

微小振動下における細胞接着過程の検討

Study on cell adhesion process under nano-vibration stimulation

○ 木村 剛 (東医歯大 生材研)、伊藤 由樹子 (東医歯大 生材研)、南 広祐 (東医歯大 生材研)、
加藤 綾子 (埼玉医大 保健医療学部)、増澤 徹 (茨城大 工学部)、岸田晶夫 (東医歯大 生材研)

Tsuyoshi KIMURA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Yukiko ITO, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Kwangwoo NAM, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Ayako KATOH, Faculty of Health and Medical Care, Saitama Medical University

Toru MASUZAWA, Faculty of Engineering, Ibaraki University

Akio KISHIDA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Abstract: Extracellular physical features of underlying the adhesive substrate affect cell adhesion to it substrate. In this study, the effects of vibration, a type of artificial physical stimulation, on the adhesion of mouse L929 cells, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), HeLa cells, and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) are reported. A nano-vibration system was designed to produce nanometer-scale vibration. When L929 cells, HeLa cells, and HUVECs were subjected to vibration at 100 Hz and 1 kHz, they were not affected. On the other hand, in MEFs, the adherent cells were increased and changed their shape remarkably in response to 1 kHz vibration. To investigate the MEFs' sensitivity to vibration in detail, the cells shape was classified into four types; round, spindle-like, filopodia-formed, and lamellipodia-formed. In serum addition culture, 1 kHz vibration increased the number of filopodia-formed cells but decreased lamellipodia cells. These results suggest that vibration could affect cell adhesion and the determination cell shape.

Key Words: Nano-vibration, Cell adhesion, mechanism

1. 緒言

人為的な細胞機能制御においては、タンパク質、低分子薬物等の液性因子を用いることが一般的であるが、静水圧、2次元張力、ずり応力等の生体内で生じる生理的な物理刺激が細胞機能に強く影響することが明らかとなってきた。これらの刺激は、主に細胞膜上に存在する受容体などの膜タンパク質および細胞骨格系を介して細胞内に伝達される。一方、最近では、上記のような生理的な物理刺激でなく、非生理的な物理刺激も生物に様々な影響を及ぼすことが報告されている。非生理的な物理刺激による細胞機能変化についてはいまだ説明されていない部分があるが、細胞膜や細胞骨格系などの細胞構造を保持している部分には多くの転写因子等が局在していることから、これらの構造体を刺激することにより、周辺の細胞内伝達系を活性化していると考えられている。いずれにせよ、非生理的な物理刺激の機序を明らかにすることで新しい細胞機能制御法の開発が期待できる。

このような観点に立ち、我々は細胞への力学的刺激による細胞機能制御を目指し、ナノ振動システムを考案した (Fig1)。本システムは細胞培養基材を介して細胞に振動刺激を付与するものであり、最大周波数 10 kHz、ナノメートルオーダーの振幅を有する振動を与える。これまで、本システムを用いて培養基材表面の微小運動が与える細胞機能への影響として、ラット副腎褐色細胞腫由来細胞 PC12 細胞を用いた分化に関する検討では、ナノ振動刺激付与による分化促進を報告している。また、マウス胎児繊維芽細胞

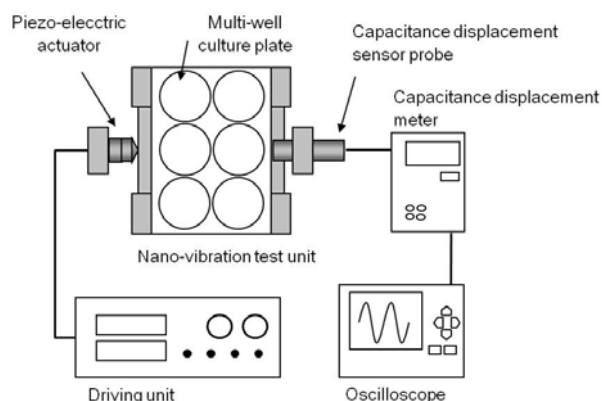


Figure 1. The nano-vibration test unit consists of a vibrator plate on which a multi-well culture plate was placed, a piezo-electric actuator, and a capacitance displacement sensor.

