機械的刺激を受けた筋芽細胞の動的応答*

村上 小百合^{*1}, 本間 恭二^{*2}, 跡見 順子^{*3}

Dynamic Response to Mechanical Stimulation in Myoblasts

Sayuri MURAKAMI, Kyoji HOMMA^{*4} and Yoriko ATOMI^{*4} The University of Electro-Communications Department of Mechanical Engineering and Intelligent Systems,
1-5-1, Chofugaoka, Chofu, Tokyo, 182-8585 Japan

Experiment of mechanical stimulus was carried out with myoblast cultured on collagen coated silicone sheet subjected to tension for 6 hours to investigate morphological response of the cell. Pictures of its morphological change were taken in computer by CCD camera in every 10 minutes for 8 hours. Both shape index (SI) and cumulative migration for a lot of cells were measured in every 1 hour. SI was increased after tension exposure. In contrast, migration velocity was decreased after tension exposure. Fluid force acts on cytoskeleton during tension exposure as the shape of cell changes. Actin filament as a cytoskeleton and cytosol were modeled to an elastic cylinder and viscous fluid, respectively, to calculate the stress of filament by the fluid-structure interaction analysis. As a result, the maximum stress was 20 Pa, which is consistent with strain velocity provided by the experiment. Taking into account of its Young's Modulus, the rupture of filaments does not cause to increase SI of myoblasts.

Key Words: Biological Engineering, Biomechanics, Myoblast, Mechanical Stimulus, Finite Element Method, Fluid-Structure Interaction Analysis

1. 緒 言

生体には力学的環境に適応する能力があるが、このメカニズムはまだ不明な点が多く、細胞レベルから見た全体にわたる広範囲の研究が必要とされている。中でも細胞が力を検知し、その力によって細胞自身がいかなる影響を受け、細胞の機械的特性を変化させるのかを定量的に解析することが重要である。これらの研究手段として、一つの細胞の機械的特性を直接調べる方法^{(1)~(5)}、細胞自身が発現する引張力を調べる方法⁽⁶⁾⁽⁷⁾、培養細胞に力学的刺激を与え、組織的な形態変化と細胞内の変化を見る方法^{(8)~(13)}、などがある。

膜状の基質に細胞を培養し、基質を繰返し刺激を与えて細胞の変化を調べる研究はいくつか行われている^{(8)~(12)}が、基質に培養した細胞に異なるひずみ速度で変形を与え、これを長時間保持したときの細胞の応答について調べた報告は見当たらない。

そこで本実験は筋肉の前駆細胞である筋芽細胞を使

用し、一軸引張りを負荷する装置により、負荷速度およびひずみ量を変化させ、シリコンシート(以下シートと呼ぶ)上に培養した細胞に引張荷重を与えたときの応答と形態変化の様子を観察した。その結果、細胞はいずれの条件でも負荷後6時間経過する間円形化が進み、その後元の状態に戻るということがわかった。

細胞が外力による変形を受けたとき、細胞の変形に関与する細胞骨格に原形質ゾルの動きにより流体力が作用する。これまで低粘性流体中にある細胞骨格に振動を与えその分散関係を求めた例はあるが⁽¹⁴⁾、高粘性流体の流れ場に置かれた細胞骨格の非定常解析を扱った例は見当たらない。そこで、細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントを弾性用柱に、細胞質ゾルを高粘性流体としてモデル化し、固体と流体の非定常連成解析を行い、フィラメントに加わる応力の大きさの目安を与えた。

2. 細胞の形態変化の観察

2・1 細胞培養 ラット由来筋芽細胞株 L6 を用いた。継代は 100 mm プラスチック製培養ディッシュで行った。培溶液は 10% ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用い、細胞は 37°C、5%CO₂ 雰囲気のインキュベータ内で培養し

* 原稿受付 1999 年 2 月 19 日。

^{*1} 学生員, 電気通信大学大学院(☎ 182-8585 東京都調布市調布ヶ丘 1-5-1)。^{*2} 正員, 電気通信大学。^{*3} 東京大学大学院(☎ 153-0041 東京都目黒区駒場 3-8-1)。

E-mail: mura-s@mce.uec.ac.jp

た。あらかじめ表面改質を行った厚さ $100\ \mu\text{m}$ 、幅 $5\ \text{mm}$ のシートを紫外線で滅菌処理し、コラーゲンコートを行い引張装置のジグに取付けた。取付けた後のシートの標点間長さは $20\ \text{mm}$ とした。ディッシュ上で培養した細胞をトリプシン処理によってディッシュ底面からはがして回収し、ジグに取付けてプリテンションを与えたシートに L6 をはん種した。このジグごと培地に浸して 24 時間培養し、培養 48 時間後に、細胞

