

# マトリックスデバイスによる細胞の 力学伝達経路の解明

大橋 俊朗

Study of Intracellular Stress Transfer Using Microfabricated Substrate

Toshiro OHASHI

Microfabricated substrates with array of micropillars were used to estimate traction forces of smooth muscle cells (SMCs), particularly exploring how cytoskeletal structures contribute to traction forces. SMCs isolated from bovine aortas were transfected with fluorescence proteins to visualize cell microstructures and then plated on a micropatterned elastomer substrate with arrays of micropillars. Deflection of the micropillars was measured to estimate traction forces. Cell spreading on the substrates produced deflection of the micropillars and was associated with organization of stress fibers of actin filaments. Traction forces varied considerably among cells, showing an average of 11.8 nN. After disruption of microtubules with nocodazole, the traction forces increased by an average of 3.3 nN and there was no detectable change in distribution of actin filaments. In contrast, the disruption of intermediate filaments with acrylamide produced a transient increase in the traction forces, followed by a decrease associated with reorganization of actin filaments. These changes in traction forces appeared to be closely related with contraction forces of stress fibers. This study suggests that contraction forces of stress fibers are mainly involved in cellular traction forces and both microtubules and intermediate filaments possibly contribute to contraction forces of stress fibers.

## 1. はじめに

細胞は細胞外基質と接着して形態および生理機能を維持している。細胞の足となる焦点接着斑は細胞外マトリックスと結合しており、他方、細胞内では細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントに連結している。細胞は基質に接着すると焦点接着斑を介して基質を細胞中心方向に引っ張る牽引力を発生させる。この牽引力は細胞の形態や運動に密接に関係するため牽引力を測定することは細胞の生理を理解する上で重要である。これまで、細胞の牽引力測定は蛍光ビーズを埋め込んだ弾性膜<sup>1)</sup>、力センサを装備した微小カンチレバー<sup>2)</sup>、マイクロピラーのアレイ<sup>3)</sup>を用いて行われてきた。特にマイクロピラーを用いた方法は牽引力の方向と大きさを直接的に求めることができる上、加工面においても他の方法よりも利点が多い。

細胞は力学環境の変化に対してその大きさと方向を感じ形態を変化させる。このとき力学刺激は細胞内を伝播していくと予想されるが、その主たる媒体は細胞骨格であると考えられる。しかしながら、細胞骨格の力学伝

達機構における役割は十分に解明されていない。一方、細胞内の力学バランスを説明するために Ingber<sup>4)</sup>はアクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメントの3種類の細胞骨格から構成されるテンセグリティモデルを提案している (Fig. 1)。テンセグリティモデルではアクチンフィラメントと中間径フィラメントによって細胞内に引っ張り力が生まれ、微小管によって圧縮力を担っていると考えられている。さらに、こうした細胞内力学要素

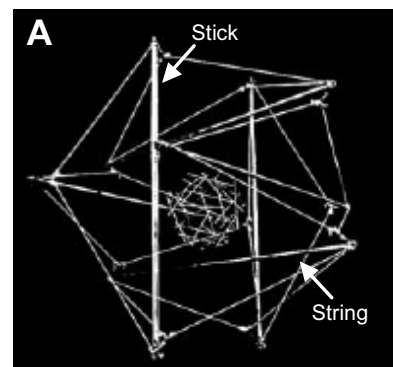


Fig. 1 Tensegrity model. Sticks, microtubules; Strings, microfilaments or intermediate filaments.

に加えて細胞外マトリックスも力学バランスに寄与していると考えられている。

そこで本研究では、微細加工技術を用いてマイクロピラーを有する基質を作製し平滑筋細胞の牽引力を測定することを目的とした。マイクロピラーのたわみ量とバネ定数から牽引力を算出する方法である。特に微小管、中間径フィラメントを薬剤によって破壊し細胞内の力学バランスについて検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 マイクロピラー基質の作製

