

〈一般研究課題〉 細胞外の幾何学的・力学的環境操作による
血管平滑筋細胞の収縮特性制御
助成研究者 名古屋工業大学 長山 和亮



細胞外の幾何学的・力学的環境操作による 血管平滑筋細胞の収縮特性制御

長山 和亮
(名古屋工業大学)

A study on the manipulation of the extracellular
geometric and mechanical environment for controlling
the contractile properties of vascular smooth muscle cells

Kazuaki Nagayama
(Nagoya Institute of Technology)

Abstract :

The objective of this study is to establish a cell manipulation technique to control cell geometry, such as cell orientation, morphology and the distribution of their intracellular structures, and to investigate the changes in the contractile properties of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch mechanical stimulation. By using an originally designed cell micro-patterning technique, we have satisfactorily controlled cell shape and the orientation of their actin filaments which are one of the main cytoskeletal structures consisting of the cellular contractile apparatus: vascular smooth muscle cells adhered well on the rectangular micro-patterned areas and their actin filaments aligned almost parallel to the major direction of the rectangular areas. The cells were then exposed to cyclic stretch stimulation. Alignment of actin filaments of these micro-patterned cells remained almost unchanged even after 24-h cyclic stretch stimulation. Total fluorescent intensity of actin filaments significantly more increased after cyclic stretch in the micro-patterned cells than in the unpatterned cells. These results indicate that expression level of actin filaments of vascular smooth muscle cells increase more remarkably when they are cyclically stretched in their major axis direction. The cell micro-patterning technique developed in this study would be useful in

mechanical regulation of many cellular functions in many situations.

1. はじめに(研究背景と目的)

血管平滑筋細胞は、正常な血管壁内では収縮要素に富んだ「収縮型」細胞と呼ばれ、血管組織内であまり増殖することなく、その収縮能により血管径を調節している。しかし、損傷を修復するような状況や人工的な培養環境に曝すと、収縮能を著しく低下させ、増殖・運動能、物質合成に富んだ「合成型」細胞へ変化する。動脈硬化などの疾患部位でも合成型細胞が確認され、血管壁の健全性の維持には合成型細胞への変化を阻止することが重要と言える。これまでも、動脈硬化進展メカニズムの解明や、人工血管開発などの観点から、VEGFやTGF- β などの細胞成長因子や形質転換因子といった生化学因子が、細胞の機能に与える影響を調べる研究が数多く進められてきた^(1,2)。

しかし、生化学的因子だけでなく、細胞の形状や細胞に加わる力の変化が平滑筋細胞の収縮特性に大きく影響する可能性が考えられる。なぜならば、生体内の収縮型平滑筋細胞は独特の紡錘型形状を有しながら、血管円周方向に沿って配向しており、合成型の細胞と全く異なる形態をしているからである(図1)。また、拍動に伴い血管壁が円周方向に伸展されることから、常に繰返し引張負荷に曝されており、血圧上昇によって血管壁内の張力が増加すると、その力の変化を察知して、血管壁厚を増加させると考えられている^(3,4)。これらのことから、平滑筋細胞は、細胞に加わる力の大きさや方向の変化を感知し、刻一刻と内部構造を作り変えながら機能を変化させる可能性があるが、この点についてはほとんど明らかとなっていない。

そこで、本研究では、細胞の形状や配列状態、細胞に加わる力の大きさ・方向が平滑筋細胞の収縮特性に与える影響を調べることにした。このために、まず、シリコン弾性膜の特定領域のみの細胞接着性を向上させるマイクロパターンニング技術を確立した。そして、これを用いてシリコン弾性膜上で、形状や配向状態を制御しつつ培養した血管平滑筋細胞に対し、生体内を模擬した力学刺激を負荷した際の、細胞の形態変化を調べた。さらに併せて、細胞収縮機構を担っている細胞骨格であるアクチンフィラメントの分布様態と発現量の変化を調査した。

