弾性マイクロピラーと短パルスレーザー切断システムを使った 血管構成細胞の収縮能力の定量解析*

—細胞の脱分化と老化に伴うアクチン細胞骨格の張力の変化—

長山和亮** 野上謙三*** 菅野隼多***

Quantitative Analysis of Contractile Ability of Vascular Smooth Muscle Cells Using a Micropillar Substrate
and a Laser Nanoscissor System

- Changes in the Internal Tension of Actin Stress Fibers in Cell Dedifferentiation and Senescence -

Kazuaki NAGAYAMA, Kenzo NOGAMI and Shunta SUGANO

Vascular cell senescence and vascular aging are known to be associated with serious vascular diseases, such as arteriosclerosis and aneurysm generation. However, it is unclear how cellular dedifferentiation and senescence affects cellular contractile force which is especially important for vascular smooth muscle cells. Here we investigated the changes in the cellular contractile ability during repeatedly passage-cultivation that promotes cell dedifferentiation and senescence. Porcine aortic vascular smooth muscle cells exposed to several passage-cultivation were seeded on the polydimethylsiloxane-based elastic micropillar array substrates, and their whole cell contractile forces were precisely estimated by the deflection of the pillars. Furthermore, we dissected intracellular actin stress fibers in living cells by laser irradiation to release their pretension, observed the dynamic behavior of the dissected stress fibers, and estimated the internal tension of individual stress fibers. We found that the both of the whole cell contractile forces and the internal tension of individual stress fibers were significantly decreased in cell dedifferentiation and senescence induced by repeatedly passage-cultivation, and the decrease was more sensitive in the individual stress fibers than in the whole cell. These results indicate that cellular contractile forces are deeply involved in cellular dedifferentiation and senescence.

Key words: cell biomechanics, mechanobiology, smooth muscle cell, micropillar, laser ablation

1. 緒 言

生体はからだ全体から各器官、それらを構成する組織、細胞にいたるまで力学環境に曝されている。なかでも血管系は血圧に基づく円周方向張力、血流によるせん断応力など、常に力学的刺激を受けており、力学環境の変化に対して自らの構造、機能を再構築すると考えられている。血管系の中でも血管壁内に存在する平滑筋細胞は、収縮・弛緩することで血管径を適切に調整するなどの重要な役割を果たしているが、長期間高血圧に曝されると細胞に過剰な力が加わることで、細胞が脱分化して肥大・増殖し¹⁾、軟化することなどが報告されている²⁾。

また、動脈硬化症や動脈瘤といった重篤な血管疾患の発生には、個々の細胞自身の脱分化だけでなく、老化も密接に関わっているとされている³⁾⁴⁾。細胞は老化すると、解糖系酵素であるβガラクトシダーゼの発現量の上昇や⁵⁾、染色体の末端にあるテロメアが短くなるといった特徴をみせる⁶⁾。そのため、これらの変化を生化学的に分析・評価する手法が提案されているが、必ずしも検出感度が高いとは言えず、大量の細胞サンプルの平均的な特徴しか捉えられないといった問題があった。また、血管

の収縮・弛緩を調整する平滑筋細胞において、特に重要と考えられる個々の細胞の収縮能に対し、細胞の老化がどのような影響を与えるかほとんど明らかとなっていない。特に血管平滑筋細胞の収縮性は、アクチン細胞骨格とミオシンモータータンパク質を主体とした「ストレスファイバ」と呼ばれる収縮線維束によって支配されていると考えられている⁸⁾¹⁰⁾。ことから、個々の細胞骨格レベルの収縮力が、細胞の脱分化さらには老化によってどのように変化するのか明らかにすることは、細胞バイオメカニクスの観点からも極めて重要である。

そこで本研究では、微細加工技術で作製した弾性マイクロピラー基板を活用して細胞全体の張力を精密計測する系、さらに顕微鏡に組み込んだパルスレーザーで個々の細胞内のアクチン細胞骨格を切断し、その収縮挙動を精密計測する系を構築した。そして、継代培養を重ねて脱分化および老化させた血管平滑筋細胞の収縮能力の変化を、細胞全体レベルならびに、細胞内収縮要素である個々の細胞骨格レベルで詳細に解析し、細胞老化との関わりを考察した。

