338 細胞外基質の変形に伴う移動性細胞の移動方向変化

Change in crawling direction of fish keratocytes induced by substrate deformation

○正 田原 大輔 (理研)

正 安達 泰治 (理研, 京都大)

Daisuke TAWARA Computational Cell Biomechanics Team, VCAD System Research Program, RIKEN, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto

Taiji ADACHI Department of Mechanical Engineering and Science, Kyoto University, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto

Key Words: Cellular biomechanics, Keratocyte, Cell migration, Substrate deformation, Micropatterned substrate

1. 緒言

高い運動性を示す移動性細胞のケラトサイト⁽¹⁾は、周囲の環境変化を感知し、自らの内部構造や特性を変化させながら、能動的に前進し⁽²⁾、移動方向を変化させる。特に移動方向の変化には、細胞内部のアクチンフィラメントの重合と脱重合、膜や細胞骨格に作用する力のバランス、細胞外基質との接着強度等が大きく影響を与える⁽³⁾と考えられる。筆者らはこれまでに、細胞内のアクチン繊維が、作用する張力の解放により、脱重合と再構築を開始することを示した⁽⁴⁾。また、マイクロパターンニング技術⁽⁵⁾を用いた細胞接着領域の制限により、細胞がパターンに依存して配向し、アクチン骨格の形成が促進されることを観察した⁽⁶⁾。さらに、ケラトサイトに対して圧縮変形を与えると、細胞の移動方向が、圧縮軸に平行な方向へ変化することを示した⁽⁷⁾。

本研究では、焦点接着斑のパターン制御下における細胞外基質の変形が、ケラトサイトの移動方向変化に与える影響を検討するため、まず、フィブロネクチンのマイクロパターンニングを用い、パターン上のケラトサイトの移動方向を評価した。次に、伸縮可能なシリコン膜にパターンを施して細胞を播種した後、細胞外基質の変形を与え、細胞の移動方向変化をパターン制御の有無で経時的に観察した。

2. 観察材料の作成方法および実験方法

本実験では、まず、接着斑の分布制御がケラトサイトの移動方向に与える影響を検討するため、ガラスベースディッシュ上で、細胞接着因子であるフィブロネクチンのパターンの有無による細胞の配向性を比較する。次に、接着斑の分布制御下で、細胞外基質の変形による細胞の移動方向変化を評価するため、4 cc シリコンチャンバー(スカラテック)膜にフィブロネクチンのパターンを施して細胞を播種し、単軸ひずみ負荷装置⁽⁸⁾にて圧縮変形を与えた後、経時的に細胞の移動方向変化を観察する。

2.1 細胞培養の条件 本実験では、ゼブラフィッシュより単離したケラトサイトを用いた。まず、ゼブラフィッシュの鱗を2枚採取し、直径 35 mm のガラスボトムディッシュに静置した。この状態で、55 % 濃度に希釈した DMEM に FBS 20 % と抗生物質(ampicillin 12.8 mg/ml, streptomycin 40 mg/ml)を添加した培地を用いて、12 時間室温にて培養した。この間、ケラトサイトが鱗からディッシュ上に移動し、その底面に接着する。実験には、ケラトサイトを Trypsin/EDTA により剥離し、ガラスベースディッシュと、シリコン膜にそれぞれ播種したものを用いた。

2.2 マイクロパターンの作成 本実験では、マイクロパターンの作成のために、PDMS (Poly-dimethyl-siloxane)-stampを用いた。パターンの作成概要と形状を Fig.1 に示す。ここでは、10

Fig.1 Procedure of fibroectin micro-patterning

$\mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ の長方形が、 $4.0 \mu\text{m}$ の間隔で並んだスタンプを使用した。これを用いて、 $25 \mu\text{g/ml}$ のフィブロネクチンと Fibrinogen Alexa 546 conjugate の混合液 (Protein Solution) をスタンプすることで、長方形の細胞接着領域が形成され、パターンの蛍光観察が可能となる。スタンプの前に、まず、pH 3 の希塩酸で 10 % 濃度に希釈した cell matrix (新田ゼラチン) でディッシュとシリコン膜の表面をコーティングした。スタンプ後、接着斑の形成阻害剤である Poly-L-Lysine-graft-Poly Ethylene Glycol (PLL-g-PEG, 1 mg/ml in 10mM Hepes buffer) をコーティングし、スタンプした部分のみを細胞接着領域とした。なお、シリコン膜へのパターンの作成においては、長方形パターンの長手方向が、チャンバーの単軸圧縮変形負荷方向と同じになるようにした。

