基質弾性率の変化が血管平滑筋細胞の形態・張力・分化に及ぼす影響 (原子間力顕微鏡を用いた細胞の表面形態・張力変化の解析)

長山 和亮^{*1}, 西宮 昂平^{*2}

The effects of substrate stiffness on the morphology, intercellular tension, and differentiation of vascular smooth muscle cells (Analysis of the surface microstructure and tension of cells using atomic force microscopy)

Kazuaki NAGAYAMA^{*1} and Kouhei NISHIMIYA^{*2}^{*1, *2}Micro-Nano Biomechanics Laboratory, Department of Mechanical Systems Engineering, Ibaraki University
4-12-1 Nakanarusawa-cho, Hitachi-shi, Ibaraki 316-8511, Japan

Received: 3 October 2018; Revised: 5 November 2018; Accepted: 28 November 2018

Abstract

Vascular smooth muscle cells (VSMCs), one of the main components of arterial walls, actively remodel arterial wall in which they reside through biomechanical signals applied to themselves. The contractile or differentiated VSMCs were observed in normal blood vessels. In pathological vascular conditions, they dedifferentiated from contractile to a non-contractile or synthetic cells, and a similar change is observed when VSMCs are placed in culture conditions. The mechanisms regulating VSMC differentiation remain unclear at this stage. Here we investigated the effects of substrate stiffness on the morphology, intercellular tension, and differentiation of VSMCs. Rat VSMCs were cultured on the polyacrylamide gels, whose elastic modulus was 15 kPa, 40 kPa, and 85 kPa. Using fluorescent microscopy image-based analysis, and nano-indentation imaging with atomic force microscopy, we found that cell spreading and cell stiffening was induced by substrate stiffening in VSMCs. Interestingly, VSMCs on the substrates with middle stiffness (40 kPa) showed significant elongation and shape polarization, and their expression ratio of α -SMA with F-actin cytoskeleton was significantly higher than that of the cells on the other substrates. These results indicate that there exists an optimal substrate stiffness to promote VSMC differentiation, and cell shape polarization might be a key factor for VSMC differentiation.

Keywords : Cell biomechanics, Mechanobiology, Substrate stiffness, Smooth muscle cell differentiation, Atomic force microscopy

1. 緒 言

血管や骨などの生体組織を構成している細胞は、生体内に生じる力の変化を感知して、自身の生化学的・材料力学的特性を変化させながら周囲の組織構造を変化させることが知られている。中でも血管中膜を構成している平滑筋細胞は、収縮・弛緩によって血管径を調整している重要な細胞であり、力に応答する代表的な細胞である。この細胞は、正常な力学環境下の血管壁内では収縮要素に富んだ「収縮型」と呼ばれる表現型を示し、その収縮能により血管径を正常に調節している。しかし、静的無負荷状態の培養環境に曝すと収縮機能を著しく低下させ、増殖・運動能が向上し、コラーゲンなどの細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) を盛んに合成する「合成型」細胞へ脱分化する (Campbell and Campbell, 1995)。このような合成型細胞は、動脈硬化病変部位でも確認されており、生体器官の健全性維持という観点からも、力学的作用に基づく細胞機能変化の詳細を明らかにすること

No.18-00387 [DOI:10.1299/transjsme.18-00387], J-STAGE Advance Publication date : 6 December, 2018

^{*1} 正員, 茨城大学大学院理工学研究科機械システム工学専攻 (〒316-8511 茨城県日立市中成沢町4-12-1)^{*2} 茨城大学工学部知能システム工学科

