与が指摘されており [Xia and Ferrier, 1992], 本実験系を用いて細胞に局所変形を与えた場合にも、引張りひずみが生じている領域からカルシウム応答が発生することが推察される。しかしながら、実験の結果、ニードルの変位領域前方の圧縮ひずみが生じている領域から局所的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が発生することが観察された。この原因として、以下の二つが考えられる。

まず第一の原因として、本実験で行った変形解析が二次元で行われていることが挙げられる。本実験では、マイクロニードルは、細胞核直上付近に押し込まれており、また、ニードルの鉛直方向への押し込みと水平方向への移動により、ニードル先端部近傍では、複雑な三次元の変形が生じていることが推測される。そのため、細胞接着面に平行な二次元面内での変形解析では、変形情報が欠落する可能性がある。第二の原因として、細胞膜の変形量を評価する力学量として、面積変化率 ε_A を用いたことが挙げられる。細胞膜は、脂質二重膜から構成されている。脂質分子同士は、膜面内で自由に拡散運動を行うことができると考えられ、そのため、せん断に対しては、脂質分子からなる細胞膜は、ほとんど剛性を持たないと考えられる。そこで、マイクロニードルの押し込みと移動により生じる細胞膜の変形を定量化するために、面積変化率 ε_A を用いて評価した。しかしながら、細胞の力学刺激応答機構においては、チャネルの存在する細胞膜のみではなく、アクチンストレスファイバーをはじめとする細胞骨格要素も重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、細胞膜のみではなく、細胞膜と細胞骨格とからなる複合構造体の変形を考慮可能な力学量を用いて評価した場合には、本結果とは異なる結果が得られる可能性がある。

4.4.2 カルシウム応答の刺激方向依存性を生み出す機構

本実験系を用いて細胞に負荷する力学刺激量を定量的に評価する上で、マイクロニードルの変位量 δ を用いて評価した場合には、第3章で示したように、骨芽細胞のカルシウム応答特性に刺激方向依存性が認められた。一方、本章で示したように、細胞膜の局所的な面積変化率 ε_A を用いて評価した場合には、力学刺激負荷量に関わらず、一

定の面積ひずみでカルシウム応答が発生することが示された。これら二つの実験結果から、アクチンストレスファイバーのネットワーク構造の配向方向により、細胞の見かけ上の局所剛性が異なることが一つの可能性として推察される。本実験系を用いて細胞に変形を与えた場合、マイクロニードルと細胞膜との間に接着は生じていないと考えられる。したがって、ニードルを移動させることにより細胞に与えられる変形は、ニードル先端と細胞膜との摩擦力に起因する。そのため、マイクロニードルを押し込んだ部位の局所剛性が異方性を有することにより、ニードルの移動量 δ を用いて評価した場合には、見かけ上の刺激方向依存性が生じると考えられる。その一方で、第2章で示したように、アクチンストレスファイバーの構造を重合阻害剤により消失させた場合には、力学刺激に対してカルシウム応答を示す細胞の割合が低下したことから、構造体としてのアクチン細胞骨格が細胞力学機構に直接的に関与していることが示唆される。アクチン細胞骨格は、本実験で着目しているアクチンストレスファイバーのみではなく、細胞膜と結合した密なネットワーク構造や、葉状仮足において見られるような微細構造など、多種多様な形態を有している [Alberts et al., 2002]。これらの複雑な構造からなる複合構造体としてのアクチン細胞骨格が、細胞力覚機構において、多岐にわたる役割を担っている可能性が考えられる。したがって、アクチンストレスファイバー構造のみではなく、その他の構造についても考慮に含めて、アクチン細胞骨格が細胞力覚機構において果たす機能的役割について検討を行っていくことが必要である。

4.4.3 細胞が感知する力学刺激の物理量

細胞力覚機構に関する議論の中で、細胞が感知している物理量に関する議論がある。すなわち、細胞は力を感知しているのか、あるいは変形を感知しているのか、という議論である。本章で示した結果では、細胞膜に一定量の面積ひずみが生じた場合にカルシウム応答が生じた。これは、細胞が変形を感知しているとする仮説を支持するものであると言える。これに対して、例えば、力学刺激受容機構の有力な候補であると言われている SA チャネルに着目すると、その活性化は、細胞膜に作用する張力に依存するとの報告がなされている [Sokabe et al., 1991]。この報告例では、パッチクランプ法を用いて SA チャネルの活性化が評価されている。そのため、細胞膜と細胞膜直下の細胞骨格のみが、パッチピペット内部に吸引され、本来あるべき細胞骨格構造との連結が失われている可能性がある。

その一方で、本章で用いた実験系では、細胞膜のみを蛍光標識し、変形量を評価したため、細胞骨格に生じている変形量については評価できていない。第2章、3章で示したように、構造体として組織化された細胞内のアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の細胞力覚機構において重要な役割を果たしている。このことを考慮すると、細胞が感知する物理量について議論するためには、細胞において、細胞膜や細胞骨格に生じる変形や力を *in situ* 観察することが不可欠であると言える。そのためには、本章で提案した手法を応用して、細胞内の構造を多重染色することにより、それらの動態を同時に可視化し、高時間・空間分解能で観察することが非常に有効なアプローチになると考えられる。

4.5 結 言

本章では、単一の骨芽細胞に対して、ガラス製マイクロニードルを直接押し込み、細胞膜上にて水平方向に移動させることで変形を与える実験系において、細胞のカルシウム応答が発生する際の細胞膜の変形量を定量的に評価する手法を提案した。細胞膜と細胞内カルシウムイオンを蛍光標識した骨芽細胞を作成し、細胞膜に生じる変形と $[Ca^{2+}]_i$ の変化を同時観察した。得られた観察画像から、画像相関法を用いて細胞膜に生じる変位分布を測定し、その変異分布から、細胞膜に生じる面積ひずみ ϵ_A の分布を算出した。マイクロニードルを細胞膜上に鉛直方向に押し込み、水平方向に移動させることで変形を与えた場合、ニードル先端近傍の変位方向前方の局所領域から $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が発生し、その後、細胞内へ濃度上昇が伝播する様子が観察された。カルシウムイオン濃度の上昇が始まった領域に生じている変形量を評価したところ、圧縮ひずみが生じていることが明らかになった。さらに、細胞の形状に対して、マイクロニードルを押し込む方向、および水平方向に移動させる際の移動方向を変化させ、細胞のカルシウム応答が発生する際の細胞膜のひずみを評価した。その結果、カルシウム応答が発生する際の細胞膜の変形量は、ニードルを押し込む方向、あるいはニードルを移動させる方向のいずれにも依存せず、一定の大きさであることが明らかになった。

第5章

選択的張力解放に伴うアクチン細胞骨格の局所的脱重合

5.1 緒言

前章までの結果から、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の細胞力覚機構において重要な役割を担っており、さらに、その構造体としての構造的特徴が、細胞のカルシウム応答特性に刺激方向依存性を生じさせていることが示された。

その一方で、アクチン細胞骨格は、静的な構造ではなく、常に再構築される動的な構造であり、アクチン細胞骨格の関与する細胞機能の発現において、そのダイナミクスが非常に重要である [Bray, 2001]。また、これらの再構築現象に加えて、細胞周囲の力学環境の変化によってもアクチン細胞骨格構造の再構築が行われることが知られている。例えば、アクチン細胞骨格の一種であるアクチンストレスファイバーは、繰り返し伸展ひずみの負荷や細胞外液の灌流によるせん断応力の負荷などの方向性を持った力学刺激により再構築され、そのファイバーネットワーク構造の配向方向が変化することが報告されている [Buckley et al., 1998; Chen et al., 2000; Wang et al., 2000; Neidlinger-Wilke et al., 2001; Noria et al., 2004]。

すなわち、骨芽細胞のアクチン細胞骨格は、その構造の配向方向により、細胞のカルシウム応答に刺激方向依存性を生じさせる一方で、方向性を有した力学刺激により、動的にその配向方向を変化させている。このことは、方向性を有する力学刺激に対する細胞応答機構において、一種のフィードバック機構が存在する可能性を示唆している。したがって、細胞構造レベルでの細胞力覚機構の解明に加え、細胞、あるいは細胞群レベルにおけるシステムとしての骨芽細胞の細胞力覚機構を検討する上では、力

学環境の変化に誘起されるアクチン細胞骨格の再構築現象についても考慮することが重要となる。

この力学刺激によって誘起される再構築機構の解明を目指して、これまでも、分子生物学的立場から多くの研究がなされており、さまざまな再構築の調整に関わる生化学シグナリング経路が明らかにされている [Naruse and Sokabe, 1993; Gunst et al., 2003; Wojciak-Stothard and Ridley, 2003]. その中で、これらの生化学的調整因子に加え、細胞構造に作用する細胞内張力が、力学刺激による再構築機構の調整因子候補として提案されている。アクチンストレスファイバーは、その構成要素として、線維状アクチンである F-アクチンと Type-2 ミオシンを含んでおり、収縮能を有していると考えられている [Isenberg et al., 1976; Katoh et al., 1998]. このアクチンストレスファイバーにより生じる細胞内張力は、細胞接着 [Balaban et al., 2001] や細胞外基質の再構築 [Zhong et al., 1998] などの細胞機能において重要な役割を果たしている。さらに、これらの役割に加えて、アクチン細胞骨格の再構築を制御する因子の一つとして、細胞内張力が関与していることを示唆する観察例が報告されている。Costa ら [2002] は、予め伸展させた状態の伸縮性の基質上で細胞を培養し、その後、基質の引張りを自然長にまで戻すことで瞬時に細胞内張力を解放すると、細胞内のアクチン細胞骨格が消失することを報告している。この実験結果は、アクチン細胞骨格に作用する張力を解放すると、アクチンファイバーの脱重合が開始されることを示唆している。しかしながら、この実験系では、細胞全体を変形させて観察を行っているため、個々のファイバーが置かれている力学状態と、脱重合現象とを直接的に関連付けることは難しい。

そこで、本章では、細胞内の対象とするアクチン細胞骨格の張力を選択的に解放させる新たな実験系を提案し、これを用いて、張力を解放したアクチン細胞骨格の構造変化を観察する。まず、細胞外基質とアクチン細胞骨格とを連結している焦点接着を選択的に溶解させることにより接着を解除し、単一の骨芽細胞に部分的な収縮を生じさせる。これにより、細胞内アクチン細胞骨格の中で対象とするアクチンストレスファイバーのみに選択的に収縮変形を生じさせ、張力を解放する。このようにして、単一の細胞内に張力を解放するファイバーと解放しないファイバーとが共存する状態をつくり、その状態で張力解放に伴うアクチン細胞骨格構造の構造変化を観察する。

5.2 実験方法

5.2.1 実験の概要

実験手順の概要を図 5.1 に示す。まず、細胞を観察用ディッシュに播種し、蛍光タンパク EGFP とアクチンの融合タンパクをコードするプラスミド DNA をトランスフェクションする。さらに、細胞内での DNA 発現を待つために 2 日間培養したものを実験に用いる。実験では、タンパク切断酵素 trypsin/EDTA を用い、細胞の焦点接着を部分的に解除することで、細胞に局所収縮を生じさせ、対象とするアクチン細胞骨格に作用する張力を選択的に解除する。このようにして、単一の細胞内に張力が解放されるファイバーと解放されないファイバーとが共存する状態をつくり、その後の構造変化を経時的に観察する。

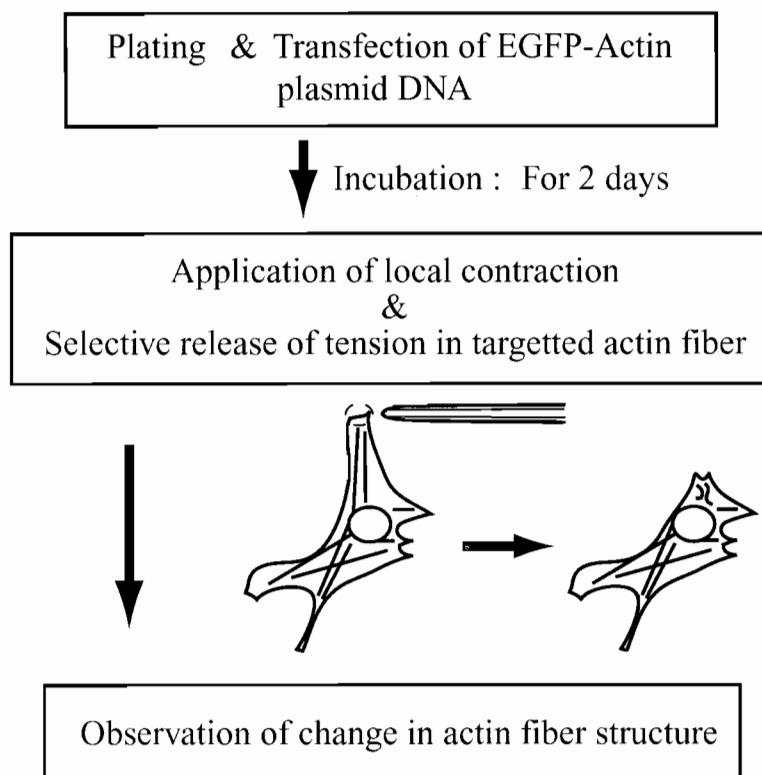


図 5.1 実験手順の概要

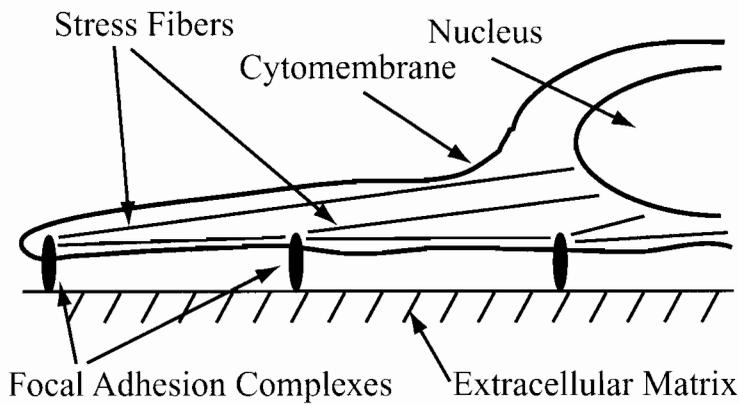
5.2.2 観察試料の作成と観察方法

EGFP-Actin プラスミド DNA の導入： 本実験では、直径 35 mm のガラスボトムディッシュに密度 2.5×10^4 cells / dish で播種した細胞を用いた。細胞播種後、24 時間培養した時点で蛍光タンパク質である EGFP とアクチンとの融合タンパク質をコードしたプラスミド DNA (Clontec) を細胞に導入した。DNA 導入には、FuGENE6 (Roche Diagnostics) を用い、EGFP-アクチンのプラスミド DNA と FuGENE6 を添加した Opti-MEM (Invitrogen) 中にて 4 時間培養することで、リポフェクションにより、細胞内へ DNA を導入した。DNA 導入操作後、通常の α -MEM に入れ替え、細胞内での遺伝子発現を待つため、さらに 48 時間培養したものを観察試料として実験に用いた。

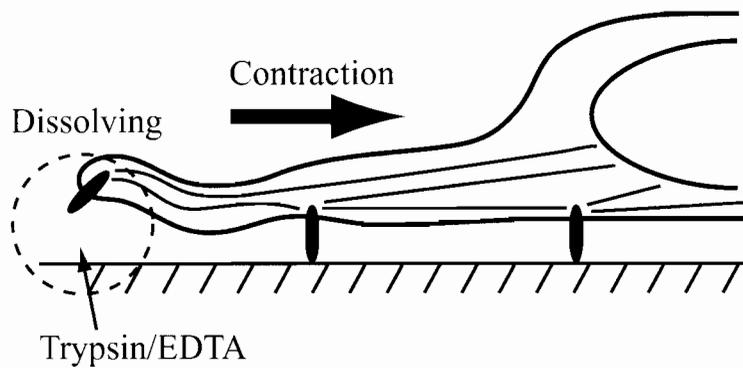
アクチン細胞骨格構造変化の観察方法： 焦点接着の局所的解除に伴うアクチン細胞骨格の構造変化を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (Digital Eclipse C1, Nikon) を用いて観察した。画像取得は、2.5 秒間隔で行った。対物レンズは、60 倍の油浸レンズを用い、観察領域は、一辺が $222 \mu\text{m}$ の正方領域とした。

5.2.3 焦点接着の局所的解除方法

本実験では、骨芽細胞の焦点接着と細胞外基質との接着を局所的に溶解させることにより接着を解除し、細胞に部分的な収縮を起こさせることで変形を与えた。アクチン細胞骨格構造は、図 5.2(a) に示すように、一端は焦点接着を介して細胞外基質と連結し、他端は他の焦点接着や、細胞内構造と連結している。したがって、焦点接着と細胞外基質との接着を局所的に解除することにより、図 5.2(b) に示のように、細胞内のアクチンストレスファイバー構造に選択的に収縮変形を与えることが可能である。



(a) Schematic of cytoskeletal structure in osteoblastic cell



(b) Application of local contraction induced by dissolving of focal adhesions

図 5.2 アクチン細胞骨格の張力解放の概要図 (側面図)

