

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、生体の細胞間で形成されるギャップ結合は、1 チャネルが直径約 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、さらにはヌクレオチドや microRNA がギャップ結合を介して輸送されることで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様々な刺激に対する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、非侵襲的な細胞間物質輸送の定量的評価方法はこれまでに開発されておらず、また、外因性刺激による輸送現象の変化のメカニズム、および輸送現象の変化と細胞機能との関連などは十分に明らかにされていない。そこで、本プロジェクトは①ギャップ結合を介した細胞間輸送現象の定量的評価方法を確立すること、②その方法を用いて様々な刺激に対する細胞間物質輸送の変化と、それが細胞機能へ及ぼす影響を検討すること、の2つの目的を設定した。

本プロジェクトは、本年度が2年目であった。初年度ではギャップ結合を介した細胞間物質輸送を可視化し、定量的に評価する実験モデルおよび解析モデルを確立した。細胞への刺激によってギャップ結合そのものや、細胞間シグナル伝達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、本年度は細胞間シグナル伝達の制御メカニズムや細胞生理機能との関連を検討するため、力学刺激および温熱刺激に晒された細胞における細胞間物質輸送現象と遺伝子発現を調べた。

以下、本年度の研究活動状況の概要を記す。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

・引張り刺激による細胞間物質輸送現象の変化

本研究では、引張り刺激が作用する環境において細胞間輸送現象と細胞機能が経時的にどのように変化するかを検討した。ウサギアキレス腱から採取した腱細胞を実験試料とし、初年度に確立したPDMS製マイクログループ実験デバイス(図1(a))に細胞を配列培養する実験モデルを用いた。CO₂インキュベータ内において、デバイスに播種した腱細胞に対して静的に4%ひずみまたは8%ひずみを作用させ、引張り刺激開始後1, 2, 4, 6, 24時間後に細胞間物質輸送の定量的評価を行った。また、刺激開始後1, 2, 4, 24時間後に細胞機能評価として遺伝子発現解析を行った。4%ひずみは腱組織にとって生理学的なひずみ量であり、8%ひずみは過負荷に相当するひずみ量である。細胞間輸送の定量的評価は初年度に確立したFLIP法(光刺激イメージングを用いた蛍光分子動態の可視化と拡散理論に基づく数理モデル解析の組み合わせ)を用いて、細胞内および細胞間のトレーサー分子(カルセイン、分子量622.25 Da)の移動度を拡散係数[$\mu\text{m}^2/\text{sec}$]として求めた。遺伝子発現解析では、腱細胞の同化作用のマーカーとしてI型コラーゲン遺伝子を、異化作用のマーカーとしてコラ

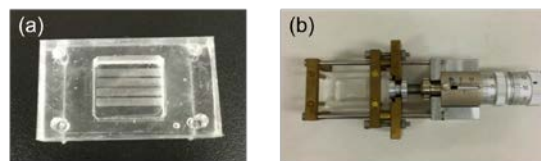


Fig. 1 (a)PDMS製マイクログループ実験デバイス。中央の凹部にあるストライプ様パターンにマイクログループが形成されている。(b)デバイスに引張りひずみを負荷する治具。

ーゲン分解酵素MMP-1 遺伝子を、またギャップ結合リモデリングのマーカーとしてギャップ結合タンパク質コネクシン 43 遺伝子を標的遺伝子として定量リアルタイムPCRを行った。

4%静的ひずみを腱細胞に作用させた場合、細胞間拡散係数は刺激開始後4時間まで緩やかな上昇を示し、その後24時間に至るまで上昇したレベルを維持し続けた(0h, 1.32 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$; 1h, 1.73 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$; 2h, 2.38 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$; 4h, 2.98 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$; 24h, 2.44 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$)

(図2(a)). なお、これらの変化には統計的有意性は認められなかった。細胞内拡散係数は刺激開始後2時間にかけて緩やかに上昇を示した以外は引張り刺激負荷前とほぼ同値を示し続けた。遺伝子発現解析の結果、I型コラーゲン遺伝子の発現には有意な変動は認められなかった一方、MMP-1 遺伝子発現は24時間で顕著に低下した(図2(b)). コネクシン43 遺伝子発現は刺激開始1時間から2時間にかけて増加したものの、その後は刺激開始前のレベルで推移した。