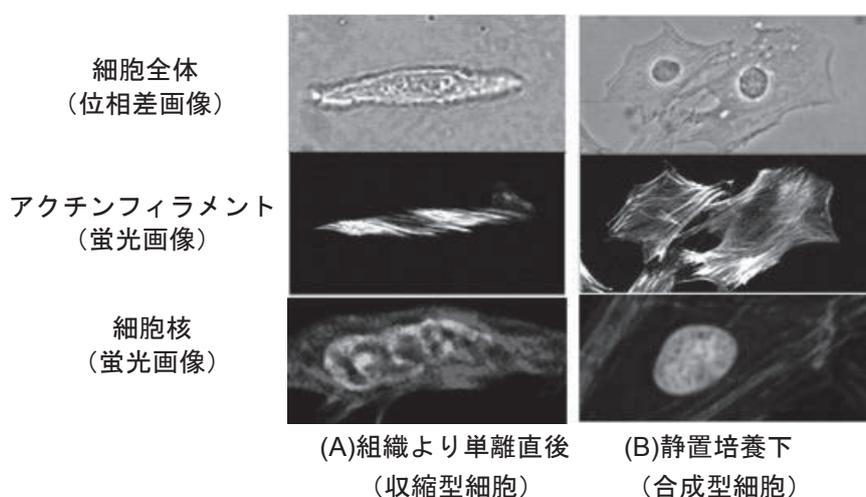


図1 環境による血管平滑筋細胞の形状(上)と内部構造(中、下)の違い。血管から単離した直後の細胞内では、アクチンフィラメントが細胞の長軸方向に規則正しく並んでおり(A-中)、細胞核も細長い形である(A-下)。人工的に細胞培養を続けて、増殖性が高くなると、アクチンフィラメントの向きがバラバラになり(B-中)、細胞核も丸い形態になる(B-下)。

2. 実験方法

2.1 細胞のマイクロパターニング

本研究では、細胞に繰返引張を負荷しながら培養するために、培養基板としてシリコン弾性膜 (Sylgard184, DowCorning) を用いることとした。数10～数100 μm の微細なスリットを有する透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察用グリッド (Ni 100/400, Ni 250, Ni H 400, VECO; Ni 2000, Agar) を、シリコンゴム製の繰返引張負荷チャンバ底面のシリコン膜に貼り付けた (図2)。細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンの溶液 (F1141-5MG, Sigma) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と、蛍光標識されたフィブリノーゲン溶液 (Fibrinogen Alexa 546 conjugate, Molecular Probes) を1:1の割合で混合した溶液をグリッド表面に滴下した。室温で1時間インキュベートした後、溶液を吸い取り乾燥後、グリッドを剥がした。このようにして、シリコン膜上にTEM観察用グリッドのスリット形状に沿ってフィブロネクチンをコートした細胞接着領域を簡単にパターン化して作製できることを見出した。

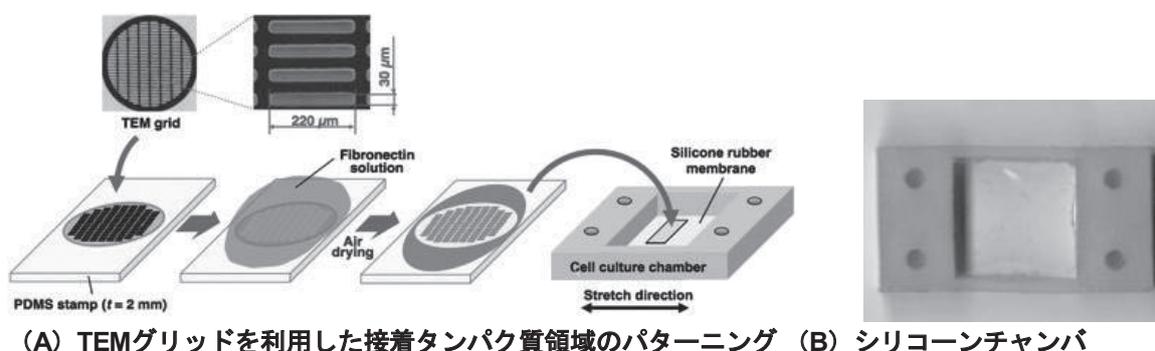


図2 本研究で確立したシリコン弾性膜への細胞接着領域のマイクロパターニング技術。微細加工した高価なマイクロスタンプなどを使用することなく、簡単に接着タンパク質をパターン化してシリコン膜上に塗布できる。