2. 実験方法

2.1 試料細胞の準備

試料として、ブタ大動脈由来血管平滑筋細胞 (PSMC010, コスモバイオ株式会社) を用いた。これらを、10% ウシ胎児血清 (FBS, CELLect Gold) と抗生物質 (penicillin (100 unit/ml) and streptomycin (100 µg/ml), Sigma) を含む DMEM 培地 (和光) を用

* 原稿受付 令和2年3月3日

** 掲載決定 令和2年6月15日

** 正 会 員 茨城大学大学院理工学研究科機械システム工学専攻
(茨城県日立市中成沢町 4-12-1)

*** 茨城大学大学院理工学研究科機械システム工学専攻
(茨城県日立市中成沢町 4-12-1)

い、CO₂ インキュベータ (IT600, ヤマト科学) 内で 37°C に保温し、湿度約 100%, 5%-CO₂, 95%-air の環境下で培養した。なお、本研究では、継代数が 3 (passage 3) の細胞を購入して、ポリスチレン製の細胞培養ディッシュ (60mm x 15mm, Corning) に播種培養し、80%コンフルエントの状態に達した後、繰り返し継代することで細胞分裂の回数を増やして老化を促進させた。なお、継代作業による細胞のダメージが十分に回復し、細胞が良好に増殖する条件として、継代の比率を 1:4 に設定した。そして、若い細胞 (passage 4-5: Young), 中程度の細胞 (passage 7-8: Middle), 老化が進んだ細胞 (passage 16-19: Old) と分類して使用した。なお、本研究で用いた試料細胞はコスモバイオ社から販売された細胞であり、広く研究分野で使用されているため倫理審査等の承認は不要である。

2.2 細胞増殖性の確認

細胞の脱分化や老化は、細胞の増殖性に影響を与えると考えられることから、2.1 節で準備した継代数範囲が異なる 3 群の平滑筋細胞に対して、以下の手順で細胞増殖性の変化を調べた。すなわち、細胞周期の S 期 (DNA 複製期) に作られた DNA に特異的に結合する EdU (5-エチニル-2'-デオキシウリジン) 染色キット (Click-iT® EdU Imaging Kits, Thermo Fisher Scientific) を使用し、Young 群、Middle 群、Old 群において、12 時間中で S 期に移行した細胞割合を計測した。

2.3 細胞形態と細胞骨格の発達状態の調査

2.1 節で準備した継代数範囲が異なる 3 群の平滑筋細胞を 10%中性緩衝ホルマリン (和光) で 5 分間処理して固定後、0.1% の Triton X-100 (和光) で細胞膜透過処理を 5 分間した。そして、Alexa Fluor 546 Phalloidin (~200 nM, Molecular Probes) で 30 分間処理して細胞内のアクチン細胞骨格を蛍光標識し、Hoechst33342 (1/1000, Sigma) で 10 分間処理して核内 DNA を蛍光標識した。

染色後の細胞試料を、倒立型蛍光顕微鏡 (IX71, オリンパス) のステージ上に設置し、20 倍の対物レンズ (LUCPlan FLN20x, NA=0.60 オリンパス) を使用して、電子増倍型デジタル CCD カメラ (C9100, 浜松ホトニクス) でアクチン細胞骨格と細胞核の蛍光画像をそれぞれ撮影した。これらすべての蛍光画像の撮影において、カメラのゲインや露光時間、光学フィルタの設定を統一した。撮影した蛍光画像に対し、画像解析ソフトウェア (Image J, NIH) で細胞の輪郭を半自動的に検出してトレースし、細胞の面積、長さ、幅を計測した。また、個々の細胞内におけるアクチン細胞骨格の蛍光輝度を画像 1 ピクセルあたりの平均値とした算出し、細胞骨格の発達具合の指標として評価した。

