

高弾性率基板上での細胞牽引力計測を目指した細胞のリターダンス計測

Measurement of Retardance of Cells toward Measurement of Cell Traction Forces on Stiff Substrates

○ 水谷衣里(名工大) 杉田修啓(名工大) 松本健郎(名工大)

Eri MIZUTANI, Nagoya Institute of Technology
Shukei SUGITA, Nagoya Institute of Technology
Takeo MATSUMOTO, Nagoya Institute of Technology

Abstract: Cell traction force plays important roles in many fundamental biological processes. Although traction force microscopy has been used widely to measure cell traction force, measurement on substrates with physiological stiffness is difficult. In this study, we investigated whether retardance can be used as an index of cell traction force or not. Retardance images of vascular smooth muscle cells cultured on a glass substrate were captured with a birefringence imaging system. High retardance area was colocalized with areas abundant in actin filaments. When contraction force of the cells was increased with calyculin A, cell retardance tended to increase. When cell contraction force was decreased with Y-27632, cell retardance significantly decreased. These results might indicate that retardance changes depending on tension in actin filaments, and thus can be used as an index of traction force of cells culture on stiff substrates.

Key Words: Vascular Smooth Muscle Cells, Actin Filament, Cell Contraction Force

1. 緒言

細胞は張力を発生して周囲を引っ張る、すなわち細胞牽引力を発生している。この細胞牽引力は、形態形成や力学刺激の伝達、表現型変化など、細胞の重要な機能と関わっている。¹⁾ この力の計測手法のひとつである細胞牽引力顕微鏡法では、細胞を播種した基板の変形から牽引力を計測するが、基板弾性率が高いと変形量が小さく計測が難しくなるので、生体軟組織よりも柔らかい基板が用いられている。しかし、細胞牽引力をより生理的な条件で調べるには、生体組織に近い弾性率を有する基板上での計測が必要である。そこで光弾性法により細胞発生張力を計測できないかと考えた。光弾性法とは、外力を受けた複屈性物質が光学的異方性を示し、生じた位相差(リターダンス)を計測することで応力分布を計測する手法である。これまでに、リターダンス計測ができる Pol-Scope によりアメフラシ由来神経細胞のアクチンフィラメントが観察されており²⁾、また引張力によりアクチンフィラメントの二重螺旋構造のピッチが増加したという報告³⁾もある。従って、細胞発生張力によりアクチンフィラメントの内部構造が変化し、リターダンスが変化する可能性がある。

そこで本研究では、リターダンスから張力を計測することを目指した。まず、微小管も Pol-Scope で観察されている⁴⁾ことから、血管平滑筋細胞のリターダンス像と細胞骨格の染色像を比較して、細胞リターダンス像の由来を確認した。次に、Rho/ROCK 経路を活性化させ、細胞収縮を促進する Calyculin A と、この経路を抑制して細胞収縮を阻害する Y-27632 を投与した際のリターダンス変化を調べた。

2. 実験方法

2-1 培養細胞の準備

エクスプラント法⁵⁾により血管壁からブタ胸大動脈由来の血管平滑筋細胞を単離し、37°C、5%CO₂-95%air のインキュベーター内で培養し、7日毎に継代した継代数 P5-10 の細胞を実験に用いた。培養液は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium に 10%ウシ胎児血清と抗生物質であるペニシリン・ストレプトマイシンを 1%加えて使用した。

2-2 細胞の染色・撮影と細胞リターダンス像の撮影

細胞内リターダンス分布と細胞骨格を比較するため、アクチンフィラメント、中間径フィラメント(ビメンチン)、および微小管(チューブリン)を蛍光染色した。継代後に 1日培養した細胞を 10%中性緩衝ホルマリンで一晩固定した。その後、蛍光ファロイジン(Alexa-Fluor 488 Phalloidin, A12379, Life Technologies)、抗ビメンチン抗体(MAB3400, Millipore)、抗β-チューブリン抗体(MAB3408, Millipore)、およびそれらの2次抗体で蛍光染色した。倒立型蛍光顕微鏡(IX-71, オリンパス)と偏光イメージングシステム(Abrio PL-700, CRi)で蛍光像、リターダンス像を撮影した。