牽引力測定用の細胞培養基質膜は微細加工によりデザインを形成したシリコンウェハを型として PDMS (Polydimethylsiloxane) で型取りをすることによって製作した。作製プロトコルを Fig. 2 に示す。まず、基質膜用のデザインを起こし、レチクルを製作した。シリコンウェハにポジレジストをコートし (a)、レチクルのデザインを露光転写した (b)。O<sub>2</sub> ライトアッシングによりウェハ表面をクリーニングした後、RIE (Reactive Ion Etching) を行い、ウェハをエッチングした (c)。エッチング終了後、O<sub>2</sub> アッシングおよび硫酸過水処理によりレジストを剥離し型を完成させた (d)。次に、PDMS の離型性をよくするために、ウェハをフッ化シラン処理した。真空中で型に PDMS を流し込んだ後、大気を解放して大気圧で PDMS を型の奥まで押し込んだ。PDMS の上にカバーガラスを載せた後、PDMS を加温硬化させた (100°C, 1 h) (e)。硬化後、型からカバーガラスごと PDMS を剥がしポスト状の基質膜を形成した (f)。作製したマイクロピラーの電子顕微鏡写真を Fig. 3 に示す。ピラーのサイズはおよそ直径 3 μm、高さ 10 μm、中心間距離 8 μm であった。マイクロピラー基質をガラスベースディッシュ底面に貼り付けて細胞培養実験に用いた。

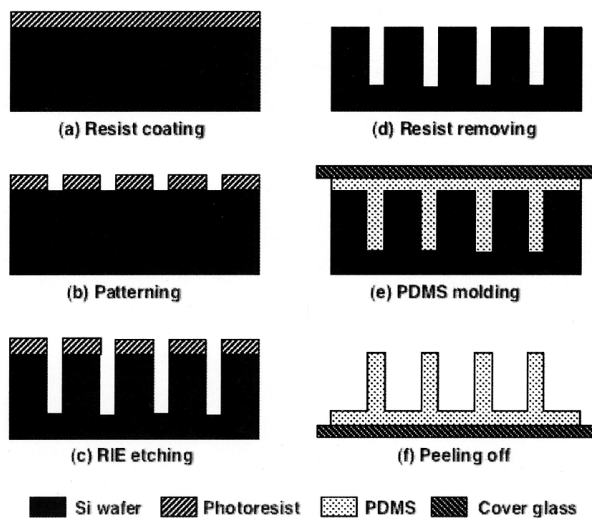


Fig. 2 Fabrication process of arrays of micropillar

### 2.2 細胞培養および蛍光染色

試料としてウシ大動脈由来平滑筋細胞の継代数 4 代目から 9 代目を用いた。培養液は DMEM+10%FBS を用いた。ディッシュは細胞を播種する前に紫外線で一晚滅菌した。細胞の接着性を向上させるためマイクロピラーを 0.1%ゼラチン水溶液でコートした後に細胞を播種した。

アクチンフィラメントおよび焦点接着斑を観察するため GFP-actin と RFP-FAT (Focal Adhesion Targeting) domain をリポソーム法により細胞に遺伝子導入した。GFP-actin プラスミドベクターと RFP-FAT domain プラスミドベクターの複合体溶液を予め 40~50%コンフルエントになるまで培養していた細胞に加えインキュベータ内で培養した。2 日後にマイクロピラーに細胞を播種し直し、翌日牽引力測定実験を行った。

### 2.3 牽引力測定方法

牽引力測定実験は倒立型蛍光顕微鏡下で行った。マイクロピラーに細胞が接着している状態で細胞の蛍光画像とマイクロピラーの透過光画像を取得した。また、マイクロピラーのバネ定数はクロスキャリブレーション法により測定した。

細胞が牽引力を発生している様子を模式的に Fig. 4 に示す。細胞の牽引力によってマイクロピラーは力の方向にたわむ。細胞が接着する前後のマイクロピラーの位置変化からマイクロピラーのたわみを算出し、マイクロピラーのバネ定数と乗ずることで細胞の牽引力を算出した。マイクロピラーの位置は画像解析ソフトウェア NIH Image 1.63 を用いてポストの透過光画像から計測した。

### 2.4 細胞骨格の破壊実験

微小管を破壊するために 10 μg/ml ノコダゾールを投与した。投与 5 分後に微小管は破壊されたことが確認されたため画像を取得した。また、中間径フィラメントを破壊するために 5 mM アクリルアミドを投与した。0.5 時間後および 1 時間毎に 5 時間にわたって画像を取得した。投与 3 時間後に中間径フィラメントは十分に破壊されていた。

