

ゲル基板上における HeLa 細胞の焦点接着斑挙動のリアルタイム観察

Real-time imaging of focal adhesions of HeLa cells on gel substrates

○松井 則裕 (名工大) 正 長山 和亮 (名工大) 正 松本 健郎 (名工大)

Norihiro MATSUI, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555
Kazuaki NAGAYAMA, Nagoya Institute of Technology
Takeo MATSUMOTO, Nagoya Institute of Technology

Key words : Mechanosensing, Focal adhesions, Extracellular matrix, Intracellular dynamics, Finite element method

1. 緒言

近年, 細胞培養基板の弾性率が細胞挙動に影響を与えることが報告され始めている. 例えば, 硬い基板上の平滑筋細胞は良く広がり, 軟らかい基板上では丸くなる^[1]. 弾性率が徐々に変化するゲル上の平滑筋細胞は弾性率の高い方向に移動する^[2]. また, 弾性率の異なる基板上で未分化な幹細胞を培養すると, 基板弾性率の違いによって異なる細胞に分化が進むことも報告されている^[3]. これらのことから, 基板弾性率が細胞挙動に与える影響を把握することは極めて重要であると考えられる. しかし, このような細胞応答メカニズムの詳細, すなわち細胞が基板弾性率をどのようにして感知しているのかなどについては全く判っていない.

細胞は焦点接着斑 (FA) にて基板と接着しており, この部位から細胞内で発生した力が基板に負荷されている^[4]. そこで我々は FA が基板弾性率感知に関与する可能性を考え, ガラス基板上に作製した種々の厚みのゲル上でラット胸大動脈由来平滑筋細胞を培養し, その面積を計測したところ, 細胞はゲル厚み 30 μm 以下で面積を増加させた. また, 力が負荷されたゲル上の FA の移動量をゲル厚みを変えて FEM 解析したところ, 移動量は細胞面積と良い相関を示した^[5]. このため, 細胞が FA に力を作用させた際の変位量から基板弾性率を察知している可能性に思い至った. しかし, ゲル上の FA の動きはまだ実験的に観察されていない. そこで本研究では, まず生細胞の FA の挙動を観察するため, FA 構成タンパク質の一種である talin に GFP を導入し細胞の FA を可視化した. その後, HeLa 細胞を剛体 (ガラス) と 3 種類の弾性率の異なるゲル上に播種し, 各基板上の面積および FA の動きを観察した. そして FEM 解析を用いて細胞発生張力を推定することで, 基板硬さの違いによる FA 挙動の差異について詳細に調べた.

2. 実験方法

2.1 培養細胞準備

実験には HeLa 細胞 (理研バイオリソースセンター) を用いた. 10% ウシ胎児血清 (Biowest) と抗生物質 (Penicillin-streptomycin, Gibco) を加えた DMEM (Wako) 中で, 37°C, 湿度 100%, 5%CO₂-95%Air の環境に保ち培養した.

2.2 FA の可視化

細胞培養用ディッシュ (Corning, ϕ 35mm) に細胞を播種し, 約 24 時間静地培養した後, 培地を抜きとり, 1 ml の培地と 50 μl の CellLight™ Talin-GFP BacMam 2.0 (Invitrogen) を滴下した後, 16 時間以上インキュベータ内で静置培養して GFP-talin を発現させ, 生細胞の FA を可視化した.

2.3 ポリアクリルアミドゲル基板の作製

弾性率の異なる基板の作製にはポリアクリルアミドゲルを用いた. 弾性率は, アクリルアミドと架橋剤のビスアクリルアミドの濃度で調整し, 今回は弾性率 92, 46, 6 kPa の 3 種類のゲルを作製した. 弾性率は, 当研究室で別途開発したプローブ式弾性率計測装置^[6]で計測した.