2-3 収縮剤または弛緩剤投与時の細胞リターダンス計測

継代後に 3日培養した細胞の位相差像とリターダンス像を倒立型顕微鏡下で撮影した。その後、Rho/ROCK 経路を活性化させて細胞発生張力が増大する 10 nM の Calyculin A⁶⁾(032-14451, 和光純薬工業)を含む培養液、Rho/ROCK 経路を抑制して細胞発生張力を減少させる 20 μM の Y-27632⁷⁾(257-00511, 和光純薬工業)を含む培養液、または培養液のみ(コントロール群)に交換し、10分毎に同様に撮影した。次に、画像解析処理ソフトウェア(ImageJ, National Institutes of Health)を用い、位相差像で細胞領域を特定した。細胞内と細胞外の平均リターダンスを計測し、両者の差を細胞リターダンスとした。各時間において各試薬投与群とコントロール群間を独立 2群 t 検定により比較した。また、試薬ごとに投与後の各時間のデータを投与前と関連 2群 t 検定により比較した。データは平均値±標準偏差で表し、有意水準は P=0.05 とした。

3. 結果と考察

細胞リターダンス像とアクチン、ビメンチン、チューブリンの蛍光染色像を Fig. 1 に示す。細胞リターダンス像では、高いリターダンス領域が線状に見られた。この領域と各細胞骨格の蛍光染色像を比較すると、リターダンス分布はアクチンフィラメント分布とよく一致していた。従って、この細胞のリターダンス像は主にアクチンフィラメント由来であると考えられる。Pol-Scope では、アクチンフィラメント²⁾と微小管⁴⁾を画像化できるとの報告があるが、少な

くとも血管平滑筋細胞の場合には、微小管よりもアクチンフィラメントのリターダンスが強いようであった。

次に、Calyculin A, または Y-27632 を投与した場合のリターダンス像の一例を Fig. 2 に示す。Calyculin A で発生張力を増加させた場合、特に細胞長軸方向に沿った細胞の縁 (Fig.2 の領域 A) でリターダンスが高くなり、一方、Y-27632 で張力を下げた場合、細胞長軸方向の端部 (Fig.2 の領域 B) でリターダンスが低くなる傾向があった。すなわち、リターダンス変化から細胞発生張力の変化が計測できる可能性が示された。

個々の細胞の平均リターダンスの試薬投与後の経時変化を Fig. 3 に示す。Calyculin A 投与前に比べ、投与 50 分後のリターダンスは、有意差はない ($P=0.06$) もの 1.41 倍に増加していた。また、Y-27632 の場合、投与 50 分後のリターダンスは 0.36 倍に有意に減少していた。また、投与 50 分後のリターダンスは、コントロール群に比べて Calyculin A 投与群で有意差がない ($P=0.08$) もの大きく、Y-27632 投与群では有意に小さかった。Calyculin A を投与すると、Rho/ROCK 経路の活性化によりアクチンフィラメントの収縮運動が活発になってアクチンフィラメントの張力が増加し、このためアクチンフィラメントの螺旋二重構造のピッチが増加することが報告されている³⁾。今回観察されたリターダンスの増加はこの螺旋二重構造のピッチの増加により生じた可能性がある。Y-27632 投与の場合は逆の作用でリターダンスが減少したと考えられる。一方、Fig. 1 を見るとアクチンフィラメントの高輝度領域でリターダンスも高いため、この領域ではアクチンフィラメント量が多かった可能性もある。ここで、Rho/ROCK 経路の活性化により LIM キナーゼが活性化し、その結果コフィリンがリン酸化し、アクチン脱重合が抑制されてアクチンフィラメントが増加することが知られている⁸⁾。よって、Calyculin A 投与では、アクチンフィラメント量が増加してリターダンスが増加、また Y-27632 投与の場合はアクチンフィラメント量減少によりリターダンス減少が生じたとも考えられる。いずれにせよ、細胞発生張力が増加または減少に伴いリターダンスも増加または減少することが示唆された。

今後は、従来法の細胞牽引力顕微鏡法による細胞牽引力計測とリターダンス計測を同時に行い、両者の相関関係を調べ、リターダンスからどの程度、細胞牽引力の推定ができるか調べていく予定である。

