

2024年5月18日

「機械伸展下における細胞内活性タンパク質計測システムの開発」
に関する報告書
(2022年度オートレース補助事業)

九州大学 大学院工学研究院 機械工学部門
教授 工藤奨



この研究は、オートレースの補助を受けて
実施しました。

(<https://www.bfe.mech.kyushu-u.ac.jp/>)

目次

1. はじめに... 1
2. 方法... 2
 - 2.1 ストレッチチャンバーの構造... 2
 - 2.2 ストレッチチャンバー作製... 2
 - 2.3 細胞生存実験... 3
 - 2.3.1 鋳型の変更... 3
 - 2.3.2 細胞播種・伸展条件の変更... 3
 - 2.4 伸展装置... 4
 - 2.5 伸展プログラム... 4
 - 2.6 細胞培養... 4
 - 2.6.1 使用細胞... 4
 - 2.6.2 ガラスベースディッシュへの培養... 4
 - 2.6.3 チャンバー上への培養... 4
 - 2.6.4 遺伝子導入... 5
 - 2.7 伸展負荷実験... 5
 - 2.8 Ca^{2+} の可視化... 5
 - 2.9 顕微鏡観察... 5
 - 2.9.1 観察・損傷細胞の選定 ... 5
 - 2.9.2 蛍光観察... 6
 - 2.9.3 細胞形状観察... 6
 - 2.9.4 レーザー損傷 ... 6
 - 2.10 解析... 6
 - 2.10.1 形状解析... 6
 - 2.10.2 輝度解析... 7
3. 結果... 8
 - 3.1 細胞生存実験... 8
 - 3.1.1 鋳型の変更... 8
 - 3.1.2 伸展条件の変更... 8
 - 3.2 伸展による細胞形状の変化... 9
 - 3.2.1 細胞の形状変化... 9
 - 3.2.2 細胞の配向変化... 10
 - 3.3 レーザー損傷時の $\text{PKC}\alpha$ の反応... 11

| | |
|---|--|
| 3.3.1 横方向損傷... | 12 |
| 3.3.2 縦方向損傷... | 13 |
| 3.3.3 コントロール... | 14 |
| 3.4 カバーガラス上での力学変形下で計測 (PKC, YAP, PTEN) ... | 14 |
| 3.5 カバーガラス上の癌細胞と正常細胞の力学変形下での計測 (PKC) | ... |
| | 18 |
| 3.5.1 ヒト正常細胞における隣接細胞剥離時の Ca^{2+} /PKC α の | ... |
| | 応答... 18 |
| 3.5.2 低悪性度膀胱癌細胞における隣接細胞剥離時の | ... |
| | Ca^{2+} /PKC α /PIP2 の応答... 20 |
| 3.5.3 高悪性度膀胱癌細胞における隣接細胞剥離時の | ... |
| | Ca^{2+} /PKC α /PIP2 の応答... 22 |
| 3.5.4 正常細胞と膀胱癌細胞の比較... | 24 |
| 4. まとめ... | 25 |
| 5. 発表成果一覧... | 26 |

1. はじめに

ガン患者の金銭的・身体的負担が最も軽いと考えられている分子標的治療薬は多くの候補が開発されているが、臨床段階で効果的な治療薬の開発には至っていない。この要因の一つとして、開発段階では、細胞内の生化学反応のみを阻害する開発が行われてきたことが考えられる。2021年ノーベル生理学・医学賞で細胞の力学センサーが受賞したように、細胞は外部の化学刺激だけでなく、力学刺激を感知しており、この力学感知が不完全な場合、疾病が発生することが明らかとなった。本研究では、この力学感知機構を分子標的治療薬開発に導入することで、臨床治験で停滞していた分子標的治療薬の治療効果が上がると考えている。そのためには、分子標的となるガン促進タンパク質、および対照としてガン抑制タンパク質の力学刺激下での応答を計測するシステム開発が急務となる。

本申請では、ガン組織の力学刺激下の影響を測定するシステムを開発し、ガン促進に関与するタンパク質の活性を調べることで、従来までの化学刺激だけから得た知見とは異なるガン促進メカニズムを明らかにすることを目的とする。

2. 実験方法

長時間の伸展を負荷した際、細胞が死ぬことを防ぐため、ディッシュや伸展条件を変更する細胞生存実験を行った。その後、その条件にしたがって、細胞に伸展を負荷し、細胞の形状の変化を確認した上で、損傷実験を行った。形状が変化した細胞を観察細胞とした。観察細胞に隣接する細胞をレーザー照射によって損傷することで、細胞間接着力を除去し、伸展細胞内の PKC α の力学的刺激に対する反応を確認した。以下に細胞を播種する準備から解析までの一連の流れを示す。実験方法は、細胞生存実験の結果を踏まえたものである。

2.1 ストレッチチャンバーの構造

細胞を伸展用のストレッチチャンバー（以下、チャンバー）上に播種した。このチャンバーは鋳型を作製し、鋳型にシリコン材料を流し込むことで作製した（[図 1](#)）のような形状であり、材料には信越シリコン社製の KE-106 および硬化剤 CAT-RG を混ぜ合わせた PDMS を用いた。チャンバーにはスペーサーによって、一辺が 10mm の正方形を断面とする穴が開いており、そこに厚さ 25 μm の PDMS 製の膜（以下、PDMS 膜）がチャンバーの裏から貼り付けられている。細胞はチャンバーの穴部にある膜上に播種される。また、チャンバーの両端には穴が開いており、伸展装置に固定できるようになっている。



図 1 伸展用チャンバーおよび概略図

2.2 ストレッチチャンバー作製

チャンバーや PDMS 膜は KE-106 と硬化剤 CAT-RG を混ぜ合わせて作製され、卓上真空プラズマ装置（YHS-R, 魁半導体）を用いて表面処理を施した後、不可逆的に貼り合わせる。チャンバー本体は次のように作製する。まず、体積比 KE-106 : CAT-RG=10 : 4 および 10 : 1.2 の割合で混合し、[図 2](#) のような鋳型に流し込み成型する。その際、細胞播種部が伸展されるよう、10 : 1.2 の割合のシリコンを中

中央のスペーサー付近に流し込む。その後、鋳型を真空装置に入れ、減圧することで、中の気泡を抜く次に電気オーブン (AVO-250, アズワン) に入れ、150°C、30分加熱し、硬化させる。PDMS膜の作製方法は次の通りである。