2.4 マイクロピラーを用いた細胞の張力計測

細胞老化に伴う細胞張力の変化を調べるため、既報¹¹⁾¹²⁾ と同様に微細加工技術にて作製したシリコンラバー (Polydimethylsiloxane, PDMS (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit)) 製のマイクロピラー基板を用いた (図 1)。マイクロピラーの直径は 3 μm、高さは 9 μm とし、ピラー同士の付着を防ぐため、ピラーの中心間距離は 9 μm とした。このマイクロピラー基板を約 15 mm × 15 mm に切り出し、直径 35 mm のガラスボトムディッシュ (GD-400, Bio-Bik) のガラス面に設置後、1 日ほど静置して基板をガラス面に吸着させた。その後、ソフトプラズマエッチング装置 (SEDE-GE, メイワフォーシス) で、ピラー基板表面をプラズマ処理 (約 10 Pa, 5 mA, 2 min) して親水化した。同様に、別途準備した PDMS シート (10 mm × 10 mm, t ≈ 2 mm) をプラズマ処理後、細胞接着タンパク質である

フィブロネクチン溶液 (50 μg/ml, Sigma) をシート上に滴下し、クリーンベンチ内で乾燥させた。PDMS シートのフィブロネクチン面を、マイクロピラー基板の表面に軽く押し付けて、フィブロネクチンをピラー先端面のみに転写した。細胞がピラー先端面以外に非特異的に接着するのを防ぐため、2%のウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) 溶液でピラー基板表面を 1 時間程ブロック処理した。その後、2.1 節で準備した血管平滑筋細胞を播種し、インキュベータ内で 5 時間以上培養して、細胞が十分に広がっていることを確認した。

これらの試料を倒立顕微鏡 (IX71, オリンパス) のステージ上に固定し、電子増倍型デジタル CCD カメラで細胞とピラー先端の画像を撮影した。さらに細胞を酵素処理して剥離後、同様に撮影して力が加わっていない状態のピラーの先端画像を撮影しピラーの原点を求めた。そして、細胞が接着しているピラーを選択し、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて、輝点追跡用のプラグイン (Track Mate) でピラー先端の輝点を自動追跡し、x 方向、y 方向のピラーの変位を求めた。求めた変位に、我々の先行研究¹¹⁾¹²⁾ で用いられたピラーのバネ定数 (26.51 nN/μm) を乗ずることで、各ピラーの張力 F_{xn} , F_{yn} を求めた。その後、各ピラーのそれぞれの方向の張力の和の平均 F_x , F_y を求め (式(1)), さらにこれらの二乗和の平方根を算出することで細胞全体の張力 F_{all} を求めた (式(2)) (図 2)。

$$F_x = \frac{\sum |F_{xn}|}{2}, \quad F_y = \frac{\sum |F_{yn}|}{2}, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (1)$$

$$F_{all} = \sqrt{F_x^2 + F_y^2} \quad (2)$$

Fig.1 Scanning electron micrographs of a substrate with a micropillar array (A) and a smooth muscle cell spread on top of the micropillars (B). The top and side surface of the pillars were coated with fibronectin and BSA, respectively (C). A smooth muscle cell cultured on the pillars produced deflection of micropillars δ with their traction forces F at adhesion sites (D).

Fig.2 An example of the image of a smooth muscle cell on the micropillar substrate and the distribution of its mechanical tension at each pillar F (A). The magnified image at the cell edges adhering on the pillar surfaces (B). The definition of its total mechanical tension F_{all} (C)