ゲルはガラスボトムディッシュ (Falcon, ϕ 35mm) に作製した. ゲルとガラスの接着を強固にするためアミノシラン処理を行った. 即ち, ガラス表面に NaOH (0.1N, Wako) を滴下し乾燥させた後 (3-Aminopropyl) triethoxysilane (Sigma) を塗り 5 分置き, 蒸留水で 2 回洗浄した. PBS(-) (Wako) で希釈した 0.5% Glutaraldehyde (Wako) を塗り 30 分静置し, 蒸留水で複数回洗浄し乾燥させた.

ゲル溶液に, 重合開始剤として過硫酸アンモニウム (Wako), 促進剤として TEMED (Wako) を加え, 溶液の調整を氷上で行った後, アミノシランコートされたガラス面に, 厚みが 100 μm となるように調整した液量の溶液を滴下した. また, 表面を平坦にするためにゲル溶液の上にカバーガラスを載せた. 室温に置くことでゲルを重合させた. 重合後, カバーガラスを外して UV 滅菌し, ゲルのタンパク親和性を向上させるため sulfo-SANPAH (Pierce) を滴下し UV 照射した後, 細胞接着性向上のため 0.05% タイプ I コラーゲン溶液 (高研) を滴下, 4°C で一晩静置してコラーゲンをコートした. また, 剛体基板としてゲル層を載せずタイプ I コラーゲンを直接コートしたガラスボトムディッシュも準備した.

2.4 HeLa 細胞 FA の挙動観察

GFP-talin が発現した細胞をガラス又はゲル基板上に播種し, 細胞を含むディッシュを倒立顕微鏡 (IX-71, オリパス) のステージ上に置いた. ステージヒーターで 37°C に保温し 5%CO₂-95%Air の混合ガスを供給しながら, 電子倍增型 CCD カメラ (C9100-12, 浜松ホトニクス), 100 倍対物レンズ (NA=1.40) を用いて 5 秒間隔で FA の蛍光画像を撮影した. 撮影した画像は画像総合ソフトウェア (NIS-Elements, ニコン) を用いて, 細胞の存在しない 100 x 100 pixel 領域の平均輝度値を画像から減算し, さらに 3 x 3 pixel のメディアンフィルタをかけノイズを低減させた. この後, 画像解析ソフトウェア (ImageJ, NIH) を用いて, FA を特定するため, 計測対象の FA の形がわかり, その周辺に位置する FA と区別できるように二値化の閾値を目視にて設定し, 作成された領域を Wand tool で選択することで面積と輝度重心を計測した.

2.5 FA モデルの有限要素解析

ゲルを線形弾性体と仮定し, ゲル基板に付着した 1 個の FA にせん断力が作用する時の FA の移動量を求めた. 今回は, FA の挙動観察を行ったゲルの物性値として, 弾性率 46 kPa, ポアソン比 0.45 と設定した. また, FA の形態は, 面積が 0.69 μm^2 となる八角形形状剛体面とした. 200 x 200 μm のゲル平面中心に FA を設定し, ゲル厚みは 100 μm としてせん断力を負荷した. ゲル底面とガラス基板間は完全拘束とし, それ以外の面は自由に変位するものとした. 有限要素モデルの作成は, HyperMesh 10.0 (Altair Engineering Inc.) で行い, また, 解析ソルバとして Optistruct (同) を使用した.

3. 結果および考察

ガラス, 92 kPa, 6 kPa のゲル基板上に播種後 24 時間の HeLa 細胞の投影面積を Fig. 1 に示す. 硬いガラス上で一番大きく広がり, 弾性率が低いほど面積が小さかった. これよりこの細胞が弾性率を感知し応答することを確認した.

次に GFP-talin 発現細胞の FA の蛍光画像の一例を Fig. 2 に示す. 硬いガラス上では大きな FA が数多くみられた. 一方 46 kPa ゲル上では, ごく小さな FA が少数見られた.