Fig. 1 Schematic diagram of loading system

Fig. 2 Cell visualizing system

が他の細胞と接触しないように増殖をおさえるため、DMEM のみの培地に交換した。ジグを装置に取付ける直前に、 $10\ \text{mM}$ の HEPES を培地に添加したのちジグを引張装置に装着した。なお、ジグはステンレスで制作し、細胞に対する毒性がないことを確認した。

2・2 実験方法 37°C の保温室内で、CCD カメラを取付けた倒立顕微鏡の視野内に一軸引張装置(ひずみ速度: 毎秒 $2.0 \times 10^{-1} \sim 2.5 \times 10^{-5}$ 可変, シグマ光機製)を設置し、細胞の変化の様子を引張開始 2 時間前から 8 時間後まで 10 分間隔で画像として記録した。このデータを記録処理して個々の細胞形態の時間的変化を求めた。なお、撮影と解析には IPLab 製の spectrum を使用した。一軸引張装置にジグを取付け、ディッシュ内でシートを引張るときの模式図を図 1 に示す。このとき、装置の伸びとシリコンの伸びとが一致することを確認してある。図 2 にシステムの模式図を示す。細胞に与える引張変形のひずみ速度は毎秒 2.0×10^{-1} と 2.5×10^{-5} の 2 種類、シートの最大ひずみ量は 2 、 10% の 2 種類とした。シートを最大ひずみまで一定速度で引張り、シートの張力を保持した状態で 6 時間保った。

2・3 評価方法 ここでは、Shape Index (SI)⁽¹⁵⁾、図心の移動速度、累積移動距離を細胞の形態変化の観察指標とした。図心、周長、面積は解析ソフトで算出した。SI 値は次式で定義し、 $0 < \text{SI} < 1$ の範囲で、 1 に近いほど円形となる。

Fig. 3 Photomicrographs of myoblast cells before and exposure to extension

$$SI = \frac{4\pi A}{P^2} \dots\dots\dots (1)$$

A は細胞の投影面積, P は細胞の周長を表す.

累積移動距離は, 細胞画像の図心の位置を1時間ごとに求め, その総和として算出した.

2・4 実験結果 図3(d), (e)にコントロール(引張刺激を受けないもの)の形態変化の様子を示す. 刺激を与えた細胞の例として, 10%ひずみを与えた直後に長円形であったものが, 引張後6時間経過する間, 次第に円形に近づく(SI値が時間とともに増加する傾向にある)様子を図3(a)~(c)に示す. 程度の差はあるものの2%のものもほぼ同様であった. 図4にSIと細胞の数の時間的変化を示す. 時間の項のマイナス値は刺激を与える前, 零は刺激を与えた時点, プラス値は刺激を受けた後の状態を表している. 図4(a)に示すようにコントロールのSI値は0.15~0.40の範囲にあり, 8時間経過後もほとんど変化がなかった. 刺激を与えた細胞の変化の例として, 図4(b)に2%ひずみを与えたものを示す. 刺激を与えた後, SI値が0.70付近まで増加する細胞もあり, 細胞が時間の経過とともに円形に近づいていくことがわかる.

なお, 本実験のデータの再現性を確かめるため, 同一条件で10個強の細胞に対して10%の最大引張りを

(a) Control

(b) Max Strain: 2% Strain rate: 0.2 s⁻¹

Fig. 4 SI distribution

与えたものを3回行ってこれを比較したところ, 各時間経過ごとの細胞について形態変化に違いは見られなかった. そこで, 以降1回の実験で任意に10個強の細胞を抽出し, その形態変化を定量化した.

2・4・1 SIと移動距離との関係 図5に刺激を与えた直後から6時間のSI-移動距離の関係を示す. SI値, 移動距離の値は各データの平均値を使用した. 折れ線で結んだ各点の値が1時間ごとの情報を与え, 矢印が変化の方向を表す. 図5(a)に示すように, コントロールについては, SIの平均値が0.15~0.25の範囲内で移動しているのに対し, 図5(b)に示すように刺激を受けた細胞は, 時間とともにSI値の増加がおり, 移動しながら円形に近づく様子がわかる.

