

伸張刺激に対する培養細胞の応答 その1 形態と配向

新井秀明・山下雅道*・跡見順子

東京大学教養学部体育学研究室
* 文部省宇宙科学研究所宇宙基地利用研究室

Responses of Cultured Cell to Stretch Stimulation I. Morphology and Orientation

Hideaki Arai, Masamichi Yamashita* and Yoriko Atomi

Dept. of Sports Sciences, College of Art and Sciences,
The University of Tokyo

* Institute of Space and Astronautical Science

Abstract

The responses of cultured myoblast L6 to unidirectional stretch stimulation were investigated. Cells plated on silicone rubber membrane with high density coating of type I collagen that were subjected to unidirectional stretch stimulation oriented parallel to this direction. Cells plated on the silicone membrane that were not subjected to stretch stimulation also oriented partially. Cells plated on normal cover glass with low density of collagen did not orient. Collagen seems to play major role in this myoblast L6 orientation.

緒言

生体内の組織・細胞はその機能と形態が密接な関係にあると考えられる。筋をはじめとする動的な負荷のかかる組織・細胞では、構造・形態が重要であろう。細胞の形態を決めているのは細胞骨格と呼ばれるタンパク繊維の複雑な網目構造である。細胞骨格は、細胞の運動や筋の収縮など生物にとって基本的で重要な役割をはたす。また、細胞内でのミトコンドリアの移動、最近ではmRNA輸送、及びタンパク質の合成にも細胞骨格が関係していることが報告されている(1, 3, 5)。

筋は力を発揮する方向に配列し機能するがその配向が起こる機構は解っていない。細胞に対する機械的な刺激がどのように感受され、どのような形態的な応答をとるかは、興味のもたれる問題である。Vandenburghら(12)はシリコン膜を用いた細胞刺激装置を作成し、鶏胚筋芽細胞から融合させた筋管細胞では一定方向の伸張刺激が0.35mm/hの速度では筋が伸張方向に配向したことを報告している。

生体内での機能・生理反応を細胞レベルで解明する目的で細胞培養法がよく用いられるが、通常の器材では機械的な刺激を与えることは困難である。我々は伸張刺激が筋細胞を含む細胞の形態形成にかかわる機構を明らかにする目的で、独自に、伸張可能なシリコン膜上で細胞培養し細胞に対して一定の方向に伸張刺激を与えることができる装置を開発した。このシステムではシリコン膜が0.1mm程度の厚さであるので免疫組織学的解析が可能である。

本研究では、まず始めに、伸張刺激した細胞の形態変化、および細胞骨格の応答を調べた。

方法

1 シリコン樹脂製細胞培養ディッシュと伸張装置

培養細胞に対して伸張刺激を与えるためには、伸縮可能で生物毒性の無い培養基質である必要がある。また、培養の経過を倒立顕微鏡で観察し、免疫細胞組織学的研究も行なうことのできる必要がある。以上のことから、シリコン樹脂を用いて底部が非常に薄い(約0.1mm)ディッシュ(2.5cm×2.5cm)を作成した(Fig. 1)。シリコン溶液

(SILASTIC MDX-4-4210 medical grade Elastomer, Dow Corning)と重合剤を混ぜ合わせた混合液を型に流し込み50°Cで1日重合させることにより、シリコンディッシュを作成した。このディッシュにはあらかじめ支柱のステンレス棒を埋め込んでおいた。このステンレス棒はホルダー部を介して、パルスモーターで駆動される微動ステージに連結した(Fig. 2)。5極のパルスモーター(VEXTA PX533M-A)の回転をウォームギヤ(30山)及びボールネジ(ピッチ1mm)により微動ステージの運動(1ステップ移動量0.066um)に変換した。パルスモーターの回転の制御はワンボードマイクロコンピューター(CPU: Z80, CTC使用)により行なった。制御プログラムはアセンブラ言語により記述した。

シリコンディッシュには、高圧蒸気滅菌後にコラーゲンコートを行なった。ラット尾部から酸抽出したコラーゲン溶液(2mg/ml, 1mM HCl)2mlをシリコンディッシュに注ぎドライヤーで乾燥させた。この後PBSで3, 4回洗った。伸張刺激の有無にかかわらずシリコン膜上には高濃度のコラーゲンコートを行なった。通常行なわれる低濃度のコラーゲンコートをしたカバーグラスを対照とした。