GFP-talin 発現細胞をガラスまたはゲル基板上に播種し, タイムラプス観察した画像から FA の発生から消滅までの面積および発生初期位置からの輝度重心位置の移動量を求めたものを Fig. 3 に示す. ガラス基板では, 発生初期では FA が殆ど移動することなく面積を $2.2 \pm 1.2 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD, $N_{\text{FA}}=5$, N_{FA} は FA の個数)まで拡大させた後, 面積減少とともに FA が移動する様子がみられた(Fig. 3a). FA の生存時間は $30.8 \pm 6.8 \text{ min}$ (mean \pm SD, $N_{\text{FA}}=5$)であった. 一方, 46 kPa のゲル基板上では, FA は発生初期から大きく移動し続け, 面積を $0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD, $N_{\text{FA}}=5$)までしか広げずに $3.1 \pm 1.1 \text{ min}$ (mean \pm SD, $N_{\text{FA}}=5$)と短い生存時間で消滅した(Fig. 3b). このことから硬い基板では, 発生した FA が移動しなかったため面積を広げ長時間安定して生存することができ, 軟らかい基板では FA が移動したため安定せずに短時間で消滅してしまっただのではないかと考えた.

そこで, FA 形成初期の面積が約 $1 \mu\text{m}^2$ 以下の FA 前駆体である focal complex の形成が 40 秒以内に起こると報告^[7]から, FA の生成 40 秒後のガラスとゲル上における FA の面積および移動量を比較した (Table 1). 40 秒の時点では両基板の FA 面積に有意差はなかった. 一方, FA の移動量は, ゲル上ではガラス基板と比較して約 4 倍の $0.49 \mu\text{m}$ であった. この移動がすべてゲルの弾性変形により生じると仮定し, FA に作用する張力を有限要素解析で推定すると約 27 nNであった. この値は, 細胞発生張力 F (nN) と FA 面積 A (μm^2) の関係を実測して得られた関係式 ($F=5 \cdot A$)^[8] で求められる張力値 3.7 nN よりも遥かに大きい. しかし, FA 面積 $1 \mu\text{m}^2$ 以下ではその相関から外れる数 10 nN の大きな力も発生しているという報告^[4]とは一致する.

これらを総合して考察すると, focal complex 形成時には基板硬さによらず FA 面積を拡大させながら発生張力を大きく増加させ, この際の足場の変形量を利用して基板の弾性率を感知している可能性がある. つまり, 細胞は focal complex が形成される間に基板の弾性率を計測しており, 基板が硬く初期張力による FA 部位の変位が小さい場合には, その後, FA が成長・安定化して細胞面積が増大するのに対し, 基板が柔らかく, 初期の FA 部位の変形量が大きい場合には, FA が成長できず消滅してしまい, 結果として足場を確保できない細胞は面積を広げられないのかも知れない. また, この感知の際に発生する張力は非常に大きく, 細胞がその形態を安定させるために発生させている張力とは別のメカニズムにより生じている可能性も考えられる.

今後は, 弾性率の範囲を広げてゲル基板上の FA の挙動を観察し, 弾性率との関係を調べる. また FA の移動が弾性基板の弾性変形によるものかどうか確かめるため, FA に連なるストレスファイバをレーザーで切断した後の FA の変位などを調べるなどして, 仮説の妥当性を検証する予定である.

参考文献

- [1] Engler AJ *et al*, *Biophys J* 86, 617-28, 2004.
- [2] Wong JY *et al*, *Langmuir* 19, 1908-13, 2003.
- [3] Engler AJ *et al*, *Cell* 126, 677-89, 2006.
- [4] Tan JL *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1484-9, 2003.
- [5] 松井ら, 2009 年度機講論 Vol.5, 31-2, 2009

[6] 平井ら, 第 17 回 BE 講演会講演論文集, 187-8, 2005.

[7] Galbraith CG *et al*, *J Cell Biol* 159, 695-705, 2002.