2.5 短パルスレーザーによる細胞骨格の切断と収縮挙動解析

倒立型蛍光顕微鏡に、波長 355 nm、パルス幅約 400 ps のレーザーユニット (FTSS355-Q1, CryLaS) を組み込み、顕微鏡観察しながら細胞骨格を切断できるレーザーアブレーションシステム¹³⁾を構築した (図 3)。ガラスボトムディッシュ上で培養した細胞に対し、レーザーのパルス周波数を 10 Hz に設定して、100 倍の油浸対物レンズ (UPLSAPO x100, NA=1.4, オリンパス) で顕微鏡焦点に位置するアクチン細胞骨格にレーザーを 1 秒間照射して切断した。このときのレーザーパワーは先行研究^{14) 15)}にに合わせて 10 nJ 未満に抑えて照射した。今回は、細胞の端から端まで横切るようなストレスファイバ (アクチン細胞骨格とミオシンタンパク質を主体とする太い線維束) を対象とし、その中央付近を切断して、細胞骨格の収縮挙動を電子増倍型デジタル CCD カメラで 5 分間撮影した (図 3B-D)。なお一連の実験は、顕微鏡ステージ設置型 CO₂ インキュベータ (STXG-IX3WX-SET, 東海ヒット) を使って細胞培養環境を維持しながら行った。また、レーザー照射によって細胞膜等に過度の損傷が生じ、細胞が直ちに収縮してしまう場合が見られた。よって、本研究では、5 分間の計測範囲において殆ど細胞の形態変化が見られなかったデータのみを解析対象とした。

得られたストレスファイバの収縮画像に対し、画像解析ソフトウェアを使って、対象となるストレスファイバの初期長さ L_0 と切断後 t 秒後の長さ $L(t)$ を計測した。切断されたストレスファイバの収縮量は時間経過に従って指数関数的に減少する傾向が見られたため、収縮率 α 、時定数 τ からなる 1 次遅れ系と見なして次式で近似し、重相関係数 $R > 0.9$ を満たすものを採用した (図 3E)。

$$L(t) = \{-\alpha(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) + 1\} L_0 \quad (3)$$

Fig.3 Schematic diagram of a laboratory-built laser nanoscissor system equipped with an ultraviolet pulsed laser for dissecting the single stress fibers (A). Fluorescent images of actin stress fibers during laser nano-dissection (B-D). An example of the length changes of dissected stress fibers (E). Thick line and thin line indicate experiment data and approximate curve, respectively

3. 結 果

まず、継代数が異なる 3 群の血管平滑筋細胞に対し、2.2 節の EdU 法を用いて 12 時間の培養期間中に DNA 複製期(S 期)に移行した細胞割合を計測したところ、Young 群、Middle 群、Old 群で、それぞれ $46.3 \pm 15.8\%$ (mean $\pm$ S.D., $n=4$ dishes), $63.6 \pm 13.2\%$, $38.3 \pm 9.4\%$ となった。細胞増殖能は Middle 群で最も高くなり、継代培養によって細胞の脱分化が促進されたと考えられる。さらに継代培養を続けた Old 群では、Middle 群に比べて有意に増殖能が低下したことから、脱分化だけでなく、細胞の老化の影響が現れている可能性が示唆された。

次に、細胞の収縮力に深く関与すると考えられているアクチン細胞骨格を蛍光染色した画像を図 4 に示す。Young 群の細胞は、典型的な細長い形態が多く、アクチン細胞骨格の太い束であるストレスファイバ (図 4, 赤色の線維) が細胞の長軸方向に揃って配列している様子が観察された (図 4A)。一方、Middle 群や Old 群では、アクチン細胞骨格の輝度が低く、多方向に広がるような形状の細胞が多く見られた。細胞形態を定量的に解析した結果、3 群で細胞面積に有意な差は見られなかったが、老化が進むほど細胞長が短くなり幅広な形態になっていくことが分かった (表 1)。また、アクチン細胞骨格の蛍光輝度は、Young 群に比べて Middle 群では半減しており、それ以降の Old 群ではほぼ一定の値となっていた (表 1)。これらは細胞内の単位面積当たりの蛍光輝度値であり、細胞内のアクチン細胞骨格の密度を反映していると考えられる。よって、Middle 群でアクチン細胞骨格の密度が半減し、その後、発現量が安定したと考えられる。

Fig.4 Fluorescent microscope image of actin stress fibers (red) and the nucleus (cyan) in vascular smooth muscle cells in young- (A), middle- (B), and old- (C) passaged groups. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1 Dimension of specimen cells and fluorescent intensity of actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells in young-, middle-, and old-passaged groups