2.2 マイクロパターニングした細胞への繰返引張負荷

本研究では、生体内における拍動による血管壁の繰返伸展を考慮し、周波数1Hz、伸展率5%の繰返引張刺激を細胞に対して負荷した。2.1にて長方形にパターニング処理を施したシリコン膜上にブタ胸大動脈由来培養血管平滑筋細胞 (継代数2-4) を播種し、10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地中で培養した。24時間培養後、シリコン弾性膜を細胞培養伸展刺激負荷装置 (NS-300、ストレックス) に取付け、繰返引張を24時間負荷した。この際に、長方形にパターニングした細胞の長手方向あるいは幅方向に引張刺激を負荷した。試験後、細胞を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、Alexa Fluor 546 Phalloidinで細胞内のアクチンフィラメントを蛍光染色した。試料を蛍光顕微鏡ステージ上に設置し、高感度デジタルCCDカメラ (DP70, Olympus) にて細胞の位相差顕微鏡画像とアクチンフィラメント蛍光画像を撮影した。なお、蛍光画像からアクチンフィラメントの発現量を定量評価するために、撮影時の励起光強度、NDフィルタの設定、露光時間等の条件を一定にした。

3. 結果と考察

3.1 マイクロパターニング領域の作製と細胞形状制御

代表例として、様々なスリット形状のTEM観察用グリッドを用いて、シリコン膜上に作製し

た接着タンパク質のパターニング領域の様子とその大きさを示す(図3)。このように、長方形や正方形、六角形の微細な細胞接着領域を形成することができた。ただし、スリットが小さいほど、形状をうまく制御できた領域の割合が減少し、(図3C)では半分以下の歩留まりとなった。

次に接着領域をパターニングしたシリコン膜上で培養した血管平滑筋細胞の形態を観察した(図4)。通常、パターニングされていない基板上的細胞は様々な形状であり、一定の配向をもたないが(図4A)、パターニングされた表面の細胞は、マスクのスリットに沿った形状に制御することができた。正方形にパターニングした細胞では、細胞内のアクチンフィラメントが4角を基点として交差するように配列している様子が見られた(図4C)が、長方形にパターニングした細胞では、細胞長軸方向に沿ってアクチンフィラメントが太い束(ストレスファイバ)を形成し、ちょうど血管組織内の細胞と同様に、ほぼ規則正しく配列している様子が観察された(図4B)。

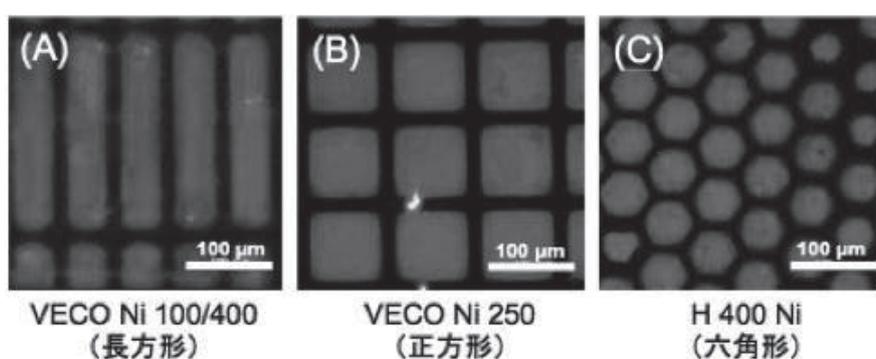


図3 マイクロパターン化した細胞接着領域。ここでは、接着タンパク質を予め蛍光色素で標識して可視化している。

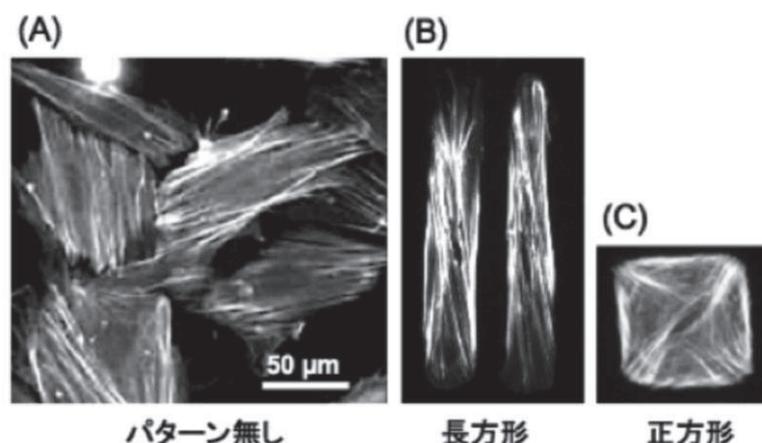


図4 血管平滑筋細胞内のアクチンフィラメントの分布。細胞骨格であるアクチンフィラメント(収縮タンパク質線維)は細胞の収縮要素を構成し、筋細胞などの収縮力を発揮する源となっている。細胞の形態を制御すると、内部のアクチンフィラメントの構造や配置を変化させることができる。