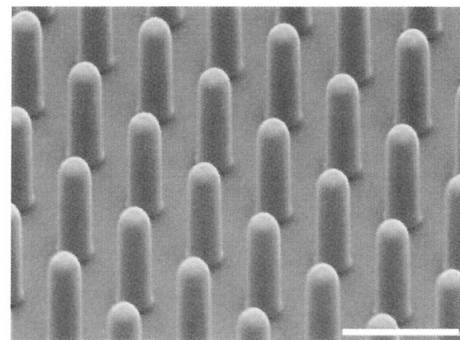


Fig. 3 Scanning electron microscope image of micropillar array. Bar = 10 μm.

### 3. 結果および考察

マイクロピラー上に播種した平滑筋細胞の蛍光画像と牽引力のベクトル図の一例を Fig. 5 に示す。GFP-actin の蛍光像より (a), 特に細胞の辺縁部でストレスファイバの発達が顕著であることがわかる。RFP-FAT domain の発現より (b), 焦点接着斑はマイクロピラーの上面で斑点状に強く発現していることが確認された。(a) と (b) を重ね合わせた画像が (c) である。焦点接着斑を連結するようにストレスファイバは発達していた。細胞の牽引力によってマイクロピラーがたわんでいる様子が確認できる (d)。細胞の牽引力は細胞の周辺部で大きく、細胞の中心部では小さい値となっていた。牽引力の方向はストレスファイバの方向と一致する傾向が見られた。牽引力の平均値は 11.8 nN であり最大値は 81.3 nN であった。

ノコダゾール投与前後における牽引力のヒストグラムを Fig. 6 に示す。ノコダゾール投与後、微小管が破壊されることによって牽引力は明らかに増加した。(a) と (b) を比較すると、微小管破壊前に全体の約 19% を占めていた 5 nN 以下の小さな牽引力の割合は微小管破壊後では約 7% に減少し、全体的に牽引力が増加していることが分かる。微小管破壊前の牽引力の平均値 20.0 nN, 最大値 66.7 nN であるのに対し、微小管破壊後は平均値 27.0 nN, 最大値 69.5 nN であった。(c) の各ポストの牽引力の増分値のヒストグラムを見ると、全体の約 91% のポストで牽引力が増加し、最大で 24.9 nN の増加が見られた。牽引力ベクトルの方向には微小管破壊前後において大きな変化は見られなかった。また、ストレスファイバの分布や形状に明らかな変化は見られなかった。

アクリルアミド投与前後における牽引力のヒストグラムを Fig. 7 に示す。アクリルアミド投与 0.5 時間後には牽引力は明らかに増加した。牽引力の増加は細胞周辺部で顕著であった。その後、時間経過とともに徐々に牽引力が低下していき、5 時間後には約 90% のポストで 5 nN 以下の小さな牽引力となっていた。牽引力の方向は投与前後で明らかな変化は見られなかった。アクリルアミド投与後、0.5 時間後まではストレスファイバの分布に明らかな変化は確認できなかったが、1 時間後以降、アクチンフィラメントの消失あるいは分裂が確認され、5 時間後においてストレスファイバの本数は顕著に減少していた。

本研究において、過去の報告例と同様に微小管を破壊すると細胞の発生する牽引力は増加した。Wang ら<sup>5)</sup>は細胞の力学モデルであるテンセグリティモデルに基づいてこの現象を説明している。彼らは細胞内では微小管が

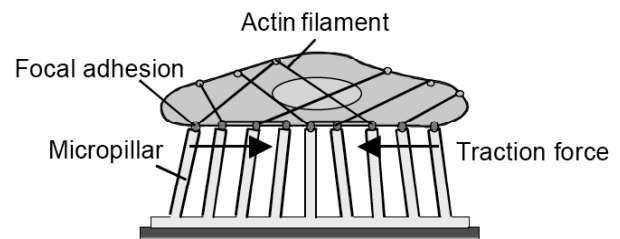


Fig. 4 Schematic diagram of cell adhesion on the micropillar array.