E-mail of corresponding author: kazuaki.nagayama.bio@vc.ibaraki.ac.jp

が重要となってきた。

近年では、細胞への直接的な力だけでなく、細胞の足場となる ECM の力学特性も細胞の様々な機能（分化、成長、運動、物質生産など）の決定に関わることが分かってきている。例えば、細胞は、より硬い基質の方向に移動するメカノタクシスと呼ばれる走行性を持つ (Lo et al., 2000)。また、硬いゲル基質上で培養された線維芽細胞は、より強固に基板に接着して扁平な形状を呈するのに対して、柔らかいゲル上で培養された細胞は、ゲルへの接着が弱く比較的丸い形状を保つ (Yeung et al., 2005)。また、間葉系幹細胞を硬さの異なるゲル基板上で培養すると、柔らかいゲル（弾性率 1 kPa 以下）上では神経細胞分化を示すマーカータンパク質の発現が上昇し、中間的な硬さ（～10 kPa）のゲル上では筋細胞系に、そしてさらに硬いゲル上では骨細胞系のマーカータンパク質の発現が向上することが報告されている (Engler et al., 2006)。血管平滑筋細胞に関しても、基質弾性率が高くなるほど、基質との接着が増強され細胞面積が増加すること (Sazonova et al., 2011) や、細胞増殖が促進されること (Xie et al., 2018) などが明らかとなってきた。しかし、このような基質の力学特性の変化に応じて、血管平滑筋細胞の形態や張力がどのように変化し、その分化に影響を与えているのか、詳細は明らかとなっていない。

そこで、本研究では培養血管平滑筋細胞を対象として、弾性率の異なる基質上で培養しつつ、生きた細胞の張力状態を原子間力顕微鏡 (Atomic force microscope: AFM) から得た詳細な表面弾性率マップから推察した。さらに、細胞内構造の蛍光観察を併用して、細胞の詳細な形態と、平滑筋分化に密接に関わる F-アクチンと平滑筋型 α アクチン（以下、 α -SMA）の分布や発現変化を捉えながら、これらの関連性を統合的に調査した。

2. 実験方法

2・1 試料細胞の準備

試料として、ラット大動脈由来血管平滑筋細胞株 (A7r5, CRL-1444, ATCC, USA) 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 μ g/ml), Sigma) を含む DMEM 培地 (和光) を用い、CO₂ インキュベータ (AH-160, アステック) 内で、37°C、湿度約 100%、5%-CO₂、95%-air の環境下で培養した。細胞がサブコンフルエントに達した時点で、1:4 の比率で継代して使用した。

2・2 ポリアクリルアミドゲル (PA ゲル) 基板の作製と弾性率計測

本研究では、比較的容易に弾性率を調整できるポリアクリルアミドゲル（以下 PA ゲル）を細胞培養基質として用いた。アクリルアミド溶液 (#1610140, Bio-Rad) と架橋剤 N,N'-Methylen bis (acrylamide) (#1610144, Bio-Rad) の濃度を調整して弾性率の異なる PA ゲル基質を作製することができる。ここで、アクリルアミドの総モノマー濃度 (%T) と架橋度 (%C) は次式で表される (Boudou et al., 2006)。

$$\%T = \frac{Acrylamide(g) + Bis(g)}{Acrylamide(g) + Bis(g) + Distilldwater(g)} \times 100 \quad (1)$$

$$\%C = \frac{Bis(g)}{Acrylamide(g) + Bis(g)} \times 100 \quad (2)$$

$$(3\% \leq \%T \leq 10\% \quad \text{and} \quad 0.2\% \leq \%C \leq 5\%)$$

図 1 に PA ゲルの作製手順を示す。まず、直径 35 mm のガラスボトムディッシュ (GD-400, Bio-Bik) にアミノシラン (3 Aminopropyltrimethoxysilane, A3648, Sigma) をコートして、ガラス面と PA ゲルの接着性を高めた。次に、上記の %T と %C を調整してアクリルアミド混合溶液を作製し、光重合開始剤である Irgacure2959 (Wako) を 0.001 g/ml の割合で加えた。このアクリルアミド混合溶液をガラス面に適量広げ、その上にカバーガラスを被せてゲル表面を平滑化した。そして、1 時間紫外線を照射することにより PA ゲルを重合させ、カバーガラスをはがして使用した。ゲルの厚みは 0.1–0.2 mm となるようにアクリルアミド混合溶液量を調整した。

Fig. 1 Process flow diagram for fabricating the polyacrylamide gel substrate.