2.3 実験方法 細胞への変形負荷は、細胞を播種し、90 分間接着を待った後に行った。シリコン膜に対して、ひずみ速度 $-0.036/\text{sec}$ で単軸圧縮ひずみ $\varepsilon = -0.25$ を与えた後、時間経過ごとに、3 % パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。その後、1 % Triton-X による脱膜処理をし、Alexa488-Phalloidin でアクチンフィラメントを蛍光染色した。各実験で 150 個以上の細胞を対象とし、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (Nikon Digital Eclipse C1) を用いて観察を行った。

2.4 画像解析 観察画像は、画像解析ソフト Image-J (NIH) を用いて解析した。本研究では、ケラトサイトの外形状を相当楕円で Fig.2(a) に示すように近似し、その短軸方向を移動方向として定義した。また、チャンバーの変形負荷直後を $t = 0$ とし、変形負荷前 ($t < 0$)、直後 ($t = 0$)、負荷から t ($0 < t$) 分後をそれぞれ状態 I, II, III とする。各状態における圧縮軸 (長方形パターンの長手方向) と細胞の移動方向とのなす角度を θ_i ($i = \text{I, II, III}$, $0^\circ \leq \theta_i \leq 90^\circ$) とすると、チャンバーの圧縮変形により生じる幾何学的な角度変化 $\Delta\theta_a (= \theta_{\text{I}} - \theta_{\text{II}})$ は、次式で与えられる。

$$\Delta\theta_a = \tan^{-1} \left(\frac{-\varepsilon \sin \theta_i \cos \theta_i}{1 + \varepsilon \sin^2 \theta_i} \right) \quad (1)$$

なお、ポアソン効果により生じる圧縮軸に垂直な方向のひずみを無視し、Fig.2(b) に示すように、状態 I における点 A, B が、圧縮軸に平行に移動して、それぞれ点 A', B' に移ると仮定した。

Fig.2 Definition of changes in crawling direction

3. 実験結果

ディッシュ上におけるケラトサイトの θ_i 分布をパターンの有無と比較して Fig.3 に示す。グラフは、各角度の細胞数を細胞総

Fig.3 Cell orientation of θ_I on patterned/normal glass dish

Fig.4 Cell orientation of θ_I and θ_{II} on patterned silicone rubber

(a) $t = 1$ min.

(b) $t = 3$ min.

(c) $t = 15$ min.

(d) $t = 15$ min.

Fig.5 Cell orientation of θ_{III} on patterned/normal silicone rubber

数で正規化して示した。図より、パターン上では、細胞の移動方向が、パターンの長手方向に対して $50^\circ \sim 90^\circ$ に配向している。これに対し、パターンのない場合は、細胞の配向性は見られない。これらの結果から、ケラトサイトは、長方形パターンの長手方向に対して、垂直に移動する傾向がわかった。

次に、パターンを付したシリコン膜上の細胞における θ_I と、その θ_I から式(1)により計算される θ_{II} の分布を Fig.4 に示す。図より、 θ_I は、ディッシュ上と同じように、パターンの長手方向に対して、垂直に配向する傾向 ($70^\circ \sim 90^\circ$) が見られる。また、状態 I から II へ遷移した時点では、幾何学的な角度変化により、 $0^\circ \sim 30^\circ$ 、 $70^\circ \sim 90^\circ$ に細胞が配向することが予想される。