焦点接着の局所的解除には、図 5.3 に示すように、ガラス製のマイクロピペットとマイクロインジェクションシステム (IM-88H, Narishige) を用いて、単一の細胞に対して、trypsin/EDTA (0.05 % / 0.02 %) (Sanko Junyaku) を局所的に吹きかけることにより、焦点接着を選択的に溶解させ解除した。ここで、マイクロピペットの先端部は、外径が約 10 μm 、内径が約 6 μm であり、単一の骨芽細胞に対して、Trypsin/EDTA を局所的に作用させることが可能である。また、trypsin/EDTA は培地中を拡散するが、本実験では、その作用を阻害する効果を有する血清を添加した培地を用いているため、焦点接着斑の溶解は、マイクロピペット先端部近傍に限定される。このようにして、焦点接着を局所的に解除し、図 5.4 に示すように、細胞内のアクチン細胞骨格に対して選択的に収縮変形を与え、単一の細胞内において、張力が解放されるファイバーと解放されないファイバーが共存する状態を作成することが可能となる。実験は、温度 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ に制御した大気開放環境下にて行い、雰囲気組成、および湿度は制御していない。

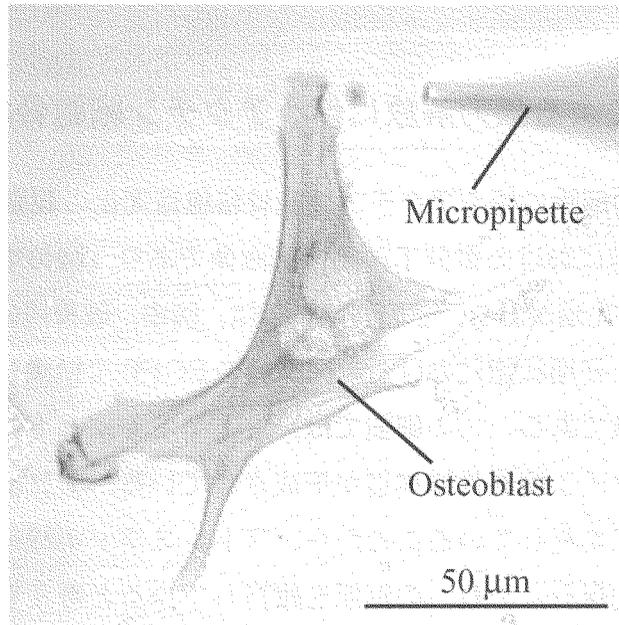


図 5.3 焦点接着を局所的に解除する実験系の透過光画像

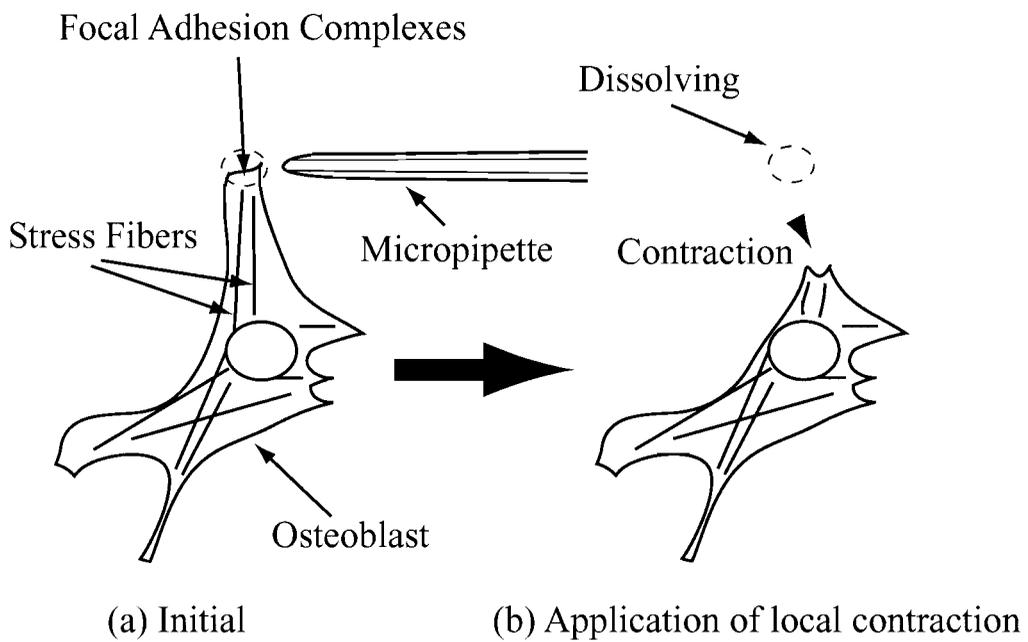


図 5.4 焦点接着の解除に伴う局所収縮の概要図

5.3 実験結果

5.3.1 局所収縮による張力解放に伴うアクチン細胞骨格の構造変化

局所的な焦点接着の解除に伴うアクチン細胞骨格構造変化の観察例を図 5.5 に示す。図 5.5(a) は、初期状態における微分干渉顕微鏡画像であり、図の中央に骨芽細胞、下部にマイクロピペット先端がある。この観察例では、図中、破線円内の焦点接着を解除させた。図 5.5(b) は、初期状態における、同細胞の EGFP で標識したアクチン細胞骨格構造の蛍光観察画像である。この細胞では、主として上端と下部左右の三点の焦点接着を結ぶようにアクチン細胞骨格構造が形成されている。アクチン細胞骨格が、直線または弧を描く形状を有していることから、ストレスファイバーと細胞膜に作用する張力が力学的平衡を保ち、それらの形態を維持していると考えられる。

この状態から、対象領域に trypsin/EDTA を作用させたところ、細胞の局所収縮が生じた。変形が生じ始めた瞬間を $t = 0$ sec として、細胞は約 20 秒間変形し、図 5.5(c), (d) に示した形状で変形が停止した。この局所収縮により、接着が解除された焦点接着に接合していたアクチン細胞骨格（白矢印 A - A'）では、最大約 32 % の収縮が生じた。これにに対して、その他の焦点接着に接合しているアクチン細胞骨格（白矢印 B - B'）に収縮は生じなかった。アクチン細胞骨格が収縮する際、バックリングあるいは湾曲するような挙動は観察されなかった。このことから、アクチン細胞骨格に生じた収縮は、圧縮状態にまでは進行しておらず、アクチン細胞骨格に作用していると考えられる張力を解放した際の長さ（自由長）までの範囲であると考えられる。

次に、図 5.5(e) は、 $t = 200$ sec の時点でのアクチン細胞骨格構造を示している。図 5.5(d) に示した細胞の輪郭形状と比較して、その外形状は変化していない。このことから、接着解除対象外の焦点接着は接着が保たれ、その焦点接着に接合しているアクチン細胞骨格には変形が生じていないと考えられる。このように張力が解放されなかったアクチン細胞骨格は、細胞の局所収縮後もその構造が明瞭であり、その構造を維持している。一方、張力を解放したアクチン細胞骨格（図 5.5(b) A - A'）は不明瞭となり、その構造が観察されない。

張力が解放されたアクチン細胞骨格構造の変化をより詳細に検討するため、拡大図を図 5.6 に示す。図中、破線で囲んだ領域を拡大して示している。図 5.6(a) は、収縮直後 ($t = 20$ sec) の画像であり、図 5.6(b) は、構造消失後 ($t = 200$ sec) の画像である。

図中に白矢頭で示したアクチン細胞骨格は、収縮直後には明瞭な構造が観察されるが、 $t = 200 \text{ sec}$ の時点では、構造が消失、あるいはファイバー径が細く、不明瞭な構造へと変化している。このとき、不明瞭となったファイバーにおいて、断片化や端部から構造が不明瞭になるといった過程は観察されず、ファイバー全体が一様に不明瞭となる様子が観察された。このように、細胞の局所収縮によって張力が解放されたアクチン細胞骨格は、張力解放後、構造が不明瞭となり消失している様子が観察された。

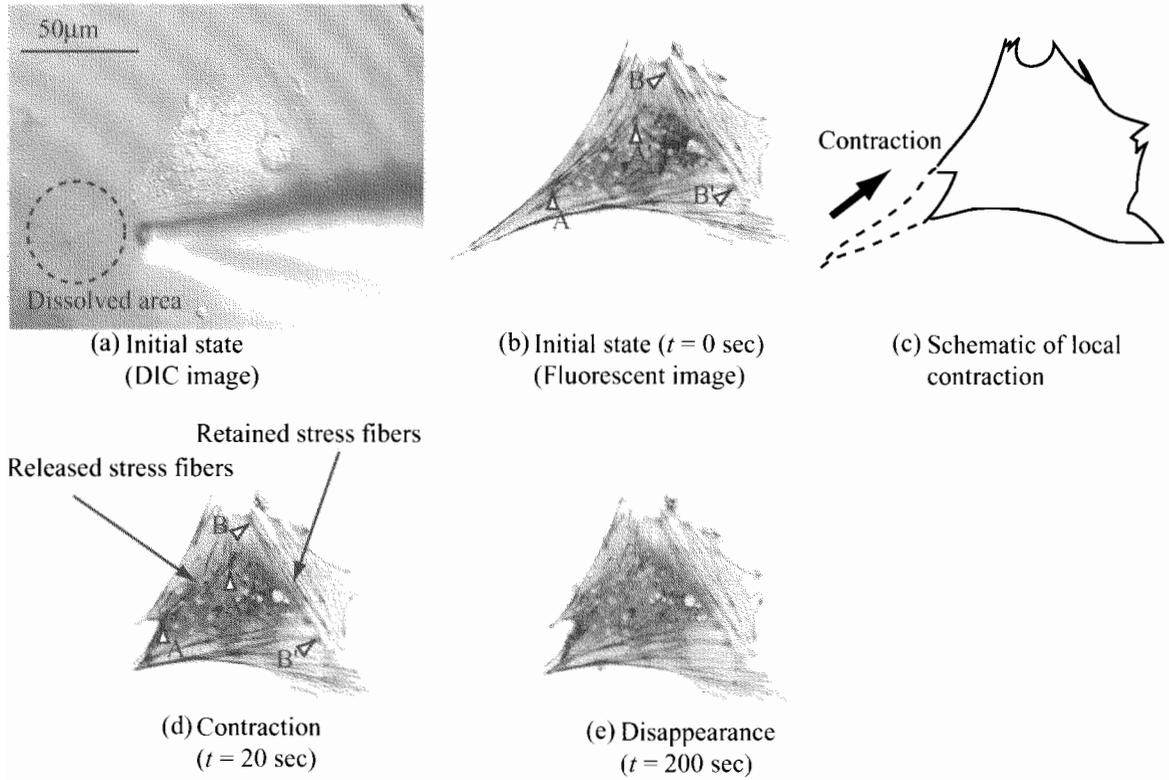


図 5.5 選択的張力解放に伴うアクチン細胞骨格構造変化

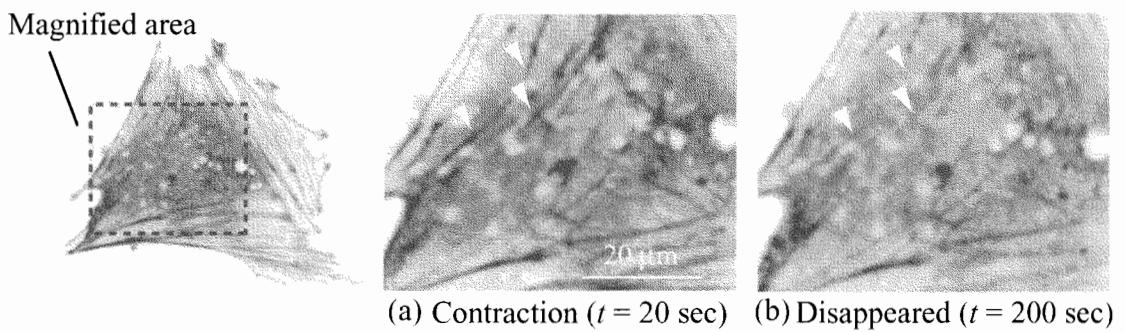


図 5.6 アクチン細胞骨格構造消失の様子 (拡大図)

5.3.2 張力解放を伴わない場合のアクチン細胞骨格の構造変化

一方、細胞に局所収縮が生じて、アクチン細胞骨格自体に変形が生じない場合は、ファイバーの消失は観察されなかった。その観察例を図 5.7 に示す。この例では、図 5.7(a) の微分干渉像に示すように、画像中央に存在する細胞の上部端に存在する焦点接着を解除した。trypsin/EDTA の局所的な作用により、上端部の接着が解除され、図 5.7(c) および (d) に示すように、細胞形状は局所的に変化した。しかしながら、図 5.7(b)、および (d) に示すように、局所収縮によるファイバー収縮は観察されず、図中縦方向に配向したアクチン細胞骨格 (白矢頭 A - A') には変形は生じていない。また、細胞自体の収縮は、変形が始まってから約 40 秒間続いた。これは、アクチン細胞骨格の収縮変形を伴っている場合の二倍の長さである。このことは、細胞の変形が、よりゆっくりと進行したことを示しており、局所収縮の負荷後のアクチン細胞骨格構造変化を比較する上では、変形停止後からの経過時間を一致させることが必要である。そのため、前述の観察例と同様に、変形が停止してから 180 秒後の時点でのアクチン細胞骨格構造を評価する。図 5.7(e) に示すように、 $t = 220 \text{ sec}$ の時点におけるアクチン細胞骨格構造は、図 5.7(d) の画像と比較して変化が見られず、ファイバーの消失現象は確認されない。さらに、拡大図 (Fig.5.8) においても、局所収縮変形が停止した直後 (図 5.8(a))、および $t = 220 \text{ sec}$ の時点において、図中に白矢頭で示した縦方向に配向したファイバーの構造は維持されており、変化は確認されない。

このように、単一の骨芽細胞内に張力が解放されるアクチンストレスファイバーと解放されないファイバーとが共存する状態を作成する新しい実験系を構築した。これらの観察例に示すように、細胞に局所変形を与えた後、張力が解放されたアクチン細胞骨格のみが、その構造が不鮮明になり、消失することが確認された。また、細胞に局所収縮が生じた場合でも、アクチン細胞骨格自体が変形しない場合には、ファイバーの消失現象は観察されなかった。