参考文献

- (1) B Li and JH Wang, Application of sensing techniques to cellular force measurement, *Sensors (Basel)*, **10** (11), 9948-9962, 2010
- (2) K Katoh et al, Actin bundles in neuronal growth cone observed with the Pol-Scope, *Biol Bull*, **193** (2), 219-220, 1997
- (3) S Matsushita et al, Effect of tensile force on the mechanical behavior of actin filaments, *J Biomech*, **44** (9), 1776-1781, 2011
- (4) R Oldenbourg et al, Birefringence of single and bundled microtubules, *Biophys J*, **74** (1), 645-654, 1998
- (5) Y Yoshida et al, Morphology and increased growth rate of atherosclerotic intimal smooth-muscle cells, *Arch Pathol Lab Med*, **112** (10), 987-996, 1988
- (6) H Ishihara et al, Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity, *Biochem Biophys Res Commun*, **159** (3), 871-877, 1989

- (7) M Uehata et al, Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension, *Nature*, **389** (6654), 990-994, 1997
- (8) M Maekawa et al, Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase, *Science*, **285** (5429), 895-898, 1999

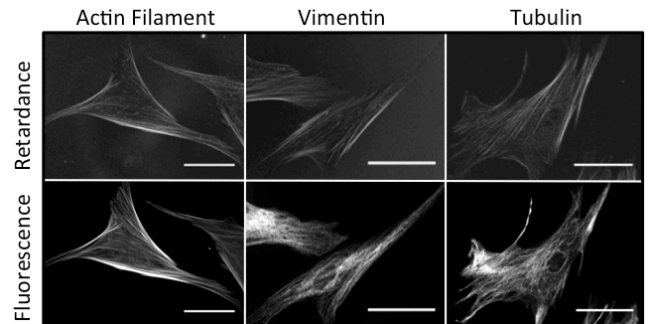


Fig. 1 Typical images of cell retardance (top) and fluorescently-labeled cytoskeletons (bottom). Scale bars = 50 μ m.

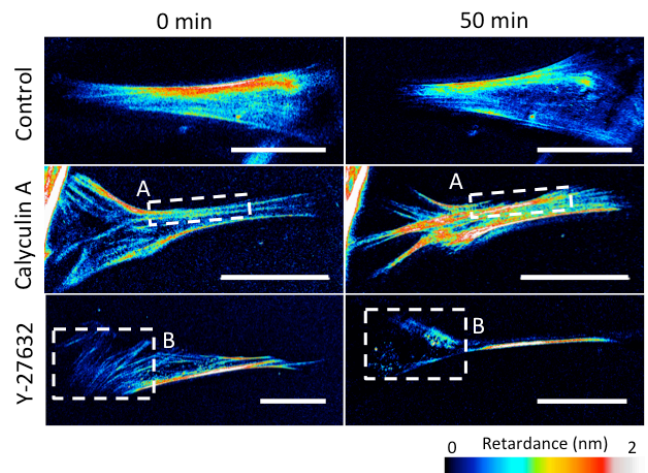


Fig. 2 Typical images of cells before (left) and after (right) treatment with calyculin A, Y-27632, and control solutions. It appears that retardance increased and decreased in regions A and B, respectively. Scale bars = 50 μ m.

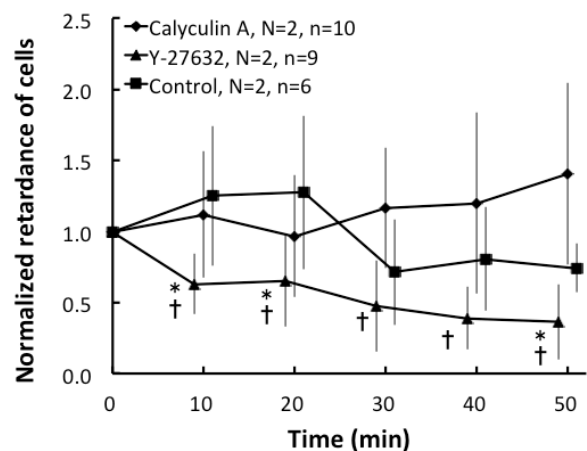


Fig. 3 Effects of calyculin A and Y-27632 on cell retardance. The retardance was normalized by the value at 0 min. N, number of dishes; n, number of cells; * $p < 0.05$ vs control, † $p < 0.05$ vs 0 min.