2・4・2 累積移動距離 図6(a)~(e)は, 刺激を与える2時間前から刺激後6時間の計8時間にわたる累積移動距離の時間的変化のデータの平均値の回帰曲線であり, 図中の棒線は各データの最大値と最小値をばらつきの範囲として表す. コントロール [図6(a)] においては時間と移動距離とがほぼ比例関係にある. 図6(b)はひずみ速度の速い10%ひずみを表し, ばらつきは大きいものの累積移動距離の増加率が時間とともに減少していくことがわかる. この傾向は

(a) Control

(b) Subjected to tension

Fig. 5 SI-Migration relation

2%ひずみにおいても同様であった [図 6(d), (e)]. これに対し, ひずみ速度の遅い 10%ひずみの場合, 図 6(c)のようにばらつきは小さく, 増加率に違いがみられる. 変形終了後細胞は動きを停止し, 急速に円形化している [図 5(b)参照]. なお, 今回の実験で細胞が引張方向に配向する傾向は見られなかった.

3. 考 察

3.1 円形化のメカニズム 以上のことより, 条件の異なる 4 種類の実験から, 細胞が刺激を受けたとき, 引張ひずみ速度, 最大ひずみ量にかかわらず円形化が起こることがわかった. そこで刺激を受けた細胞の円形化のメカニズムについて考えてみる.

円形化の要因については以下のものがあげられている. Sims らは, ATP 存在下において, アクチオシンの滑りのメカニズムにより細胞骨格内で張力が生み出されることにより細胞が丸くなることを示した⁽¹⁶⁾. Robert らは, 非筋細胞において Ca^{2+} 依存性のミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) がミオシン軽鎖をリン酸化することにより, 細胞収縮を調節していることを示した⁽¹⁷⁾. また, Ca^{2+} のイオン濃度の局所的な上昇により, ゲルゾリンのようなアクチンフィラメント切断タンパクが活性化され, アクチンフィラメントの網目構造が破壊されてしまい, 細胞骨格系の再編成が起こる⁽¹⁸⁾ ともいわれている. しかしこれらはいずれも生化学的な反応を引き起こす原因となるものを明確にしていない. 一方, 力学的刺激により生化学的な活性化が引き起こされると考えた場合, どの程度の刺激に反応するかが問題となる. 基質の強制変化による細胞内の高粘性原形質ゾルの流体力により細胞骨格が物理的に破壊することもあり得るが, このことについてはほとんど検討がなされていない. また一方で, 細胞構成要素の物性が細胞により大きく異なり, 同じ細胞であっても測定方法によって値が異なるという問題点もある. こうした物性の不確定要因と細胞骨格が超微細構造を持つことによる連続対力学適用の妥当性につ

(a) Control

(b) Max. Strain: 10%, Strain rate: 0.2 s^{-1}

(d) Max. Strain 2%, Strain rate: 0.2 s^{-1}

(c) Max. Strain 10%, Strain rate: $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

(e) Max. Strain 2%, Strain rate: $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

Fig. 6 Migration-Time relation

いても言及しなければならないが、ここでは力学的刺激の大きさの目安を与えるために、連続体を仮定する。シリコンシートに接着している細胞膜の部分はシートから強制変位を受け、細胞内部にある細胞骨格は強制変位で流動した原形質ゾルから流体力を受ける。そこで、ここでは原形質ゾルの粘性や流れの速度を変えたときの細胞骨格の変形挙動を、単純化したモデルを用いて固体-流体連成問題として解析した。なお、筋芽細胞の物性値が得られていないことから、繊維芽細胞のそれを用いて計算しているため、本実験の条件とは異なることをお断りしておく。

3.2 細胞骨格の変形挙動のシミュレーション

3.2.1 フィラメントゾルのモデル化と解析条件

長い円筒状の巨大分子であるアクチンフィラメントを弾性円柱(以降、フィラメントを円柱と呼ぶ)、細胞質ゾルを様な高粘性ニュートン流体としてモデル化した。ここでは、有限領域の2枚の平行平板に両端固定された円柱(細長比16.7)の周りに一様流れ(Poiseuille 流れ)がある場合について計算を行った。円柱の直径6 nm、平板の間隔100 nm、流れ入口-出口間の距離120 nm、流れの入口から円柱中心まで50 nm、円柱から出頃まで70 nmとした。図形の対称性から1/4断面を解析した。モデルの模式図を図7に示す。座標系は円柱の長手方向を z 軸、初期流れの方向を x 軸、これに垂直なものを y 軸とし、円柱の中心点を座標の原点にとった。