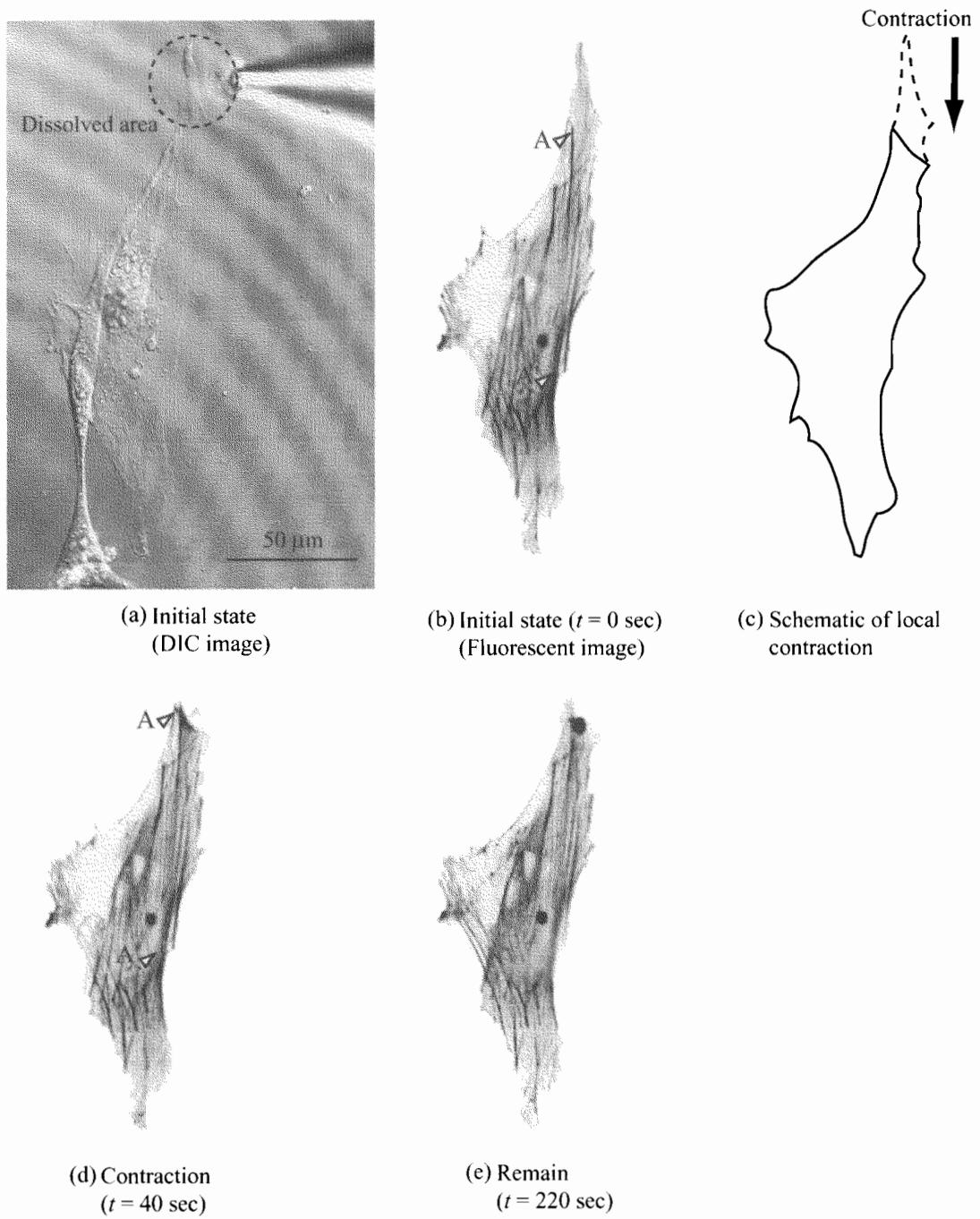


図5.7 アクチン細胞骨格の収縮を伴わない場合の構造変化の様子

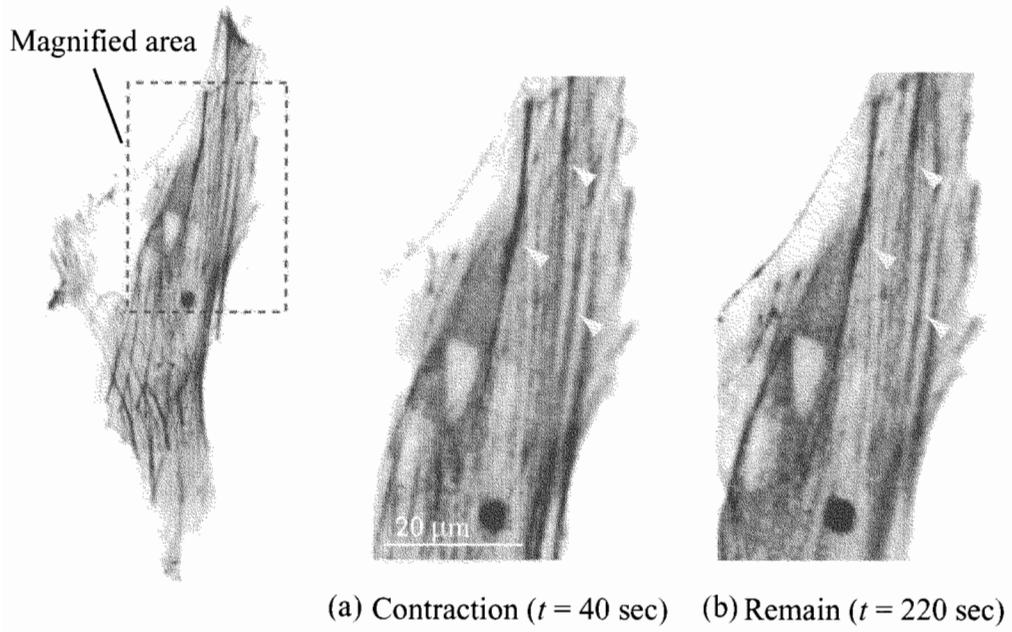


図5.8 アクチン細胞骨格構造維持の様子（拡大図）

5.4 考察

5.4.1 アクチン細胞骨格の動的安定性への張力の影響

細胞に力学刺激を与えた場合に、アクチン細胞骨格の再構築が開始される現象は、他の研究においても報告されている。しかしながら、これらの報告例では、弾性膜に細胞を接着させ、その接着基質の変形を介して、力学刺激として細胞に力や変形を与える実験系が用いられている [Buckley et al., 1998; Wang et al., 2000; Neidlinger-Wilke et al., 2001; Costa et al., 2002]。また、その他の例では、細胞外液に流れを生じさせ、細胞にせん断力を与える実験系などが用いられている [Chen et al., 2000]。これらの実験系では、細胞構造全体に変形や力が作用するため、個々のアクチン細胞骨格がおかれている力学環境と、同構造の脱重合現象との関連を直接的に検討することは困難である。すなわち、アクチン細胞骨格の再構築が、同構造のおかれている力学状態が変化したことにより直接的に引き起こされたものであるか、あるいは、力学刺激負荷に対して、細胞内でアクチン細胞骨格の再構築に関わる生化学シグナルが活性化されることにより引き起こされたものであるかを分離して検討することが困難である。

そこで、本章では、単一の細胞内に張力を解放させたファイバーと解放させないファイバーが共存する状態を作成し、その構造の変化を観察した。その観察の結果、張力を解放させたアクチン細胞骨格のみが消失した。このことは、アクチン細胞骨格構造の安定的維持に対して、同構造に作用する張力の存在が重要であることを直接的に示している。なぜならば、細胞の局所収縮により、活性化される生化学シグナルは、細胞全体で活性化されると考えられるからである。実際、局所収縮を生じさせた細胞において、アクチン細胞骨格構造の再構築に関与していると提案されている細胞内カルシウムイオン濃度の変化 [Yamada et al., 2000] を観察したところ、局所収縮後、数秒以内に細胞内全体において一過的なカルシウムイオン濃度の上昇が観察された (Data not shown)。それにもかかわらず、単一の細胞内においても構造が消失するファイバーと消失しないファイバーが存在することは、張力の作用の有無が選択的に関与していることを示唆しているものと考えられる。

5.4.2 アクチン細胞骨格の再構築機構における細胞内張力の役割

アクチン細胞骨格に作用する張力を解放することで、ファイバーの脱重合が開始され、消失するという観察結果から、弾性膜上に培養した細胞に単軸の繰り返し伸展ひずみを与えると、アクチン細胞骨格構造が伸展方向と直角方向に配向するという現象を仮説的に説明することができる。しかしながら、その一方で、細胞外液の流れによりせん断力を作用させた細胞において、アクチン細胞骨格が流れの方向に平行に配向するという現象に対しては、これを直接説明することが困難である。

この疑問に対する一つの仮説を立てることができる。すなわち、アクチン細胞骨格構造の再構築機構は、アクチンの脱重合過程と重合過程の二つの過程から構成されており、脱重合と重合のそれぞれを調整する因子が存在し、二つの異なった機構が存在している可能性が考えられる。これまでの研究例では、アクチン細胞骨格構造の再構築が完了した段階、例えば、配向方向が変化し終わった段階で様々な検討を行っており、アクチンストレスファイバーの脱重合と重合の機構を区別して考慮していない。本研究においても、アクチンストレスファイバーが脱重合される段階に着目して観察を行っているが、さらに次の段階であるアクチンストレスファイバー構造の重合過程における、張力の作用の影響については検討されていない。この点については、アクチンストレスファイバーの脱重合と重合という過程を分離した上で、張力の作用が及ぼす影響について検討する必要がある。

5.4.3 張力解放にともなう脱重合開始の物理的意味

アクチン細胞骨格の安定性維持における張力の重要性の物理的意味について考察する。アクチンストレスファイバーの脱重合過程においては、様々な生化学的因子が重要な役割を果たしている。しかしながら、アクチンストレスファイバーに作用している張力の有無が、これの生化学的調整因子の活性を直接的に調整していると考えられることは適切ではないと考えられる。

一方、アクチンストレスファイバーに作用する張力の有無は、おそらくアクチンストレスファイバーを構成する分子のコンフォメーションに大きく影響を与えている可能性が考えられる。そのため、アクチンストレスファイバーを構成するペプチド鎖の二次、あるいは、より高次の構造は、張力の作用により安定化されていると考える仮説を立てることができる。すなわち、張力の解放により、ペプチド鎖のコンフォメーション変化が生じ、その結果として、アクチンとアクチンに結合する調整因子との親

和性に変化し、最終的にはアクチンアクチンストレスファイバーの構造が不安定化される可能性がある。この仮説を検証することが、力学刺激の負荷に伴うアクチン細胞骨格の再構築機構を解明する上での重要な課題である。

5.5 結 言

骨芽細胞の焦点接着を部分的に溶解させて局所収縮を発生させることで、対象とするアクチン細胞骨格のみの張力を選択的に解放する実験系を構築した。単一の骨芽細胞内において、張力が解放されるアクチンストレスファイバーと解放されないアクチンストレスファイバーが共存する状態をつくり、張力解放がアクチン細胞骨格の構造変化に与える影響を検討した。観察の結果、同一の細胞内において、張力が解放されたアクチン細胞骨格のみが、不明瞭な構造となり消失する様子が観察された。その一方で、張力が解放されなかったアクチン細胞骨格構造は、明瞭なまま維持されていた。これらの結果は、アクチン細胞骨格構造の動的安定性に対して、張力の作用が重要な役割を果たしていることを直接的に示すものであると考えられる。

第6章

アクチン細胞骨格の再構築を開始するひずみ量の評価

6.1 緒言

前章では，単一の骨芽細胞の焦点接着を部分的に解放することで，細胞に局所収縮を与え，同一の細胞内において，張力が解放されるストレスファイバーと解放されないストレスファイバーが共存する状態を作成し，張力の解放によりストレスファイバーが脱重合されその構造が消失することを示した．この実験結果は，細胞全体に対して変形や力を負荷する実験系と比較して，張力の作用がストレスファイバー構造の動的安定性において重要であることをより直接的に示している．

その一方で，この実験系では，細胞に与える変形量は制御されておらず，収縮量は，ストレスファイバーと細胞膜など他の細胞構造に作用する力の平衡状態に大きく依存している．細胞バイオメカニクスの観点から，力学刺激負荷によるストレスファイバー再構築機構の解明を目指す上では，再構築に関与する力学量を明らかにするだけでなく，その力学量を定量的に評価することが重要である．そこで，本章では，ストレスファイバーの再構築が開始される際に必要な力学量を定量的に評価することを目的とした．

微小な蛍光ビーズを混合した柔軟なコラーゲンを基質上にコーティングし，細胞がその上を移動する際に生じる蛍光ビーズの変位分布から，間接的に細胞の移動時における基質への駆動力を測定した報告例 [Galbraith and Sheetz, 1997; Dembo and Wang, 1999; Beningo et al., 2001] がある．しかしながら，細胞内のファイバーや膜に作用する張力を直接的に測定することは困難である．そこで，本論文では，張力と

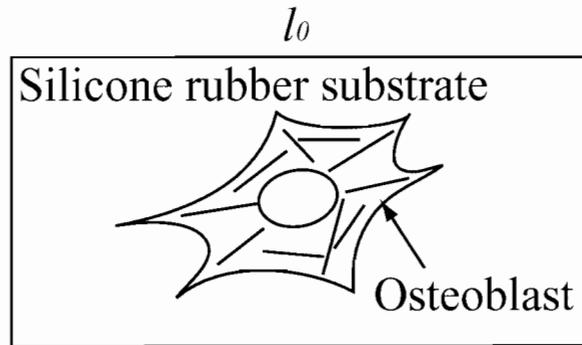
関連した力学量として、ファイバーに生じるひずみの大きさを評価対象とした。

実験には、新たに設計・試作したシリコンチャンバー単軸ひずみ負荷装置を用い、細胞に対して単軸の圧縮ひずみを負荷した。予め伸展させた状態で装置に取り付けたシリコンラバー製のチャンバーの底面に骨芽細胞様細胞を播種し、チャンバーに対して、制御された単軸の圧縮ひずみを生じさせることで、基質の変形を介して細胞に変形を与え、ストレスファイバーに作用している張力を解放した。その後、圧縮ひずみ負荷に伴うストレスファイバー構造の変化を観察し、その結果から、ストレスファイバーの再構築開始に必要なひずみ量を定量的に評価した。

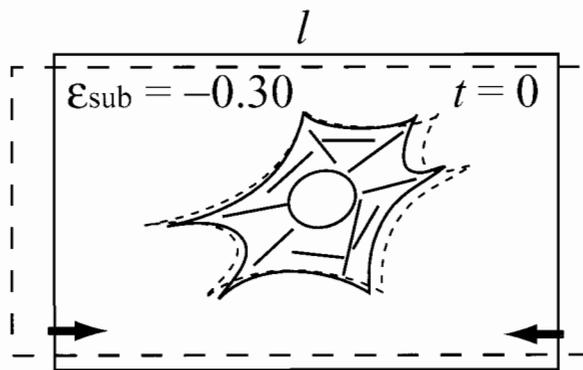
6.2 実験方法

6.2.1 実験の概要

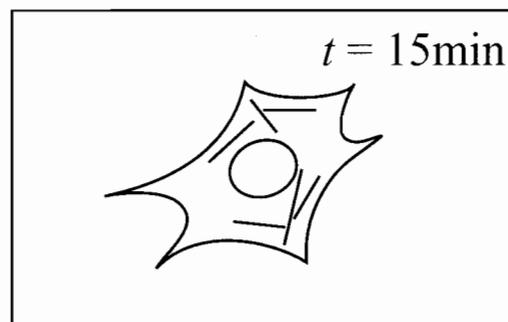
予め単軸伸展させた状態のシリコンラバー製チャンバー（スカラテック）内に骨芽細胞様細胞を播種し、以下に述べる手順にしたがって実験を行った。実験手順の概要図を図 6.1 に示す。図 6.1(a) に示すように、予め伸展させた初期状態における基準長さを l_0 と定義する。次に、 $t = 0 \text{ min}$ の時点で、図 6.1(b) に示すように、チャンバーを長さ l まで収縮させる。このとき、単軸の圧縮ひずみを $\varepsilon_{sub} = (l - l_0) / l_0$ として定義する。本研究では、 $\varepsilon_{sub} = -0.30$ 、ひずみ速度 $-0.045/\text{sec}$ とした。骨芽細胞は、シリコンラバー製基質の表面に接着、伸展した状態で存在しているため、細胞形状は、基質の変形に伴って変形する。この細胞形状の変化により、細胞内のストレスファイバーに作用している張力が解放され、細胞骨格構造の力学状態に非平衡が生じる。この力学的外乱の負荷により、ストレスファイバーの再構築が開始されると考えられる。本研究では、張力解放後、 $t = 15 \text{ min}$ (図 6.1(c)) の時点における細胞内のアクチンストレスファイバーの量を評価し、ストレスファイバーの軸方向のひずみ量 ε_{SF} との関連を解析した。



(a) Prestretched



(b) Strain released



(c) Reorganization of S.F.

図 6.1 実験手順の概要図

6.2.2 観察試料の作成と観察方法

細胞培養シリコンチャンバー： 本実験では、4 cc (20 × 20 × 10 mm) シリコンラバー製細胞伸展チャンバー (図 6.2) を用いた。チャンバーの底面は、厚さ 100 μm の透明なシリコンラバー製であり、倒立顕微鏡を用いて底面に接着・伸展している細胞を観察することが可能である。細胞の接着性を増すため、このシリコンチャンバー内面を 5 N の硫酸に 30 分間さらし、表面処理を行った。その後、洗浄し、オートクレーブにて滅菌を行ったものを実験に用いた。

実験に際して、細胞を予め引張りひずみを与えた 4 cc シリコンチャンバーに、細胞数が 3.0×10^4 個となるように播種し、同環境にて、さらに 24 時間培養したものを実験に用いた。

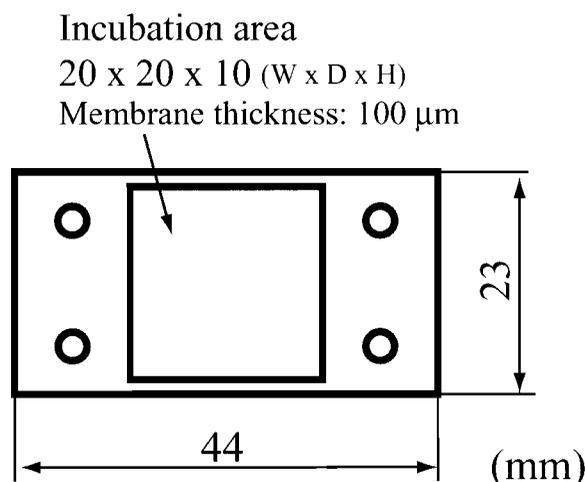


図 6.2 シリコンラバー製細胞培養チャンバー

アクチン細胞骨格の蛍光標識： 細胞内のアクチンストレスファイバー構造は、蛍光標識法を用いて観察した。ストレスファイバーの張力解放後、 $t = 15$ min が経過した時点で、5 % の paraformaldehyde 中にて、30 分間 4 °C で保持し、細胞の固定を行う。次に、PBS にて 1 回洗浄した後、0.1 % Triton-X により、脱膜処理を行う。最後に、rhodamine-phalloidin を添加した PBS 中にて、2.5 時間、37 °C で保持し、F-アクチンを蛍光標識する。Phalloidin は、線維状アクチン (F-アクチン) と特異的に結合する。そのため、主として線維状アクチンから構成されているストレスファイバーを特異的に蛍光標識することが可能である。一方、細胞質中に存在する重合していないアクチンモノマー (G-アクチン) は標識されない。

アクチン細胞骨格の蛍光観察方法： アクチン細胞骨格の蛍光観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (Digital Eclipse C1, Nikon) を用いた。取得した画像は、12 bit 階調のデジタルデータとしてPCに記録した。観察平面は、アクチンストレスファイバーがもっとも発達している細胞底面とした。

