B337

コラーゲン線維の配向がもたらす 上皮細胞の集団運動

○伊良原 史子、芳賀 永、川端 和重 (北大・院理・生物科学)

上皮細胞は血管や消化管の内壁および体表面上皮組織とよばれるシート状の構造を作る。創傷の治癒過程や胚の発生過程において、細胞は極性をもった集団運動をしめすことが知られているが、そのメカニズムについては未解明な点が多い。細胞が組織を形成するにあたり、3次元培養担体、化学的因子、物理的因子という3つの因子の大きな影響を受けると考えられている。我々はこの中でも、基盤のかたさという物理的因子に着目して研究を行ったところ、やわらかいコラーゲンゲル基盤上で培養された上皮細胞が集団で一方向に運動することを見出した。この現象を調べることによって、治癒や発生過程において必須の集団運動が起こる要因を明らかにすることができると考えている。

本研究では、コラーゲンゲル基盤上で培養したMDCK細胞が増殖・運動し上皮組織を形成する過程を、光学顕微鏡下で長時間観察した。さらに、集団運動の時間発展を定量的に解析するために、各細胞の運動速度に関して平均自乗変位、自己相関、空間相関の時間変化を調べた。

この結果、あらかじめコラーゲン線維が強く配向したゲル上で培養した細胞は、細胞数が少なくとも個々の細胞が線維の配向にそった運動を示すのに対し、線維の配向が弱いゲル上においては、細胞数が増加することで初めてゲルの配向方向に沿った集団運動を示すことが明らかとなった。以上のことから、細胞が基盤に応力を与えることでゲル基盤に異方的なひずみが生じ、結果としてゲルの異方的なひずみに沿った細胞運動があらわれると考える。本年度では、ゲルの配向性と細胞の一方向への運動開始における細胞数の閾値についても定量的な議論を行う予定である。

C.Irahara, H.Haga and K.Kawabata : Cooperative movement of epithelial cells induced by orientation of collagen gel fibers

B338

弾性体接着基質上に培養した細胞運動と細胞-基質間の力学的相互作用の解析

○原田 伊知郎、赤池 敏宏 (東工大 生命理工)

組織中において細胞は様々な細胞外マトリクス成分に接着して従来持つ機能を発現していることが多く明らかにされている。しかし、単なる接着基質をECMをコートした接着基質を細胞に提供するだけでは不十分なことも明らかになってきている。生体中にある細胞は細胞外マトリクスの個々の分子を認識しているだけではなく、それら分子の物理的な状態を認識している可能性が報告されている。特に、細胞が柔らかい基質から堅い基質へと移動する現象は"durotaxis"と呼ばれ、細胞が基質の力学的な強度を認識する分子機構が存在することを意味する。我々は、細胞が基質の力学的な強度を認識しているかを明らかにすることを目的に様々な力学的強度を有する基質に細胞を培養し、細胞の振る舞い、特に細胞の運動性の挙動を中心に解析を行っている。本研究では、弾性体接着基質としてアクリルアミドゲルに細胞が生理的に接着出来るようにコラーゲン分子をグラフト重合を行ったものを培養基質として用いた。さらに、ゲル中には細胞の牽引力の解析を行うことを目的にラテックスビーズを封入した。こうすることで、細胞の牽引力により生じたゲルの歪みとゲルの力学的強度から細胞の牽引力を定量化することが可能であった。本来硬いシャーレ上にあつては、接触阻害によって分散するSwiss3T3繊維芽細胞を柔らかい基質上に培養すると、細胞は互いに基質を引き合い、力学的な相互作用によって互いに集まりコロニーを形成する様子が観察された。また、同じコロニー内では細胞が伸張する方向が揃い、同一方向に配向する様子が観察された。さらに、接着基質の弾性率の違いによって接着班分子に付随するタンパクの発現量に特徴的な違いが得られたのでそれらを報告する。

I. Harada, T. Akaike : Analysis of Mechanochemical Interaction of the cell cultured on Synthetic Polymer-Gel for the Elastic Substrata