Fig. 7 Schematic filament-sol model

Fig. 8 Hexahedral mesh used in analysis

を座標の原点にとった。図8にメッシュ分割図を示す。ソフトウェアのソルバーはSPECTRUM V 1.1(Centric Engineering Systems 製)を使用した。解析は三次元とし、物流の節点数4004、六面体要素による要素数3180、フィラメントの節点数689、要素数504とした。コンピュータはワークステーション(シリコングラフィックス製)を利用した。ゾルの粘性は繊維芽細胞の粘性の測定例⁽⁴⁾より $1.0 \times 10^4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ を採用し、初期流入速度は細胞を培養したシリコンシートを低速度で引張ったときのひずみ速度 $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ をもとに $v_x = 0.875 \text{ nm/s}$ として計算した。円柱は骨格筋のアクチンフィラメントのヤング率 $E = 1.02 \times 10^9 \text{ Pa}$ を用いた⁽¹⁹⁾。

3.2.2 解析結果

3.2.2.1 円柱の変形移動量 $t=0$ で初期速度 v_x を与えたとき、円柱表面位置(a)(図8)の x 方向移動量の時間変化を求めた。図9に示すように、 $t = 3.0 \times 10^{-2} \text{ s}$ 付近まで流速と円柱の移動速度は一致しているが、その後円柱は減速し2秒後に停止した(図9)。また、この移動量は初期流入速度に比例することも確かめた。

3.2.2.2 流線ベクトル 流速ベクトルははじめ x 軸と平行であるが、円柱の移動速度が遅くなると、円柱の周囲に沿った流れができる。円柱後方で渦の発生はなかった。図10に x - y 断面の流線ベクトル図

Fig. 9 Displacement-Time relation of filament (Viscosity: $10^4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$)

Fig. 10 Velocity vector (4 s)

を示す。初期流入速度の違いは、速度ベクトルの大きさにのみ関係した。

3・2・2・3 非定常流れ場での円柱の垂直応力 円柱表面(c) (図8)における応力の時間的な変化を図11(a), (b)に示す。 $t=1.1 \times 10^{-3}$ sにおいては $z=0$ (中央部)のところで $\sigma_{xx}=\sigma_{yy}=0$, $\sigma_{zz}<0$ を示している [図11(a)]。また, $z=50$ nm(固定端)のところで $\sigma_{xx}>0$, $\sigma_{yy}>0$, $\sigma_{zz}>0$ を示している。これは変形の拘束による軸力の作用と思われる。このときの応力の絶対値は定常流れのときの1/1000以下である。

図11(b)は表面(c)の定常状態(4 s)における応力分布を表す。このとき、応力の最大・最小は σ_{zz} でおこり, $z=0$ で圧縮応力の最大値を、固定端で引張応力の最大値を示す [図11(b)]。また、応力の大きさは初期流入速度 [図11(c)]、粘性 [図11(d)] に比例することも確かめた。

3・2・2・4 実験結果との対応 定常状態で初期流入速度 0.875 nm/sのときの円柱に生ずる最大曲げ応力は 1.5×10^{-3} Paと極めて低い値を示した。高ひずみ速度の実験の流入速度は 7000 nm/sであることから、最大曲げ応力は 1.2×10 Paとなる。フィラメントの破断応力が、ヤング率(1.02 GPa)の数十分の程度⁽²⁰⁾であることを考慮すれば、流体力によってフィラメントが破壊して円形化が起こるとは考えにくい。しかし、この程度の応力の大きさに対しても細胞は力

学的刺激を感知し、低ひずみ速度においてより強く応答し、変形を加えている間、累積移動量が増大し続ける [図6(c)] ことから、応力の絶対値ではなく、ある程度継続して刺激を与えることが細胞の動きを活発にし、円形化を促進していると思われる。

4. 結 言

シート上に培養した筋芽細胞に異なるひずみ速度とひずみ量の引張刺激を与えて長時間保持したところ、以下のことがわかった。

(1) 細胞は移動し、細胞の形態に大きな変化が現れる。これに対し、引張刺激を与えなければ細胞は移動するだけで形態変化は現れない。

(2) 細胞の形態変化の指標として Shape Index (SI)をとり、その移動距離との関係を調べたところ、SIは時間とともに増大して円形に近づき、移動速度は減少して行く。

(3) ひずみ速度 $2.0 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ の10%ひずみと2%ひずみでは細胞の累積移動距離の増加率が時間とともに減少するのに対し、ひずみ速度 $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の10%ひずみでは負荷終了後移動が停止し、円形になる。