を用いたナノ振動下における培養基材への細胞接着に関しては、接着促進が示された。本研究では、ナノ振動刺激の機序についての考察を深めるためナノ振動下における細胞接着過程について詳細に検討した。

2. 実験

細胞は、マウス繊維芽細胞 (L929)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa)、およびマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた。振動子に電圧アクチュエータを有する微小振動付加装置を用いた。10kHz を最大とする周波数に応答した振動が可能である。プラズマ照

射未処理、処理のポリスチレン製マルチプレートの本装置に装着し、細胞播種直後に 0、100、1k Hz の周波数で 1 時間振動付加した。振動付加後、接着細胞数計測および細胞形態観察を行った。

3. 結果と考察

種々の細胞へのナノ振動付加後のプラズマ未処理、処理プレートへの接着細胞数を Fig2 に示す。細胞接着におけるプラズマ未処理、処理の比較では、いずれの細胞もプラズマ未処理にて接着細胞数は減少した。次に、ナノ振動付加の細胞接着への影響については、L929、HeLa、HUVEC を用いた場合では、プラズマ未処理、処理のいずれの培養プレートにおいても振動付加の有無による接着細胞数の有意な差異は認められなかった。一方、MEF の場合、プラズマ処理プレートでは振動付加による接着細胞数の差異は示されなかったが、プラズマ未処理プレートにて 1k Hz のナノ振動付加時の接着細胞数が増加した。細胞の接着は、培養液中の接着タンパク質の培養プレートへの吸着を介して行われることが知られている。ナノ振動刺激が接着タンパク質を介しているかどうかを検討するため、血清非存在下での細胞接着を検討した結果、ナノ振動付加の有無に寄らず接着細胞数は同程度であった。

上記のナノ振動付加時の細胞接着の機序を検討するため、ナノ振動付加有無時のプラズマ未処理、処理プレートへの MEF の接着形態を観察した。Fig3 には、球状、星状、フィロポディア状、ラメリポディア状の 4 種の接着形態の割合を示す。血清非存在下においては、ナノ振動付加の有無に寄らず、フィロポディア状、ラメリポディア状の進展細胞は観察されなかった。これは、接着タンパク質存在しないためプレートへの十分な細胞の進展がなされなかったと考えられる。血清存在下においては、プラズマ未処理、処理プレートとも、フィロポディア状、ラメリポディア状の進展細胞が観察された。また、プラズマ未処理プレートにおいては星状細胞が観察された。これは、プラズマ処理プレートに比べプラズマ未処理プレートにて接着タンパク質吸着が減少しているためプラズマ未処理プレートにて十分な進展がなされなかったと考えられる。ナノ振動付加時では、フィロポディア状細胞の増加、ラメリポディア状細胞の減少が示され、ナノ振動刺激は接着タンパク質を介して細胞内にシグナル伝達されていることが明らかとなり、また、振動下では接着斑形成が抑制されることがわかった。

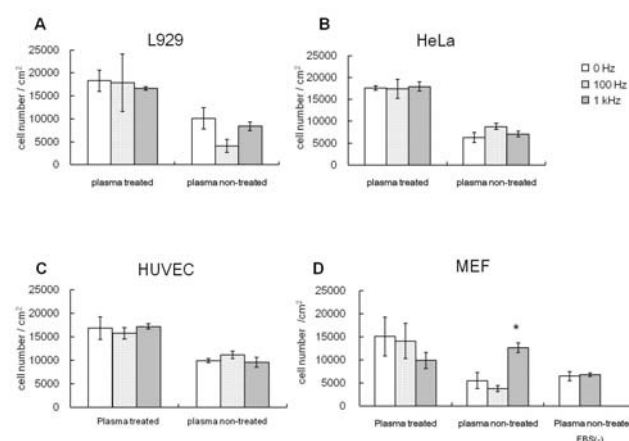


Figure 2. Effects of vibration on cell adhesion in cultured L929 cells (A), HeLa cells (B), HUVECs (C), and MEFs (D).

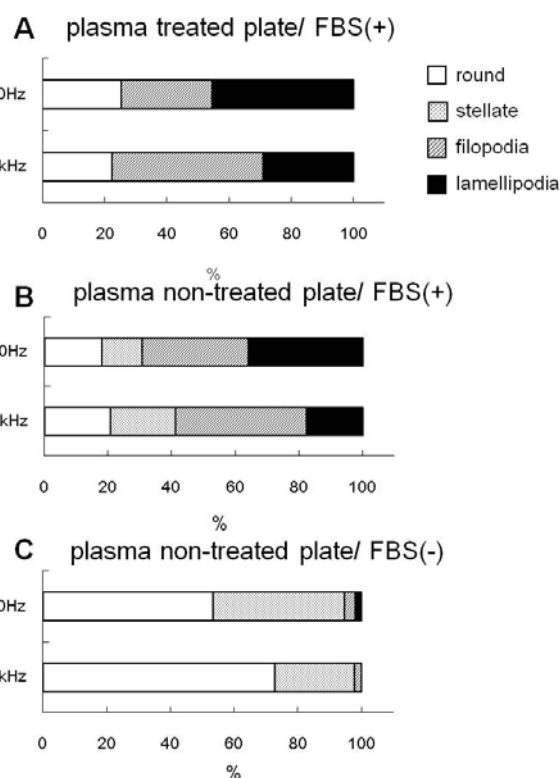


Figure 3. Cell shape was analyzed in the percentage of each type of cell shape at each culture condition.