DURASURF をスピコートし、1時間 80°Cで熱処理をしたスライドガラスの上
に比 KE-106 : CAT-RG=10 : 2 の脱泡したシリコーンを、目標膜厚 25 μm でスピ
コートする。次に、電気オーブンで 150°C、30分加熱し、硬化させることで完成
する。チャンバー、PDMS膜は 300秒プラズマ露光し、それぞれ貼り付けてチャン
バー全体が完成する。このチャンバーは細胞を播種する前に、オートクレーブを
使用して高温高圧滅菌を行った後、乾燥機にて 80°Cで 12時間乾燥させた。

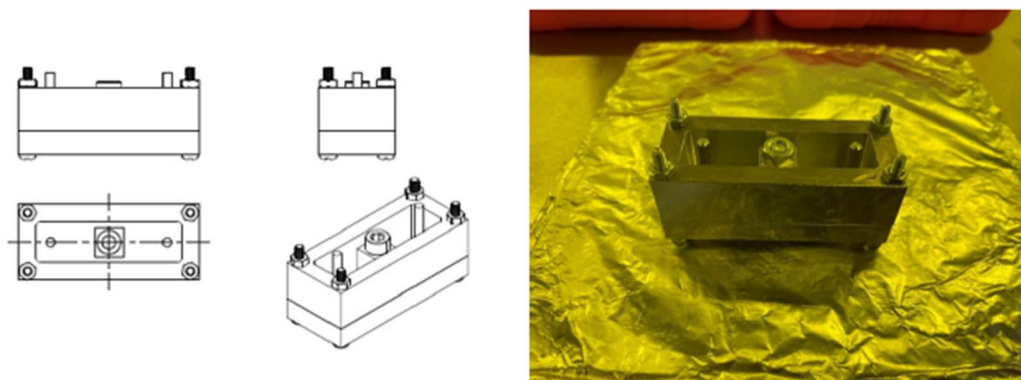


図2 チャンバー作製用鋳型

左:チャンバー作製用鋳型組立図, 右:鋳型の写真

2.3 細胞生存実験

細胞に伸展をかけ、観察を可能にするため、鋳型、および伸展時の条件について、改善を行った。

2.3.1 鋳型の変更

チャンバーの底面の表面精度を向上させ、膜の隙間からの液漏れやコンタミネーションを防ぐため、鋳型の変更を行った。

2.3.2 細胞播種・伸展条件の変更

細胞播種時の細胞外基質と、伸展時の培地、および、温度の管理方法の変更を行った。

2.4 伸展装置

伸展装置は図3に示すような構造をしており、この上にチャンバーを固定し、伸展を負荷した。最大で二つのチャンバーを伸展させることができる。

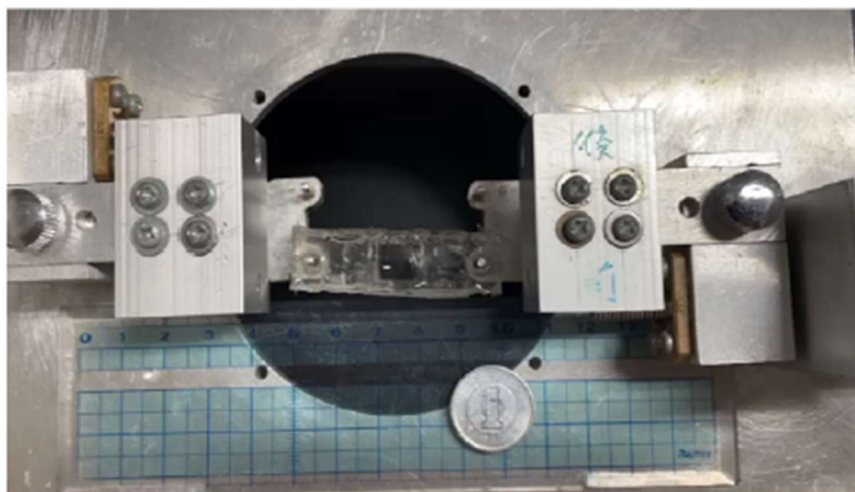


図3 伸展装置

2.5 伸展プログラム

伸展は両端のモータによって制御されており、それぞれ 2mm ずつ、計 4mm の伸展をチャンバーに与えた。予備実験によって、これにより細胞播種部には 2mm、つまり 20%の伸展が与えられる。

2.6 細胞培養

2.6.1 使用細胞

ウシ大動脈血管内皮細胞 (Bovine Aortic Endothelial Cell: BAEC), ラット皮膚表皮細胞 (Fetal Rat Skin Keratinocyte: FRSK), ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC), 低悪性度 (Grade1) の KU-7 と高悪性度 (Grade4) の TCCSUP を使用した。

2.6.2 ガラスベースディッシュへの培養

ガラスベースディッシュへの細胞播種は、ディッシュの底面が完全に覆われるように、1%w/v ゼラチン PBS1ml を注ぐ。ディッシュの蓋を開け、冷蔵庫内で一晚 (約 8 時間) 以上乾燥させた。その後、PBS (-)1ml でディッシュを洗浄した後、細胞を播いた。播種する際は、細胞がディッシュ上で均一に分布するよう、ピペティングを行い、播種後 30 分で培地を交換した。

2.6.3 チャンバー上への培養

PDMS 膜上へ細胞を播種するため、チャンバーの細胞播種部にフィブロネクチン (シグマアルドリッチ) $50\mu\text{l}$ を PBS1ml で希釈した溶液 $350\mu\text{l}$ を注ぎ、冷蔵庫内で一晩 (約 8 時間) 以上、完全に乾燥させた。培養方法はガラスベースディッシュと同様とした。

2.6.4 遺伝子導入

細胞に遺伝子を導入するために本研究ではリポフェクション法を用いた。遺伝子導入試薬と DNA (PKC α -AcGFP, YAP-GFP, PTEN-GFP) を 1:1 で混合し、混合した溶液を添加してインキュベートすることで遺伝子を導入した。遺伝子導入剤にはリポフェクション用遺伝子導入試薬 Lipofectamin を用いた。遺伝子導入を行うタイミングはコンフルエント率が 60%~80%とした。

2.7 伸展負荷実験

遺伝子導入後、BAEC を 100%コンフルエントになるまで培養した。培養後、作製したチャンバーを伸展装置の上に固定し、伸展を負荷した。伸展時に培地を L15 培地に交換した。L15 培地は CO₂ コントロールを必要としない培地である。伸展は 4s 周期の周期伸展であり、温度を 38°C で管理した状態で、9 時間伸展を与えた。実験は、断熱された箱の中で行った。温度管理は、卓上型温度調節器 (TJA-550P, アズワン) により箱の中の温度を白金測温抵抗体によって測定し、PID 制御によって 38°C 付近を維持するよう電圧を制御した。同時に、コントロールとして、温度管理されたインキュベータ内で播種をおこなったチャンバーを 9 時間静置した。