引き続き、作製した PA ゲル基質の弾性率を計測した。PA ゲル基質上をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) で満たし、細胞組織計測用の AFM (NanoWizard 4 BioScience AFM, JPK Instruments) を取り付けた倒立顕微鏡 (IX73, オリンパス) のステージ上に静置した。そして、先端に直径 5 μm の球状ビーズを付着させたカンチレバー (CP-PNPS-BSG-A, sQube) を使用してゲル表面に対しランダムに押込み試験をした。このとき、カンチレバーの押込み速度は 2 $\mu\text{m/s}$ とし、押込み量は約 1 μm とした。得られたフォースカーブに対し、(3) のヘルツの接触理論の式で近似し弾性率を求めた。

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{(1-\nu^2)} \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (3)$$

ここで F は力、 ν は試料のポアソン比 (非圧縮性を仮定して $\nu=0.5$)、 E は試料の弾性率、 R はカンチレバー先端球の半径、 δ は試料変形量である。なお、使用したカンチレバーのバネ定数は 0.15~0.20 N/m の範囲とした。

本研究では、アクリルアミドの総モノマー濃度 (%T) と架橋度 (%C) の組み合わせを 3 条件設定し、PA ゲルを作製して、その弾性率を計測した (表 1)。ゲルの表面弾性率の平均値は、それぞれ、約 1.5 kPa, 40 kPa, 85 kPa となった。

Table 1 Elastic modulus of the polyacrylamide gel substrates measured by atomic force microscopy. (mean $\pm$ S.D.)

Concentration condition	6.5%T-0.5%C (n = 10)	10%T-2%C (n = 10)	10%T-5%C (n = 10)
Elastic modulus E_{sub} (kPa)	1.6 $\pm$ 0.1	40.3 $\pm$ 2.1	85.9 $\pm$ 1.1

2・3 PA ゲル基板上の細胞表面形状と弾性率計測

2・2 節で作製した弾性率の異なる PA ゲル基質に対し、細胞接着を促すために、表面に細胞接着タンパク質であるフィブロネクチン溶液 (50 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) を滴下し、クリーンベンチ内で 2 時間静置してコートした。そして、A7r5 細胞を播種し、CO₂ インキュベータ内で 3 日間静置培養して、基質に接着していることを確認した。続いて、CO₂ インキュベータ外での計測に備え、培地を CO₂ independent medium (Invitrogen) に交換した。そして、2・2 節の AFM を備えた倒立型顕微鏡のステージ上に細胞試料を設置し、計測対象とする細胞の位相差画像を撮影した。引き続き、本 AFM の付属機能である quantitative imaging mode (QI mode) を用いて生細胞の表面形状と表面弾性率を計測した。すなわち、室温 (約 25°C) 環境下で PA ゲル基質上に張り付いた細胞試料の 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ の領域に対し、AFM カンチレバーによる高速の押込み試験を 128 $\times$ 128 箇所について等間隔に実施して走査した。ここでは、細胞表面の精密計測の観点から探針先端の曲率半径が 20 nm 以下のカンチレバー (BioLever-mini, BL-AC40TS-C2, オリンパス) を使用した。得られた 128 $\times$ 128 個のフォースカーブに対し、細胞の変形量が約 500 nm の範囲までを(4) のヘルツの接触理論の式で近似して、カンチレバーと試料との接触点および試料表面の弾性率を半自動的に算出した。

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta^2 \quad (4)$$

ここで F は力, ν は試料のポアソン比 (非圧縮性を仮定して $\nu = 0.5$), E は試料の弾性率, α はカンチレバー探針先端の半角, δ は試料変形量である. なお, ここではバネ定数が $0.06 \sim 0.08$ N/m の範囲のカンチレバーを使用し, 押込み試験での最大負荷力は 1 nN に固定した. カンチレバーと試料との接触点および試料の表面弾性率データを 128×128 pixel の画像としてまとめ, 細胞表面の微細形状マップおよび弾性率マップを作成した. 細胞表面の微細形状マップから, PA ゲル基質部と細胞の中心付近との高さの差を, その細胞の高さとして求めた. また, 細胞が薄い部位では, 細胞の表面弾性率に基質硬さの影響が現れる可能性がある. そこで今回は, 細胞表面の弾性率マップにおいて, 最も厚みのある細胞中心付近の $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ の領域の平均弾性率を, その細胞の表面弾性率として評価した.