3.2 形状・配向を制御した血管平滑筋細胞への繰返し引張り刺激負荷

長方形マスクによるパターニング処理によって形状・配向を揃えた細胞、ならびにパターニングをせずに配向をランダムな状態にした細胞に繰返し引張り刺激(伸展率5%、負荷時間24時間)を加

え、その後の細胞形態とアクチンフィラメントの形態を観察した。パターンング処理を施さなかった細胞は引張方向に対して、引張りを避けるようにほぼ垂直方向あるいは若干斜め方向に伸長・配向し、アクチンフィラメントも細胞の長軸方向に配向していた(図5 A)。一方、パターンング処理によって形状を制御した細胞に対して、細胞の長軸方向に繰返し引張を負荷した場合は、アクチンフィラメントも引張方向とほぼ平行な方向を維持していた(図5 B)。

培養血管平滑筋細胞に繰返し引張刺激を負荷した場合、細胞はひずみが最小となる方向に配向することが報告されている。この応答は、ひずみの大きい方向に配向しているアクチンフィラメントの脱重合が促進され、ひずみの小さい方向に形成するアクチンフィラメントの割合が高くなることに起因すると推測されている⁶⁾。実際に本研究においても、パターンングを施さない場合は、細胞が引張りを避けるかのように、引張方向に対し直行するよう向きを変え、アクチンフィラメントも同様の方向に配向していた(図5 A)。これに対し、本研究で細胞の長軸方向と繰返し引張の方向を一致させた場合、細胞の長軸方向に走向したアクチンフィラメントは常に大きな変形を受けているにもかかわらず、その配向性を維持していた(図5 B)。このことから、アクチンフィラメントの配向は細胞の形状に大きく依存し、細胞の長軸方向に優先的に配向すると考えられる。

次に、それぞれの試料について個々の細胞内のアクチンフィラメントの総蛍光輝度を評価した(図5 C)。パターンング処理の有無に関わらず、繰返し引張刺激を負荷することによって細胞内のアクチンフィラメントの発現量が有意に増加した。一方の、繰返し引張刺激負荷後の試料に注目すると、パターンング処理を施した細胞の方が、アクチンフィラメントの発現量が有意に高くなった(図5 C、*印)。すなわち、長方形に制御した血管平滑筋細胞に対して、細胞の長軸方向に力学刺激を持続的に負荷することによって、よりも高いレベルで細胞内のアクチンフィラメントの発現量を増加させることができた。近年の研究から、繰返し引張刺激に曝すと、細胞内のアクチンフィラメントは自身のひずみエネルギーが最小となるように構造変化をすると考えられている^{6,7)}。このような構造変化は、細胞が力学刺激を受けながら増殖するためのエネルギーを保持するために、よ