2.8 Ca²⁺の可視化

細胞の位置、損傷の完了の指標を得るため、Fura2-AM (同仁化学研究所, F015) を用いて細胞内 Ca²⁺の染色を行った。Fura2-AM 粉末を DMSO (SIGMA, D8418) および HBS で希釈し、終濃度 $10\mu\text{mol/L}$ となるよう培養細胞に滴下した。Fura2-AM 溶液の負荷後は、インキュベータ内で 10~15 分間インキュベートしたのち、HBS で 2 回洗浄してから蛍光観察を行った。

2.9 顕微鏡観察

本実験では、PKC α , YAP, PTEN を可視化できた細胞を観察対象とし、その隣接した細胞に損傷を加えた時、観察対象の PKC α の様子を撮影した。隣接細胞の細胞膜を損傷し、変形を誘導した。

2.9.1 観察・損傷細胞の選定

観察する細胞は、PKC, YAP, PTEN の発現が確認された細胞かつ、隣接する細胞があるものとした。

2.9.2 蛍光観察

ディッシュを HBS で満たし、40 倍油浸レンズ (S-Fluor, NA=1.30, Nikon Corp.) を取り付けた倒立顕微鏡 (のステージ上に設置した) Fura-2AM の励起波長 380 nm, GFP 融合タンパク質に対しては励起波長 488 nm を用いて照射した。

2.9.3 細胞形状観察

細胞が伸展によって、細長くなり、縦に配向したことを明視野と Fura-2AM によって確認した。

2.9.4 レーザー損傷

レーザー照射装置 (MicroPoint, Andor) を用いて隣接細胞を損傷した。レーザーの波長は DyeCell によって 404 nm に設定してあり、照射は 15 Hz で 1 回から 10 回行い、損傷細胞の Ca²⁺ の蛍光輝度が減少した後、輝度の回復が見られなかった場合を損傷成功とした。

2.9.5 マイクロピペットによる損傷

機械的創傷のために、先端径が 2 μm となるように作製したガラス製マイクロピペットを用いて単一の細胞を穿刺した。マイクロピペットの作製にはマイクロピペットプラー (P-97, Sutter Instrument Company) を用いてホウケイ酸管 (B100-75-10, Sutter Instrument Company) を加工することで作製した。穿刺は、観察対象と隣接して接着しており、蛍光物質を発現していない細胞の直上にピペット先端を移動させ、垂直方向に適当な速度で下ろすことにより行った。この動作により隣接細胞を損傷することで細胞間接着を破壊し細胞間張力を除去した。隣接細胞剥離実験では細胞剥離の成否は Fura-2AM によって可視化された Ca²⁺ の輝度値で判断し、つき後に輝度が回復しないことを剥離成功とした。

2.10 解析

2.10.1 伸展実験の際の形状解析

細胞の形状の評価は Image-J Fiji を用いた。まず、明視野の細胞の画像に対し、その輪郭の ROI (関心領域, Region of Interest) をフリーハンドで取得した。その後その ROI の真円度 (Shape Index) を計測した。真円度は領域の面積 A , 円周を p とした時に、 $4\pi A/p^2$ で表される値である。その値は 0~1 の範囲をとり、1 に近いほど真円に近づき、0 に近いほど線に近いことを示す。真円度を伸展

後の細胞とコントロールの細胞で比較した。

2. 10. 2 伸展実験の際の輝度解析

観察細胞を図4に示すように、隣接細胞の近傍 (near) とその反対 (far) に分割した。その後、near, far 領域の細胞膜付近に直径 $1\mu\text{m}$ の円状の ROI を設定し、輝度を取得した。輝度変化のデータは損傷した隣接細胞が、観察細胞と縦に並んでいるか、横に並んでいるかで分けてまとめてあり、変化の様子の違いを比較した。例えば、図4は横のデータとして解析を行った。

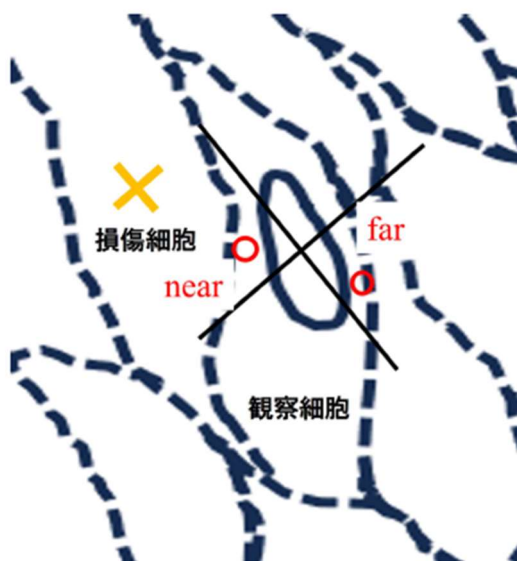


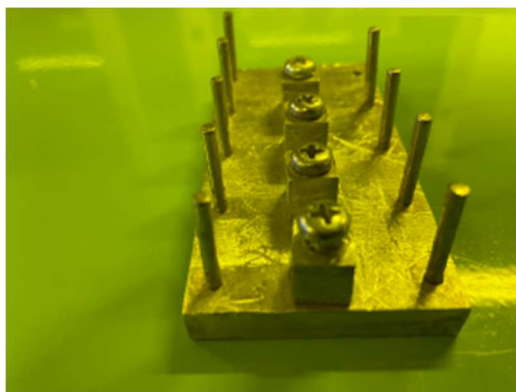
図4 観察領域

3. 結果

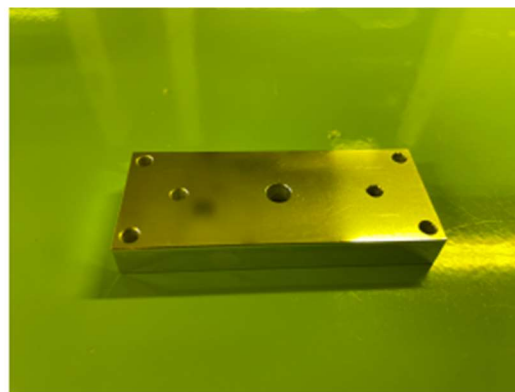
3.1 細胞生存実験

3.1.1 鋳型の変更

チャンバーの底面の表面精度を改善し、膜との隙間をなくすため、[図5](#)のように鋳型底面を鏡面仕上げに変更し、清掃しやすいよう、分割した。結果、チャンバー本体の底面が[図6](#)のように改善された。