2・4 PA ゲル基板上の細胞形態と平滑筋分化の調査

2・3 節と同様に, 弾性率の異なる PA ゲル基質上で 3 日間培養した A7r5 細胞を準備し, 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フィラメント (以下, F-アクチン) を蛍光標識し, 引き続き Hoechst33342 ($1/1000$, Sigma) で 10 分間処理して核内 DNA を蛍光標識した. また, 血管平滑筋分化への影響を調べるため, 代表的な血管平滑筋マーカータンパク質である α -SMA の発現及び分布様態に注目した. このため, 一次抗体として α -SMA 抗体 (A2547, clone 1A4, Sigma, $1/200$) を加え 1 時間静置後, Alexa Fluor 488 標識の二次抗体 (Molecular Probes) を加え 1 時間静置して免疫蛍光染色した.

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, 40 倍の対物レンズ (LUCPlan FLN40x, 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 F-アクチン, 細胞核, α -SMA 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. また, 蛍光染色のバラツキを低減するため, それぞれの弾性率の PA ゲル基質上の細胞は, 同一日に染色して直ちに蛍光画像を撮影した.

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, 細胞の面積および, 次式で表される Shape Index (S.I) を算出した.

$$\text{S.I.} = \frac{4\pi A}{p^2} \quad (5)$$

ここで, S.I. は $0 \sim 1$ の範囲の値をとり, 1 に近づくほど円形に近い形態であることを表す. A は細胞の面積, p は細胞の周長である. また, 併せて, 個々の細胞内における F-アクチンの蛍光輝度 $I_{\text{F-actin}}$ と α -SMA の蛍光輝度 $I_{\alpha\text{-SMA}}$ を, それぞれ画像 1 ピクセルあたりの平均値とした算出した. $I_{\text{F-actin}}$ と $I_{\alpha\text{-SMA}}$ は, それぞれ, 細胞内での F-アクチンと α -SMA 平面的な密度の指標と考えられることから, これらに細胞面積 A を乗じることで, $I_{\text{F-actin}} \times A$ と $I_{\alpha\text{-SMA}} \times A$ を個々の細胞内での発現量の指標として算出した. また, 細胞内の全 F-アクチンに対する α -SMA の発現比率として両者の比 $I_{\alpha\text{-SMA}} / I_{\text{F-actin}}$ も評価した. なお, それぞれの蛍光画像にて細胞が存在しない箇所の背景輝度も計測し, その平均値を各タンパク質の輝度値から減算することで, ゲルの自家蛍光等の影響を極力低減して解析した.

2・5 統計解析

細胞の形態データおよび蛍光輝度データに関して, ANOVA で分散分析後, Steel-Dwass 法によって多重比較検定した. 統計解析には, 大阪大学遺伝情報実験センターが公開している統計解析用プログラム MEPHAS (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/testdocs/tomocom/>) を使用した.

3. 結 果

PA ゲル基質上で培養した A7r5 細胞の F-アクチンと核の蛍光画像を図 2 に示す. いずれの基質上でも細胞が接着している様子がみられたが, 軟らかい基質上 ($E_{\text{sub}} = 1.5 \text{ kPa}$) では, 一部, 剥がれているような細胞もあり, 比較的接着が弱い状態にあると考えられた (図 2A). 基質弾性率が高くなるにつれ細胞も広がり, ストレスファイバ状に F-アクチンが発達していく様子が見られた (図 2B, C). また, 最も硬い基質上 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) になると細胞形態が不規則になり, F-アクチンの方向にもバラツキが生じるように見えた. 基質弾性率 $E_{\text{sub}} = 1.5 \text{ kPa}$, 40 kPa , 85 kPa の細胞試料について, 撮影した蛍光画像を用いて細胞密度を計測したところ, それぞれ, $29 \pm 12 \text{ cells/mm}^2$ (mean $\pm$ S.D., $n = 8$ dishes), $47 \pm 19 \text{ cells/mm}^2$ ($n = 7$ dishes), $56 \pm 14 \text{ cells/mm}^2$ ($n = 7$ dishes) となり, 基質が硬くなるほど有意に細胞密度が上昇し, 細胞増殖が盛んになっていることが分かった.