[8] Bershadsky AD *et al*, *Ann Rev Cell Dev Biol* 19, 677-95, 2003.

謝 辞 本研究の一部は, 科学研究費補助金(21650109, 22240055, 20680025)のもと行われた. また, 有限要素解析はアルテアエンジニアリング(株)の Academic Open Program の援助のもと行われた. 記して謝意を表す.

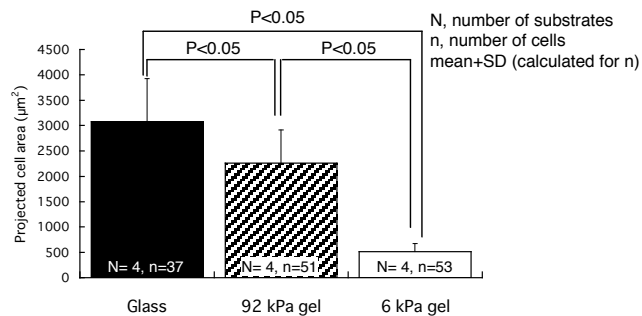


Fig. 1 Projected area of HeLa cells cultured on glass and polyacrylamide gel with Young's modulus of 92 and 6 kPa.

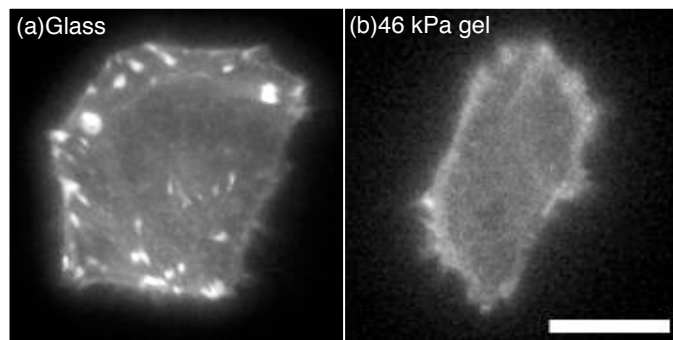


Fig. 2 An example of fluorescent images FA (talin) of HeLa cells on glass (a) and polyacrylamide gel with Young's modulus of 46 kPa (b). Bar in (b) = 20 μm applies to all.

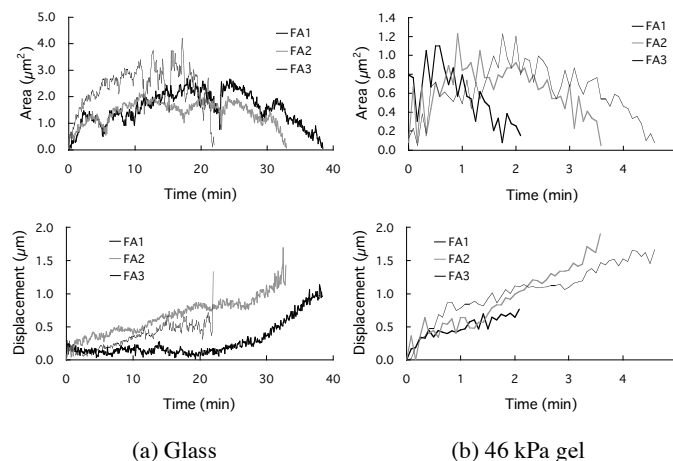


Fig. 3 Time course changes of area and displacement of focal adhesions of HeLa cells on glass (a) and 46 kPa polyacrylamide gel substrate (b).

Table 1 Area and displacement of each focal adhesion 40 s after its formation on glass and 46 kPa polyacrylamide gel substrate.

(mean \pm SD, *P < 0.05)			
Substrate	N_{FA}	Area (μm^2)	Displacement (μm)
Glass	5	0.56 ± 0.23	0.13 ± 0.06
46 kPa gel	5	0.74 ± 0.24	0.49 ± 0.13