

## 気液および固液界面遷移領域における非平衡状態の 高分解能観察

### [1] 組織

代表者：渡部 正夫  
(北海道大学大学院工学研究院)

対応者：川田 善正  
(静岡大学電子工学研究所)

分担者：  
小林 一道 (北海道大学大学院工学研究院)  
前田英次郎 (北海道大学大学院工学研究院)

### [2] 研究経過

気液および固液界面遷移領域における非平衡状態の流れについては未知の事象が多いものの、それらを明らかにすることで様々な極微小流路流れの物理特性を明らかにすることが可能となる。実際、生体における細胞間で形成されるギャップ結合は、1チャンネルが直径約1 nmの中孔を有する極小流路である。分子量1 kDa以下の分子やイオンがギャップ結合を介して輸送されることが細胞間のシグナル伝達として作用し、細胞間で機能の同期が行われる。ギャップ結合シグナル伝達が細胞の力学刺激に対する細胞応答において必要不可欠であることはこれまでの研究で明らかにされている。しかしながら、力学刺激によりギャップ結合シグナル伝達自体がどのように制御されるかについては、明らかにされていない点が多い。そこで、本研究ではギャップ結合シグナル伝達の力学制御を検討するため、細胞に導入した蛍光分子の移動度を見かけの拡散係数として定量的に算出し、力学負荷が拡散係数に及ぼす影響を評価することを目的とした。

本プロジェクトは、本年度が初年度であった。以下、本年度の研究活動状況の概要を記す。なお、2014年5月には前田が、2014年9月には渡部がそれぞれ静岡大学工学部を訪問し、研究打ち合わせを行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

まず、細胞内および細胞間の蛍光分子の移動を可視化する手法として Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP) 法を確立し、次いで FLIP 結果にフィッティングすることで拡散係数を推定する数理モデルを確立した。

FLIP 法は直列に連なった細胞群に対して行う為、ウサギアキレス腱から採集した腱細胞をマイクログループ基質上で配列培養した。マイクログループ基質は、フォトリソグラフィおよびソフトリソグラフィを用いて高さ・幅・間隔がそれぞれ10 μmのマイクログループをPDMS製薄膜の細胞培養面にパターンニングすることで作製した。マイクログループ表面は細胞培養に先立ちプロネクチンでコーティングした。更に、腱細胞に引張り刺激を負荷することを可能とする為、マイクログループ基質をチャンバーに接合することで実験デバイスを完成させた。

デバイスに細胞を播種した後に、マイクログループ上の腱細胞に5 μM calcein-AM溶液をローディングしてインキュベートし、腱細胞にギャップ結合透過性蛍光物質 calcein を導入した。共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R システム, ニコン) のステージに設置した伸展装置にデバイスをマウントし、次に述べる手順で FLIP 実験を行った。まず、3つまたは4つ直列に接続している腱細胞群を視野内に収めた。次に、群のいずれかの端に位置する細胞を target 細胞として ROI の設定を行った (図 1(a))。この target 細胞に対し出力100%のレーザー (488 nm) を2 fps の frame rate で照射し、続いて出力3%のレーザーで細胞群全体および視野内の腱細胞の画像を取得した。これを1ステップとして2.6秒毎に99回繰り返した。得られた画像シリーズから、target 細胞を含む細胞群内の各細胞内の平均輝度の経時変化を求めた。得られた各細胞の蛍光輝度のプロファイル、各細胞の FLIP 実験前の輝度値で正規化した。さらに、どの細胞にも5 μMの calcein が導入されていると仮定し、推定細胞体積 (投影面積×グループ高さ10 μm) から細胞内 calcein 分子数を算出し、それを正規化したプロファイルに乗ずることで、蛍光輝度の変化プロファイルを蛍光 calcein 分子数変化のプロファイルに変換した (図 1(b))。

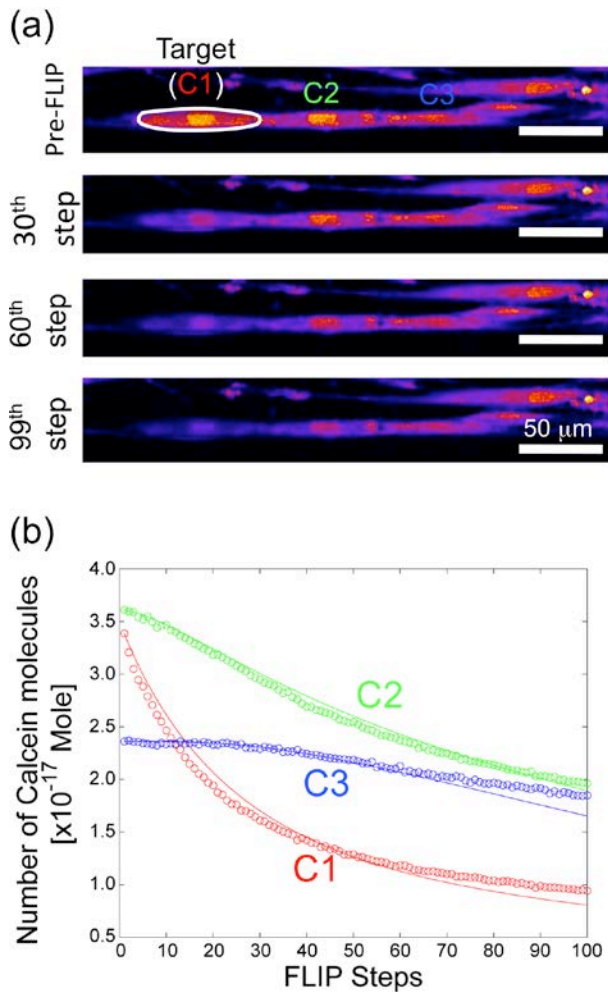


Fig. 1 (a)代表的な FLIP 実験中の細胞蛍光輝度変化の様子。Target 細胞である C1 に断続的にレーザーを照射した。(b)得られた蛍光輝度変化プロファイルを変換し、数学モデルをフィッティングした。プロットは実験データを、曲線は数学モデルデータをそれぞれ示す。