B339

周期的一軸伸張刺激に対する血管内皮細胞のインテグリンクラスターの場所依存的応答

○宮津 真寿美¹、辰巳 仁史^{2,3}、成瀬 恵治^{2,4}、曾我部 正博^{2,4}
(¹名大・医・保健、²名大院・医・細胞科学、³JST・CREST、⁴JST・ICORP・細胞力覚)

伸張可能なシリコンエラストマー膜の上にヒト臍帯静脈血管内皮細胞を培養し、拍動を模した周期的な一軸伸張刺激を加えると、細胞は伸張軸に対して垂直に配向する。今回は、Alexa488を結合させた $\beta 1$ integrinの細胞外ドメインを認識する抗体でintegrin clusterを可視化して、周期的伸張刺激に対するintegrin clusterの形態変化の初期過程をライブ観察した。細胞をシリコンエラストマー膜上に培養し、一軸方向に120%、1Hzの条件で100~600回伸張した。integrin clusterの観察は共焦点顕微鏡で行い、伸張前と伸張後の画像の蛍光強度変化を解析した。その結果、integrinの蛍光強度は、伸張軸に垂直な細胞端で帯状に減少し(図中の黒矢印: 矢印の向きは細胞の縮退方向を示す)、細胞の中央部では粒状に減少した。また、伸張軸に平行な細胞端では、新しくintegrin clusterが形成された(白矢印: 細胞の伸長方向を示す)。以上のことから、周期的一軸伸張刺激を加えると、一つの細胞の中でintegrin clusterの崩壊(帯状、粒状の2種類)と形成過程が場所依存的に同時進行することが明らかになった。

M.Inoue-Miyazu, H.Tatsumi, K.Naruse and M.Sokabe : Position dependent changes in integrin cluster morphology by uniaxial cyclic strain in endothelial cells

B340

非二重層形成膜脂質が膜物性に及ぼす効果の研究

○大木 和夫、出口 隆宏、鹿妻 武洋 (東北大・院理・物理)

生体膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)が脂質二重層膜構造を形成するのに対してホスファチジルエタノールアミン(PE)はヘキサゴナルII相を形成し、非二重層形成脂質に分類される。最近、非二重層形成脂質の役割として、PEが脂質膜の側方圧力を高め膜蛋白質の構造を安定させることが示唆された。また、生体膜内で非二重層形成脂質は膜脂質の貯蔵槽として、膜蛋白質の割合が変化しても安定な二重層膜部分を維持する役割も提唱された。細胞の情報伝達では、イノシトールリン脂質のジアシルグリセロールへの、また、スフィンゴミエリン(SM)からセラミド(Cer)への変換は非二重層形成脂質への変換である。そこで、生体膜機能と非二重層形成脂質との関連を明らかにするために非二重層形成脂質が膜物性に及ぼす効果について、環境感受性色素Laurdanを用いた蛍光測定、高感度示差走査熱量測定、デジタル式密度測定などを用い、非二重層形成脂質の割合を変えた各種の膜脂質で調製したりポソームで実験を行った。Laurdanでは脂質膜への水の浸入度、DSCでは相挙動、密度計では密度の絶対値とその変化について、それぞれの物性測定を行った。卵黄PCと卵黄PEの比率を変えて調製したりポソームでLaurdanの蛍光スペクトルを測定したところPEは2.5 mol%含まれれば、有意な変化が見られ、測定した10℃から40℃の範囲で濃度依存的にPEは脂質膜への水の浸入を減少させることが示された。同様な実験を50 mol%を卵黄PCとし、残りは比率を変えた卵黄SMとCerの比率を変えて調製したりポソームで行ったところ、0.3 mol%のSMをCerに置換しただけでもスペクトルの有意な変化が観察され、スフィンゴミエリナーゼによる膜脂質の変換が膜物性に及ぼす効果の大きいことが示唆された。また、リポソームの密度測定ではPCからPEへの置換が密度を増加させる効果の評価を行った。

K.ohki,T.Deguchi,T.Kazuma : Effects of lipid species forming non-bilayer on physical properties of lipid membranes