細胞の変形により、細胞内の原形質ゾルの動きが細胞骨格(アクチンフィラメント)に与える影響を調べるため、固体-流体連成解析を行った結果、以下のことが

Fig. 11 Normal stress distribution at upper stream (c) along z -direction

わかった。

(4) フィラメントに生ずる垂直応力は初期流入速度と粘性の大きさに比例する。

(5) 非定常から定常流れに至る間、フィラメントは始め流速と同速度で変形するが、振動を伴わずに変形と流体力とが釣合った状態で停止する。

(6) 今回の実験条件ではゾルの流体力によりフィラメントが破壊することは考えにくく、円形化の直接的原因とはならない。

最後に、本研究を進めるにあたり計算の便宜と助言をいただいた柴田一美氏、深澤学氏〔ウェーブフロント(株)〕に感謝する。また実験に協力下さった金子克巳氏(電気通信大学)、山下正道氏(文部省宇宙科学研究所)および田中幹人氏(東京大学大学院)にお礼申し上げます。

文 献

- (1) Simon, S. I. and Schmid-Schönbein, G. W., Kinematics of Cytoplasmic Deformation in Neutrophils During Active Motion, *J. Biomech. Eng.*, **112**(1990), 303-310.
- (2) Ragsdale, G. K., Phelps, J. and Luby-Phelps, K., Viscoelastic Response of Fibroblasts to Tension Transmitted through Adherens Junctions, *Biophys. J.*, **73**(1997), 2798-2808.
- (3) Sato, M., Theret, D. P., ほか 2 名, Application of the Micropipette Technique to the Measurement of Cultured Porcine Aortic Endothelial Cell Viscoelastic Properties, *Trans. ASME, J. Biomech. Eng.*, **112**(1990), 263-268.
- (4) Thoumine, O. and Ott, A., Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation, *J. Cell Sci.*, **110**(1997), 2109-2116.
- (5) Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E., Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton, *Science*, **260**(1992), 1124-1127.
- (6) Kolodney, M. S., Isometric Contraction by Fibroblasts and Endothelial Cells in Tissue Culture: A Quantitative Study, *J. Cell Biol.*, **117**-1 (1992), 73-82.
- (7) 高久田和夫・宮入裕夫, 力学的刺激による生体繊維組織の強化, *機論*, **63**-615, A (1997), 194-201.
- (8) Kanda, K., ほか 2 名, Two-dimensional Orientational Response of Smooth Muscle Cells to Cyclic Stretching, *Asaio J.*, (1992), M382-385.
- (9) Vandeburgh, Mechanical stimulation of skeletal muscle increase prostaglandin $F_{2\alpha}$ Production, Cyclooxygenase activity, and cell growth by a pertussis toxin sensitive mechanism, *J. Cellular Physiol.*, **163**(1995), 285-294.
- (10) Matsuo, T., Bovine and Porcine trabecular cells produce prostaglandin $F_{2\alpha}$ in response to cyclic mechanical stretching, *Jpn J. Ophthalmol.*, **40**(1996), 289-296.
- (11) 曾我部正博・成瀬恵治・山田恭子・井上真寿美・浅野久木, 機械的刺激に対する内皮細胞の Ca^{2+} 応答と形態応答, *脈管学*, **34**-12 (1994), 989-994.
- (12) 藪崎克巳・大日方昂, 新しい培養システム—電気刺激と機械的な張力による培養筋細胞の発達—, *運動生化学*, **5**(1993), 49-59.
- (13) 片岡則之・宇治田伸吾・木村圭秀・佐藤正明, 低密度分布およびコロニー状態での培養内皮細胞の流れに対する形態反応, *機論*, **63**-607, C(1997), 204-211.
- (14) Sirenko, Y. M., ほか 2 名, Dynamics of cytoskeletal filaments, *Phys. Rev.*, E, **54**-2 (1996), 1816-1823.
- (15) Cornhill, J. F., ほか 5 名, Quantitative study of the rabbit aortic endothelium using cascular caste, *Atherosclerosis*, **35**(1980), 321-337.
- (16) Sims, J. R., ほか 2 名, Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape, *J. Cell Sci.*, **103**(1992), 1215-1222.
- (17) Wysolmerski, R. B. and Lagunoff, D., Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(1990), 16-20.
- (18) Alberts, B., ほか 5 名, 細胞の分子生物学, 第 3 版, (1995), 837, 教育社.
- (19) Yanagida, T., ほか 3 名, Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin, *Nature*, **307**(1984), 58-60.
- (20) Brown, N., The relationship between yield point and modulus for glassy polymers., *Mater. Sci. Eng.*, **8**-2 (1971), 69-73.