	Young (n = 50 cells)	Middle (n = 50 cells)	Old (n = 50 cells)
Cell area, μm^2	2780 ± 1410	2820 ± 1300	2850 ± 1550
Cell length, μm	103.5 ± 30.8	100.0 ± 29.1	$87.5 \pm 21.9^*$
Cell width, μm	33.9 ± 12.0	36.0 ± 11.2	$39.6 \pm 14.6^*$
Fluo. intensity of actin cytoskeleton A.U.	3140 ± 560	$1780 \pm 190^*$	$1840 \pm 240^*$

mean $\pm$ S.D., *P < 0.05 vs. Young

次に、それぞれの継代数の細胞をマイクロピラー基板上で培養し、細胞張力を計測した結果を図5に示す。いずれの群の細胞も、ピラーの先端に接着して広がっていることを確認した(図5A-C)。特に細胞両端に位置するピラーの撓みが比較的大きく、接着部位にて10–40 nNの張力を発生していることが確認できた。細胞接着部位でのピラーの変位から、個々の細胞の全体張力 F_{all} を算出してみると、脱分化が進むにつれて細胞の張力が徐々に低下していく傾向がみられた(図5D)。すなわち、十分に脱分化が進行し、細胞の老化の影響が現れ始めた Old 群では、他群と比べて張力が有意に低くなり、Young 群の細胞張力の半分ほどの値になった(図5D)。また、マイクロピラー基板上での細胞の面積を比較したところ、Young 群、Middle 群、Old 群で、それぞれ $2750 \pm 1500 \mu\text{m}^2$ (mean $\pm$ S.D., n = 10 cells), $2490 \pm 530 \mu\text{m}^2$ (n = 9 cells), $1130 \pm 270 \mu\text{m}^2$ (n = 6 cells) となり、平坦な基板上での結果(表1)と異なり、継代数が大きくなるにつれ細胞面積が減少する傾向が見られた。平坦な基板に比べ、マイクロピラー基板では、個々のピラーの間に数 μm のスペースが空いており、細胞は仮足を伸ばしてその間隙をまたぎながら伸展していくと考えられる。このような環境では、細胞が仮足を安定して成長させる能力の差などが顕著に現れやすいと考えられ、継代培養による細胞の脱分化および老化によって、仮足を伸ばして伸展する能力にも影響が生じた可能性がある。

最後に、継代数が異なる3群の細胞に対し、細胞内部のストレスファイバを切断して、その収縮挙動を詳細に観察した(図6)。いずれの群でも切断されたストレスファイバは直ちに細胞両端に向かって収縮し、徐々にその収縮速度を低下させ、1次遅的な収縮挙動を見せた。特に Young 群では収縮量が大きく、切断から5分後には半分以下の長さになった(図7A)。得られた収

縮データを式(3)で近似し、収縮率 α と時定数 τ を算出したところ、収縮率 α は Young 群で最も高く初期長さの60%程度まで収縮することが分かった。一方、Middle 群や Old 群では30%程度の収縮率に留まった(図7B)。時定数 τ も老化が進むほど徐々に小さくなる傾向があり、Young 群に比べて Old 群では有意に小さく、より早く収縮が完了することが分かった(図7C)。

Fig.5 Examples of bright field images of vascular smooth muscle cells spreading on the pillar substrate (A-C). The average total mechanical tension F_{all} of vascular smooth muscle cells in young-, middle-, and old-passaged groups (D)

Fig.6 Fluorescent images of actin stress fibers during laser nano-dissection. The time course images after dissection of single stress fiber was captured in vascular smooth muscle cells in young- (A-C), middle- (D-F), and old- (G-I) passaged groups. The light blue crosses in (A), (D), and (G) represent irradiation points of the laser beam. White arrowheads indicate the dissected ends of the actin stress fibers. Scale bars = 10 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig.7 The length changes of dissected stress fibers in vascular smooth muscle cells in young-, middle-, and old-passaged groups (A) and analyzed contraction rate α (B) and time constant τ (C) of their shortening behavior