(a) 変更前鋳型底面



(b) 変更後鋳型底面

[図5](#) 鋳型底面



(a) 変更前チャンバー底面

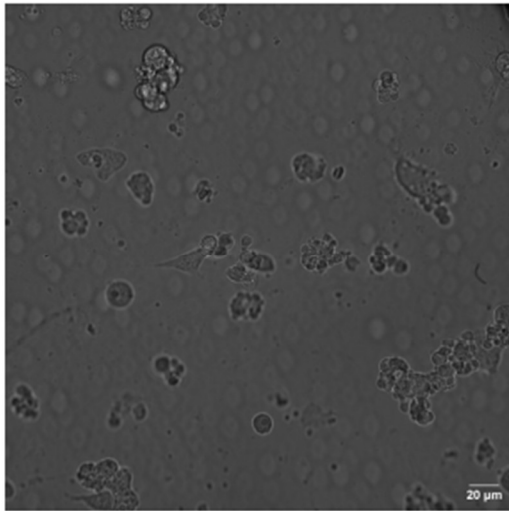


(b) 変更後チャンバー

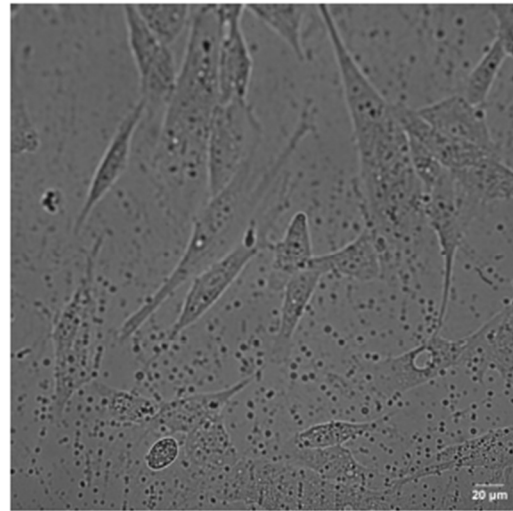
[図6](#) チャンバー底面

3.1.2 伸展条件の変更

伸展後、細胞が生存し、かつ、形状の変化を確認できるよう、以下のように条件を変更した。細胞外基質をゼラチンからフィブロネクチンのコーティングに変更した。その後、伸展中の培地を HBS から、CO₂ コントロールを必要としない、L15 培地に変更した。また、伸展時、温度管理をドライヤーによって行っていたものを、デスクパネルヒーターで行った。その結果、[図7\(a\)](#)のように、伸展後細胞が剥離していたものが、[図7\(b\)](#)のように生存するようになった。



(a) 変更前 実験後細胞



(b) 変更後 実験後細胞

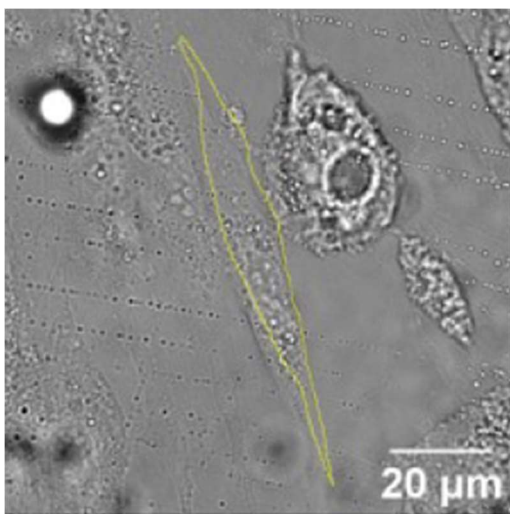
図 7 伸展後の細胞明視野画像

3.2 伸展による細胞形状の変化

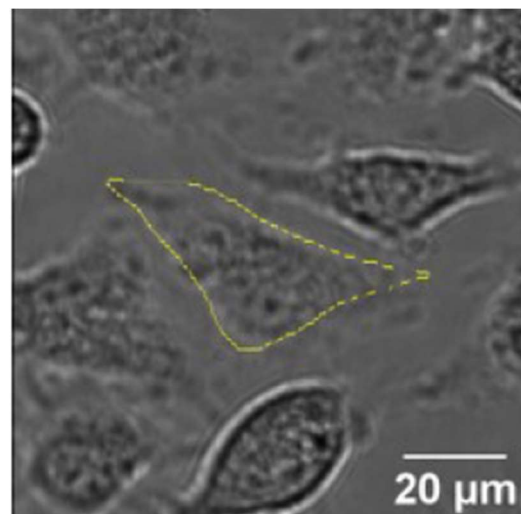
伸展によって細胞の形状と配向が変化していることを確認した。

3.2.1 細胞の形状変化

明視野画像にて、伸展を負荷していない細胞（コントロール）と伸展を負荷した細胞の輪郭を図 8 のように ROI で囲み、その真円度を評価した（図 9）。伸展を負荷した細胞の値の方が 0 に近く、より細く伸びていることが分かる。



(a) 伸展細胞



(b) コントロール

図 8 細胞の形状変化

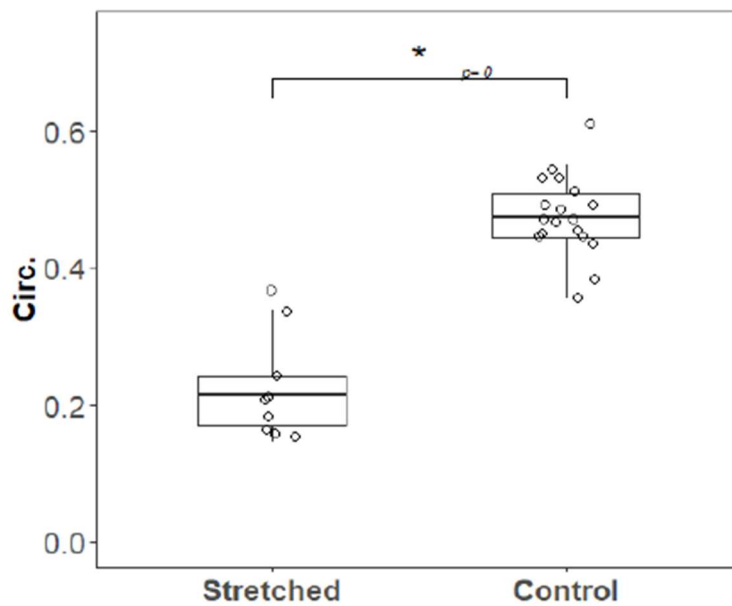
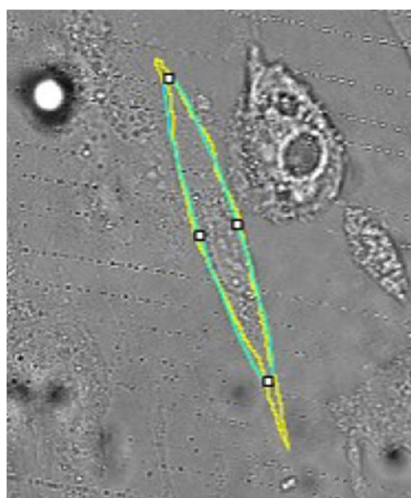


