間葉系幹細胞の機械特性解析及び提示システムの構築

Mechanical feature analysis of mesenchymal stem cells and display system

学 ○清水 祐司 (大阪大学) 正 木原 隆典 (大阪大学)
 非 Seyed Mohammad Ali Haghparast (大阪大学)
 非 弓場 俊輔 (産業技術総合研究所) 正 三宅 淳 (大阪大学)

Yuji SHIMIZU, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3, Machikaneyama-cho, Toyonaka,
 Syunsuke YUBA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Key words : *Mesenchymal Stem Cells, Atomic Force Microscopy, Haptic device*

1. 緒言

間葉系幹細胞 (MSC) は中胚葉, 非中胚葉系統への多分化能を有する細胞であり, 再生医療や組織工学において応用利用されている。しかしながら MSC の生理特性における調節機能は明確化されておらず, 安全性の確保や医療分野への実用化に向けて総合的な理解が必要となっている。我々は, 細胞の状態や運命に関与しているとされる機械特性に着目し, 高い分解能を有する原子間力顕微鏡 (AFM) を生体組織に応用することで直接的, 非破壊的な機械特性の測定を行い, MSC の機能解析を進めている⁽¹⁾⁽²⁾。また, 力覚提示デバイスをを用いて, 細胞機械特性の分析や, 計測における力学シミュレーションへの応用を目的とした細胞機械特性提示システムの構築も行っている。

2. アクチン細胞骨格形成阻害

先行研究によると, 機械特性は様々なアクチン細胞骨格に支配されることが報告されている⁽³⁾。我々は, 機械特性を解析することでアクチン細胞骨格の状態を推し量ることが可能ではないかと考えて実験を進めている。そしてその上で, アクチン細胞骨格の形成と MSC の機能との関係性を考察し, 新たな知見の獲得を目指している。今回新たに, 増殖能や細胞の高さといった MSC における機能的な要素に関して, 調節を行うアクチン骨格部位とその調節機能を調べ, 検討を行った⁽²⁾。

物理特性を支配するアクチン細胞骨格は図 1 が示すように, Rho タンパクからのシグナルが下流のタンパクへと経由していき形成される。アクチン細胞骨格の機能を評価する為に, 骨格系阻害剤である Y27632 (10 μ M), blebbistatin (5 μ M), C3 Transferase (20 ng/mL), calyculin A (0.15 nM), wiskostatin (1 μ M) を添加した。そして, アクチン骨格の形成を各過程で阻害することで, MSC の機械特性, 増殖能, 形態等の変化を調べた。また, 阻害剤添加での培養期間は 2 日間である。

3. AFM 測定

35mm ディッシュを使用し, rat MSC を播種後, 室温, 培地中で AFM 測定を行った。細胞に対し 50nN, 10 μ m/s で図 2 (右) のように探針を押し込んでいく。図 2 (左) は AFM 測定により得られた応力-変位曲線を示すフォースカーブで, 黒線で示されているのが押し込み時のデータである。そして, 得られたフォースカ

ーブに対して式 (1) に示した Hertz の理論式でフィッティングを行い, 見かけのヤング率を算出する。測定は核上部で行い, 1 条件につき 9points/cells で 10 細胞測定し, 中央値によって評価を行っている。

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \frac{2\pi\alpha}{\pi} \delta^2 \quad (1)$$

4. 細胞力覚提示

我々は, 現在までの細胞機械特性の測定において, 弾性率が個々の細胞ごとにばらつき, 幅広く分布することを確認してきた。また細胞弾性率のヒストグラムが対数正規分布を示すデータも獲得している (図 3)。このように, 細胞の機械特性は同一の試料 (ドナー) であっても一意には決まらず, 考察時や実験者間での情報共有は困難である。上記の問題を解決する為に, 我々は, 近年細胞の解析システム等に応用されている力覚提示デバイスを AFM 測定データと組み合わせることで, 細胞機械特性の表現を試みた。また, 細胞ごとの弾性のばらつきも同時に表現している。

汎用性を考慮するため, AFM 測定において BAM コーディングしたディッシュを用い, 細胞を球状のまま固定して測定を行った。また, 測定におけるカンチレバーはデータが乱れにくく, 大量測定に有効なスフィアタイプを使用した。対象の細胞には human MSC と HEK293 を使用し, 100points/cells で 100 細胞測定し中央値によって評価した。得られたフォースカーブに対して (2) に示した, 球に対する Hertz の理論式でフィッティングを行い見かけのヤング率を算出した。

$$F = \frac{4}{3} \delta^{\frac{3}{2}} \left(\frac{E}{1-\nu^2} \right) \sqrt{\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}} \quad (2)$$

全体のシステムフローを図 4 に示す。前述した AFM 測定において得られた, 細胞機械特性ヒストグラムの中央値と分散の値をシステムに代入し, Box-Muller 法を用いることで, 任意の対数正規分布に基づく乱数を生成し, 細胞の弾性率として決定している。

5. 結果と考察

アクチン細胞骨格の形成阻害により, 機械特性におけるヤング率が低下, 高さの上昇が確認された。さらに, 細胞の ATP 総量を測ることで増殖能を確認したと

ころ、形成阻害により上昇が見られた。また、阻害剤添加時の細胞状態を共焦点顕微鏡で確認したところ、核上部に渡って発達するアクチンキャップの破壊が確認された。F-アクチンの性質や形態変化を考慮すると、アクチンキャップが破壊されたことにより、ディッシュ底面との間に存在していた内部張力が消失していると考えられる。以上のことから、MSC ではアクチン細胞骨格の中でもアクチンキャップが上記の特性の調節を担っており、かつ増殖能に関しても調節を行っている可能性が示唆される。

構築した細胞力覚提示システムを図5に示す。用いたCPUはcore i3 (2.53 GHz)、メモリは4GBである。また、使用した力覚提示デバイスは Novint 社製、Falcon である。実験者はハンドルを操作し、PC モニタ上の細胞オブジェクトに操作点が接触することで細胞の力覚を感じることが可能である。

6. 結語

本研究ではAFMを用いてMSCの機械特性を測定し、アクチン細胞骨格に着目した実験を行う中で浮かび上がったアクチンキャップに関して、増殖や形態に対する調節機能の考察を行った。今後、コルティカルアクチンなど他のアクチン細胞骨格にも焦点を当て、総合的な細胞の理解に繋げていきたい。また、細胞力覚提示システムに関しても、内部応力解析や細胞マニピュレーション等へ応用していきたいと考えている。

Fig.1 Schematics of effects

Fig.2 Measuring method by AFM

Fig.3 Young's Modulus Histogram

Fig.4 System flow

Fig.5 Cell Mechanical property display system

参考文献

- (1) T. Sugitate, T. Kihara, X-Y. Liu, J. Miyake, Mechanical role of the nucleus in a cell in term of elastic modulus, Curr. Appl. Phys. 9 (2009) e291-293.
- (2) T. Kihara, S.M.A. Haghparast, Y. Shimizu, S. Yuba, J.Miyake, "Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap", Biochemical and Biophysical Research Communications, No. 409 (2011), pp. 1-6.
- (3) A.M. Collinsworth, S. Zhang, W.E. Kraus, G.A. Truskey, Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283 (2002) C1219-1227.