次に、FLIP 実験中の消光 calcein 分子 (トレーサー) の細胞内および細胞間移動を以下に述べる数理モデルを用いて求めた。3 または 4 細胞が直列にギャップ結合を介して接続した 1 次元モデルを考案し、細胞部およびギャップ結合部を要素分割した。要素間の物質移動は 1 次元非定常拡散方程式を用いて記述し、その際には陰解法による差分方程式

$$C_i^{t+1} - C_i^t = \frac{k\Delta t}{\Delta x^2} (C_{i-1}^{t+1} - C_i^{t+1}) + \frac{k\Delta t}{\Delta x^2} (C_{i+1}^{t+1} - C_i^{t+1})$$

を基礎式とした。ここで  $C_i^t$  は  $i$  番目要素の時刻  $t$  における消光 calcein 分子数を表し、 $k$  は細胞内 ( $k_C$ ) またはギャップ結合の透過性に相当する細胞間

( $k_G$ ) の拡散係数 ( $[m^2/s]$ ) を境界条件に応じて設定した。また、細胞とギャップ結合の界面においては、等価拡散係数を算出して用いた。上式を 1 次元モデル全域に亘って立式し、これを FLIP ステップ

間隔 2.6 秒について計算することで消光 calcein 分子数分布を求めた。各細胞内の総 calcein 分子数は不変であるとし、各 FLIP ステップ終了時の細胞内消光 calcein 分子数から各細胞の蛍光 calcein 分子数を算出した。続いて、数理モデルから得られた蛍光分子数変化プロファイルについて  $k_C$ 、 $k_G$  および消光効率  $\alpha$  を未定係数として実験結果とのフィッティングを行い、これらのパラメータの値を求めた。

このようにして確立した方法を用いて、力学負荷が細胞内・細胞間拡散係数に及ぼす影響を検討した。デバイス内細胞に 0% 引張りずみ (0% 群)、腱細胞への生理的な力学刺激として知られる 4% 引張りずみ (4% ひずみ群)、または腱細胞にとって過負荷に相当する 8% 引張りずみ (8% ひずみ群) を 1 時間静的に負荷したのち、FLIP 実験を行った。なお、比較対照群として、力学負荷前にも FLIP 実験を行った (pre-strained 群)。

力学負荷実験から得られた  $k_C$  および  $k_G$  値を図 2 に示す。各群の  $k_C$  の中間値については、力学負荷前 (pre-strained 群) で  $25.3 \mu m^2/s$ 、0% 群で  $25.2 \mu m^2/s$ 、4% 群で  $16.0 \mu m^2/s$ 、および 8% 群で  $32.8 \mu m^2/s$  であった。各群の  $k_G$  の中間値は、pre-strained 群で  $1.06 \mu m^2/s$ 、0% 群で  $1.01 \mu m^2/s$  であり、両者の間には有意差は認められなかった。一方、4% 群では  $4.04 \mu m^2/s$ 、8% では  $0.01 \times 10^{-2} \mu m^2/s$  となり、4% ひずみ負荷によって  $k_G$  が有意に上昇した一方で、8% ひずみ負荷によって  $k_G$  は有意に低下した。

このことから、細胞間物質輸送は力学負荷によって直接的に制御されることが明らかになった。生理的な 4% ひずみ負荷による  $k_G$  の増加は既存のギャップ結合の開口率の増加やギャップ結合斑の増大化が寄与し、また非生理的な 8% ひずみ負荷による  $k_G$  の低下は物理的にギャップ結合が破断されたことによるとそれぞれ考えられる。

### (3-2) 波及効果と発展性など

今年度で得られた成果によって、国内学会 2 件、国際学会 2 件の発表を行った。また、前田は 2014 年 9 月に三重県で開催された日本—スイスバイオメカニクス会議において、最優秀プレゼンテーション賞を受賞した。

本プロジェクトでは引き続きギャップ結合を介した物質輸送の制御機構や輸送メカニズム、またギャップ結合の局在性について、ナノメートルスケールの解像度を有する EXA や分子動力学解析を用いて詳細な検討を行う予定である。

### [4] 成果資料

上記の実験について、現在投稿論文を準備中である。

出張報告（特別教育研究経費を使用した場合について、全員分記載して下さい。）

氏名：渡部 正夫

所属：北海道大学大学院工学研究院

期間：平成26年9月23日～平成26年9月24日

用務先：静岡大学浜松キャンパス

用務内容：気液および固液界面遷移領域における非平衡状態の高分解能観察に関する共同研究の打合わせ

主たる対応者：川田 善正