6.2.3 単軸ひずみ負荷装置

単軸の圧縮ひずみを細胞に対して負荷する装置を新たに設計・試作した。その概要図を図 6.3 に示す。本装置は、倒立顕微鏡のステージ上に設置可能であり、ステージ上にて動作させることができる。また、2本の平行なリニアガイド、及び、左右両ネジシャフトに単軸 (x 軸) 方向の平行移動が可能なスライダを2つ取り付けたものである。シリコンチャンバーは、4本のネジを用いてスライダに固定した。スライダは、左右両ネジシャフトにより駆動され、ステッピングモーターを制御することにより、シリコンチャンバーに任意のひずみを与えることが可能である。

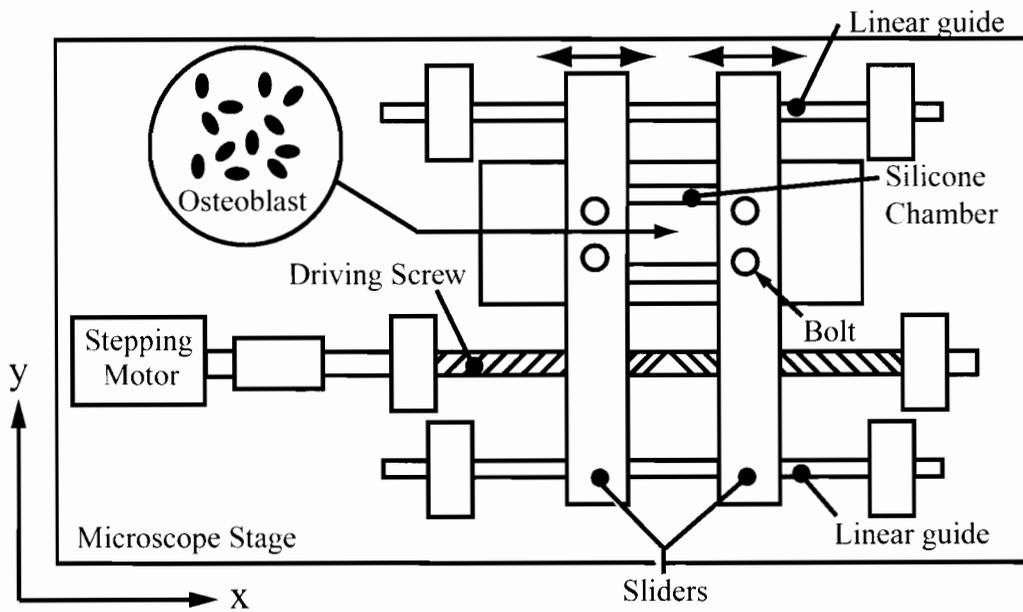


図 6.3 単軸圧縮ひずみ負荷装置の概要図

6.2.4 ストレスファイバーの軸方向ひずみ量の評価

本研究では、細胞全体に与えられたひずみ量と同時に、ストレスファイバーの軸方向のひずみ量についても評価した。骨芽細胞様細胞において、ストレスファイバー構造は、主に細胞の長軸方向に配向している。したがって、その軸方向のひずみ量は、シリコーンラバーチャンバーに与えるひずみの軸方向とファイバーの配向方向との相対的な角度により決定される。

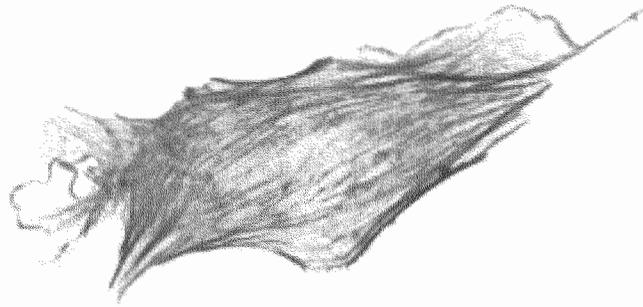
細胞形状の方向は、図 6.4 に示すように、画像処理ソフトウェア (Image Pro Plus, Media Cybernetics) を用い、細胞の輪郭形状を近似した楕円を算出し、その長軸方向として定義した。まず、取得した蛍光観察画像 (図 6.4(a)) を二値化し、輪郭形状を明確にする (図 6.4(b))。次に、その輪郭の近似楕円を算出し、楕円の長軸と圧縮ひずみの負荷方向との間の角度を θ ($0 < \theta < 90^\circ$) として定義する (図 6.4(c))。

ストレスファイバーに生じるファイバー軸方向の圧縮ひずみ量 ε_{SF} は、図 6.5 に示すように、チャンバーの長さの変化、すなわち、長さ l_0 , l とストレスファイバーの配向方向の角度 θ を用いて、次式のように算出される。

$$\varepsilon_{SF} = \frac{l_F - l_{F0}}{l_{F0}} \quad (6.1)$$

$$\begin{cases} l_{F0} = \left\{ l_0^2 + (l \tan \theta / (\nu(l_0 - l)/l_0 + 1))^2 \right\}^{1/2} \\ l_F = l / \cos \theta \end{cases} \quad (6.2)$$

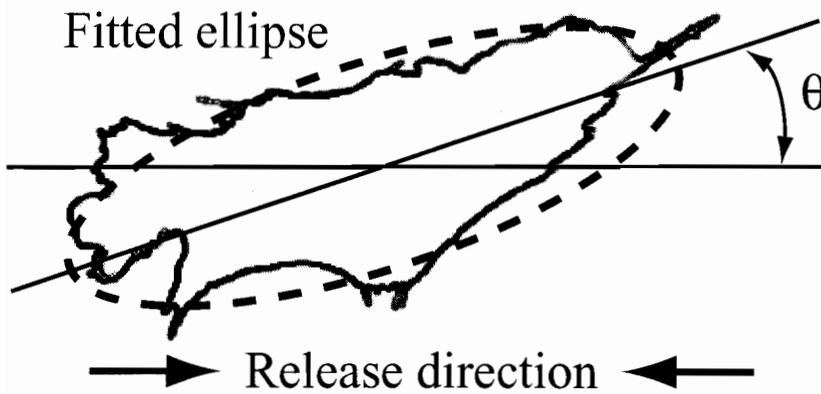
ここで、定数 ν は、 $\varepsilon_{sub} = -0.30$ の時点における、ひずみの比 $-\varepsilon_y / \varepsilon_x$ によって定義される見かけ上の Poisson 比である。シリコーンラバーチャンバーの底面膜は、側壁により支持されているが、実際には、Poisson 効果により、圧縮ひずみ負荷方向に対して垂直な方向に対してもひずみが生じる。今回の実験で ν は、 $\varepsilon_{sub} = -0.30$ の時点におけるひずみの比 $-\varepsilon_y / \varepsilon_x$ を測定し、 $\nu = 0.24$ と決定した。これらの関係から、 $\varepsilon_{sub} = -0.30$ の場合における、ストレスファイバーに生じる軸方向の圧縮ひずみ量 ε_{SF} とストレスファイバーの配向方向の角度 θ との関係は、図 6.6 のグラフのようになる。



(a) Observed image



(b) Binarization



(c) Calculation of angle θ

図 6.4 細胞軸方向の算出手順

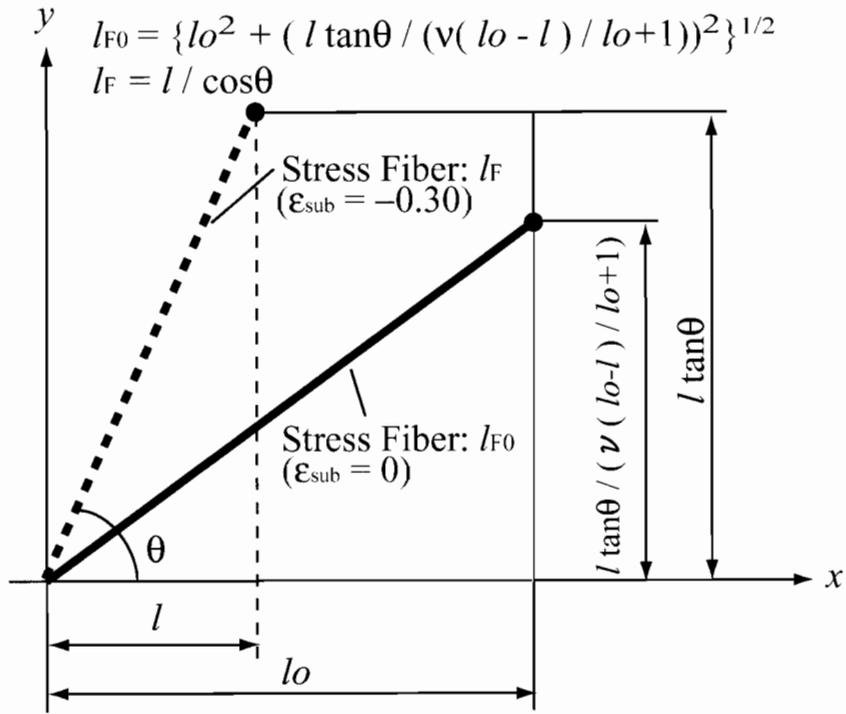


図 6.5 ストレスファイバーの軸方向のひずみ量算出方法

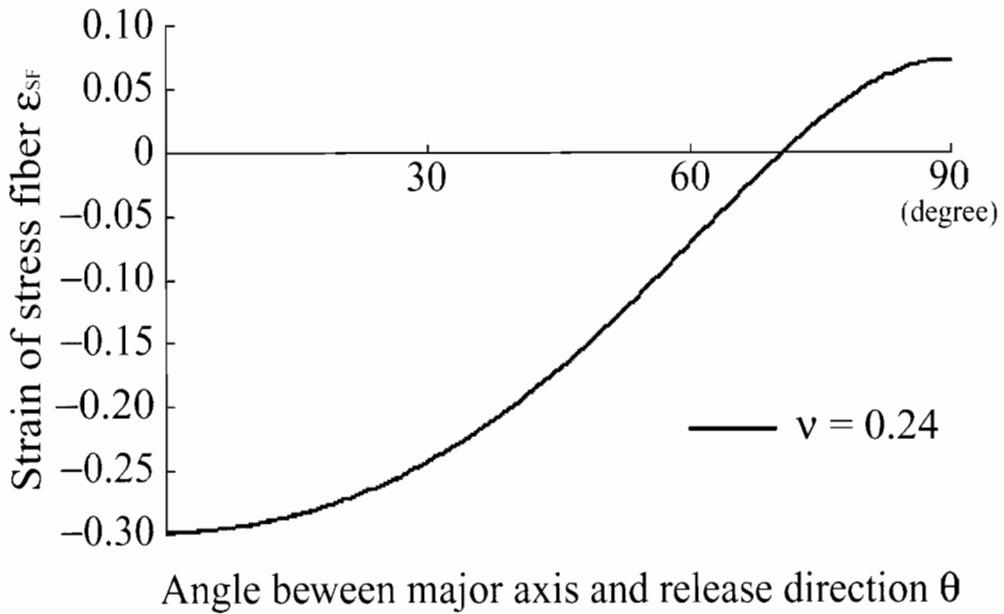
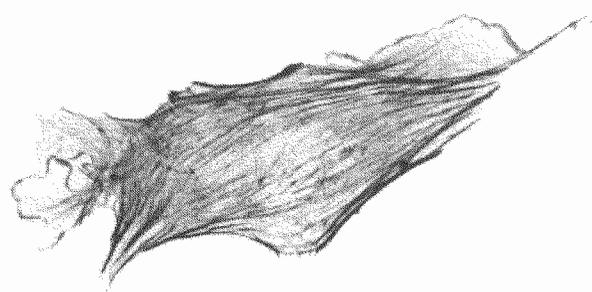


図 6.6 細胞軸方向とストレスファイバーの軸方向ひずみとの関係

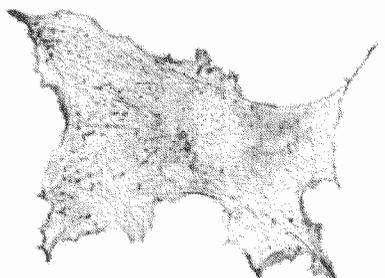
6.3 実験結果

6.3.1 圧縮ひずみ負荷に伴うストレスファイバーの構造変化

細胞底面における細胞内のストレスファイバー構造の観察例を図 6.7 に示す。まず、力学的外乱を与えていない通常の細胞では、図 6.7(a) に示すように、細胞内全体に密なストレスファイバーのネットワーク構造が観察される。また、ストレスファイバーは、細胞内において同一方向に配向した特徴的な構造を有している。一方、図 6.7(b) に示す圧縮ひずみ ($\varepsilon_{sub} = -0.30$) を与えた細胞では、細胞の輪郭付近のみにストレスファイバーが観察され、細胞中央部ではストレスファイバー構造が消失しており、通常細胞で見られるようなストレスファイバーのネットワーク構造は観察されない。このように、単軸の圧縮ひずみを与えることにより、ストレスファイバー構造が消失した細胞が観察された。しかしながら、全ての細胞においてこのようなストレスファイバー構造の消失が生じたわけではなく、図 6.7(c) に示すように、細胞全体に対して、同量の圧縮ひずみ ($\varepsilon_{sub} = -0.30$) を負荷した場合においても、ストレスファイバーの脱重合が生じていない細胞も観察された。この結果は、細胞全体に与えられるひずみ量ではなく、ストレスファイバーの軸方向のひずみが、ストレスファイバー構造の動的安定性に重要であることを示唆している。



(a) Normal cell



Release direction

(b) Disassembled



(c) Remained

図 6.7 ストレスファイバー構造の蛍光観察画像

6.3.2 脱重合開始と軸方向ひずみ量との関係

図 6.8 は、圧縮ひずみ負荷後 $t = 15 \text{ min}$ の時点における rhodamine-phalloidin により蛍光標識した細胞内アクチンストレスファイバーの平均蛍光輝度と、ストレスファイバーに生じた軸方向の圧縮ひずみ量との関係を表したグラフである。軸方向への圧縮ひずみ量が、 $\varepsilon_{SF} = -0.20 \sim 0.00$ の場合、control の細胞と比較して平均蛍光輝度に有意な差は認められない。また、軸方向へのひずみ量が、引張、すなわち $\varepsilon_{SF} = 0.00 \sim 0.10$ の場合においても、有意な差は認められない。これに対して、軸方向の圧縮ひずみ量が、 $\varepsilon_{SF} = -0.30 \sim -0.20$ の場合では、平均蛍光輝度が有意に減少している ($p < 1.0 \times 10^{-7}$, t -test)。この結果は、ストレスファイバーの軸方向のひずみ量が、細胞骨格の再構築現象に関連した動的安定性において、重要な調整因子であることを示唆している。さらに、軸方向に生じる圧縮ひずみ量を定量的に評価することにより、ストレスファイバーの脱重合現象を開始させるために必要な軸方向の圧縮ひずみ量には、閾値が存在することが示唆され、その大きさは、 $\varepsilon_{SF} = -0.20$ と見積もることができる。

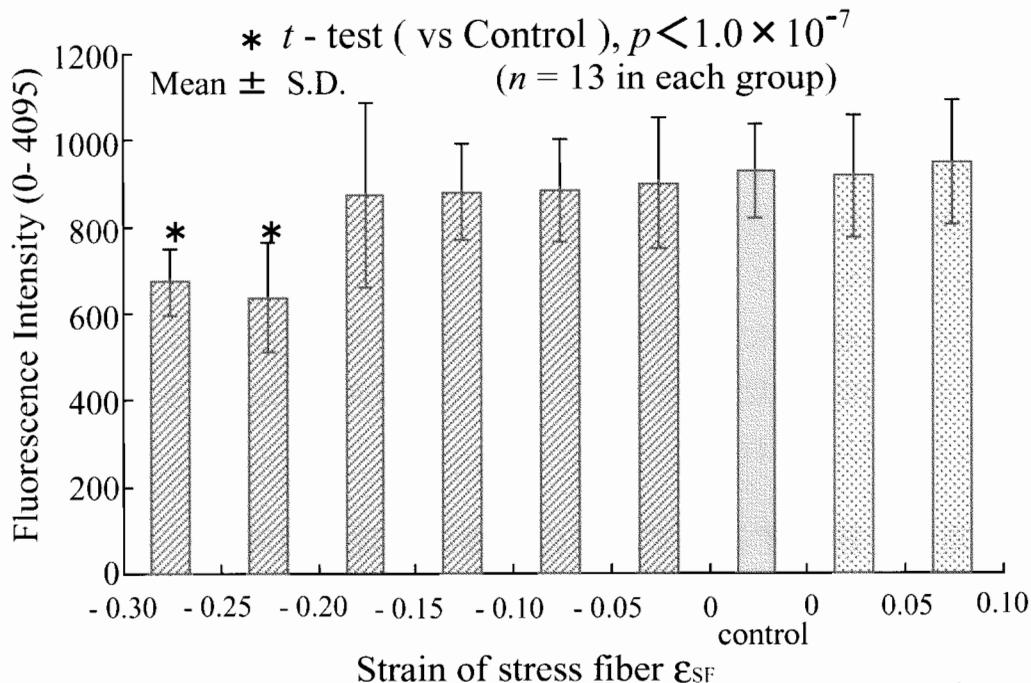


図 6.8 ストレスファイバーの軸方向ひずみと平均蛍光輝度値との関係

6.4 考察

6.4.1 アクチン細胞骨格の動的安定性における軸方向ひずみの重要性

多くの研究において、骨芽細胞様細胞が力学刺激を感知し、様々な種類の応答を示すことが報告されている。これらの細胞応答は、細胞内において、力学刺激が生化学的なシグナリングへと変換された結果としてとらえられる。ストレスファイバー構造の脱重合についても、これらの細胞応答と同様に、細胞内における生化学シグナリングが活性化された結果として生じたものと考えられる。したがって、本実験により評価された圧縮ひずみ量の閾値は、細胞の力学刺激の感知感度を評価しているにすぎない。すなわち、力学刺激の負荷に誘起される細胞内の生化学シグナリングが活性化されるために必要なひずみ量を評価している可能性がある。