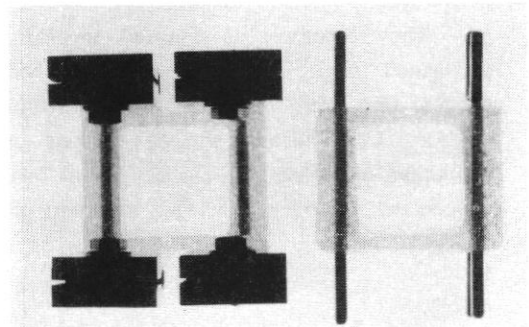


Fig. 1 シリコン樹脂製細胞培養ディッシュ

2 細胞培養

培養にはラット由来筋芽細胞株L6細胞を用いた。培養時の細胞密度は 3×10^4 cells/cm²であった。培養液は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変成イーグル培地(DMEM)であり、培養は37°C, CO₂インキュベーター内で行なった。細

胞浮遊液を注いだ後、10分後にストレッチを始め16時間後に終了した。伸張刺激を与えた細胞は組織学的解析用にホルマリン固定した。総伸張量は4mmであり、伸張速度は0.25mm/hであった。

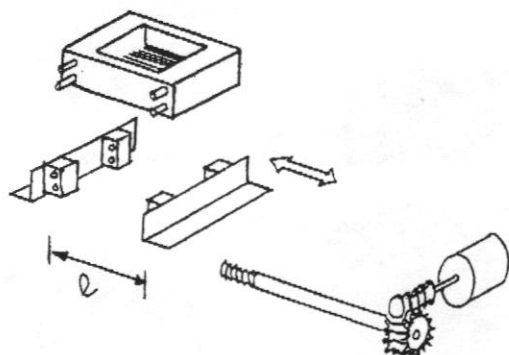


Fig. 2 装置の概念図

3 組織学的解析

細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの検出にはローダミン結合ファロイジンを用いた。核の染色には、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を用いた。

結果

通常のコラーゲンコートを行なったカバーガラス上では、細胞はよく伸展しストレスファイバーがはっきり見られた。高濃度のコラーゲンコートシリコン膜上の細胞はそれに比べ、細長い形態をとり針状の突起を出すものが多かった(Fig. 3)。カバーガラス上の細胞では全体的な配向も局所的な配向も見られなかった。それに対し、高濃度のコラーゲンコートを行なったシリコン膜上の細胞では配向が見られた。この配向は、伸張刺激を与えなかった細胞では局所的に見られたのがその方向はランダムであった。これに対して、伸張刺激を与えた細胞では多くが伸張した方向に配向した(Fig. 4)。核に関しては、細胞の長軸方向に向くものの極端な形態の変化は見られなかった(Fig. 3)。

考察

生体内にある細胞は、その機能と形態は密接な関係にあると考えられる。たとえば筋細胞では細

胞骨格が収縮方向へ配列していて機能的な構造をとっている。その機能が機械的刺激に関係するような細胞にたいしては、機械的刺激は、その構造をつくり維持することに関係することが考えられる(2)。機械的刺激が細胞の配向や分化におよぼす影響が、最近になってさまざまな細胞(骨格筋細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、繊維芽細胞)について研究されてきている(7, 8, 9, 10, 11)。

本研究では、高濃度のコラーゲンコートを行なったシリコン膜上の細胞は伸張方向に配向した。アクチンフィラメントも伸張方向に配向した。この配向は高濃度のコラーゲンコートを行なったシリコン膜上であれば伸張刺激を与えない場合にも局所的に見られた。これに対しコラーゲンコートが低濃度の場合には伸張速度が同一であるにもかかわらず高濃度のときと比較して配向の程度が小さかった(データ不掲載)。これらのことから、細胞の配向にはコラーゲンの有無が大きく影響していると考えられる。高濃度のコラーゲンコート上の細胞は接着部分のコラーゲン繊維を引っ張って配向させ、他の細胞はその配向の影響を受けると考えられる(4)。伸張刺激は直接的にはコラーゲンを配向させ、その向きに沿って細胞が伸展あるいは移動することが推察される。本研究の結果から、細胞外基質(extracellular matrix; ECM)の変化に関して、細胞の配向とアクチンフィラメントは密接な関係にあると示唆される。先行研究では、アクチンフィラメントの変化の後細胞の配向が起こっている(9)。今後、中間径フィラメント、微小管の応答、及びそれぞれの時間的変化を調べる必要がある。

血管内皮細胞の血流による剪断力に対する応答に関する先行研究では、コンフルエントでない内皮細胞は機械的な刺激に対し反応を示しにくいことが報告されている(7)。本研究で用いた筋芽細胞の細胞株では、コンフルエントでなくても伸張刺激に反応した。細胞間の相互作用は細胞の配向に関して必ずしも必要ではないと考えられる。適当なECMが無い場合に細胞間の相互作用が配向を起こすのに十分であるか調べる必要がある。