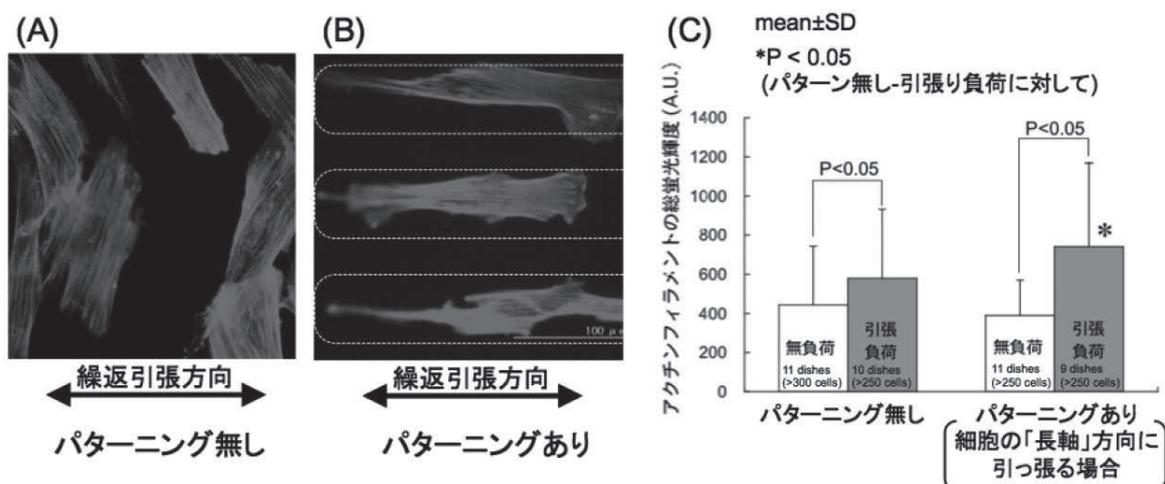


図5 繰返し引張負荷後の血管平滑筋細胞内のアクチンフィラメント。パターンングを施していない細胞では、引張方向とほぼ垂直方向に再配列するが(A)、パターンング処理した細胞では引張負荷後も引張方向と平行に太いアクチンフィラメントの束が維持されている(B) (図中の白点線内がパターンングした細胞接着領域)。アクチンフィラメントの総蛍光輝度(細胞内における発現量の指標)(C)。

り安定な状態を保とうとする一種の適応応答と考えることができる。しかし、今回の細胞のマイクロパターンング技術を用いて、引張り方向とアクチンフィラメントの方向を揃えることで、力学刺激環境下で持続的にアクチンフィラメントに高いひずみエネルギーが加わり、それが一種のストレスとして作用して、細胞が増殖するためのエネルギーが強制的に抑制され、それによって本来の筋細胞が有する収縮性が向上できるのかもしれない。

以上のように、本研究では、独自の細胞マイクロパターンング技術を確立し、細胞の形状や配列状態を揃えながら、生体内環境を模擬した力学刺激を負荷できる系を構築した。血管平滑筋細胞の向きを一様に揃えながら、それらの長軸方向に持続的に繰返引張変形を加えることで、細胞収縮機構を担うアクチンフィラメントの発現量を効率的に上昇できることを見出した。このような技術は、今後、生体内環境を考慮して効率良く再生組織を構築する上でも有効な手段と考えられる。

謝辞

本研究を遂行する上でご協力をいただきました、名古屋工業大学 大学院工学研究科 機能工学専攻 松本健郎教授ならびに名古屋工業大学バイオメカニクス研究室の学生の方々に、記して感謝の意を表します。

なお、本助成研究者は、平成26年4月より茨城大学工学部 知能システム工学科へ異動しました。本助成研究を基盤としてさらなる研究への展開を目指す所存であります。

参考文献

- 1) Basson M.D., et al., *Am. J. Surg.*, 190, 780-786, (2005).
- 2) Augustin H.G. et al., *J. Cell Sci.* 118, 771-780, (2005).
- 3) Wolinsky, H., *Circ. Res.*, 30 (3), 301-9, (1972).
- 4) Matsumoto, T., and Hayashi, K., *J. Biomech. Eng.*, 116 (3), 278-83, (1994).
- 5) Takemasa T., et al., *Eur. J. Cell. Biol.* 77, 91-99 (1998).
- 6) Nagayama K., et al., *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 302, 1469-1478, (2012).
- 7) Kaunas R., et al., *Cell Health and Cytoskeleton*, 3 13-22, (2013).

研究成果

A) 論文発表

- 1) Kazuaki NAGAYAMA, Sho YAMAZAKI, Yuki YAHIRO, and Takeo MATSUMOTO, Estimation of the mechanical connection between apical stress fibers and the nucleus in vascular smooth muscle cells cultured on a substrate, *Journal of Biomechanics*, 47, 1422-1429, 2014.
- 2) 矢口俊之, 武澤健司, 長山和亮, 益田博之, 松本健郎, ヒト橈骨動脈の力学特性の非侵襲計測法の確立と力学特性に対する平滑筋収縮状態の影響評価, *ライフサポート*, 25-4, 143-150, 2013
- 3) Kazuaki NAGAYAMA, Yuki YAHIRO, and Takeo MATSUMOTO, Apical and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of the nucleus in smooth muscle cells cultured on a substrate, *Cellular and Molecular Bioengineering*, 6-4, 473-481, 2013.