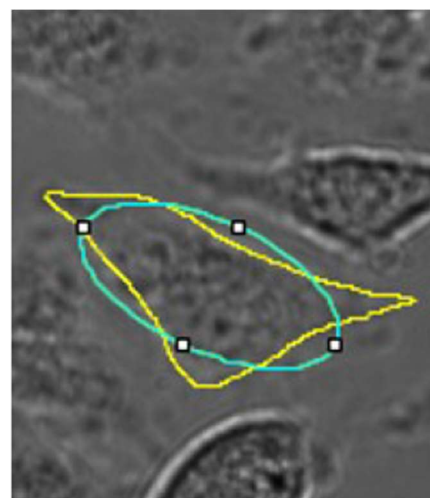
図9 伸展による形状変化の比較

3.2.2 細胞の配向変化

明視野画像にて、伸展負荷をおこなっていない細胞（コントロール）と伸展をおこなった細胞の輪郭を図10のようにROIで囲み、楕円近似した後、長軸と伸展向（水平方向）との間の角度を評価した（図11）。伸展を負荷した細胞は90°付近に分布し、配向が縦に並んでいることが分かった。



(a) 伸展細胞



(b) コントロール

図10 細胞の配向の変化

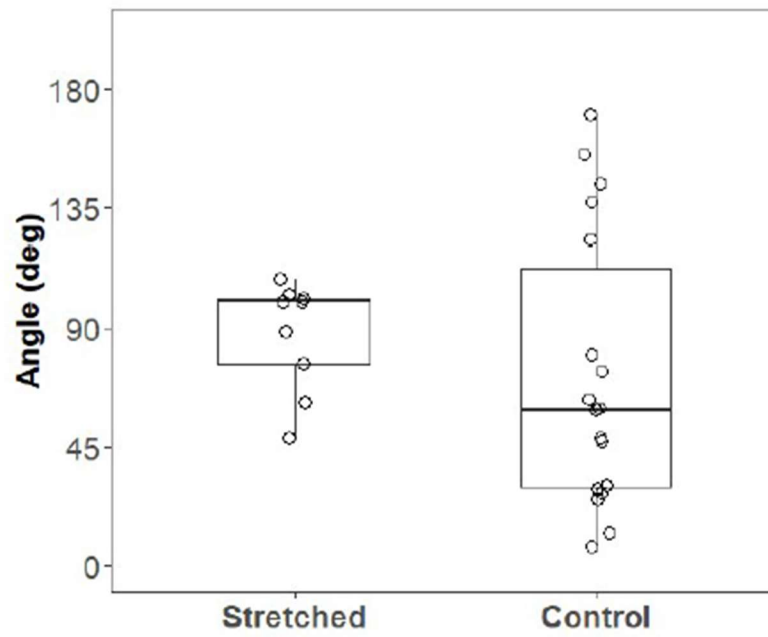


図 1 1 伸展による配向の変化

3.3 レーザー損傷時の PKC α の反応

レーザーを用いて隣接細胞損傷実験をすることが可能となった.

3.3.1 横方向損傷

観察細胞に対して、横に隣接する細胞を損傷した際の継時的な PKC α の輝度変化を示す (図 1 2). また、3つのデータに対して、Near と Far 領域の輝度の時間変化を示す (図 1 3).

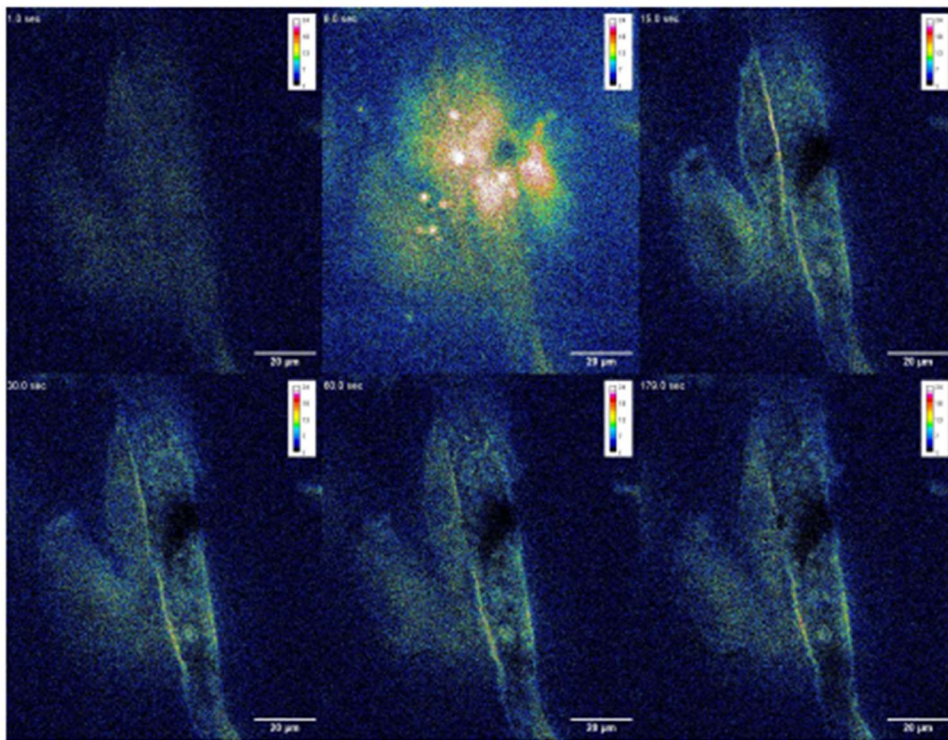


図 1 2 横に隣接した細胞を損傷した際の PKC α の反応

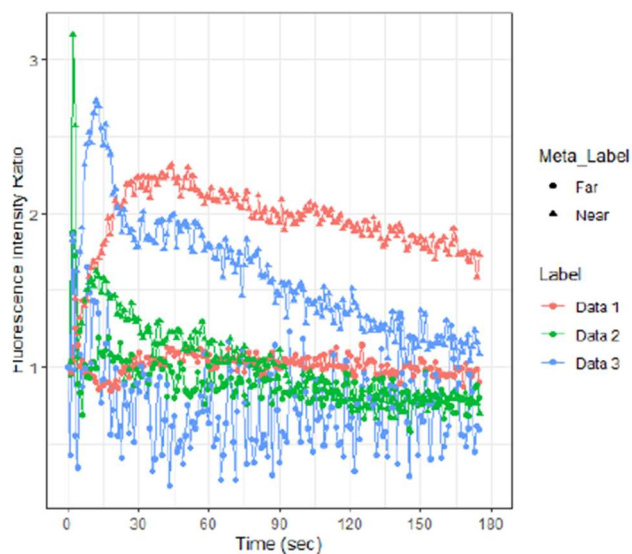


図 1 3 PKC α の輝度の時間変化

3.3.2 縦方向損傷

観察細胞に対して、縦に隣接する細胞を損傷した際の継時的な PKC α の輝度変化を示す (図 1 4). また、2つのデータに対して、Near と Far 領域の輝度の時間変化を示す (図 1 5).

