

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) ナノ構造による遺伝情報選択制御の力学機構の理解と幹細胞分化制御への応用展開
(英語) Mechanobiological understanding of the mechanism of selective gene expression regulated by extracellular nano-topographical cues, and the application to external control of the stem cell differentiation

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
上級研究員 三好 洋美

所属 役職 氏名： (英語) Hiromi Miyoshi, Senior Scientist, RIKEN Center for Life Science Technologies

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

再生医療において、目的の細胞を再現性良く多量に得るため、幹細胞の分化状態を精緻かつ頑強に（信頼性）、高い安定性で制御する技術が求められている。細胞の分化状態の外的制御の信頼性と安定性の向上の鍵を握る因子として、微細凹凸構造や剛性をはじめとした細胞培養基材の物理特性の重要性が広く認識されるようになってきている。しかしながら、これらの因子が細胞分化に影響を及ぼすメカニズムの理解が進んでいないため、細胞培養基材の最適設計手法が存在しない。そこで本研究開発では、細胞外微細構造が細胞の分化状態を変化させる力学機構を理解し、幹細胞分化の外的制御へと応用展開することを目的とする。目的達成のため、細胞が微細構造を感知し分化状態を変化させるシグナル伝達プロセス—1.細胞外微細構造に応答した細胞接着複合体の形成, 2.アクチン線維から細胞核内へ伝達される力によるクロマチン時空間分布の決定, 3.遺伝子配置の変化による転写活性の調節—についての仮説を構築し検証を進める。本年度は以下に示す三つの知見を得た。

第一に、細胞外微細構造に応答した細胞接着複合体形成の力学機構に関する仮説を検証するため、マイクロ溝状構造に対する複数細胞種の応答特性を比較解析した。その結果、細胞接着斑の構成タンパク質である vinculin がマイクロ溝状構造のエッジに集積することが明らかになった。さらにこの vinculin の集積には、細胞体部及び葉状仮足部におけるアクチン-ミオシン相互作用による力発生が必要であることを示唆する結果も得た。この結果は、「微細構造のインテグリンに対する拡散障壁効果」及び「アクチン線維の力による接着斑の成熟」により、細胞接着斑が微細構造のエッジに優位に形成されるという仮説を支持する。

第二に、アクチン線維から細胞核内へ伝達される力によりクロマチン空間分布が決定される機構についての仮説を検証するため、ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化の過程におけるアクチン細胞骨格及び核内 DNA 分布の変化を評価した。分化誘導前、アクチン線維は細胞核の全周囲に存在したが、分化に伴い細胞核上部のアクチン線維が消失することが分かった。また、分化に伴い核内 DNA の密度が小さくなる傾向も認められた。来年度以降、アクチン線維分布の変化と DNA 分布の変化との間の因果関係について精査し、仮説の検証を進めたい。

第三に、遺伝子配置の変化による転写活性調節機構についての仮説を洗練化するため、平面ガラス上で間葉系幹細胞に骨芽細胞分化を誘導し、骨芽細胞分化マーカーの発現と遺伝子配置との関係性を評価した。X 遺伝子では、分化誘導開始直前において 30%程度、分化誘導培地による分化誘導 3 日後には 60%弱、7 日後には 65%程度の細胞において発現が確認された。X 遺伝子の空間配置について定量評価を行った結果、X 遺伝子座は、特定の領域に制限されていることが分かった。分化誘導前と分化誘導 7 日後との間の X 遺伝子座存在領域に、違いは認められなかった。来年度以降、他のマーカー遺伝子についても同様の評価を行い、細胞分化に伴い核内配置と発現が変化する遺伝子の探索を進めたい。スクリーニングされた遺伝子に対して空間配置と遺伝子発現を生細胞で観察するためのイメージング系を構築し、仮説の検証を進めたい。

(英文)

Regenerative medicine requires techniques for efficient and stable control of cell differentiation to prepare a large number of cells with the intended functions. A growing number of researchers are focusing attention on the physical properties, such as micro-/nano-structures and stiffness, of the cell culture substrates as key

factors to increase the efficiency and stability in controlling cell differentiation. However, the concept of optimal design of the cell culture substrate has not been established because the mechanism how these physical factors affect cell differentiation remains to be clarified. To achieve a breakthrough, this research tries to understand the mechanism how micro-/nano structures in the extracellular environment affect cell differentiation from a mechanobiological point of view, and utilize the findings of the basic research to external control of stem cell differentiation. To gain the object, I built a hypothesis about the signaling in a cell to sense the micro-/nano-structure and to change differentiation state. The hypothesis consisted of three parts: the first one was about the mechanism to form and then mature the cell adhesion complexes in response to the extracellular micro-/nano-structures, the next one was about the mechanism to coordinate the spatial distribution of the chromatin by mechanical forces transmitted from actin filaments to intranuclear structures, and the last one was about the mechanism to regulate transcriptional activities via the change in the localization of genes. The results achieved in fiscal year 2016 are following.