- 4) Yusuke HARA, Kazuaki NAGAYAMA, Takamasa S. YAMAMOTO, Takeo Matsumoto^c, Makoto SUZUKI, Naoto UENO, Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation, *Developmental Biology*, 382, 482–495, 2013.
- 5) Toshihiro BANJO, Kota Y. MIYASAKA, Kazuaki NAGAYAMA, Toshihiko OGURA et al., Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21, *Nature Communications*, 4, 1978, 2013 (DOI:10.1038/ncomms2978)

B) 学会発表

- 1) Kazuaki NAGAYAMA, Yuki YAHIRO, Sho YAMAZAKI, Mitsuhiro UKIKI, and Takeo MATSUMOTO: On the Roles of Actin Stress Fibers on the Mechanical Regulation of Nucleus in Adherent Cells, *The 15th International Conference on Biomedical Engineering. (ICBME 2013)*, Singapore , 2013.12. 5-7.
- 2) Kazuaki NAGAYAMA Takuya INOUE, Yasuhiro HAMADA, Shukei SUGITA, and Takeo MATSUMOTO: Direct application of mechanical stimuli to cell adhesion sites using magnetic-driven micropillar substrates, *The 15th International Conference on Biomedical Engineering. (ICBME 2013)*, Singapore, 2013.12. 5-7.
- 3) Takeo MATSUMOTO, Yohei UNO, Kazuaki NAGAYAMA: Heterogeneity in the intramural mechanical environment of the aorta: Estimation of stress applied to elastic laminae in a physiological state, *The 15th International Conference on Biomedical Engineering. (ICBME 2013)*, Singapore, 2013.12. 5-7.
- 4) Shintaro IJIMA, Sakiko NAKAMURA, Hideo YOKOTA, Kazuaki NAGAYAMA, *Takeo MATSUMOTO: Three-dimensional observation of microscopic structure of the aortas reveals their heterogeneous deformation, *The 15th International Conference on Biomedical Engineering. (ICBME 2013)*, Singapore, 2013.12. 5-7.
- 5) Kazuaki NAGAYAMA, Yuki YAHIRO, Mitsuhiro UKIKI, and Takeo MATSUMOTO: Actin cap fibers and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of cell nucleus, *The 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics (APCB2013)*, Seoul Korea, 2013.8 29-31.
- 6) Takeo MATSUMOTO, Akihisa FUKUNAGA, Kengo NARITA, Yohei UNO, Kazuaki NAGAYAMA: Effects of Microscopic Heterogeneity on the Mechanical Behavior of the Elastic Arteries, *The 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics (APCB2013)*, Seoul Korea, 2013.8 29-31.
- 7) Kazuaki NAGAYAMA, Akifumi ADACHI, Keisuke SASASHIMA, and Takeo MATSUMOTO: Laser Nano-Dissection for Analysis of Cellular Mechanotransduction: Direct Force Transmission from Actin Stress Fibers to Nucleus: Tensional Homeostasis of Vascular Smooth Muscle Cells, *the 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Osaka, Japan , 2013. 7. 3-7. 【依頼講演】
- 8) Takeo MATSUMOTO, Akihisa FUKUNAGA, Kengo NARITA, Yohei UNO, Kazuaki NAGAYAMA: Heterogeneity in Microscopic Residual Stress in the Aortic Wall, *2013 SEM*

- Annual Conference & Exposition on Experimental & Applied Mechanics*, Lombard, IL, USA, 2013.
6. 3-5.
- 9) 岩田誠, *長山和亮, 松本健郎: 「大動脈平滑筋細胞の継代培養に伴う細胞核の3次元形態と力学特性の変化」, 日本機械学会 第26回バイオエンジニアリング講演会, 仙台, 2014.1.11-12.
 - 10) 長山和亮: 「メカノトランスダクションの解明に向けた細胞バイオメカニクス: 焦点接着斑・細胞骨格・核の力学的相互作用の解析」, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.4-5 【招待講演】
 - 11) Kazuaki NAGAYAMA, Yuki YAHIRO, and Takeo MATSUMOTO: 「Actin cap fibers and basal stress fibers have different roles in mechanical regulation of nucleus in vascular smooth muscle cells」, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 神戸, 2013.10, 27-30.
 - 12) 長山和亮, 児玉文基, 松本健郎: 「骨芽細胞様細胞Saos-2の石灰化過程における核内外の力学場の変化」, 日本機械学会 2013年度年次大会, 岡山, 2013.9.9-11.