Fig. 2 Typical examples of the fluorescent images of F- actin (red) and the nucleus (cyan) in vascular smooth muscle cells cultured on the polyacrylamide gel substrates. Thick bundles of actin stress fibers were observed clearly in the cells on the substrates with middle (40 kPa) and maximum (85 kPa) stiffness. The cell numbers also increased significantly as increasing the substrate stiffness.

PA ゲル基質上の細胞について, AFM による高速走査押込み試験で得られた細胞表面形状マップと弾性率マップの代表例を図 3 に示す. 軟らかい基質上 ($E_{\text{sub}} = 1.5 \text{ kPa}$) の細胞表面は比較的滑らかであり, 特に細胞核付近が高く盛り上がった形状であった (図 3D). 細胞の表面弾性率は細胞全域に渡って均一な値を示し, PA ゲル基質と同程度の値であった (図 3G, Cell A). 一方, PA ゲル基質が硬くなるにつれて細胞の高さが低下し (図 3E, F), 表面弾性率が特に高い領域がファイバー状に分布している細胞が多く見られた (図 3H, Cell B; 図 3I, Cell C). 細胞の中心付近で得られたフォースカーブに注目すると, 押込み深さが 200 nm を越えるあたりから曲線の傾きに顕著な差が見られ (図 3J), 硬い基質上で培養した細胞ほど, 表面の硬さが上昇していることが分かった.

平滑筋分化マーカーである α -SMA の代表的な蛍光画像 (緑色) に対し, F-アクチン (赤色) と核 (青色) の画像をマージした状態で図 4 に示す. 軟らかい基質上 ($E_{\text{sub}} = 1.5 \text{ kPa}$) では α -SMA の輝度が高い細胞が疎らに存在し, そのような細胞内では α -SMA が細胞全域に均一に分布しているように見えた (図 4A). 中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) では, ファイバー状に分布する α -SMA がはっきりと見られ, 細胞全域に渡って F-アクチンの局在と良く一致していた. また, 細胞によっては F-アクチンよりも α -SMA の輝度が高い様子が観察された (図 4B, 白矢印). 最も硬い基質上 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) でもファイバー状に分布する α -SMA がみられたが, その局在が細胞の中心付近に偏っており, F-アクチンの輝度よりも相対的に低いように見えた (図 4C, 白矢頭).

以上の様な蛍光画像および AFM データから, 細胞面積 A , Shape index S.I., 細胞の高さ H , 細胞表面弾性率 E , F-アクチンと α -SMA の発現指標 $I_{\text{F-actin}} \times A$ および $I_{\alpha\text{-SMA}} \times A$, F-アクチンに対する α -SMA の発現比率 $I_{\alpha\text{-SMA}} / I_{\text{F-actin}}$ を求め, 基質弾性率ごとにまとめた結果を図 5 に示す. 細胞面積 A と細胞表面弾性率 E は, 軟らかい基質 ($E_{\text{sub}} = 1.5 \text{ kPa}$) から中程度の硬さの基質 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) にかけて有意に増加し, さらに最も硬い基質 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) になると緩やかに増加していく傾向が見られた (図 5A, D). これと相反するように細胞の高さ H は単調に減少する傾向が見られた (図 5C). しかし S.I. は, 中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) で最も小さな値となり, 他群に比べ細胞が有意に細い形状になっていることが分かった. F-アクチンと α -SMA の発現量も, 基質弾性率の上昇に伴い増加傾向にあり, 特に F-アクチンにおいては有意な増加となった (図 5E). 一方で, F-アクチンに対する

α -SMA の発現比率に注目すると、中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) で最も大きな値となり、さらに基質が硬くなると細胞内での α -SMA の発現比率が有意に低下する結果となった (図 5F)。

Fig. 3 Typical atomic force microscopy (AFM) images. The phase contrast images (A–C), surface topography (D–F), and mechanical properties (F–I) of vascular smooth muscle cells cultured on the polyacrylamide gel substrates. The precisely controlled, high-speed indentation tests were performed to obtain a force-indentation curve at each pixel of 128×128 pixels. An example of the force-indentation curves of the cells described in G–I (J). The cell stiffness increased significantly as increasing the substrate stiffness.