4. 考 察

これまでに細胞老化に関しては、細胞内で産生される老化関連物質、老化に関わる遺伝子の発現や生化学シグナルを明らかにする生化学的研究が主であった。そのような中で、酸性 β -ガラクトシダーゼなどの老化関連酵素が見出され、これらをタンパク質定量して評価する手法が適用されている。しかし、検出感度が低く、大量の細胞サンプルの固定と粉碎処理を要するなどの問題があり、多数の細胞の平均的な情報しか得ることができなかった。一方、本研究では、個々の細胞が発生する張力変化に着目し、弾性マイクロピラー基板を活用して細胞全体の張力を精密計測する系、さらにパルスレーザーで個々の細胞内の細胞骨格を切断して、その収縮挙動を計測する系を構築した。これらの実験計測系を使用し、継代培養を重ねて脱分化を促進させ、さらに老化傾向が見られた血管平滑筋細胞を対象に、細胞の張力変化を細胞全体ならびに細胞内のストレスファイバのレベルで評価した。その結果、細胞の脱分化が進行し、さらには老化傾向が現れた細胞では、細胞全体の張力が低下し、さらに個々のストレスファイバの収縮性が著しく低下することを初めて実験的に明らかにした。

マイクロピラーで計測した個々の血管平滑筋細胞の全体張力は、継代培養に伴って低下していく傾向が見られたが、Young 群 (passage 4-5) で約 95 nN, Middle 群 (passage 7-8) で 85 nN 程であり、両群に有意な差が見られなかった。これまでに同手法で計測された血管平滑筋細胞 (passage 6-7) の平均張力は 130 nN と報告されており¹²⁾、本研究の Young 群や Middle 群では同程度のオーダーとなった。これらに対し、Old 群 (passage 16-19) では細胞全体の張力が半減した (図 5)。細胞形態にも変化が見られ、継代培養が進行すると細胞面積に有意な差が生じなかったが増加傾向があり (表 1)、細胞が次第に幅広の形態に変化し、Old 群で有意な差が生じた (図 4C, 表 1)。ヒト肺静脈血管平

滑筋細胞では継代培養の進行に伴い細胞面積が増加する傾向が見られており、特に継代数が passage 10 を越えるあたりから有意な差が生じると報告されている¹⁶⁾。また、マウス皮膚由来の線維芽細胞では、細胞形態のアスペクト比 (長さ/幅) が 3 を越えて細長い形態になると、細胞張力が増加することが示されている¹⁷⁾。以上を考慮すると、本研究で観察された血管平滑筋細胞の老化に伴う張力の低下は、細胞形態のアスペクト比の低下に密接に関連したグローバルな変化と考えられる。細胞が細長くなるほど、細胞内のストレスファイバの配向も一様に揃っている傾向が見られていることから (図 4)、個々のファイバの向きが揃うことで、細胞張力を制御するモータータンパク質の活性化が促進されるなどが考えられるかもしれない。

パルスレーザーを使って切断した生細胞内のストレスファイバにおいても、継代培養によって老化が進行するほど収縮性が低下する傾向が見られた。しかし、その変化は細胞全体張力 F_{all} に比べてより早い段階で生じており、Young 群に比べ Middle 群でファイバの収縮率 α が半減し、その後の Old 群では同程度に落ち着く傾向があった (図 7B)。この変化は、蛍光染色したストレスファイバの輝度の変化と同様であり (表 1)、個々のストレスファイバを成すタンパク質構造の発達具合の違いがそのままファイバの収縮率に反映されたと考えられる。一方で、ファイバの収縮挙動の時定数 τ は、細胞の脱分化および老化が進行すると緩やかに減少する傾向があった。すなわち、Young 群に比べ Middle 群では時定数 τ に有意差が見られず、Old 群で有意な減少が見られた (図 7C)。この変化は、ファイバの蛍光輝度に基づくファイバ構造の減少 (図 4B, C, 表 1) だけでは説明できない。現状ではその詳細な要因は不明であるが、細胞が脱分化し、さらに老化が進行するほど、細胞形態が幅広になり (表 1)、ファイバの配向方向も多様になる傾向が見られたことから (図 4, 6)、細胞内のストレスファイバ同士の物理的な接触による機械的抵抗なども、ファイバの収縮挙動に影響している可能性が考えられる。

