104 ストレスファイバー構造の再構築現象に必要なひずみ量の定量的評価

Quantitative evaluation of strain required for the stress-fiber reconstruction

○学 松尾 守 (神戸大・院)

正 佐藤 克也 (神戸大・院)

正 安達 泰治 (神戸大・工)

正 富田 佳宏 (神戸大・工)

Mamoru MATSUO

Grad. Sch. of Sci. & Tech., Kobe University, Nada, Kobe

Katsuya SATO

Grad. Sch. of Sci. & Tech., Kobe University, Nada, Kobe

Taiji ADACHI

Dept. Mech. Eng., Fac. Eng., Kobe University, Nada, Kobe

Yoshihiro TOMITA

Dept. Mech. Eng., Fac. Eng., Kobe University, Nada, Kobe

Key words: Cell Biomechanics, Mechanobiology, Cytoskeletal Stress Fiber Structure, Osteoblastic Cell

1. はじめに

骨芽細胞内のストレスファイバー構造は、力学環境の変化に伴い、その構造が動的に再構築されることが知られている⁽¹⁾。⁽²⁾。著者らも、これまでに骨芽細胞に単軸圧縮変形を与えることで、ストレスファイバー構造の再構築が開始され、同構造が消失する様子を実験的に観察してきた⁽³⁾。しかしながら、ストレスファイバー構造の再構築を引き起こすひずみや力などの力学量について定量的に検討した例は少ない⁽⁴⁾。そこで、本研究では、ストレスファイバー構造の再構築開始に必要なひずみ量を定量的に評価することを目的としている。予め単軸方向に伸張させた状態のシリコン膜上に骨芽細胞様細胞を培養し、その後、シリコン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与えた。それに伴うストレスファイバー構造の変化を観察し、ストレスファイバー構造の再構築開始に必要なひずみ量について検討した。

2. 実験方法

2-1. 観察試料および実験装置

本実験では、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (理研 BRC より入手)を用い、10% FBS (SIGMA) を添加した α -MEM (ICN) 培地を使用し、温度 37°C、湿度 100%、5% CO₂ - 95% Air の環境下で培養した。この細胞を 4cc シリコンチャンバー (スカラテック) に、細胞 3.0×10^4 個を播種し、同環境にて 24 時間培養したものを実験に用いた。

実験装置 (Fig.1) は、2 本の並行なリニアガイド、及び、左右両ネジシャフトに、単軸 (x 軸) 方向の平行移動可能なスライダを 2 つ取り付けただものである。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で、シリコンチャンバーに任意の単軸のひずみを与えることが可能である。

2-2. 実験の概要

実験の概要について述べる。Fig.2(a)に示すように、予め単軸の引張りひずみを与えた状態のシリコン膜上に細胞を培養する。この時のシリコン膜の引張り方向長さを l_0 とする。次に、時刻 $t=0$ で、シリコン膜を長さ l まで縮めることでひずみを解放し、細胞に圧縮ひずみ $\epsilon_{sub} = (l - l_0) / l_0$ を与える。本実験では、 $\epsilon_{sub} = -0.25$ 、ひずみ速度は $-0.045/\text{sec}$ とした。これに伴い、Fig.2(b)に示すように、細胞の形状が変化する。この細胞形状の変化に伴い、細胞内では力学状態の不均衡が生じ、ストレスファイバー構造の再構築が開始されると考えられる。

ひずみを与えた後のストレスファイバー構造の観察は蛍光観察により行った。 $t = 15\text{min}$ の時点で、5% Paraformaldehyde により細胞を固定した。その後、0.1% TRITON-X により細胞膜の脱

Fig.1: Experimental apparatus

Fig.2 Definition of released strain (ϵ_{sub})

膜処理を行い、Rhodamine-Phalloidin によりストレスファイバーを蛍光染色した。観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (Nikon Digital Eclipse C1) を用いて、細胞底面におけるストレスファイバーの蛍光画像を取得し、12bit の輝度データとして PC に記録した。

3. 実験結果と考察

3-1. 実験結果

Fig.3 に、細胞底面におけるストレスファイバー構造の蛍光画像の例を示す。ひずみを与えていない通常細胞では Fig.3(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線維状構造が観察される。一方、Fig.3(b) に示す、ひずみを与えた細胞では、細胞の輪郭付近にストレスファイバー構造が観察されるが、細胞中央部ではストレスファイバーが消失しており、通常細胞で見られるような線維状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、Fig.3(c) に示すように、通常細胞と同様のストレスファイバー構造を維持している細胞も観察された。