Fig. 4 Typical examples of the fluorescent images of F-actin (red), nucleus (blue), and α -SMA (green) in vascular smooth muscle cells cultured on the polyacrylamide gel substrates. Note that expression ratio of α -SMA with F-actin cytoskeleton in cells on the substrates with middle stiffness (40 kPa) was significantly higher than that of the cells on the other substrates.

Fig. 5 Changes in the projected cell area (A), shape index (B), cell height (C), surface elastic modulus (D), F-actin or α -SMA expression (E), and the expression ratio of α -SMA to F-actin (F) in vascular smooth muscle cells cultured on the polyacrylamide gel substrates. C and D were obtained by AFM measurements, and others were assessed with fluorescent images. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M.

4. 考 察

これまでに、アクリルアミドゲルなどを利用して基質の弾性率を変化させ、細胞の増殖性の変化や分化への影響に注目した研究が精力的に進められている (Engler et al., 2006). 例えば、血管平滑筋細胞に関しても、基質弾性率が高くなるほど細胞面積が増加し、Talin や Vinculin などの焦点接着斑を形成するタンパク質の発現が向上すること (Sazonova et al., 2011) や、細胞増殖が促進され、マトリックスメタロプロテアーゼの産生が盛んになることなどが報告されている (Xie et al., 2018). しかし、このような細胞機能の変化に関わる細胞の形態や張力の変化の詳細については、定量的にはほとんど明らかとされていなかった. 一方、本研究では培養血管平滑筋細胞を対象として、弾性率の異なる基板上で培養しつつ、生きた細胞の張力状態を、AFM から得た詳細な弾性率マップから推察した. 細胞内構造の蛍光観察を併用して、細胞の詳細な形態と、平滑筋分化に密接に関わる F-アクチンと α -SMA 分布や発現変化を捉えながら、実際の細胞の張力状態を精密に計測し、これらを統合的に解析した点が本研究の第一の優位性と言える.

本研究では、弾性率の異なるアクリルアミドゲル基板上で血管平滑筋細胞を培養した場合、基質弾性率が高くなるほど、細胞面積が増加し、細胞内のアクチン細胞骨格も発達して、細胞が増殖していく傾向が見られた. これらは、血管平滑筋細胞を始め (Sazonova et al., 2010; Brown et al., 2010)、他の多くの間葉系細胞 (Park et al., 2010) でも見られる現象であり、基質弾性率上昇に伴う焦点接着斑の安定化、アクチン細胞骨格の発達というサイクルによるものと考えられる. しかし本研究では、中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) と最も硬い基質上 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) を比べると、細胞面積の有意な増加は見られず (図 5A)、蛍光画像によるアクチン細胞骨格の発達具合にも明確な差が見られなかった (図 2B, C). また、AFM 計測の結果から、基質が硬くなるほど細胞中心付近の高さが減少し表面弾性率が上昇していく傾向はあったが、やはり、中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) の細胞と、最も硬い基質上 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) の細胞の間に統計的な有意差が見られなかった (図 5C, D). 一方で、最も硬い基質上 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) の細胞では、ファイバー状の硬い領域がよりはっきりと見られ (図 3I, Cell C)、個々のストレスファイバの張力が上昇していることが示唆された. 基質弾性率 $40 \text{ kPa} \sim 85 \text{ kPa}$ 間では、細胞表面全体のアクチンネットワークを含めた平均的な張力上昇に比べ、個々のストレスファイバレベルの構造の安定化とその張力上昇の方が、より敏感に生じているものと考えられる.