さらに、パターンを付したシリコン膜上の細胞における $t = 1, 3, 15$ min、およびパターンを付さない場合の $t = 15$ min の θ_{III} 分布を Fig.5(a)-(d) にそれぞれ示す。グラフより、 $t = 1$ min の θ_{III} 分布は、Fig.4 の θ_{II} 分布と比べ、長方形パターンの長手方向、すなわち、圧縮変形方向 ($0^\circ \sim 30^\circ$) へと変化している (Fig.5(a))。また、 $t = 3$ min では、圧縮変形方向に対して、 $0^\circ \sim 40^\circ$ の角度をなす細胞がさらに増加し、 $40^\circ \sim 80^\circ$ の角度をなす細胞が減少している (Fig.5(b))。しかし、 $t = 15$ min において、パターン上では、パターンの長手方向 (圧縮変形方向) に対して $0^\circ \sim 40^\circ$ の角度をなす細胞が減少し、 $40^\circ \sim 80^\circ$ の角度をなす細胞が増加している (Fig.5(c))。これに対して、パターンがない場合は、圧縮変形方向に対して平行 ($0^\circ \sim 40^\circ$) のままの細胞が多く見られた (Fig.5(d))。これらの結果から、ケラトサイトの移動方向は、圧縮変形に対応して変形負荷方向へと変化するが、その後、再びパターンに依存して変化することが示された。

4. 考察

ケラトサイトの運動の駆動力は、Fig.6 のように、細胞体から葉状仮足の先端へ伸びるアクチンフィラメントの重合が、細胞膜を

押し出すことにより発生すると考えられている。また、細胞体部には、移動方向と直交するようにストレスファイバーが形成され、接着斑を介して引張力が作用すると考えられる。細胞の移動方向は、これらのベクトルの合力に一致すると考えられる。

細胞の移動方向は、Fig.7 に示すように、状態 I では、長方形パターンの長手方向 (圧縮変形方向) に対して垂直 (Fig.7 (a)) で、状態 III では、平行な向きへ変化した (Fig.7(b))。パターン上には、接着斑が高密度で分布すると予想されることから、状態 I の細胞の配向性は、長方形パターンに平行なストレスファイバーに結合する接着斑を介した引張力が強く作用した結果と考えられる。しかし、変形後の細胞は、パターンの長手方向と直交する圧縮変形方向へ移動方向を変化させたことから、細胞内では、変形前の駆動力および接着強度の均衡が崩れ、合駆動力の方向が、圧縮変形方向へ向いたと考えられる。

変形負荷時の細胞の向きにより、細胞内の各部位における変形量には違いが生じる。アクチン細胞骨格の動的安定性には、力学的な因子が影響を与えている⁽⁸⁾ことから、細胞内の変形量が大きい領域では、アクチンフィラメントの脱重合と張力の緩和が起こり、それに結合する接着斑の解体が促進されると推定される。さらに、これらが、駆動力を生み出すアクチンモノマーの重合の速度変化を引き起こし、細胞全体におけるアクチン重合速度分布に依存して、細胞の移動方向が変化する可能性が考えられる。今後、圧縮ひずみの負荷が、細胞内のアクチンフィラメントの重合速度に与える影響について、実験的に検証し、細胞の移動方向の変化と合わせて検討することが必要である。

Fig.6 Hypothetical mechanism of change in crawling direction

Fig.7 Fluorescence images of actin filament in the keratocytes

5. 結言

焦点接着斑のパターン制御をした上で、細胞外基質に変形を与え、ケラトサイトの移動方向変化を経時観察した。その結果、ケラトサイトの移動方向は、接着斑の制御に依存し、圧縮変形負荷に対応して、圧縮軸に平行な方向へと変化するが示された。さらに、圧縮変形負荷後は、再び接着斑の制御に依存して移動方向を変化させることが示された。

本研究では、Boris Hinz 博士 (Swiss Federal Institute of Technology) に PDMS-stamp を提供いただいた。また、須長純子氏 (理研) には実験に協力いただいた。記して、謝意を表す。

参考文献

- (1) Svitkina TM, et al., *J. Cell Biology*, **139** (2), (1997), 397-415.
- (2) Bray D, *Cell Movements from Molecules to Motility* 2nd edition, Garland Publishing, 2001.
- (3) Verkhovsky AB, et al., *Molecular Biology of the Cell*, **14**, (2003), 4667-4675.
- (4) Sato K, et al., *J Biomechanical Science and Engineering*, **1** (1), (2006), 204-214.
- (5) Singhvi R, et al., *Science*, **264**, (1994), 696-698.
- (6) 田原大輔 ほか, 機講論, 06-65, (2007), 118-119.
- (7) 下川善道 ほか, 機講論, 04-39, (2004), 23-24.
- (8) Sato K, et al., *J. Biomechanics*, **38**, (2005), 1895-1901.