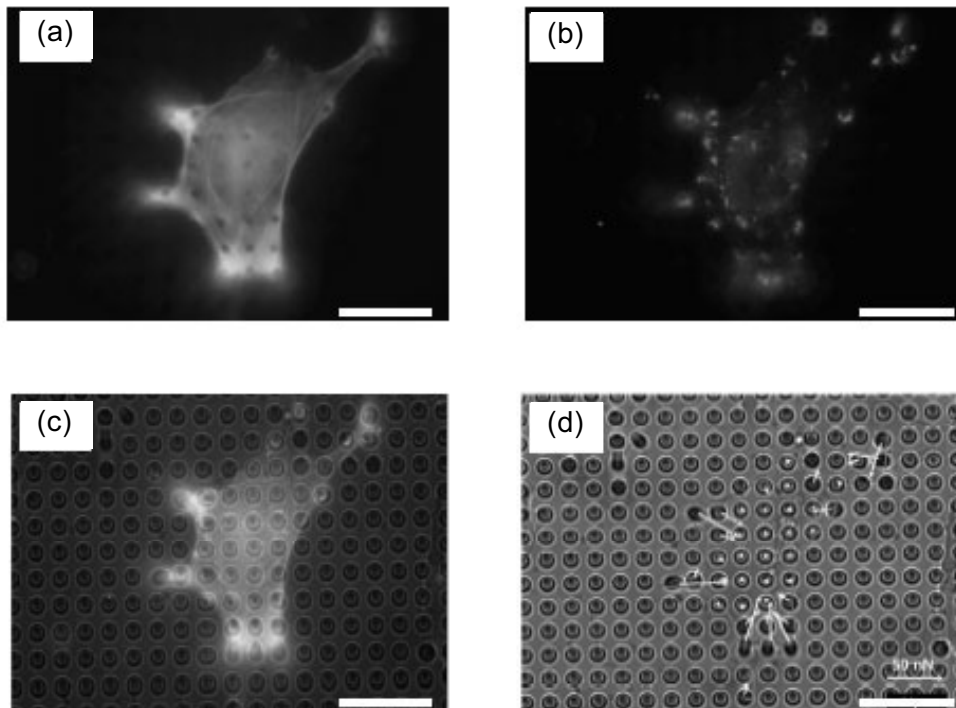


Fig. 5 Fluorescence images of GFP-actin (a), RFP-FAT domain (b), overlay image of (a) and (b) (c) and traction forces estimated by deflection of micropillars (d). In (d), arrows show direction and magnitude of traction forces. Bar = 30  $\mu$ m.

圧縮要素として働き、微小管を破壊することによってその圧縮要素がなくなるために基質に及ぼす牽引力が増加するとしている。本研究の結果より微小管破壊前後でストレスファイバの分布状態に明らかな変化は見られなかったことからストレスファイバの新たな形成あるいは消失によって牽引力に変化が生じているとは考えられない。すなわち微小管破壊時の牽引力増加は微小管破壊によってストレスファイバに発生する張力が増加することに起因すると考えられる。Strege ら<sup>6)</sup>は平滑筋細胞に 5 mM のアクリルアミド投与 0.5 時間後から中間径フィラメントの破壊が始まることを報告した。本研究において、アクリルアミド投与 1 時間後に中間径フィラメントが部分的に破壊され始めたことによって細胞内の力学バランスが崩れ、その力学バランスの崩壊による二次的な作用によってストレスファイバが破壊されたことが考えられる。

#### 4. おわりに

本研究では微細加工技術を利用して細胞牽引力測定用基質を製作した。製作した基質を用いて平滑筋細胞の牽引力測定を行った。同一細胞の微小管および中間径フィラメント破壊前後での牽引力を測定するとともにアクチンフィラメントの観察を行い、細胞牽引力の発生メカニズムの検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. 平滑筋細胞の牽引力の平均値は 11.8 nN であり、線維芽細胞の牽引力と同程度であった。また、牽引力の発生方向とストレスファイバ分布には相関が示唆された。
2. 微小管を破壊すると牽引力の方向は変化せずに牽引力値は平均 3.3 nN 増加した。微小管破壊前後でアクチンフィラメントの分布に明らかな変化は観察されなかった。微小管の分布状態と各ポストでの牽引力の変化から微小管破壊時の牽引力の増加はストレスファイバの発生する収縮力が増加することによるものと推測された。
3. 中間径フィラメントを破壊すると最初牽引力が増加し、その後時間経過とともに牽引力が減少した。牽引力の増加時にはアクチンフィラメントの変化は観察されなかったが、牽引力の低下時にはアクチンフィラメントの減少が観察された。中間径フィラメントの分布状態と各ポストでの牽引力の変化から中間径フィラメント破壊時における初期の牽引力増加はストレスファイバの発生する収縮力が増加することによるものと推測された。また、その後の牽引力の減少はアクチンフィラメントの破壊によるものと推測された。