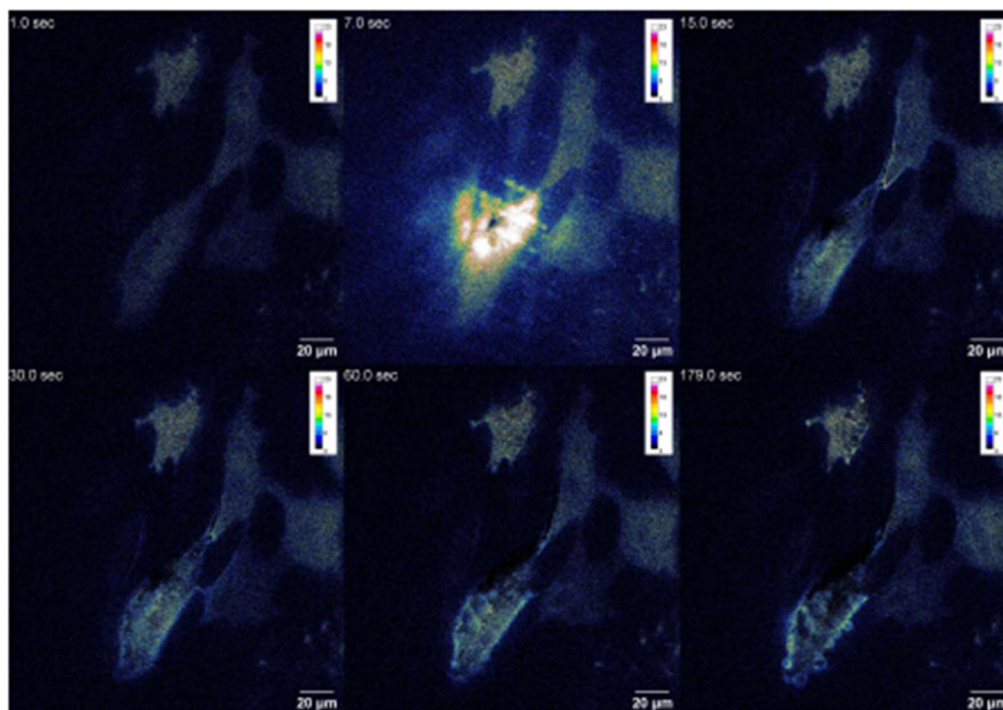


図 1 4 縦に隣接した細胞を損傷した際の PKC α の反応

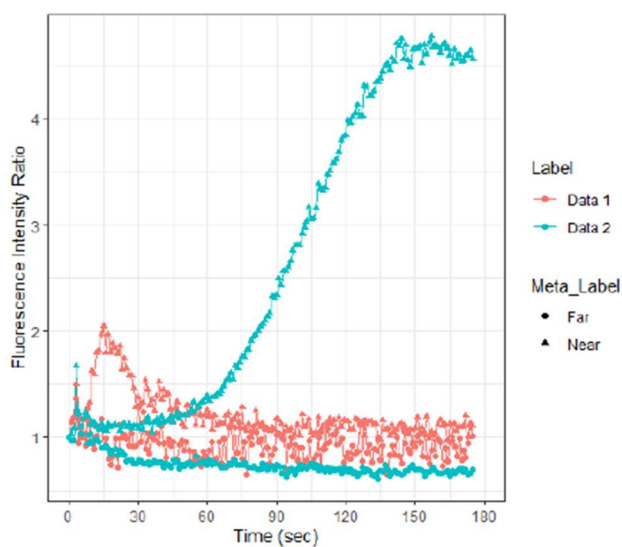


図 1 5 PKC α の輝度の時間変化

3.3.3 コントロール

伸展を負荷せず、同時間インキュベータ内に安置した細胞をコントロールとして、レーザー損傷をした際の Near と Far 領域の輝度の時間変化を示す(図 1 6)。

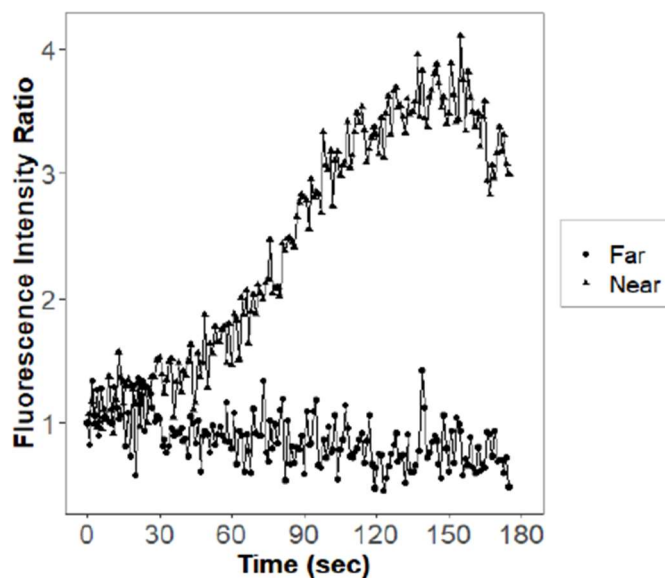


図 1 6 PKC α の輝度の時間変化

3.4 カバーガラス上での力学変形下で観察(PKC, YAP, PTEN)

カバーガラス上で隣接細胞を剥離することで細胞を収縮させ、細胞収縮時の PKC 移動現象の計測をおこなった。その結果、以下に細胞変領域に PKC が集積する興味深いデータが取得できた(図 1 7)。