細胞形態に着目すると S.I. 値の変化が特徴的であった. 基質弾性率 $1.5 \text{ kPa} \sim 40 \text{ kPa}$ 間で有意に減少した SI 値が、 $40 \text{ kPa} \sim 85 \text{ kPa}$ 間では逆に増加した. このとき基質弾性率 85 kPa にて、細胞の幅が増加すると共にアクチン細胞骨格が全方向に走行するような細胞も見られた (図 2C, 図 4C). すなわち、中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) で、血管平滑筋細胞が最も細長い形態となり細胞の極性化が促進されると考えられるが、さらに基質弾性率が上昇すると、個々のストレスファイバの張力が上昇するとともに、細胞極性が失われていくのかもしれない.

このような、基質硬さの変化に伴う細胞形態の極性化は、細胞の分化にも影響を与える可能性がある. 実際に蛍光画像解析によって F-アクチンと α -SMA の発現量を調べたところ、基質弾性率の上昇に伴い増加傾向にあった (図 5E). しかし、F-アクチンに対する α -SMA の発現比率は、中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) で最も大きな値となった (図 5F). また、中程度の硬さの基質上 ($E_{\text{sub}} = 40 \text{ kPa}$) では、 α -SMA の発現が細胞全域に渡って比較的均一に見えたのに対し (図 4B, 白矢印)、最も硬い基質上 ($E_{\text{sub}} = 85 \text{ kPa}$) では、細胞端部分での α -SMA の発現が低く見えた (図 4C, 白矢頭). Quinlan ら (2012) は、弾性率の異なる PA ゲル基板上で弁間質細胞を培養した場合に、基質弾性率が $15 \text{ kPa} \sim 80 \text{ kPa}$ の基板上で α -SMA の発現が上昇し、ガラス基板上では逆に α -SMA の発現が低下することを示している. また、Scott ら (2017) は、血管外膜線維芽細胞について、 1 kPa , 3 kPa , 10 kPa の基質でそれぞれ培養して比較した結果、この実験系にて中程度の硬さに相当する 3 kPa で α -SMA の発現が向上することを報告している. 細胞種には違いがあるが、数 $\text{kPa} \sim$ 数 10 kPa といった、比較的中程度の基質弾性率にて、平滑筋分化が最も促進される可能性が挙げられる. ところで、実際の血管壁中のラメラユニットにて平滑筋細胞は弾性板 (エラスチン) に挟まれた状態で接着していると考えられるが、血管組織中のエラスチンの弾性率は約 440 kPa と報告されており (Matsumoto et al., 2016)、今回、最も平滑筋分化が進んだゲル基質の弾性率 (40 kPa) と大きく異なっている. 一方、血管組織から摘出した直後の収縮型平滑筋細胞の弾性率は、約 15 kPa (Ca^{2+} free 環境での弛緩状態) から約 88 kPa (セロトニン投与時の収縮活性状態) に変化すると報告もある (Nagayama and Matsumoto, 2004). これらを考慮すると、培養下の平滑筋細胞の分化が最も促進される基質弾性率は、収縮型の

平滑筋細胞そのものの生理的範囲の弾性率（上記，15 kPa から 88 kPa の間の値）となるのかもしれない．現状では，このような中程度の基質弾性において，平滑筋分化が促進されるメカニズムの根底となる生化学シグナルは不明であるが，本研究で観察されたような細胞の形態的な極性化が 1 つの重要な要因となっている可能性がある．

本研究では，作製したゲル基質から十分な量の細胞が回収できなかったことから，細胞内タンパク質の発現評価として蛍光画像の輝度解析のみを用いた．励起光強度や光学フィルタの設定，カメラの露光時間など，撮影条件を統一して計測してはいるが，より多数の細胞試料を使ったウェスタンブロッティング等によるタンパク質の定量が必要と考えられる．また，本研究における AFM を活用した力学的視点からの解析と共に，平滑筋分化に関わる血清応答因子（serum response factor : SRF）や，近年，平滑筋脱分化に密接に関わるとされる YAP/TAZ などの転写活性化補助因子に注目した生化学シグナル解析を組み合わせるなどして，基質弾性率変化に応じた平滑筋分化機構をより詳細に明らかにしていく必要がある．