このように、同一の大きさの単軸圧縮ひずみを与えた場合でも、ストレスファイバー構造が消失した細胞と、消失しない細胞

Fig.3 Fluorescent images of stress fiber structure in osteoblastic cells

Fig.4 Relation between $|\epsilon_{SF}|$ and $|\theta|$

が観察された。骨芽細胞内では、ストレスファイバーは細胞形状の長軸に平行した方向に配向している。したがって、細胞に対して単軸圧縮ひずみを与えた場合、ストレスファイバーの配向方向に応じて、同構造に与えられるひずみ量が変化する。そこで、ストレスファイバー自体に与えられるひずみ量が、再構築の開始に重要な役割をすると考え、両者の関係を検討した。

まず、Fig.4(a)に示すように、細胞輪郭形状の近似楕円を算出し、その長軸方向と単軸圧縮方向とのなす角度を θ として定義した。次に、 θ と単軸圧縮で与えた変形量を用いて、ストレスファイバー自体に与えられるひずみ量(ϵ_{SF})を、Fig.4(b)に示す形で表現した。本実験の場合では、 θ と ϵ_{SF} は、Fig.4(c)に示すような関係になった。このようにして算出した ϵ_{SF} を横軸に、細胞内ストレスファイバー構造の平均蛍光輝度を縦軸にプロットすると、Fig.5に示すグラフが得られた。同グラフにおいて、 $|\epsilon_{SF}| = 0.00 \sim 0.05$ の細胞群に対して、 $|\epsilon_{SF}| = 0.05 \sim 0.20$ の細胞群では、平均輝度に有意な差は認められなかった。一方、 $|\epsilon_{SF}| = 0.20 \sim 0.25$ の細胞群では、蛍光輝度が有意に低い結果が得られた($p < 1.0 \times 10^{-4}$, T-test)。

3・2. 考察

細胞に対して、一様に $\epsilon_{sub} = -0.25$ の圧縮ひずみを与えた場合でも、ストレスファイバー構造が消失した細胞と、消失していない細胞が観察された。この結果から、ストレスファイバー構造の再構築開始には、細胞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ひずみ量が重要であると考えられる。また、ストレスファイバー構造自体に与えられるひずみ量 ϵ_{SF} と、ストレスファイバー構造の平均蛍光輝度との関係を検討した結果、 $|\epsilon_{SF}| < 0.20$ の細胞群では、蛍光輝度に差異は認められなかったのに対して、 $|\epsilon_{SF}| = 0.20 \sim 0.25$ の細胞群では、蛍光輝度が有意に低い結果が得られた。これらの結果から、ストレスファイバー構造の再構築開始に必要なひずみ量には閾値が存在し、その値は、約-0.20であることが示唆される。

4. おわりに

本研究では、ストレスファイバー構造の再構築開始に必要なひずみ量を定量的に評価することを目的として、シリコーン膜

Fig.5 Relation between strain of stress fiber $|\epsilon_{SF}|$ and fluorescent intensity

上に培養した細胞に単軸の圧縮ひずみを与え、細胞内ストレスファイバー構造の変化を観察した。その結果、ストレスファイバーが消失するためには、細胞全体に対してではなく、ストレスファイバー自体に与えられるひずみ量が重要であることおよび、ストレスファイバー構造の再構築を開始させるひずみ量に閾値が存在し、その値は約-0.20である可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、一部文部科学省科学研究費補助金の援助のもとに行われた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- (1) Neidlinger-Wike, C., Grood, E. S., Wang, J. H. -C., Brand, R. A. and Claes, L., Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: Studies of cell grown in cyclically stretched substrates, *J. Orthop. Res.*, **19**, (2001), 286-293.
- (2) Chen, N. X., Ryder, K. D., Pavalko, F. M., Turner, C. H., Burr, D. B., Qiu, J. and Duncan, R. L., Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**, (2000), C989-C997.
- (3) 松尾守, 佐藤克也, 安達泰治, 富田佳宏, 細胞外基質のひずみ解放に伴う細胞内アクチンファイバー構造変化の観察, 第14回バイオエンジニアリング部門講演会講演論文集, (2003), 5-6.
- (4) Costa, K. D., Hucker, W. J., Yin, F. C. -P., Bucking of actin stress fibers: A new wrinkle in the cytoskeletal tapestry, *Cell Motility and the Cytoskeleton* **52**, (2002), 266-274.