First, to test the hypothesis about the formation and maturation of the cell adhesion complexes in response to the extracellular micro-/nano-structures, I did a comparative analysis about the responsiveness of several kinds of cells. The result demonstrated that vinculin, which is a component of the cell adhesion complex, accumulated at the edge of the microgroove. Furthermore, actomyosin force generations both in the cell body and in the lamella are required to accumulate the vinculin molecules at the edge of the groove. The result supports the hypothesis that focal adhesions are preferentially formed at the edges of the micro-/nano-structures because of the diffusion barrier effect at the edges of the micro-/nano-structure on the integrin molecules as well as the maturation of the focal adhesions due to the force in the actin filaments.

Second, to test the hypothesis about the mechanism to coordinate the spatial distribution of the chromatin by mechanical forces, the features of the intracellular distribution of the actin cytoskeleton and the intranuclear distribution of DNA during osteogenic differentiation process in human mesenchymal stem cells were extracted. Before the induction, the actin filaments enclosed a nucleus, whereas disappeared from the top of the nucleus 7 days after the osteogenesis induction. Furthermore, DNA density had a tendency to decrease during the osteogenesis. In the following year, the hypothesis will be further verified by investigating the cause and effect relationship between the change in the spatial distribution of the actin filaments and that in the DNA density.

Third, to refine the hypothesis about the mechanical regulation of transcriptional activities via the change in the localization of genes, osteogenesis was induced in the mesenchymal stem cells on a flat glass substrate, and the relationship between gene expressions and nuclear locations of the genes was evaluated. In the cells cultured on the flat glass substrate, the X gene was expressed in 30% of the cells just before the osteogenic induction, and a little less than 60% and about 65% of the cells 3 days and 7 days after the induction, respectively. A quantitative analysis of the localization of the X gene demonstrated that the X gene localized in a restricted region of the cell nucleus in the cells both before and 7 days after the osteogenesis induction. The restricted region seemed not to change before and 7 days after the induction. In the following year, the same analysis will be performed for the other genes to screen the genes of which localization changes with the progress of osteogenesis. Once the genes are screened, this study is planning to establish an experimental system to observe the localization and expression of the gene in a living cell.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 3件）

1. MIYOSHI H, NISHIMURA M, YAMAGATA Y, LIU H, WATANABE Y, SUGAWARA M. Cell migration guided by a groove with branches. Journal of Biomechanical Science and Engineering. 2017, 12, 16-00613.
2. MIYOSHI H, KENSUKE S, JU J, KO JS, ADACHI T, YAMAGATA Y. A perturbation analysis to understand the mechanism how migrating cells sense and respond to a topography in the extracellular environment. Analytical Sciences. 2016, 32, 1207-11.
3. MIYOSHI H. Smart design of materials for tissue engineering. Smart Materials for Tissue Engineering: Fundamental Principles, 1-24. Royal Society of Chemistry, 13 Dec 2016. (Book Chapter)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Mechanical interaction of migrating cells and micro-topographical surface as a basis to design surface of biomaterials, 口頭, MIYOSHI H, The 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2016/7/28, 国内.
2. The effects of microgrooved structures on cell shape and actomyosin organization, 口頭, MIYOSHI H, NISHIMURA M, YAMAGATA Y, LIU H, WATANABE Y, SUGAWARA M, The 7th International Conference on Computational Methods, 2016/8/4, 国外.
3. 足場材料のマイクロ・ナノ凹凸構造がアクチン線維の細胞内分布に及ぼす影響, 口頭, 鈴木健介, 三好洋美, 日本機械学会 2016 年度年次大会, 2016/9/12, 国内.
4. 微細凹凸表面に対する細胞の運動応答を利用した細胞培養系の開発, 口頭, 三好洋美, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017/1/19, 国内.
5. 遺伝情報選択制御メカニズムを理解するためのアクチンと細胞核のイメージング, 口頭, 三好洋美, 樋口千佳, 第 2 回メカノバイオロジー学会, 2017/3/14, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 細胞が歩く(!?), 三好洋美, 理研 day 研究者と話そう, 2016/9/18, 国内.
2. 細胞培養用足場材料の表面設計における細胞イメージングの重要性, 三好洋美, OLYMPUS Innovation Forum 2016 in Yokohama, 2016/11/30, 国内.

(4) 特許出願

無