以上のことから微小管や中間径フィラメントはそれ自身が基質に対して直接的に牽引力を作用させているわけではなく、ストレスファイバの収縮機構に対して影響を及ぼしている可能性が考えられた。今後は微小管や中

間径フィラメント破壊時のストレスファイバの収縮力の変化を測定し、その役割を検証する必要がある。

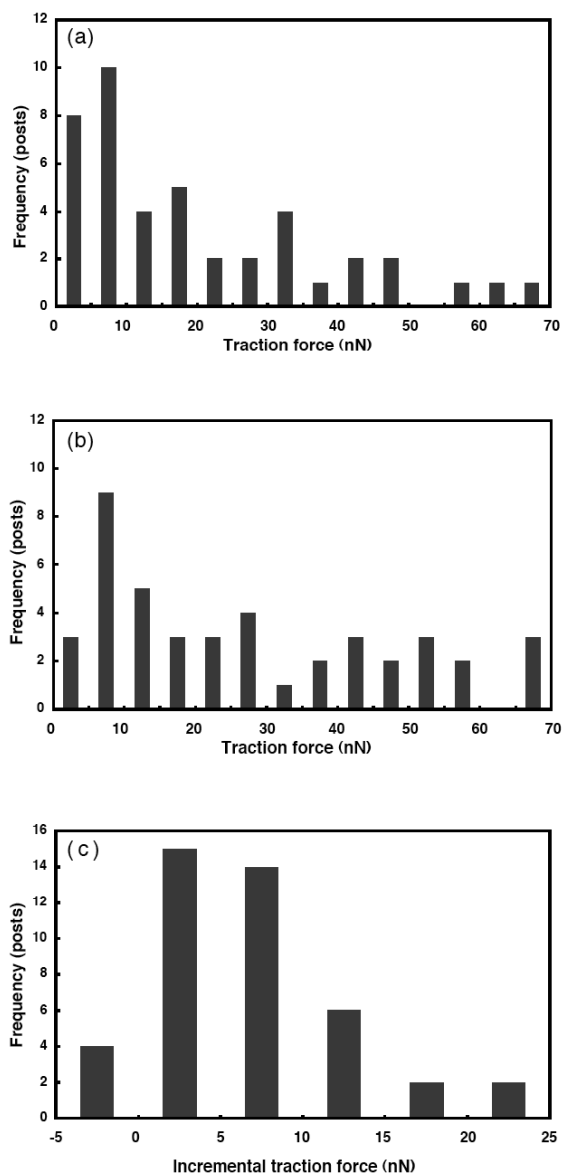


Fig. 6 Histograms of traction forces before (a) and after (b) treatment with nocodazole. (c) Increment from (a) to (b). Traction forces increased from 20.0 nN to 27.0 nN in average after the treatment.

#### 引用文献

- 1) Munevar, S., Wang, Y. and Dembo, M., *Biophys. J.*, **80**, 2001, 1744-1757.
- 2) Galbraith, C. G. and Sheetz, M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 1997, 9114-9118.
- 3) Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K., Chen, C.S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 2003, 1484-1489.
- 4) Ingber, D.E., *J. Cell Science*, **116**, 2003, 1157-1173.

- 5) Wang, N., Naruse, K., Stamenovic, D., Fredberg, J.J., Mijailovich, S.M., Tolic-Norrelykke, I.M., Polte, T., Mannix, R., Ingber, D.E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 2001.7765-7770.
- 6) Strega, P.R., Holm, A.N., Rich, A., Miller, S.M., Ou, Y., Sarr, M.G., Farrugia, A.G., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **284**, 2003, C60-C66.