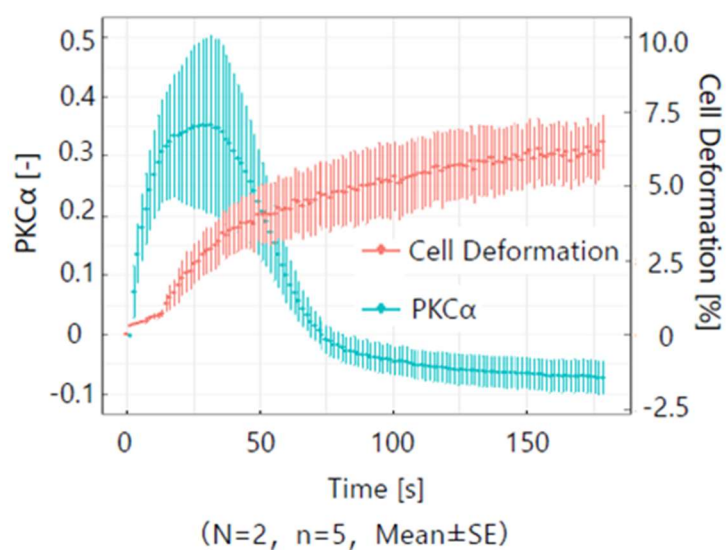


図 1 7 PKC α の輝度の時間変化

さらに詳細なメカニズム解明のために、カバーガラス上で PKC α とケラチン、PKC α と KIF5B の細胞変形下での実験をおこなった。

図 1 8 に示す様に正常細胞で PKC が集積する変形部では、ケラチンが接着領域に垂直になっていることがわかった。そして、正常細胞ではケラチンが垂直な構造が多く観察された。癌細胞では、ケラチンの構造が垂直な場合は集積することもあったが、ケラチンの構造は不規則なものが多く、PKC α が集積することは少なかった。

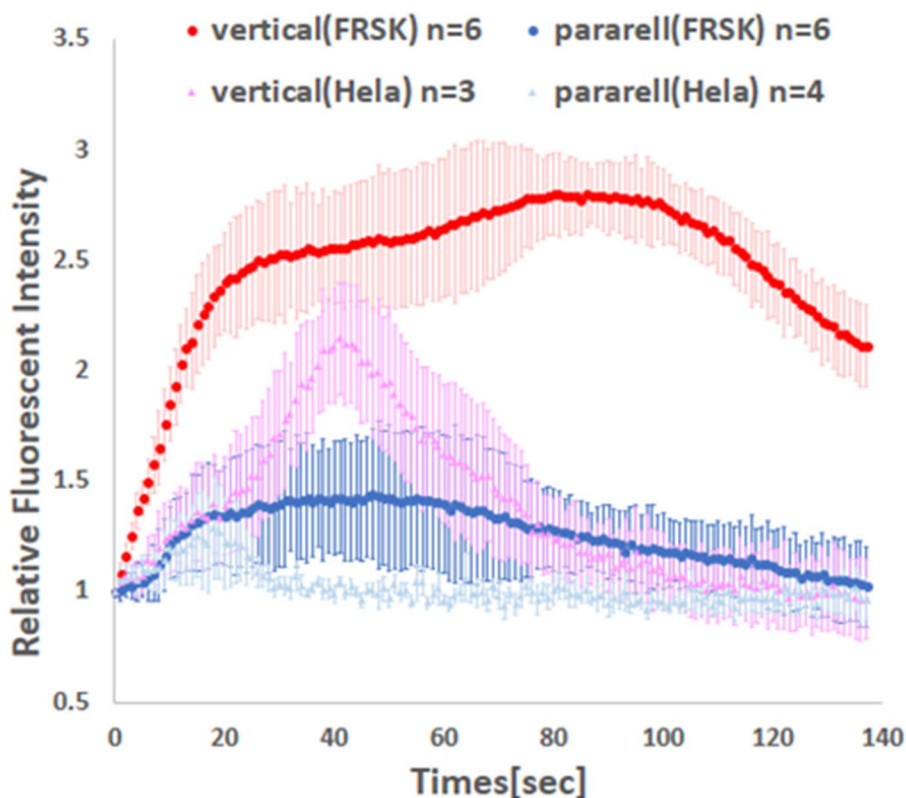


図 1 8 PKC とケラチンの関係の時系列変化

移動形態を詳細に調べるためにモータータンパク質の1つであるキネシンの構成タンパク質 KIF5B と同時観察をおこなったところ、PKC と KIF5B が同じ位置に集積することが明らかとなった (図 1 9 上)。そして、PKC が先に集積して、その後に KIF5B が集積してくることがわかった (図 1 9 下)。

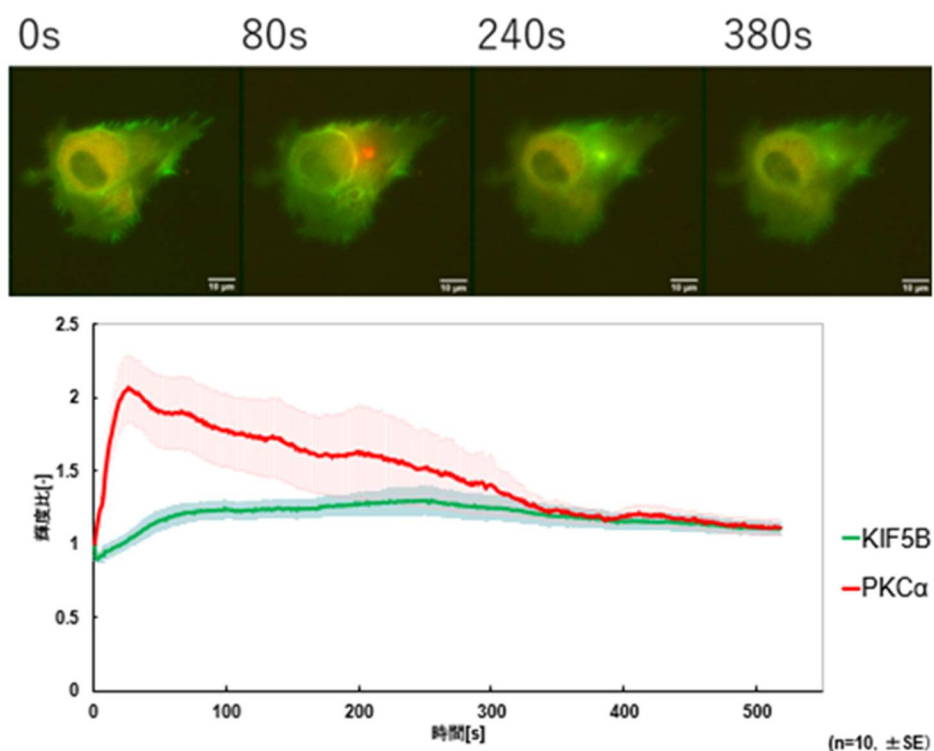


図19 PKC (赤) と KIF5B(緑)の変形下での同時観察
上：画像，下：集積部位での時系列データ

PTEN (図20) および YAP (図21) に関しては、カバーガラス上で細胞を収縮させた際に、細胞変形時に核へ集積する興味深いデータを取得することに成功した。