しかしながら、本研究の観察結果から、細胞全体に対して、同量の圧縮ひずみ ($\epsilon_{sub} = -0.30$) を与えた場合にも、ストレスファイバーの脱重合現象を示す細胞と示さない細胞の二つのグループの細胞が観察された。このことは、細胞全体に与えられるひずみ量ではなく、ストレスファイバーの軸方向のひずみ量が、同構造の動的安定性を決定する因子であることを示唆している。さらに、前章では、単一の細胞内において、対象とするストレスファイバーの張力を選択的に解放することで、同一の細胞内において、張力が解放されるストレスファイバーと解放されないファイバーが共存する状態を作成する実験系を構築した。その実験系を用いた観察結果から、収縮変形の負荷により、細胞内全体で生化学シグナルが活性化された場合にも、張力を解放したストレスファイバーのみが選択的に脱重合されることが示された。この結果からも、ストレスファイバーの動的安定性において、ファイバーの軸方向の圧縮ひずみ量が重要な調整因子であることが支持される。

6.4.2 脱重合を誘起するひずみ量の閾値の物理的意味

本章の実験では、脱重合現象の開始に必要なひずみ量を定量的に評価した。その結果、張力の解放に伴うストレスファイバー構造の脱重合が開始されるためのひずみ量には閾値が存在し、その大きさは $\epsilon_{SF} = -0.20$ であると見積もられた。ここでは、その物理的解釈について考察する。

一つの仮説として、前章で述べたように、張力の作用が、ストレスファイバーを構

成するアクチンフィラメント分子のコンフォメーションを機械的に安定化させ、張力の解放にともなうコンフォメーションの変化により、同構造の動的安定性が失われるとの仮説が考えられる。その仮説に基づいた場合、本実験の結果から見積もられたひずみ量 $\varepsilon_{SF} = -0.20$ は、そのコンフォメーション変化が生じる変形量を示していると考えられる。

仮説を検証するための一つの方法として、分子動力学法を援用した計算機シミュレーションを用いる方法が挙げられる。アクチンフィラメントの分子構造をモデル化し、張力の作用の有無が、分子のコンフォメーションに与える影響を計算機実験により明らかにすることで、例えば、アクチン切断タンパクの結合サイトが、コンフォメーション変化により露出する可能性などを検討することができる。ただし、ストレスファイバーは、それ自身がミオシン等の他のタンパク質と相互作用することで収縮力を発生することが知られており、圧縮ひずみを与えることで張力を解放する場合には、圧縮ひずみを負荷する速度と、ファイバー自身が収縮する速度との関係により、その変形挙動が大きく異なる可能性がある。そのため、計算機実験を用いて変形挙動を検討する場合、ひずみ速度や負荷条件などの力学条件が適切なものとなるように設定する必要がある。

6-4-3 アクチン細胞骨格の再構築とひずみ量の関係

様々な細胞種において、力学環境の変化に対するストレスファイバー構造の再構築現象が、定量的に制御されたひずみ環境下で報告されている [Gunst et al., 2003; Naruse and Sokabe, 1993; Yoshigi et al., 2003]。本研究では、ストレスファイバーの脱重合開始に必要な軸方向の圧縮ひずみ量は、約 -0.20 であることを示した。しかしながら、他の報告例においては、例えば、大きさが 0.10 の繰り返し伸展ひずみの負荷により、インテグリンに関連したシグナリングパス [Gunst et al., 2003] や、細胞内カルシウムイオン濃度の変化 [Naruse and Sokabe, 1993] など、アクチン細胞骨格の再構築を制御する生化学因子が活性化されることが報告されている。

本実験の結果と他の報告例との間でひずみ量の大きさが異なる理由を考察すると、一つ目の理由として、変形を負荷する形態の相違、すなわち、一過性刺激と繰り返し刺激の違いが挙げられる。また、二つ目の理由として、他の報告例では、ストレスファイバーの配向方向が変化し終わった段階、つまり再構築が完了した時点でストレスファイバー構造を観察している [Yoshigi et al., 2003]。これに対して、本研究では、ストレ

スファイバーの脱重合過程に着目している。アクチンファイバーは、モノマーアクチンの重合と脱重合が絶えず継続的に生じており、それらの反応が動的な平衡状態を保つことにより、アクチンファイバー構造が維持されている。したがって、他の報告例では、本研究では評価していないアクチンの重合過程を調整している因子の影響を含めて評価していることが考えられる。力学環境の変化に伴うアクチン細胞骨格の再構築機構解明のためには、本実験の結果に加えて、アクチン構造の形成過程における張力やひずみの作用の影響についても検討することが必要である。

6.5 結 言

張力解放に伴うストレスファイバー構造の脱重合現象に着目し、力学的観点から、その機構の解明を目指し、同構造脱重合が開始される際の力学量を定量的に評価した。本実験では、ストレスファイバーに作用する張力と関連していると考えられるファイバー軸方向のひずみ量について、定量的に評価した。まず、細胞に対して単軸のひずみを与える装置を新たに試作した。実験では、予め伸展させた状態で実験装置に取り付けたシリコンラバー製チャンバー内に骨芽細胞を播種・培養した。その後、チャンバーに対して単軸の圧縮ひずみを与えることで、チャンバー底面の基質を介して細胞に圧縮ひずみを与え、細胞内ストレスファイバーの張力を解放した。変形負荷に伴うストレスファイバー構造の変化を観察したところ、張力の解放によるストレスファイバー構造の消失が観察された。しかしながら、細胞に対しては同一量のひずみを負荷しているにもかかわらず、ストレスファイバー構造の消失した細胞と消失しない細胞とが観察された。この結果は、細胞構造全体に負荷されるひずみ量は、ストレスファイバー構造の脱重合現象において重要ではないことを示唆している。そこで、ストレスファイバー自身に与えられる軸方向のひずみ量に着目した。基質の変形量とストレスファイバー構造の配向方向との関係から、ファイバーに作用する軸方向のひずみ量を算出し、ストレスファイバーの脱重合現象との関連を検討した。その結果、圧縮ひずみの負荷により、ストレスファイバーが脱重合が開始されるためには、負荷される軸方向の圧縮ひずみ量に閾値が存在することが示された。さらに、本実験結果から、その軸方向ひずみ量の閾値は、 $\varepsilon_{SF} = -0.20$ と見積もられた。

第7章

結 論

骨芽細胞は、力や変形などの力学刺激を感知し、自らの活動を変化させる能力を有していると考えられる。そして、この微視的レベルにおける細胞活動の変化が、巨視的レベルにおける骨の力学環境に対する適応的な構造変化を生み出している。力学刺激に対する細胞の応答機構を明らかにすることは、生体機構の解明という科学的側面のみならず、再生医療工学に代表されるような、医工学的側面からも非常に重要な課題である。これまでの、生物学、および分子生物学的観点からの数多くのアプローチにより、力学刺激に対する骨芽細胞の応答の評価がなされ、その応答機構に関わる生化学シグナリングパスが解明されつつある。その一方で、骨芽細胞が力学刺激を感知し、自らの活動の調整へと変換する機構、すなわち細胞力覚機構については、未解明な点が多い。骨芽細胞の力覚機構解明を目指す上で、細胞構造に作用する力や変形を取り扱うことは不可欠であり、そのため、本質的に生体における機能と構造との関連を取り扱うバイオメカニクス的アプローチが必要となる。

本論文では、構造体としてのアクチン細胞骨格に着目し、骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格が果たす役割、および、力学環境変化に対する同構造の再構築機構について、細胞バイオメカニクスの観点から検討を行った。

まず、第2章では、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の力学的刺激応答特性に及ぼす影響について検討した。アクチン重合阻害剤 cytochalasin D を用いて、細胞内のアクチン細胞骨格を一旦脱重合させ、その後のアクチン細胞骨格再重合過程における培養時間を調整することで、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格の量を制御した細胞群を作成した。それぞれの細胞群において、単一の細胞に対して、ガラス製のマイクロニードルを直接押し込むことにより、力学的刺激として変形を与え、それに対する細胞応答として、細胞内カルシウムイオン濃度の変化

を観察した。その結果、同一量の刺激負荷に対しても、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格量が多い細胞群ほど、より敏感に力学刺激を感知し、カルシウム応答を示すことが示された。この結果は、骨芽細胞の細胞力覚機構において、アクチン細胞骨格が構造体として組織化されていることが重要であることを示唆している。

次に、第3章では、第2章の結果を受け、骨芽細胞のアクチン細胞骨格の構造的特徴に着目した。骨芽細胞では、アクチン細胞骨格は細胞形状の長軸方向に配向した特徴的なネットワーク構造を形成している。この構造体としての特徴が、骨芽細胞の力学刺激応答特性に影響を与えているとの仮説を立て、実験により検証した。マイクロニードルを細胞に直接押し込み変形を与える実験系において、ニードル先端を移動させる方向、および変位量を定量的に変化させ、刺激負荷に対する骨芽細胞のカルシウム応答の特性を評価した。その結果、アクチン細胞骨格の配向方向に対して、ニードルの変位方向が直角に近づくほど、細胞がより敏感に刺激負荷を感知し、カルシウム応答を示すことが明らかになった。この結果は、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格の構造的特徴が、骨芽細胞の力学刺激応答特性に影響を与えており、細胞の応答特性に刺激方向依存性が存在する可能性を示唆している。

第4章では、第3章の結果を受け、骨芽細胞のカルシウム応答の刺激方向依存性が生み出される機構についてより詳細に検討するため、マイクロニードルを細胞に直接押し込み、変形を与える実験系において、細胞構造に生じている変形量を定量的に測定する手法を提案した。さらに同手法を用い、細胞のカルシウム応答を誘起する細胞膜の変形量を定量的に評価することを試みた。細胞内カルシウムイオンと細胞膜をそれぞれ蛍光標識し、これらを同時に観察する実験系を構築した。さらに、画像相関法を用いて、力学刺激負荷時に細胞膜に生じる変位場を計測し、その分布から、細胞膜に生じるひずみの分布を算出する手法を提案した。これらの手法を用いて、マイクロニードルの直接押し込みにより力学刺激を負荷し、骨芽細胞のカルシウム応答が発生する際に生じる細胞膜の変形量を定量的に評価した。その結果、局所変形の負荷により、カルシウム応答が発生する領域には、圧縮の変形が生じていること、および、カルシウム応答が発生する際の変形量を面積ひずみで評価した場合、その値は、約 $\varepsilon_A = -0.72$ であることが明らかとなった。この手法を応用することにより、力学刺激負荷に対する細胞応答機構について、力学的観点からアプローチする上で不可欠となる細胞構造に生じる変形量を定量的に計測することが可能となる。

以上、第2～4章では、骨芽細胞の細胞力覚機構において、構造体として組織化さ

れたアクチン細胞骨格が、その構成要素として重要な役割を果たしており、さらに、その構造的特徴が、細胞の力学刺激応答特性に影響を与えていることが明らかになった。これらの結果は、骨のリモデリング機構を明らかにする上で重要となる骨芽細胞の力学刺激に対する応答特性として、新たな知見をもたらすのみではなく、さらに、細胞力覚機構の解明を目指す上で、従来の分子生物学的手法に基づくアプローチのみではなく、細胞構造それ自体を取り扱う細胞バイオメカニクスに基づくアプローチが有用、かつ重要であることを示すものである。

次に、第5章、第6章では、第2～4章までの結果を受け、アクチン細胞骨格そのもののダイナミクスに着目した。アクチン細胞骨格は、方向性を有した力学刺激に対して、その構造が動的に再構築され、その配向方向が変化する。構造体として組織化されたアクチン細胞骨格の構造的特徴が、骨芽細胞の力学刺激感知特性に影響を与えていることを考慮すると、同構造の再構築機構を解明することにより、骨芽細胞の細胞力覚機構への理解を深める上での有用な知見を得ることが期待できる。そこで、この再構築機構の解明を目指し、細胞バイオメカニクスの観点から、再構築を引き起こす力学量について検討し、さらにその力学量を定量的に評価した。

まず、第5章では、細胞内構造に作用している張力の存在が、アクチン細胞骨格構造の動的安定性に与える影響について検討した。単一細胞の焦点接着を部分的に解除することで、細胞に局所収縮を生じさせ、細胞内の対象とするアクチン細胞骨格のみの張力を選択的に解放し、その後の構造変化を観察した。その結果、同一の細胞内においても、張力を解放したアクチン細胞骨格のみ、その構造が消失した。一方、張力を解放しなかったアクチン細胞骨格に構造変化は観察されなかった。これらの実験結果より、アクチン細胞骨格構造の動的安定性において、張力の作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に、第6章では、第5章で示された張力解放に伴うアクチン細胞骨格構造の脱重合現象について、同構造の脱重合が開始されるために必要な力学量を定量的に評価した。弾性を有するシリコーンラバー製の細胞培養チャンバーと単軸ひずみ負荷装置を用い、骨芽細胞に対して、単軸の圧縮ひずみを与えることにより、アクチン細胞骨格に作用する張力を解放し、その後の構造変化を観察した。細胞構造に生じるひずみ量进行评估し、アクチン細胞骨格構造の再構築が開始されるひずみ量について検討した結果、細胞全体に与えられるひずみ量ではなく、ストレスファイバー自体に与えられる軸方向ひずみ量が、脱重合の開始において重要であることが示された。さらに、脱重

合が開始される圧縮ひずみ量に閾値が存在し、その大きさが、約 $\varepsilon_{SF} = -0.20$ であることが示された。

以上の第5, 6章において、骨芽細胞のアクチン細胞骨格構造は、その動的な安定性において、細胞内張力の存在が重要であり、ファイバーに作用する張力を解放すると脱重合が生じ構造が消失することを示した。さらに、脱重合が開始されるために必要な力学量を定量的に評価した。これらの結果は、アクチン細胞骨格構造の再構築機構の解明を目指し、力学モデルの構築を考える場合に非常に有用な力学量を与えるものである。

以上のように、本論文では、細胞バイオメカニクスを基礎とする実験的手法により、骨芽細胞の力覚機構において、構造体として組織化されたアクチン細胞骨格が重要な役割を果たしていること、およびアクチン細胞骨格の構造的特徴が骨芽細胞の力学刺激応答特性に影響を与えていることを明らかにするとともに、骨芽細胞のカルシウム応答を誘起する細胞構造の変形量を定量的に評価した。さらに、力学環境の変化に対するアクチン細胞骨格構造の再構築機構について、同構造の再構築を誘起する力学因子として、細胞内張力が重要な役割を果たしていることを示した。さらに、その細胞内張力と関連した力学量として、アクチン細胞骨格に生じるひずみに着目し、再構築開始に必要なひずみ量を定量的に評価した。

細胞内微細構造であるアクチン細胞骨格が、骨芽細胞の力覚機構において果たす機能的役割を明らかにし、さらに同構造の再構築を調整する力学因子を評価したことは、生化学的観点から従来行われてきた研究に加えて、力学的観点から行われるバイオメカニクス的研究の重要性を示すものである。さらに、再生医療への応用を見据えた細胞の機能や機構の人的制御を考える場合、生化学的調整因子を用いる手法に加えて、細胞構造の形態制御による細胞機能の制御手法という新たな考え方への展開の可能性を示すとともに、細胞構造の形成制御において考慮することが必要になると考えられる力学因子に関する新たな知見をもたらした。

科学的側面のみにとどまらず、医工学的側面から見た場合には、細胞機能の理解に加えて、その制御を考えることが重要となる。本論文の結果を受け、さらに細胞機能の制御へとつなげるためには、細胞構造の人為的形成誘導を行う手法の確立が望まれる。その手法には、(1) 細胞が接着・伸展する基質表面を創成、および修飾する技術、(2) 細胞構造を適切に維持するための力学場の設計技術、などが必要になると考えられる。これらの技術は、機械工学が取り扱うべき重要な分野であり、バイオメカニク

スの基本的方法論に加え、機械工学の知識・手法を援用した研究が、今後益々重要になると考えられ、その推進が期待される。

付録 A

原子ビームを用いた細胞接着 制御の試み

A.1 緒言

近年、生体と人工材料との適合性のメカニズムの理解が深まるにつれ、新規適合材料の研究開発やその実用化が進められてきた [例えば, Ratner et al., 1996]. この中で、生体と材料との接着性を考えた場合、生体の最小単位である細胞と直接接する材料表面との親和性が重要となる. これまでにも、材料表面への細胞の接着親和性に関する様々な研究が行われてきた. 例えば、細胞接着タンパク質等の材料基板表面へのパターン修飾 [Chen et al., 1997; Zhang et al., 1999; Kane et al., 1999; Barbucci et al., 2002] や、表面凹凸形状の創成 [den Braber et al., 1996; Wang et al., 2003, Liao et al., 2003] により、細胞接着形状の制御や接着パターンニングが試みられてきた. しかしながら、これらの手法では、複雑な表面処理が必要であり、また、生体内では、修飾したタンパク質自体が、様々な生化学的反応を受けるため、安定した接着性制御の維持が容易ではない. そのため、基板材料の表面自体の組成や構造の直接的な改質による細胞親和性の制御が望まれる.