5. 結 言

本研究では、微細加工技術で作製した弾性マイクロピラー基板を活用して細胞全体の張力を精密計測する系、さらに顕微鏡に組み込んだパルスレーザーで個々の細胞内のアクチン細胞骨格を切断し、その収縮挙動を精密計測する系を構築した。そして、継代培養を重ねて脱分化および老化させた血管平滑筋細胞の収縮能力の変化を、細胞全体レベルならびに個々の細胞骨格レベルで詳細に解析した。老化の進行に伴って細胞全体の張力が低下すること、さらに細胞内の個々のストレスファイバの収縮性が比較的老化の早い段階で低下することを初めて実験的に明らかにした。本研究で確立した実験系は、バイオメカニクスの観点から細胞の老化メカニズムを理解する上で有用なツールとなり得る。

謝 辞

本研究の一部は科学研究費補助金・基盤研究 (B) (17H02077)、挑戦的研究 (萌芽) (19K22944) ならびに国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の革新的先端研究開発支援事業 (JP19gm0810005, JP20gm0810005) の支援のもとに行われました。本研究の細胞試料の準備作業等の一部は、茨城大学工学部・技術補佐員の佐藤亜希子さんにご協力をいただきました。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) T. Matsumoto and K. Hayashi: Stress and strain distribution in hypertensive and normotensive rat aorta considering residual strain, *ASME Journal of Biomechanical Engineering*, **118**, 1 (1996) 62.
- 2) T. Matsumoto et al.: Effects of hypertension on morphological, contractile and mechanical properties of rat aortic smooth muscle cells, *Cellular and Molecular Bioengineering*, **4**, 3 (2011) 340.
- 3) K. Buring: The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, **11**, 6 (1991) 1678.
- 4) J. Zhang et al.: Extracellular matrix disarray as a mechanism for greater abdominal versus thoracic aortic stiffness with aging in primates, *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, **36**, 4 (2016), 700.
- 5) T. Minamino, I. Komuro: Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis, *Circulation Research*, **100**, 5 (2007), 15.
- 6) 鮎沢大 他: 細胞の老化を支配する遺伝子, *化学と生物*, **38**, 4 (2000), 224.
- 7) 山越貴水: 細胞老化と慢性炎症, *日本老年医学会雑誌*, **53**, 2 (2016), 88.
- 8) S. Pellegrin, H. Mellor: Actin stress fibres, *Journal of Cell Science*, **120** Pt 20 (2007), 3491.
- 9) K. Nagayama et al.: Estimation of single stress fiber stiffness in cultured aortic smooth muscle cells under relaxed and contracted states: Its relation to dynamic rearrangement of stress fibers, *Journal of Biomechanics*, **43**, 8 (2010) 1443.
- 10) K. Nagayama: Biomechanical analysis of the mechanical environment of the cell nucleus in serum starvation-induced vascular smooth muscle cell differentiation, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, **14**, 4 (2019), 19-00364.
- 11) K. Nagayama et al.: Heterogeneous response of traction force at focal adhesions of vascular smooth muscle cells subjected to macroscopic stretch on a micropillar substrate, *Journal of Biomechanics*, **44**, 15 (2011), 2699.
- 12) 長山和亮: 弾性マイクロピラー基板を用いた細胞張力の定量解析と細胞内の核に加わる力の推定, *日本機械学会論文集*, **81**, 824 (2015), p.14-00692.
- 13) K. Nagayama et al.: 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**, 6 (2014), 1422.
- 14) S. Kumar et al.: Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics, *Journal of Biomechanics*, **47**, 6 (2014), 1422.
- 15) K. Nagayama et al.: Stress fibers stabilize the position of intranuclear DNA through mechanical connection with the nucleus in vascular smooth muscle cells, *FEBS Letters*, **585**, 24 (2011), 3992-3997.
- 16) 野口展士 他: 細胞挙動に基づく細胞寿命の定量化および増殖ポテンシャル評価, *ライフサポート*, **25**, 3 (2013), 101.
- 17) A. Rape et al.: The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions, *Biomaterials*, **32**, 8 (2011), 2043.