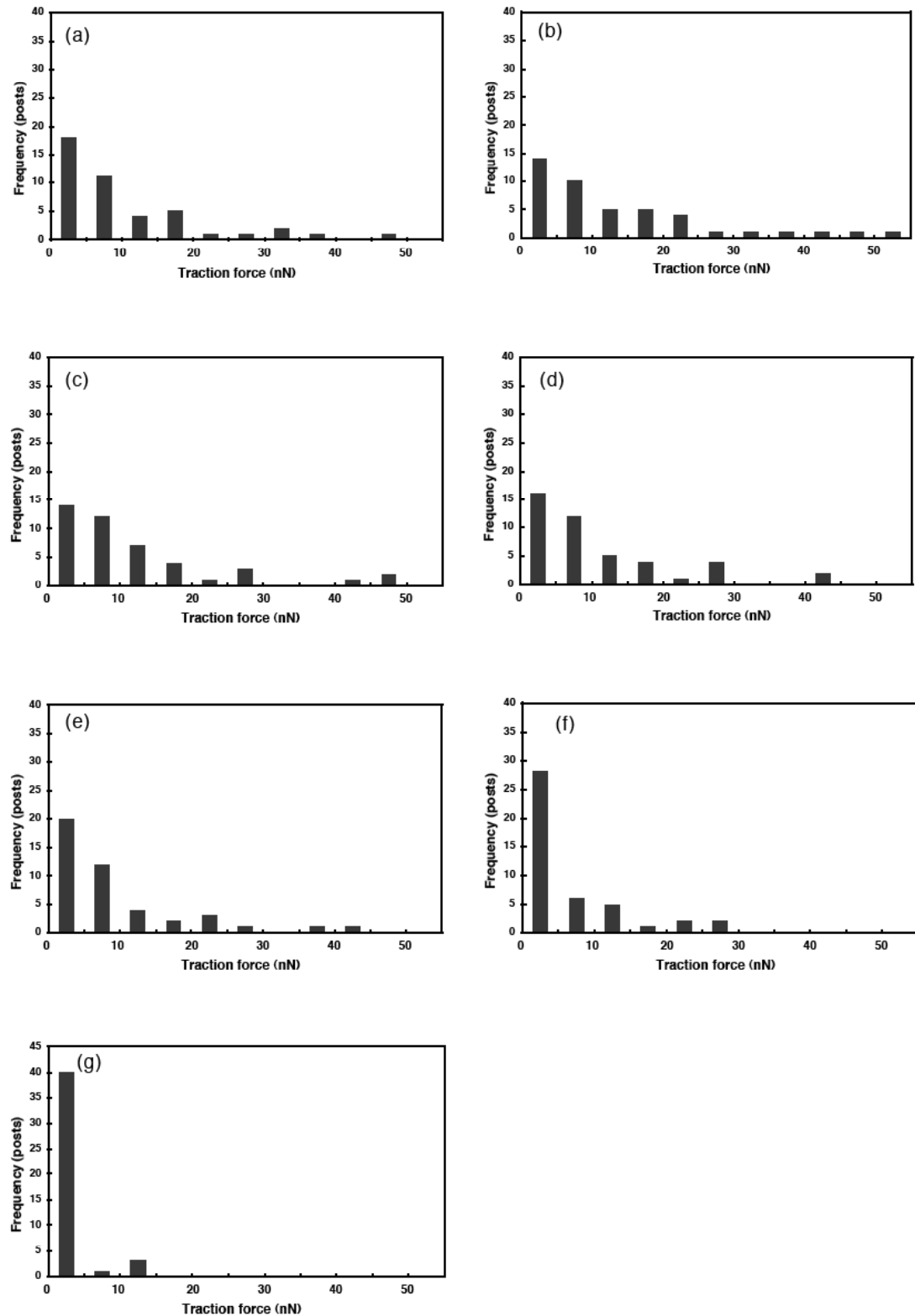


Fig. 7 Histograms of traction forces before treatment with acrylamide (a), and at 0.5 h (b), 1 h (c), 2 h (d), 3 h (e), 4 h (f) and 5 h (g) after the treatment. Traction forces increased at 0.5 h followed by a decrease over 5 h.