機械的な刺激を受容するのは、細胞膜上のECMレセプターであると考えられる。糖タンパクの

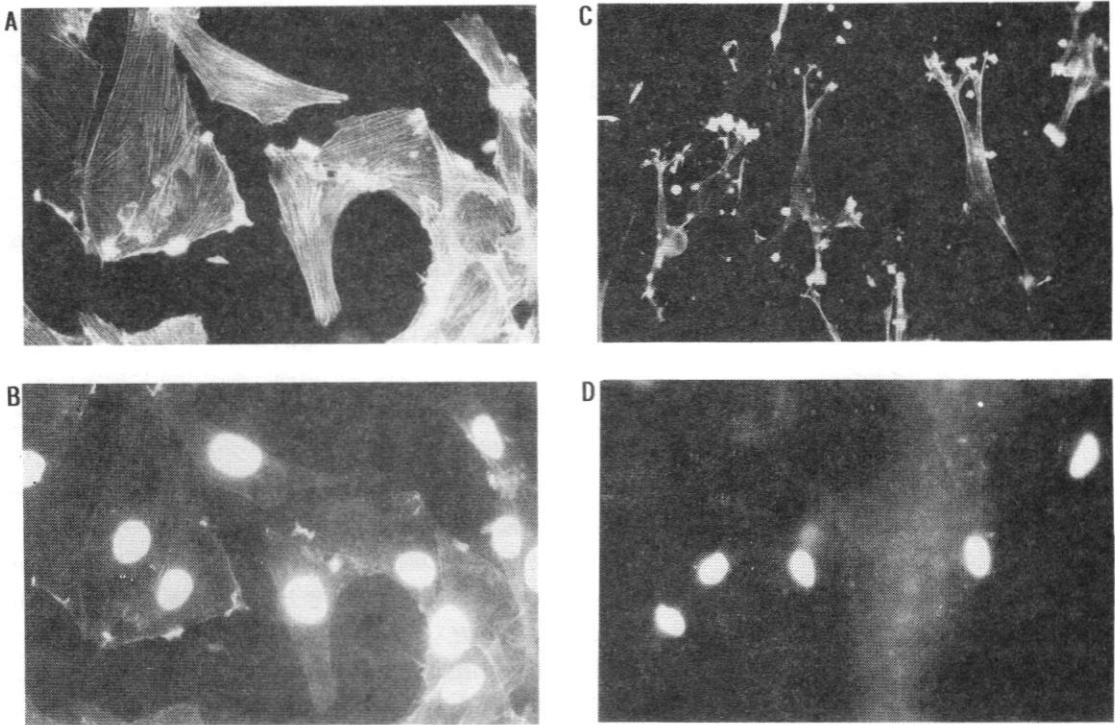


Fig. 3 低濃度のコラーゲンコートを行ったカバーガラス上 (A, B) と高濃度のコラーゲンコートを行ったシリコン膜上 (C, D) の筋芽細胞株 L6。 (C, D) は 16 時間の伸張刺激を写真で縦方向に加えた。ローダミン結合ファロイジンにより F-アクチン (A, C) を、DAPI により DNA (B, D) を、それぞれ検出した。バーは 50 μm を表わす。

インテグリン類は、ECM とアクチンフィラメントとの結合を仲介する膜貫通型連結タンパクである。細胞に与えられる機械的刺激は直接的にはこの ECM-インテグリン-細胞骨格を通じて伝えられると考えられる (6)。細胞接着に関する ECM 及びインテグリン類は、接着に限らず細胞の増殖・分化にも関与している (6) ので、機械的刺激との関係でその役割に興味もたれる。

シリコン膜のような伸張性の膜上での細胞の伸張刺激は、接着に関与する因子への刺激の他に、細胞膜への刺激ももたらすと考えられる。細胞膜上の Na-K ポンプ、イオンチャネル、ホスホリパーゼ、GTP 結合タンパクに変化をもたらすことも考えられる。伸張性の膜をもちいた研究では細胞膜の変化と大きな形態の変化は避けられないことから、Wang らは、ECM 分子を結合させた磁性体に磁場をかけることでインテグリン-細胞骨格に局所的に刺激を加える方法をとっている (13)。

本研究では、シリコンをコートするのにラット尾部から抽出した I 型コラーゲンを用いた。本結果によればコラーゲン濃度により配向の程度に影響が出ると考えられるので、今後濃度の影響を調べる必要がある。また、心筋ではコラーゲンよりもラミニンが適しているという報告もあり (8)、直接機械的刺激が伝わる部分に関係するので、コラーゲン以外のフィブロネクチン、ポリリジン、人工ペプチドなどの細胞培養用基質でも検討する必要がある。今後、伸張刺激に対する応答を形態だけでなくタンパク質、遺伝子レベルで解析する予定である。

参考文献

1. Adams, R. J., T. D. Pollard, Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. *Nature*, 322:754-756, 1986.
2. Alberts, B., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Roberts., J. D. Watson. (中村桂子・松原謙一監修) 細胞の分子生物学 第 2 版 1 細胞の進化