そこで、本研究では、基板材料の表面に原子ビーム [Tagawa et al., 2001] を照射することにより、表面自体の組成、または構造を変化させ、これにより個々の細胞の接着形状および細胞接着パターンを人為的に制御することを目的とした. まず、基板材料として用いた FEP (4 フッ化エチレン・6 フッ化プロピレン共重合樹脂) 表面に対して、原子ビームを照射した. 次に、改質表面の評価として、原子間力顕微鏡 (AFM) による表面粗さ測定、および純水の接触角測定を行った. また、改質表面と細胞との接着親和性

を評価するために、基板表面に接着した細胞の増殖率および接着面積を計測した。さらに、空孔パターンを配置したメッシュマスクを用いて原子状酸素を照射し、基板表面上に改質領域パターンを作成した。この改質された材料表面上にて骨芽細胞様細胞を培養し、細胞接着パターン、細胞形状、およびアクチン細胞骨格構造の観察を行った。

A.2 実験方法

A.2.1 基板表面の改質方法

本研究で用いたレーザーデトネーション型原子ビーム発生装置の概略図を図 A.1 に示す。本装置は、低軌道宇宙環境における材料劣化現象を地上で模擬するために試作されたものである。本装置では、図 A.1 に示すように、ピエゾ駆動のパルスバルブにより、真空チャンバー内に導入された酸素原子に $5 \sim 7 \text{ J / pulse}$ の CO_2 レーザー光を集光し、レーザーデトネーション現象により、酸素分子を原子状酸素 (Atomic Oxygen) に解離、加速することで、 5 eV 程度の並進エネルギーを有するビームとして材料表面に照射することができる。生成された原子ビームのフラックスおよび並進エネルギーは、水晶振動子マイクロバランスと飛行時間スペクトルを用いて、*in situ* 測定することができる。

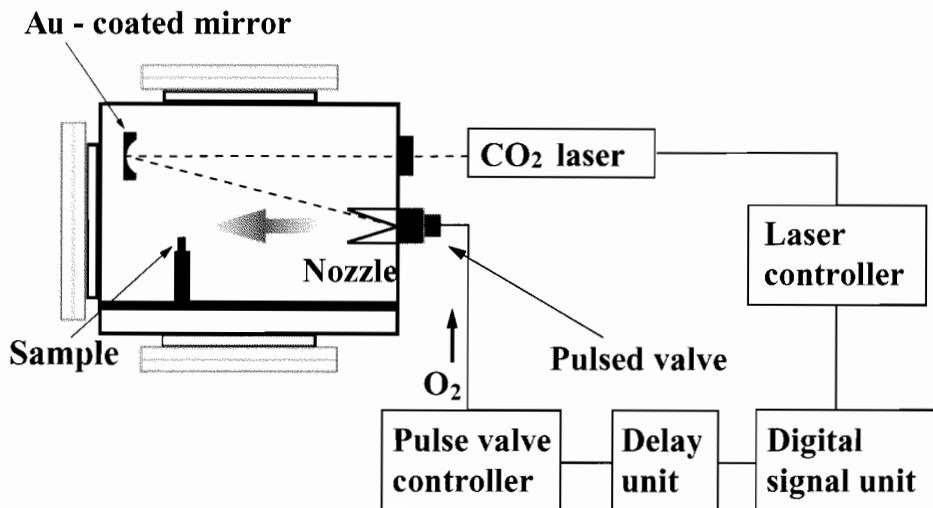


図 A.1 Atom beam facility

細胞接着基板材料として、FEP を使用し、厚さ $50 \mu\text{m}$ のシートから 直径 25 mm の円板基板試料を作成した。試料は、エタノールと純水を用いて超音波洗浄を行い、その後、原子ビームを照射した。なお、原子状酸素の照射条件は、原子状酸素の並進エネルギーが約 5.0 eV 、原子状酸素のフラックスが $2.6 \times 10^5 \text{ atom / cm}^2 / \text{s}$ であり、原子状酸素のフルエンス（照射量）が、 $1.0 \times 10^{20} \text{ atoms / cm}^2$ の条件で行った。

本研究では、改質による材料表面の評価、および細胞と材料との接着親和性を調べるために、まず FEP 試料表面の全面に原子ビームを照射し、これに細胞を播種して実験を行った。次に、細胞接着パターンを作成してその評価を行うために、非照射基板に対してメッシュマスクを被せた FEP 表面に原子ビームを照射し、空孔部位のみを改質した。

本実験で用いたメッシュマスクを図 A.2 に示す。厚み $50 \mu\text{m}$ の Ni 製マスクに作成した空孔パターンは、試料ホルダー開口部直径に相当する直径 18 mm の円内に配置した。空孔形状は、正方形、円形、直線形の 3 種類とした。また、正方形の辺長、円の直径、および直線の幅がそれぞれ、 $100, 80, 60, 40, 20 \mu\text{m}$ である 5 種類のグループを作成し、それぞれのグループ内において、図 A.2 (b) ~ (d) に示すように、空孔を $200 \mu\text{m}$ 間隔で配置した。

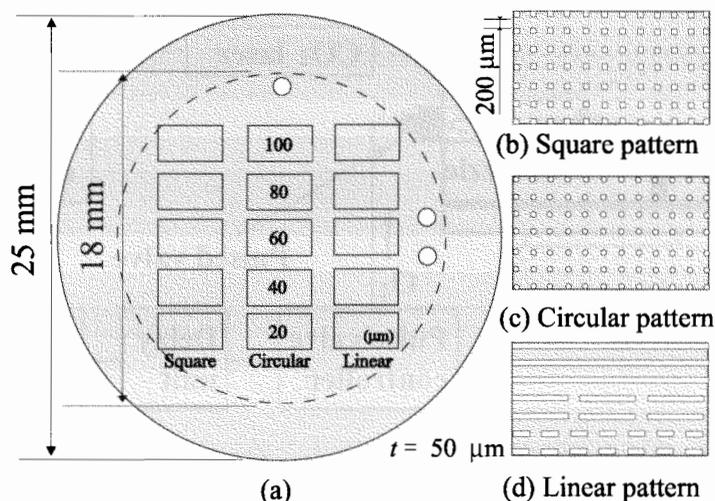


図 A.2 メッシュマスクパターン

A・2・2 観察試料の作成と観察方法

本研究では、理化学研究所バイオリソースセンターより入手した骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた。培地を満たした直径 35 mm のガラスボトムディッシュに FEP 試料を沈め、その上に細胞を約 10^4 cells / dish (10.4 cells / mm^2) の密度で播種した。培地には、FBS を 10 % 添加した α -MEM を用い、温度 37°C 、湿度 100 %、5 % CO_2 - 95 % Air の環境下で培養した。

細胞形状の観察には位相差顕微鏡 (TE200, Nikon)、アクチン細胞骨格の観察には共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (LSM510, Zeiss) をそれぞれ用いた。アクチン細胞骨格の観察に際しては、5 % paraformaldehyde にて細胞固定を行った後、0.1 % Triton-X 100 で脱膜処理を行い、rhodamine-phalloidin にてアクチンファイバーの蛍光標識を行ったものを観察試料とした。

A.3 実験結果

A.3.1 材料基板表面の改質結果

本節では、まず原子ビームを全面に照射した試料基板を用いて、改質表面の特性および細胞接着親和性について評価した。

A.3.1.1 表面粗さと純水接触角

原子ビームを高分子基板表面に照射することで、材料表面の組成、および構造が変化する [Gotoh et al., 2001]. まず、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察した画像から算出した表面粗さ (算術平均粗さ: Ra) の比較を図 A.3 に示す. 原子ビーム照射前の FEP の表面粗さは、 5.1 ± 0.2 nm であるのに対し、原子ビーム照射後の FEP の表面粗さは、 20.5 ± 0.6 nm であり、原子ビームの照射により、FEP 表面の凹凸構造が有意に ($p < 0.001$, t -test) 増加した。

次に、接触角測定装置を用いて Sessile Drop 法 [Gotoh et al., 2001] により測定した純水との接触角の比較を図 A.4 に示す. 原子ビーム照射前の FEP 表面での純水の前進接触角は、 108.3 ± 0.7 deg. であるのに対し、原子ビーム照射後の FEP 表面での純水の前進接触角は、 132.4 ± 3.4 deg. であった. また、後退接触角も 91.2 ± 2.2 deg. から 99.3 ± 2.9 deg. に増加し、原子ビーム照射により、FEP 表面での純水の接触角は、前進および後退ともに有意に ($p < 0.001$, t -test) 増加した。

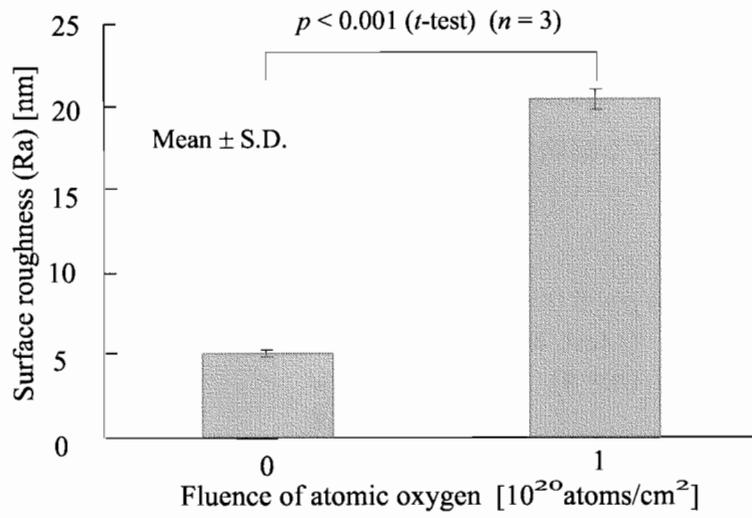


図 A.3 原子状酸素ビーム照射による FEP 表面粗さの変化 (AFM 計測)

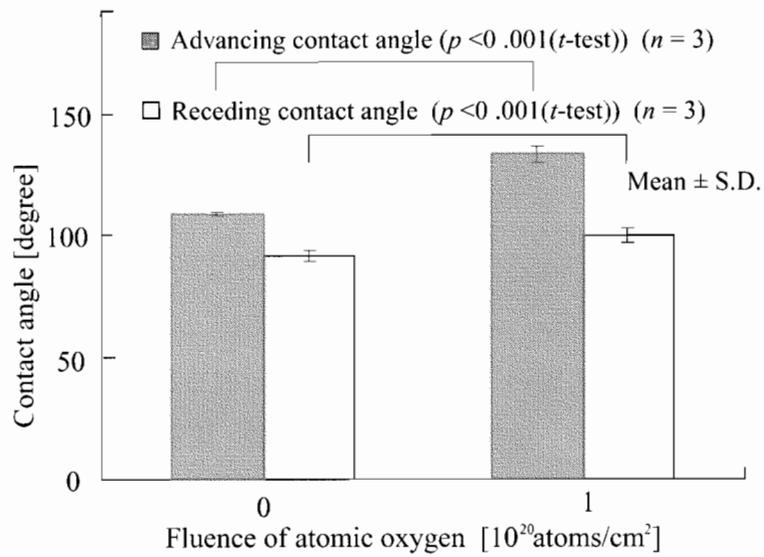


図 A.4 原子状酸素ビーム照射による FEP 表面の純水接触角の変化 (Sessile Drop 法)

A.3.1.2 細胞と材料表面の接着親和性

FEP 基板表面に原子ビームを照射することにより、細胞の接着親和性が変化する。まず、細胞播種から4日間、一日毎に計測した接着細胞数の変化を図 A.5 に示す。播種から2日後以降、原子ビームを照射した FEP では、照射していない FEP と比較して、細胞密度が有意に ($p < 0.001$, t -test) 高くなっている。さらに、細胞播種4日後では、原子ビームを照射した FEP では、細胞密度が約 $73 \text{ cells} / \text{mm}^2$ となり、原子ビームを照射していない FEP における細胞密度 (約 $16 \text{ cells} / \text{mm}^2$) の約 4.5 倍の細胞が基板表面に接着していた。

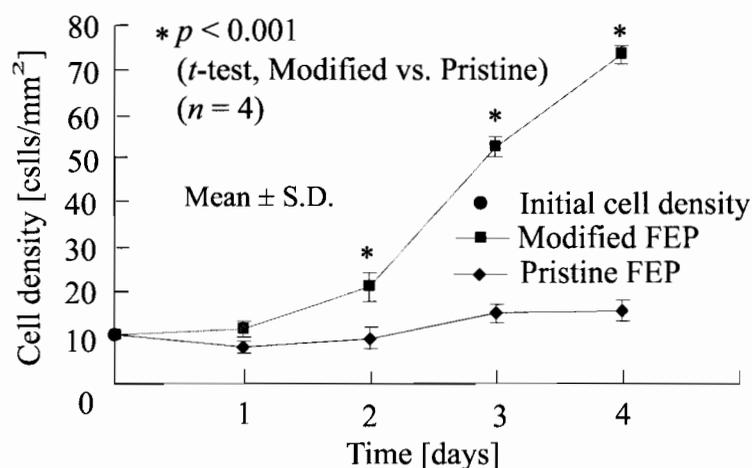


図 A.5 原子状酸素ビーム照射／非照射による FEP 表面における細胞増殖数の比較

A.3.2 細胞接着の観察

本節では、メッシュマスクを用いて、原子ビームが照射される領域を基板表面上にパターンニングし、その表面に細胞を播種した。細胞の播種・培養後、細胞接着パターン、および細胞形状の観察を行う。

A.3.2.1 細胞接着パターン

細胞播種1日後における細胞の接着パターンを図 A.6 に示す。原子ビーム照射領域の形状は、それぞれ、辺長 $60\ \mu\text{m}$ の正方形 (図 A.6(a), (d)) , 直径 $60\ \mu\text{m}$ の円形 (図 A.6(b), (e)) , および幅 $60\ \mu\text{m}$ の直線形 (図 A.6(c), (f)) , である。まず、4倍の対物レンズを用いて、観察した画像を図 A.6(a)~(f) に示す。図 A.6(a), (b) より、空孔の配置と同様の格子状に細胞が接着している様子がわかる。次に、10倍の対物レンズを用いて観察した画像を、図 A.6(d)~(f) に示す。図 A.6(d), (e) より、改質領域上に接着した細胞が確認できるが、改質領域と非改質領域との境界周辺に接着している細胞が数多く観察される。また、図 A.6(f) より、改質領域と非改質領域との境界に沿って接着した細胞が多く観察される。

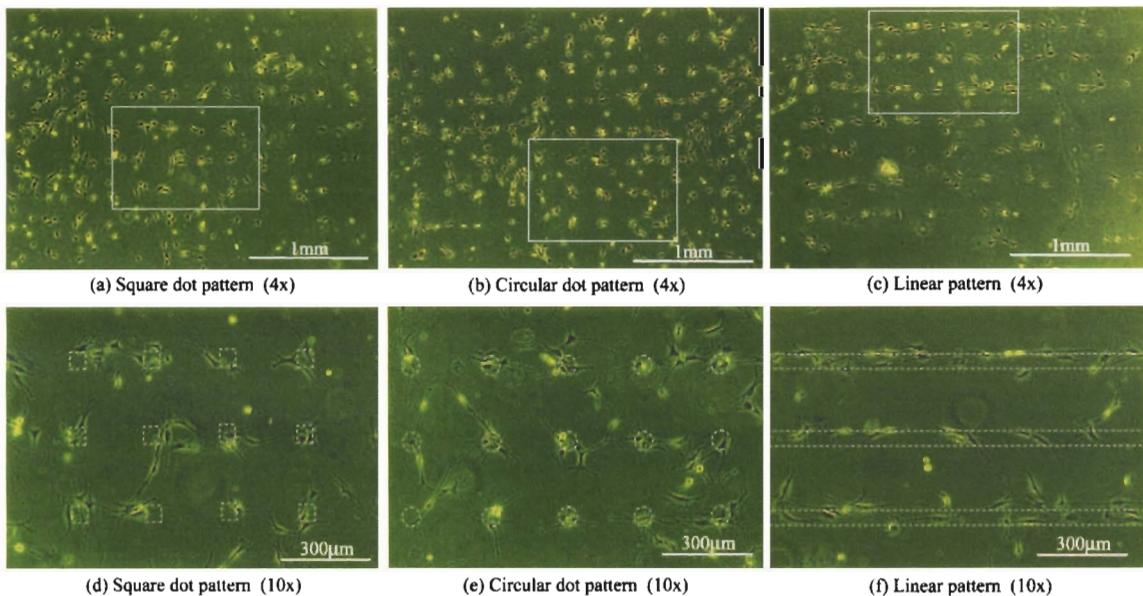


図 A.6 細胞のマイクロパターンニング結果 (細胞播種後1週間)

A.3.2.2 細胞接着形状の観察

共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて、細胞播種後1日間培養した細胞のアクチン細胞骨格の観察を行った。観察されたアクチン細胞骨格の蛍光画像を図 A.7 に示す。透過光画像により観察した改質領域の境界形状を図中を実線で示した。改質領域の形状は、辺長 $100\ \mu\text{m}$ の正方形 (図 A.7(a), (b)) , 直径 $100\ \mu\text{m}$ の円形 (図 A.7(c), (d)) ,

および幅 $100\ \mu\text{m}$ の直線形 (図 A.7(e), (f)) である. 観察には, 10 倍, および 63 倍の対物レンズを用いた. 図 A.7(a), (c) に示すように, 改質領域と非改質領域との境界の外側に接着した細胞が観察される. また, 図 A.7(b), (d) では, 改質領域の境界に沿って接着している様子が明瞭に観察される. さらに, 図 A.7(e) では, 改質領域内側, および外側に接着している細胞が観察でき, 図 A.7(e) では, 改質領域内に接着した細胞が, 境界に沿うように接着している様子が観察される.