5. 結 言

本研究では，弾性率の異なる基質として 15 kPa，40 kPa，85 kPa のアクリルアミドゲル基質を作製し，これらの基質上で血管平滑筋細胞を培養して，生きた細胞の張力状態を AFM から得た詳細な表面弾性率マップから推察した．さらに，細胞内構造の蛍光観察から，細胞の形態と，平滑筋分化に密接に関わる F-アクチンと α -SMA の発現変化を捉えながら，これらの関連性を統合的に調べた．基質弾性率の上昇に伴い，細胞表面のアクチン細胞骨格が発達し，細胞面積と表面弾性率に増加傾向が見られたことから，硬い基質になるほど平滑筋細胞内の張力が徐々に増加することが分かった．一方，中程度の弾性率である 40 kPa の基質上にて，細胞が最も細長い形態となり，F-アクチンに対する α -SMA の発現比率が最も高くなった．基質硬さの変化に応じて細胞が細長い形態へと極性化することが，平滑筋分化に密接に関わる可能性が示唆された．

謝 辞

本研究の一部は科研費（17H02077），内藤記念科学奨学金・研究助成，高橋産業経済研究財団研究助成，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（JP18gm0810005）の支援のもとに行われました．ここに記して謝意を表します．

References

- Boudou, T., Ohayon, J., Picart, C. and Tracqui, P., An extended relationship for the characterization of Young's modulus and Poisson's ratio of tunable polyacrylamide gels. *Biorheology*, Vol.43, No.6 (2006), pp.721-728.
- Brown, X.Q., Bartolak-Suki, E., Williams, C., Walker, M.L., Weaver, V.M. and Wong, J.Y., Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis, *Journal of Cell Physiology*, Vol.225, No.1 (2010), pp.115-122.
- Campbell, G.R. and Campbell, J.H., *The Vascular Smooth Muscle Cell*, Academic press, Inc. New York (1995), pp.1-15.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. and Discher D.E., Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell*, Vol.126, No.4 (2006), pp.677-689.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M. and Wang, Y.L., Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, Vol.79 (2000), pp.144-152.
- Matsumoto, T., Sugita, S. and Nagayama, K., *Tensile properties of smooth muscle cells, elastin, and collagen fibers*, *Vascular Engineering*, Springer (2016), pp.127-140.

- Nagayama, K. and Matsumoto, T., Mechanical anisotropy of rat aortic smooth muscle cells decreases with their contraction (possible effect of actin filament orientation), JSME International Journal Series C, Vol.47, No.4 (2004), pp.985-991.
- Park, J.S., Chu, J.S., Tsou, A.D., Diop, R., Tang, Z., Wang, A. and Li, S., The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β , Biomaterials, Vol.32, No.16 (2011), pp.3921-3930.
- Quinlan, A.M. and Billiar, K.L., Investigating the role of substrate stiffness in the persistence of valvular interstitial cell activation, Journal of Biomedical Materials Research Part A, Vol.100, No.9 (2012), pp.2474-2482.
- Sazonova, O.V., Lee, K.L., Isenberg, B.C., Rich, C.B., Nugent, M.A. and Wong, J.Y., Cell-cell interactions mediate the response of vascular smooth muscle cells to substrate stiffness, Biophysical Journal, Vol.101, No.3 (2011), pp.622-630.
- Scott, R.A., Kharkar, P.M., Kiick, K.L. and Akins, R.E., Aortic adventitial fibroblast sensitivity to mitogen activated protein kinase inhibitors depends on substrate stiffness, Biomaterials, Vol.137 (2017), pp.1-10.
- Xie, S.A., Xie, S.A., Zhang, T., Wang, J., Zhao, F., Zhang, Y.P., Yao, W.J., Hur, S.S., Yeh, Y.T., Pang, W., Zheng, L.S., Fan, Y.B., Kong, W., Wang, X., Chiu, J.J. and Zhou, J., Matrix stiffness determines the phenotype of vascular smooth muscle cell in vitro and in vivo: Role of DNA methyltransferase 1, Biomaterials, Vol.155 (2018), pp.203-216.
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. and Janmey, P.A., Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. Cell Motility and the Cytoskeleton, Vol.60 (2005), pp.24-34.