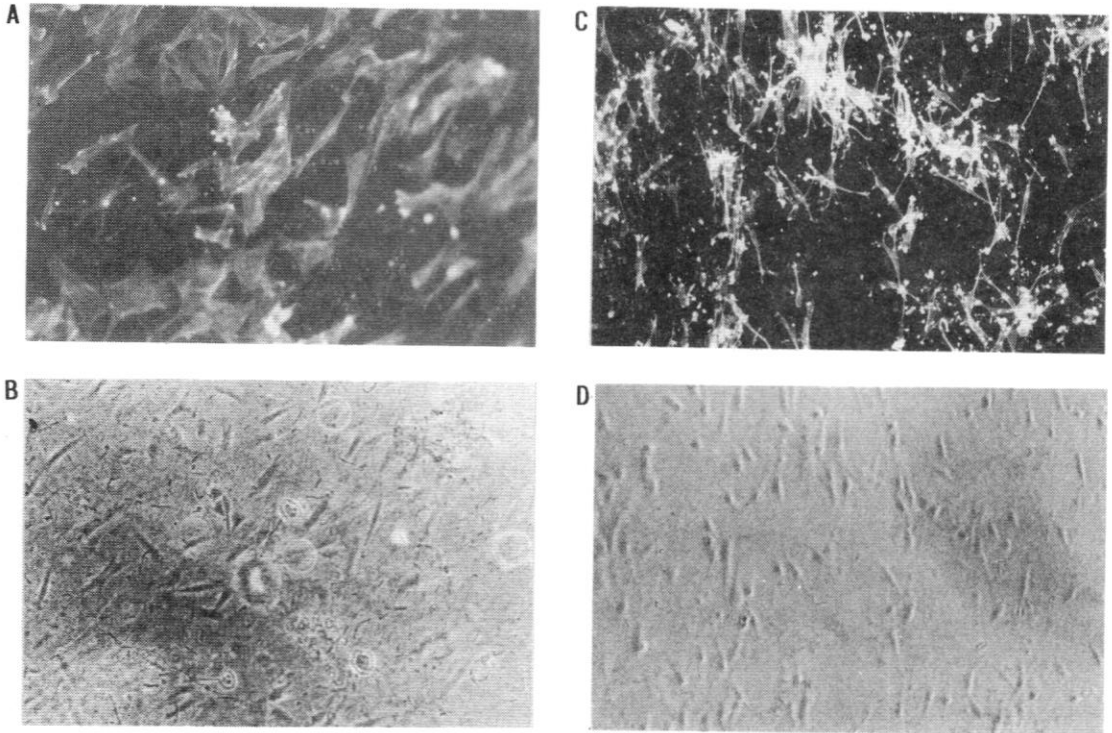


Fig. 4 高濃度のコラーゲンコートを行ったシリコン膜上の筋芽細胞株L6。伸張刺激を与えなかった(A, B)細胞と16時間の伸張刺激を縦方向に与えた細胞(C, D)。ロードミン結合ファロイジンによりF-アクチン(A, B)を検出し、位相差顕微鏡により位相差像(B, D)を観察した。バーは200 μ mを表わす。

3. Allen, R. D. The microtubule as an intracellular engine. *Sci. Am.* 256(2):42-49, 1987.
4. Hay, E. D. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix*, edited by E. D. Hay. 2nd ed. Plenum Press, New York, 1991, p. 419-462.
5. Hesketh, J. E., I. F. Pryme. Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. *Biochem. J.* 277:1-10, 1991.
6. Hynes, R. O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell.* 69:11-25, 1992.
7. Masuda, M., K. Fujiwara. Cultured endothelial cells respond to fluid shear stress. In: *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*, edited by E. B. Clark, A. Takao. Mount Kisco, NY, Futura Publishing, 1990, p. 325-336.
8. Samuel, J. L., H. H. Vandeburgh. Mechanically induced orientation of adult rat cardiac myocytes in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26:905-914, 1990.
9. Shirinsky, V. P., A. S. Antonov, K. G. Birukov, A. V. Sobolevsky, Y. A. Romanov, N. V. Kabaeva, G. N. Antonova, V. N. Smirnov. Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J. Cell Biol.* 109: 331-339, 1989.
10. Vandeburgh, H. H. A computerized mechanical cell stimulator for tissue culture: Effects on skeletal muscle organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24:609-619, 1988.
11. Vandeburgh, H. H. Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro. *Am. J. Physiol.* 262(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 31): R 350-355, 1992.
12. Vandeburgh, H. H., P. Karlisch. Longitudinal growth of skeletal myotubes in vitro in a new horizontal mechanical cell stimulator. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:607-616, 1989.
13. Wang, N., J. P. Butler, D. E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 260:1124-1127, 1993.