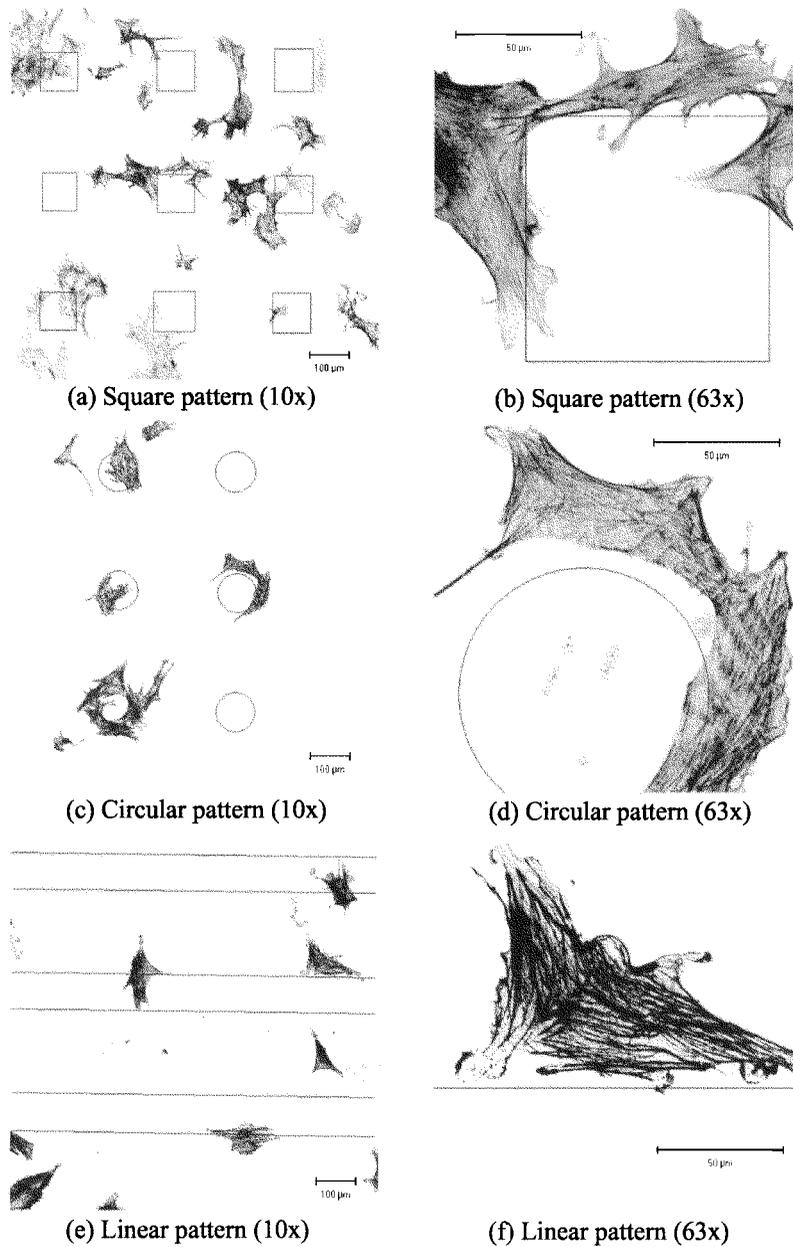


図 A.7 パターン改質部近傍の細胞内アクチン骨格構造の観察 (Rhodamine-Phalloidin 蛍光観察)

A・4 考 察

A・4.1 原子状酸素ビーム照射による影響

原子状酸素ビームによる FEP 基板表面の改質結果の特性、および細胞接着親和性の変化についてまとめたものを、表 A.1 に示す。表に示すように、FEP 表面に原子状酸素ビームを照射した結果、表面粗さが増加し、純水との接触角が増加した。これは、原子状酸素ビームを照射することで、表面の凹凸構造が変化し、ぬれ性が低下したと考えられる。また、原子状酸素ビーム非照射、および照射後の FEP 表面上に骨芽細胞様細胞を播種した。その結果、原子状酸素ビーム照射後の FEP 表面上での細胞数は、非照射表面上で培養した細胞と比較して有意に増加した。このことから、原子状酸素ビーム非照射と照射後の FEP 表面上では、細胞と材料との接着親和性が異なることが示された。

表 A.1 原子状酸素ビーム照射による表面改質の特性

	FEP	
表面粗さ(AFM)		
ぬれ性(接触角)		
細胞接着親和性 (増殖率)		

A・4.2 基板表面におけるパターン状の改質領域への細胞接着

次に、メッシュマスクの空孔部位のみを改質した FEP 表面上に培養細胞を播種し、細胞接着パターンの作製を試みた。その結果、改質領域パターンと同様に接着した細胞接着パターンが確認できた。しかしながら、改質領域内と比較して、改質領域境界近傍に接着した細胞が数多く観察された。これは、マスクの設計パターンから分かるように、非改質領域の面積が改質領域の面積と比較して大きいために、細胞播種後、細胞が試料表面まで沈み接着を開始する際、改質領域周辺に存在している割合が高いためであると考えられる。

また、改質領域境界近傍に接着した細胞のアクチン細胞骨格を観察した結果、細胞が、改質領域と非改質領域との境界に沿って接着している様子が観察された。これは、原子状酸素ビームが照射されることで表面に新たな凹凸構造が形成された領域と非照射領域との境界において、境界に対して垂直な方向には細胞伸展が抑制され、平行な方向には促進された結果、境界に沿った接着形状が形成されたと考えられる。しかしながら、この照射／非照射境界部分の表面構造の詳細は不明であり、また、境界に沿う方向に多くのアクチン細胞骨格が発達した理由は、明らかではない。

アクチンファイバーが、細胞内において、自らに作用する張力によって安定的に存在し、それらが形成するネットワーク構造内の力の自己平衡によって、骨芽細胞の形態が維持されていることが知られている。このことを考えると、境界を横断するアクチンファイバーが、境界に沿う方向のファイバーと比較して、力学的に不安定であることが原因の一つとして推察される。

A.5 結 言

本研究では、原子状酸素ビーム照射を用いた材料表面改質により、材料表面と細胞との接着親和性を制御し、これにより形成される細胞接着パターンを観察した。その結果、メッシュマスクと同様の配置の接着パターンが観察された。さらに個々のアクチン細胞骨格構造を観察すると、多くの細胞が、改質領域と非改質領域との境界に沿って接着している様子が観察された。これは、改質領域と非改質領域との境界における表面の凹凸構造の変化により、細胞の伸展が抑制、あるいは促進され、改質領域境界に沿った細胞形状が形成されたと考えられる。

付録 B

関連学術論文・学術講演

B.1 学術論文

- 佐藤克也, 西島尚吾, 安達泰治, 富田佳宏, (2003), (第2章)
アクチン細胞骨格構造の量が培養骨芽細胞の力学刺激応答特性に及ぼす影響,
日本ME学会・生体医工学, **41-4**, 449-457.
- Adachi, T., Sato, K., and Tomita, Y., (2003), (第3章)
Directional Dependence of Osteoblastic Calcium Signaling Response to Mechanical Stimulus,
Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, **2-2**, 73-82.
- Sato, K., Adachi, T., Shirai, Y., Saito, N., and Tomita, Y., (2004), (第5章)
Local disassembly of actin stress fibers induced by selected release of intracellular tension in osteoblastic cell,
Cell Motility and the Cytoskeleton, (submitted).
- Sato, K., Adachi, T., Matsuo, M., and Tomita, Y., (2004), (第6章)
Quantitative evaluation of threshold fiber strain that induces reorganization of cytoskeletal actin fiber structure in osteoblastic cells,
Journal of Biomechanics, (in press).
- 安達泰治, 梶田文昭, 佐藤克也, 松本康志, 田川雅人, (2003), (付録 A)
原子ビームを用いた細胞接着パターンの作成,
日本機械学会論文集, A編, **69-688**, 118-124.

- 安達泰治, 河東万智子, 佐藤克也, 田川雅人, (2004), (付録 A)
細胞接着マイクロパターンニングとアクチン細胞骨格の配向制御：原子ビームを用いた基板表面改質の試み,
日本結晶成長学会誌, 特集「生体・医療材料」, **31-1**, 78-82.

B・2 国際会議

- Adachi, T., Sato, K., and Tomita, Y., (2000)
Change in Intracellular Calcium Concentration and Its Intercellular Propagation in Osteoblasts In Vitro Induced by Mechanical Stimulus Using Micropipette, Proceedings of 10th International Conference on Biomedical Engineering, 429-430, (Singapore).
- Sato, K., Adachi, T., and Tomita, Y., (2001)
Directional dependency of Ca²⁺ signaling response to mechanical stimulus in osteoblastic cell,
Proceedings of ASME 2001 Bioengineering conference, 153-154, (Snowbird, Utah).
- Adachi, T., Sato, K., and Tomita, Y., (2001)
Calcium Signaling Response in Osteoblastic Cells to Mechanical Stimulus by Micropipette,
Switzerland - Japan Workshop on "New Directions in Cellular and Tissue Biomechanics, 59, (Wengen, Switzerland).
- Sato, K., Adachi, T., and Tomita, Y., (2002)
Directional dependency of sensing characteristics to mechanical stimulus in osteoblastic cell,
The 4th World Congress of Biomechanics, in Proceedings CD, (Calgary, Canada).
- Sato, K., Adachi, T., and Tomita, Y., (2002)
Characteristic of calcium signaling response to cytomembrane deformation in a single osteoblastic cell,
The 6th Membrane Research Forum, (Nagoya, Japan).

- Sato, K., Higashi, N., Adachi, T., and Tomita, Y., (2003)
Observation of Localized Calcium Signaling Initiated by deformation of Cytomembrane in a Single Osteoblastic Cell,
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, in Proceedings CD, (Sydney, Australia).
- Sato, K., Adachi, T., Matsuo, M., and Tomita, Y., (2004)
Threshold magnitude of axial strain that induces stress fiber reorganization in osteoblastic cells,
BMES 2004 Annual Fall Meeting, in Proceedings CD, (Philadelphia, Pennsylvania).

B·3 国内学術講演

- 佐藤克也, 星合壮大, 村井隆公, 安達泰治, 富田佳宏, (1999)
マイクロピペット押し込みによる培養骨芽細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇と伝播,
日本機械学会関西支部 機械の強度と形態研究懇話会 第23回NCPシンポジウム
論文集, 81-82, (金沢).
- 佐藤克也, 星合壮大, 安達泰治, 富田佳宏, (2000)
力学的刺激の負荷により生じる培養骨芽細胞間のカルシウムイオン波伝播の観察,
日本機械学会 2000年度 年次大会 講演論文集, 251-252, (名古屋).
- 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏, (2001)
力学的刺激に対する単一培養骨芽細胞の Ca^{2+} 応答特性の方向依存性,
第13回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会 講演論文集, 166-167, (仙台).
- 佐藤克也, (2001)
培養骨芽細胞に対するマイクロニードルを用いた直接刺激とカルシウム応答,
日本機械学会バイオエンジニアリング部門 第11回生物機械システム研究会, (京都).

- 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏, (2002)
力学環境の変化に伴う培養骨芽細胞内アクチン構造変化の観察,
日本機械学会第14回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集, 239-240, (東京).
- 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏, (2003)
焦点接着の一部解除に伴う培養骨芽細胞内ストレスファイバー構造変化の観察,
日本機械学会第15回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集, 7-8, (大阪).
- 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏, (2003)
アクチンファイバー量が培養骨芽細胞の力学応答特性に及ぼす影響,
日本機械学会 2003年度 年次大会 講演論文集, 31-32, (徳島).
- 佐藤克也, 西島尚吾, 安達泰治, 富田佳宏, (2003)
アクチン細胞骨格の組織化度が培養骨芽細胞の力学刺激応答特性に及ぼす影響,
日本ME学会 生体医工学シンポジウム 講演論文集, 291-300, (北海道).
- 佐藤克也, 東規雄, 安達泰治, 富田佳宏, (2003)
細胞膜の変形によって生じる局所的なカルシウムシグナリング応答の観察,
日本生物物理学会年会 講演予稿集, S163, (新潟).
- 佐藤克也, 西島尚吾, 東規雄, 安達泰治, 富田佳宏, (2003)
力学刺激負荷に対する骨芽細胞のカルシウム応答の評価,
日本機械学会関西支部 機械の強度と形態研究懇話会 第26回NCPシンポジウム
論文集, 25-26, (大阪).
- 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏, (2004)
培養骨芽細胞内ストレスファイバーの選択的張力解放に伴う局所収縮と再構築,
日本機械学会 第16回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集, 9-10, (北九州).
- 佐藤克也, (2004)
"アクチン細胞骨格構造システムのバイオメカニクス",
日本ME学会専門別研究会 第99回バイオメカニクス研究会, (金沢).

参 考 文 献

- (1) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002): "Molecular biology of the cell, forth edition", Garland Science.
- (2) Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. and Geiger, B. (2001): "Force and focal adhesion assembly: A close relationship studied using elastic micropatterned substrates", *Nature Cell Biology*, **3**, 466-472.
- (3) Barbee, K.A., Macarak, E.J. and Thibault, L.E. (1994): "Strain measurements in cultured vascular smooth muscle cells subjected to mechanical deformation", *Annals of Biomedical Engineering*, **22**-1, 14-22.
- (4) Barbucci, R., Lamponi, S., Magnani, A. and Pasqui, D. (2002): "Micropatterned surfaces for the control of endothelial cell behaviour", *Biomolecular Engineering*, **19**, 161-170.
- (5) Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V. and Wang, Y.L. (2001): "Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts", *Journal of Cell Biology*, **153**-4, 881-888.
- (6) Binderman, I., Zor, U., Kaye, A.M., Shimshoni, Z., Harell, A. and Somjen, D. (1988): "The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A₂", *Calcified Tissue International*, **42**, 261-266.
- (7) den Braber, E.T., de Ruijter, J.E., Smits, H.T.J., Ginsel, L.A., von Recum, A.F. and Jansen, J.A. (1996): "Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrate with uniform parallel surface micro-grooves", *Biomaterials*, **17**, 1093-1099.
- (8) Bray, D. (2001): "Cell movements. From molecules to motility, second edition". Garland Publishing.

- (9) Brown, T.D. (2000): "Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review", *Journal of Biomechanics*, **33-1**, 3-14.
- (10) Buckley, M.J., Banes, A.J., Levin, L.G., Sumpio, B., Sato, M., Jordan, R., Gilbert, J., Link, G.W. and Tran Son Tay, R. (1998): "Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro", *Bone and Mineral*, **4-3**, 225-236.
- (11) Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M. and Ingber, D.E. (1997): "Geometric control of cell life and death", *Science*, **276**, 1425-1428.
- (12) Chen, N.X., Ruder, K.D., Pavalko, F.M., Turner, C.H., Burr, D.B., Qiu, J. and Duncan, R.L. (2000): "Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts", *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, **278**, C989-C997.
- (13) Cohen, C.R., Mills, I., Du, W., Kamal, K. and Sumpio, B.E. (1997): "Activation of the adenylyl cyclase/cyclic AMP/protein kinase A pathway in endothelial cells exposed to cyclic strain", *Experimental Cell Research*, **231-1**, 184-189.
- (14) Costa, K.D., Hucker, W.J. and Yin., F.C.-P. (2002): "Buckling of actin stress fibers: A new wrinkle in the cytoskeletal tapestry", *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **52**, 266-274.
- (15) Cowin, S.C. (1985): "The relationship between the elasticity tensor and the fabric tensor", *Mechanics of Materials*, **4**, 137-147.
- (16) Cowin, S.C., Moss-Salentijn, L. and Moss, M.L. (1991): "Candidates for the mechanosensory system in bone", *Journal of Biomechanical Engineering*, **113-2**, 191-197.
- (17) Cowin, S.C. (1993): "Bone stress adaptation models", *Journal of Biomechanical Engineering*, **115-4B**, 528-533.
- (18) Cowin, S.C. and Weinbaum, S. (1998): "Strain amplification in the bone mechanosensory system", *American Journal of Medical Science*, **316-3**, 184-188.