8%静的ひずみ負荷を行った腱細胞での細胞間拡散係数は刺激開始後2時間にかけて値が上昇した(2.64 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$). 刺激開始後6時間にかけて刺激負荷前のレベルまで低下(1.20 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$)したものの、24時間にかけて再度上昇を示した(3.38 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$)

(図2(c)). 24時間での拡散係数は刺激負荷前と比べて有意に高い値を示した。細胞内拡散係数は刺激開始後2時間で有意な値の上昇を示した他は顕著な変化は認められなかった。遺伝子発現解析の結果、I型コラーゲンとコネクシン43の遺伝子は共に共通した傾向を示し、刺激開始後経時的に発現が低下していく様子が認められた(図2(d)). 一方、MMP-1 遺伝子は刺激開始後2時間で一時的に発現量が低下したものの、その後緩やかに回復した。

生理学的な引張り刺激が細胞に作用すると細胞自体が伸展し細胞内部の細胞骨格がひずみ方向に配向すると共に細胞内張力が上昇することが知られている。ギャップ結合を構成するコネクシンは細胞骨格と結合していることから、ギャップ結合のチャンネル開閉や分解・再構築(リモデリング)には細胞骨格、および細胞骨格が発揮する細胞内張力の変化が関連していると考えられる。本研究において4%ひずみを作用させた場合、ひずみ量は腱細胞にとって生理的であったことから細胞内張力は増加して安定し、その結果コネクシンの産生促進や細胞膜に既存のコネクシン六量体(ギャップ結合のベースユニット、コネクソン)の細胞近接点への局在化などが誘引され、細胞間物質輸送量を示す細胞間拡散係数も増加した後に安定したものと考えられる。この細胞間シグナル伝達の増加はMMP-1 遺伝子発現が低下した

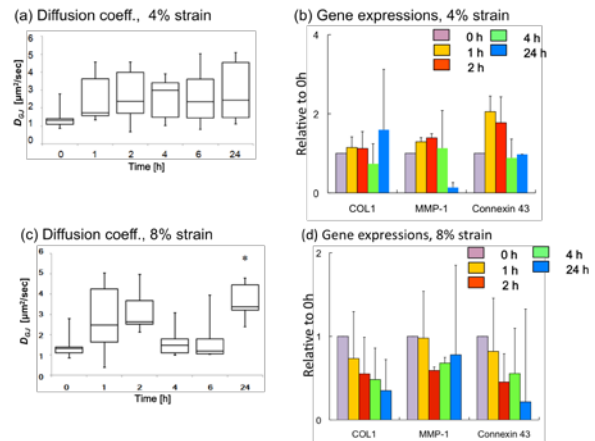


Fig. 2 4%ひずみ群の(a)細胞間拡散係数と(b)遺伝子発現解析結果, および8%ひずみ群の(c)細胞間拡散係数と(d)遺伝子発現解析結果.

ように異化作用を抑制する効果があったものと考えられる。一方、8%ひずみは腱細胞にとって非生理的なひずみ量であったことから、過度な負荷によって細胞内張力は安定せず、腱細胞同化作用の低下や不安定なコネクシン産生が誘引されたと考えられる。また、既存のギャップ結合にも過大なひずみが作用することで物理的に破断に至ったものもあったと考えられる。したがって細胞間拡散係数も安定した経時変化ではなく、24時間にわたって数値変動を示し続けたものと考えられる。このような不安定な細胞間シグナル伝達はI型コラーゲン遺伝子発現の低下に示される様に同化作用を低下する効果があったと考えられる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本プロジェクトで確立された実験手法及び解析手法は細胞間物質輸送によるシグナル伝達を定量的に評価出来ることから、今後は更なる応用が期待される。例えば生物の個体発生においては、ギャップ結合を介した細胞間物質輸送によって多細胞間の濃度勾配が形成され、これによって形成・発達する組織や器官の種類が決定されると考えられている。このような現象を更に定量的に理解するために本手法を利用することができると考えられる。

[4] 成果資料

(1) Maeda E and Ohashi T, "Mechano-regulation of Gap Junction Communications Between Tendon Cells Is Dependent on The Magnitude of Tensile Strain", Biochemical and Biophysical Research Communications, 465 (2015), pp.281-286