- (19) Currey, J. (1984): "The mechanical adaptations of bones", Princeton Univ. Press.
- (20) Dembo, M. and Wang, Y.L. (1999): "Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts", *Biophysical Journal*, **76**, 2307-2316.
- (21) Duncan, R. and Mislis, S. (1989): "Voltage-activated and stretch-activated Ba^{2+} conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106)", *FEBS letter*, **251**-1-2, 17-21.
- (22) Duncan, R.L. (1995): "Transduction of mechanical strain in bone", *American Society for Gravitational and Space Biology Bulletin*, **8**-2, 49-62.
- (23) Duncan, R.L. and Turner, C.H. (1995): "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain", *Calcified Tissue International*, **57**, 344-358.
- (24) Duncan, R.L., Akanbi, K.A. and Farach-Carson, M.C. (1998): "Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells", *Seminars in Nephrology*, **18**-2, 178-190.
- (25) Fermor, B., Gundle, R., Evans, M., Emerton, M., Pocock, A. and Murray, D. (1998): "Primary human osteoblast proliferation and prostaglandin E_2 release in response to mechanical strain in vitro", *Bone*, **22**-6, 637-643.
- (26) Frost, H.M. (1966): "The bone dynamics in osteoporosis and osteomalacia", Charles C. Thomas, The Henry Ford Hospital surgical monographs.
- (27) Frost, H.M. (1987): "The mechanostat: A proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents", *Bone and Mineral*, **2**-2, 73-85.
- (28) Fung, Y.C. (1990): "Biomechanics motion, flow, stress and growth", Springer-Verlag.
- (29) Galbraith, C.G. and Sheetz, M.P. (1997): "A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces", *Proceedings of National Academy of Science USA*, **94**, 9114-9118.

- (30) Gillespie, P.G. and Walker, R.G. (2001): "Molecular basis of mechanosensory transduction", *Nature*, **413**, 194-202.
- (31) Gotoh, K., Tagawa, M., Ohmae, N. and Kinoshita, H. (2001): "Surface characterization of atomic oxygen beam-exposed polyimide films using contact angle measurements", *Colloid Polymer Science*, **279**, 214-220.
- (32) Guharay, F. and Sachs, F. (1984): "Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle", *Journal of Physiology*, **352**, 685-701.
- (33) Guilak, F., Donahue, H.J., Zell, R., Grande, D.A., McLeod, K.J. and Rubin, C.T. (1994), "Deformation-induced calcium signaling in articular chondrocytes", in *Cell Mechanics and Cellular Engineering*, Springer Verlag, 380-397.
- (34) Gunst, S., Tang, D. and Saez, A. (2003): "Cytoskeletal remodeling of the air smooth muscle cell: A mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung", *Respiratory physiology and Neurobiology*, **137**, 151-168.
- (35) Hara, F., Fukuda, K., Asada, S., Matsukawa, M. and Hamanishi, C. (2001): "Cyclic tensile stretch inhibition of nitric oxide release from osteoblast-like cells in both G-protein and actin-dependent", *Journal of Orthopedic Research*, **19-1**, 126-131.
- (36) 林紘三郎, 安達泰治, 宮崎浩 (2003): "生体細胞・組織のリモデリングのバイオメカニクス", 日本エム・イー学会編 コロナ社.
- (37) Hung, C.T., Allen, F.D., Pollak, S.R. and Brighton, C.T. (1996): "Intracellular Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} are required in the real-time Ca^{2+} response of bone cells experiencing fluid flow", *Journal of Biomechanics*, **29-11**, 1411-1417.
- (38) Ingber, D.E. (2003a): "Tensegrity I: Cell structure and hierarchical systems biology", *Journal of Cell Science*, **116-7**, 1157-1173.
- (39) Ingber, D.E. (2003b): "Tensegrity II: How structural networks influence cellular information processing networks", *Journal of Cell Science*, **116-8**, 1397-1408.

- (40) Isenberg, G., Rathke, P.C., Hulsmann, N., Franke, W.W. and Wohlfarth-Bottermann, K.E. (1976): "Cytoplasmic actomyosin fibrils in tissue culture cells Direct proof of contractility by visualization of ATP-induced contraction in fibrils isolated by laser microbeam dissection", *Cell and Tissue Research*, **166**, 427-443.
- (41) Jacobs, C.R., Yellowley, C.E., Davis, B.R., Zhou, Z., Cimbala, J.M. and Donahue, H.J. (1998): "Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells", *Journal of Biomechanics*, **31**, 969-976.
- (42) Jaworski, Z.F. and Lok, E. (1972): "The rate of osteoclastic bone erosion in Haversian remodeling sites of adult dog's rib", *Calcified Tissue Research*, **10-2**, 103-112.
- (43) Jones, D.B., Nolte, H., Scholubbers, J.G., Turner, E. and Veltel, D. (1991): "Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells", *Biomaterials*, **12-2**, 101-110.
- (44) Kane, R.S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D.E. and Whitesides, G.M. (1999): "Patterning proteins and cells using soft lithography", *Biomaterials*, **20**, 2363-2376.
- (45) Kanzaki, M., Nagasawa, M., Kojima, I., Sato, C., Naruse, K., Sokabe, M. and Iida, H. (1999): "Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated non-selective cation channel", *Science*, **285**-5429, 882-886.
- (46) Katoh, K., Kano, Y., Masuda, M., Onishi, H. and Fujiwara, K. (1998): "Isolation and contraction of the stress fiber", *Molecular Biology of the Cell*, **9**, 1919-1938.
- (47) Klein-Nulend, J., Burger, E.H., Semeins, C.M., Raisz, L.G. and Pilbeam, C.C.,(1997): "Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells", *Journal of Bone Mineral Research*, **12-1**, 45-51.
- (48) Langer, R. and Vannanti, J. (1993): "Tissue engineering", *Science*, **260**-5110, 920-926.

- (49) Levesque, M.J. and Nerem, R.M. (1985): "The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress", *Transaction of the ASME, Journal of Biomechanical Engineering*, **107-4**, 341-347.
- (50) Liao, H., Andersson, A.-S., Sutherland, D., Petronis, S., Kasemo, B. and Thomsen, P. (2003): "Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces *in vitro*", *Biomaterials*, **24**, 649-654.
- (51) Meazzini, M.C., Toma, C.D., Schaffer, J.L., Gray, M.L. and Gerstenfeld, L.C. (1998): "Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain *in vitro*", *Journal of Orthopaedic Research*, **16-2**, 170-180.
- (52) Millward-Sadler, S.J. and Salter, D.M. (2004): "Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction", *Annals of Biomedical Engineering*, **32-3**, 435-446.
- (53) 御子柴克彦, 遠藤實, 宮本英七 (1998): "カルシウムイオンとシグナル伝達", 共立出版.
- (54) Naruse, K. and Sokabe, M. (1993): "Involvement of stretch-activated ion channels in Ca^{2+} mobilization to mechanical stretch in endothelial cells", *American Journal of Physiology*, **264**, C1037-C1044.
- (55) Naruse, K., Yamada, T. and Sokabe, M. (1998): "Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch", *American Journal of Physiology*, **274-5 Pt.2**, H1532-H1538.
- (56) Neidlinger-Wilke, C., Grood, E.S., Wang, J.H.-C., Brand, R.A. and Claes, L. (2001): "Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: Studies of cell grown in cyclically stretched substrates", *Journal of Orthopaedic Research*, **19**, 286-293.
- (57) Noria, S., Xu, F., McCue, S., Jones, M., Gotlieb, A.I. and Langille, B.L. (2004): "Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress", *The American Journal of Pathology*, **164**, 1211-1223.

- (58) Ozawa, H., Imamura, K., Abe, E., Takahashi, N., Hiraide, T., Shibasaki, Y., Fukuhara, T. and Suda, T. (1990): "Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro", *Journal of Cell Physiology*, **144**, 177-185.
- (59) Parfitt, A.M. (1994): "Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone", *Journal of Cellular Biochemistry*, **55-3**, 273-286.
- (60) Pavalko, F.M., Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y.F., Qiu, J. and Duncan, R.L. (1998): "Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions", *American Journal of Physiology*, **275-6 Pt.1**, C1591-C1601
- (61) Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. and Lemons, J.E. (Eds.) (1996): "Biomaterials science: an introduction to materials in medicine", *Academic Press*.
- (62) Reich, K.M., Gay, C.V. and Frangos, J.A. (1990): "Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production", *Journal of Cell Physiology*, **143-1**, 100-104.
- (63) Reich, K.M. and Frangos, J.A. (1993): "Protein kinase C mediates flow-induced prostaglandin E₂ production in osteoblasts", *Calcified Tissue International*, **52**, 62-66.
- (64) Roelofsen, J., Klein-Nulend, J. and Burger, E.H. (1995): "Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro", *Journal of Biomechanics*, **28-12**, 1493-1503.
- (65) Rosales, O.R., Isales, C.M., Barrett, P.Q., Brophy, C. and Sumpio, B.E. (1997): "Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Ca²⁺ concentration through mobilization of intracellular and extracellular pools", *Biochemical Journal*, **326 Pt.2**, 385-392.
- (66) Rubin, C.T. and Lanyon, L.E. (1985): "Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude", *Calcified Tissue International*, **37-4**, 411-417.

- (67) 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏 (2003): “焦点接着の一部解除に伴う培養骨芽細胞内ストレスファイバー構造変化の観察“, 日本機械学会第15回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, **03-1**, 7-8.
- (68) Saunders, M.M., You, J., Trosko, J.E., Yamasaki, H., Li, Z., Donahue, H.J. and Jacobs, C.R. (2001): “Gap junctions and fluid flow response in MC3T3-E1 cells“, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, **281-6**, C1917-C1925.
- (69) Shirinsky, V.P., Antonov, A.S., Birukov, K.G., Sobolevsky, A.V., Romanov, Y.A., Kabaeva, N.V., Antonova, G.N. and Smirnov, V.N. (1989): “Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size“, *Journal of Cell Biology*, **109**, 331-339.
- (70) Smalt, R., Mitchell, F.T., Howard, R.L. and Chambers, T.J. (1997): “Induction of NO and prostaglandin E₂ in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain“, *American Journal of Physiology*, **273-4**, E751-E758.
- (71) Sokabe, M., Sachs, F. and Jing, Z.Q. (1991): “Quantitative video microscopy of patch clamped membranes stress, strain, capacitance and stretch channel activation“, *Biophysical Journal*, **59-3**, 722-728.
- (72) Sokabe, M., Naruse, K., Sai, S., Yamada, T., Kawakami, K., Inoue, M., Murase, K. and Miyazu, M. (1997): “Mechanotransduction and intracellular signaling mechanisms of stretch-induced remodeling in endothelial cells“, *Heart Vessels, Supplement*, **12**, 191-193.
- (73) Tagawa, M., Yokota, K., Ohmae, N., Kinoshita, H. and Umeno, M. (2001): “Oxidation properties of hydrogen-terminated Si(001) surfaces following use of a hyperthermal broad atomic oxygen beam at low temperatures“, *Japanese Journal of Applied Physics*, **40-10**, 6152-6156.
- (74) The International Human Genome Mapping Consortium (2001): “A physical map of the human genome“, *Nature*, **409**, 934-941.
- (75) Vande Geest J.P., Di Martino, E.S. and Vorp, D.A. (2004): “An analysis of the

- complete strain field within Flexercell(TM) membranes“, *Journal of Biomechanics*, **37-12**, 1923-1928.
- (76) Wang, H.-C.J., Grood, E.S., Florer, J. and Wenstrup, R. (2000): “Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching“, *Journal of Biomechanics*, **33**, 729-735.
- (77) Wang, J.H.-C., Goldschmidt-Clermont, P., Wille, J. and Yin, F.C. (2001a): “Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching“, *Journal of Biomechanics*, **34-12**, 1563-1572.
- (78) Wang, N., Naruse, K., Stamenovic, D., Fredberg, J.J., Mijailovich, S.M., Tolic-Norrelykke, I.M., Polte, T., Mannix, R. and Ingber, D.E. (2001b): “Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98-14**, 7765-7770.
- (79) Wang, J.H.-C., Jia, F., Gilbert, T.W. and Woo, S.L.-Y. (2003): “Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix“, *Journal of Biomechanics*, **36**, 97-102.
- (80) Westerlind, K.C. and Turner, R.T. (1995): “The skeletal effects of spaceflight in growing rats: tissue-specific alterations in mRNA levels for TGF- β “, *Journal of Bone Mineral Research*, **10-6**, 843-848.
- (81) Wojciak-Stothard, B. and Ridley, A.J. (2003): “Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI3-kinases“, *Journal of Cell Biology*, **161**, 429-439.
- (82) Wolff, J. (1892): “Das gesetz der transformation der knochen“, Verlag von August Hirschwald. (“The law of bone remodelling“, Springer-Verlag (1986)).
- (83) Xia, S.-L. and Ferrier, J. (1992): “Propagation of a calcium pulse between osteoblastic cells“, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **186-3**, 1212-1219.

- (84) Yamada, T., Naruse, K. and Sokabe, M. (2000): "Stretch-induced morphological changes of human endothelial cells depend on the intracellular level of Ca^{2+} rather than of cAMP", *Life Science*, **67-21**, 2605-2613.
- (85) Ypey, D.L., Weidema, A.F., Hold, K.M., Van der Laarse, A., Ravestloot, J.H., Van Der Plas, A. and Nijweide, P.J. (1992): "Voltage, calcium and stretch activated ionic channels and intracellular calcium in bone cells", *Journal of Bone Mineral Research*, **7-Supplement 2**, S377-S387.
- (86) Yoshigi, M., Clark, E. and Yost, H. (2003): "Quantification of stretch-induced cytoskeletal remodeling in vascular endothelial cells by image processing", *Cytometry Part A*, **55A**, 109-118.
- (87) Zanetti, N.C. and Solursh, M. (1984): "Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton", *Journal of Cell Biology*, **99-1**, 115-123.
- (88) Zar, J.H. (1999): "Biostatistical analysis, 4th ed., Chapter 11", Prentice Hall Inc.
- (89) Zhang, S., Yan, L., Altman, M., Lässle, M., Nugent, H., Frankel, F., Lauffenburger, D.A., Whitesides, G.M. and Rich, A. (1999): "Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation", *Biomaterials*, **20**, 1213-1220.
- (90) Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A. and Burridge, K. (1998): "Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly", *Journal of Cell Biology*, **141**, 539-551.
- (91) Ziambaras, K.L., Lecanda, F., Steingerg, T.H. and Civitelli, R. (1998): "Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells", *Journal of Bone Mineral Research*, **13-2**, 218-228.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり懇切丁寧なご教授、ご指導を賜りました神戸大学工学部 富田佳宏教授に心より感謝いたします。本論文の作成に際して、ご多忙中にも関わらずご校閲を賜りました神戸大学工学部 白瀬敬一教授、神戸大学バイオシグナル研究センター 齋藤尚亮教授ならびに神戸大学理学部 洲崎敏伸助教授に深く感謝いたします。本論文をまとめるに至るまで、終始ご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院工学研究科 安達泰治助教授に心より感謝いたします。

日々の研究活動において、神戸大学工学部機械工学科 固体力学研究室 屋代如月助教授には、有益なご助言、ご討論を賜りました。また古宇田由夫技官には、研究が円滑に行えるよう数々の便宜をはかっていただきました。心より感謝の意を表します。細胞への遺伝子導入を行う実験において、丁寧なご指導とご助言を賜りました神戸大学バイオシグナル研究センター 白井康仁助教授に厚く御礼申し上げます。博士課程三年次の一年間、特別研究学生として京都大学大学院工学研究科機械工学専攻 連続体力学研究室に在籍いたしました。この間、研究の遂行にあたり様々な面でご配慮賜りました北條正樹教授ならびに田中基嗣助手に心より御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、共に研究を行っていただいた梶田文昭氏（現西日本旅客鉄道株式会社）、松尾守氏（現アイシン精機株式会社）、河東万智子氏（現ペンタックス株式会社）、植田大介氏（京都大学大学院工学研究科）、西島尚吾氏（神戸大学大学院自然科学研究科）、東規雄氏（神戸大学大学院自然科学研究科）に心より感謝いたします。

神戸大学工学部機械工学科 固体力学研究室諸氏ならびに京都大学工学部物理工学科 連続体力学研究室諸氏には様々な形でご援助いただき、さらに日々の研究室での生活を共に楽しく過ごさせていただきました。記してここに謝意を表します。

末文ながら、著者が大学院博士課程に進学し研究を遂行するにあたり、父 勉ならびに母 文子よりご理解とご支持をいただいたことに心より感謝いたします。また両親に加え、家族・友人・知人など、周りの皆様からの暖かいご支援がなによりの支えとなりました。深く感謝いたします。