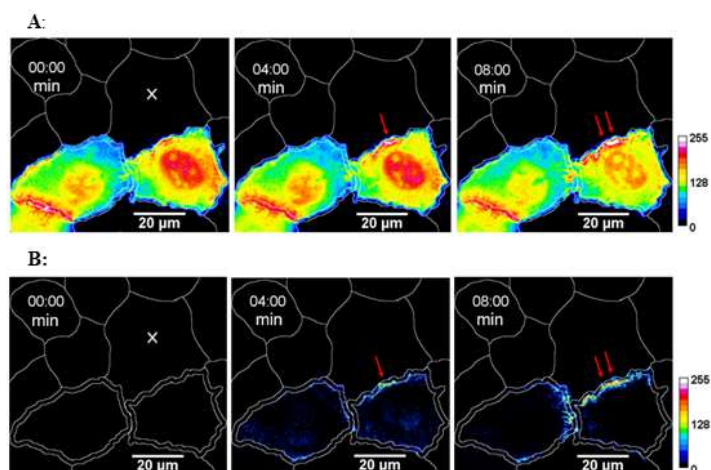
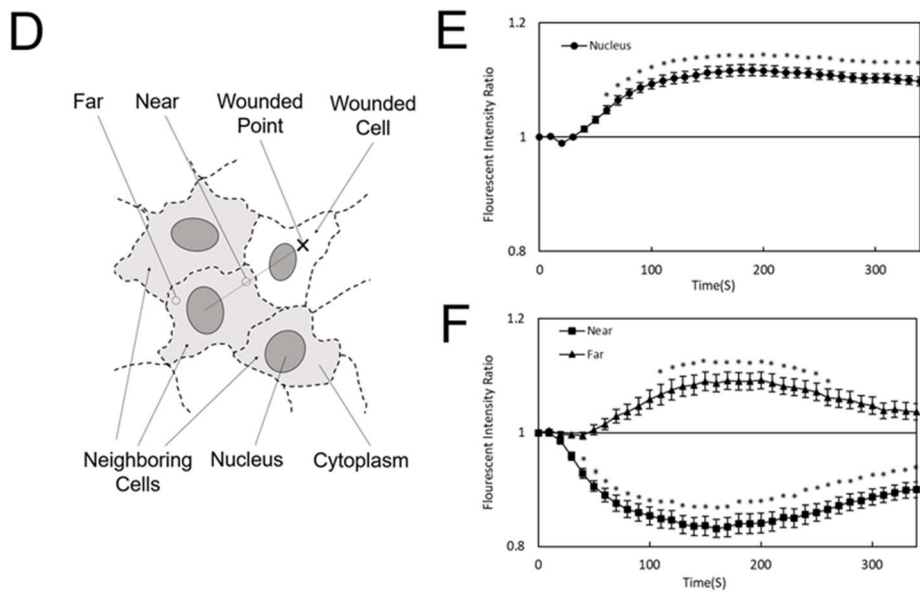
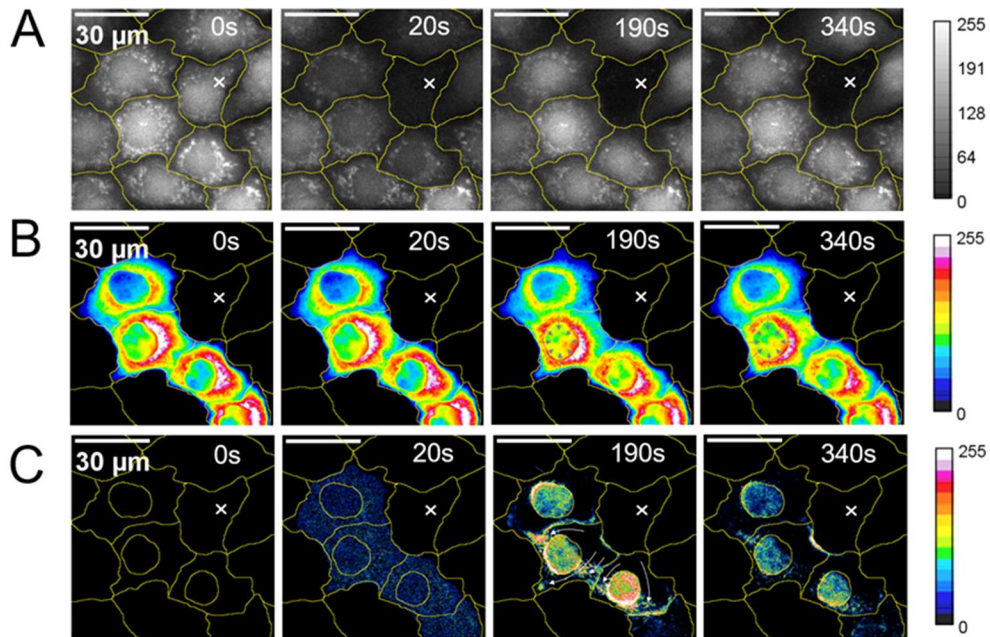


図20 細胞内 PTEN 蛍光遺伝子発現および解析



A: 細胞変形時の細胞内カルシウム応答, B: 細胞変形時の YAP 蛍光遺伝子の変化,
 C: B の蛍光輝度の差分, D: 計測領域模式図, E: 核内 YAP の時系列解析, F: 細胞
 質内 YAP の時系列解析細胞変形直後からガン抑制物質 YAP が核内へ移行する様子
 を捉えること に成功した(F).

図 2 1 細胞内 YAP 蛍光遺伝子発現および解析

3.5 カバーガラス上の癌細胞と正常細胞の力学変形下での計測(PKC)

3.5.1 ヒト正常細胞における隣接細胞剥離時の Ca^{2+} /PKC α の応答

正常細胞(HUVEC)に対して隣接細胞剥離を行った際の Ca^{2+} , PKC α , PIP2 の様子を図 2 2 にそれぞれ示した. HUVEC では隣接細胞が剥離された直後 Ca^{2+} は輝度が低下したが時間が経つと回復した. PKC α は細胞膜に移動, 特に near 側に強く集積した後基底状態に戻った. PIP2 は反応があまり見られなかった.

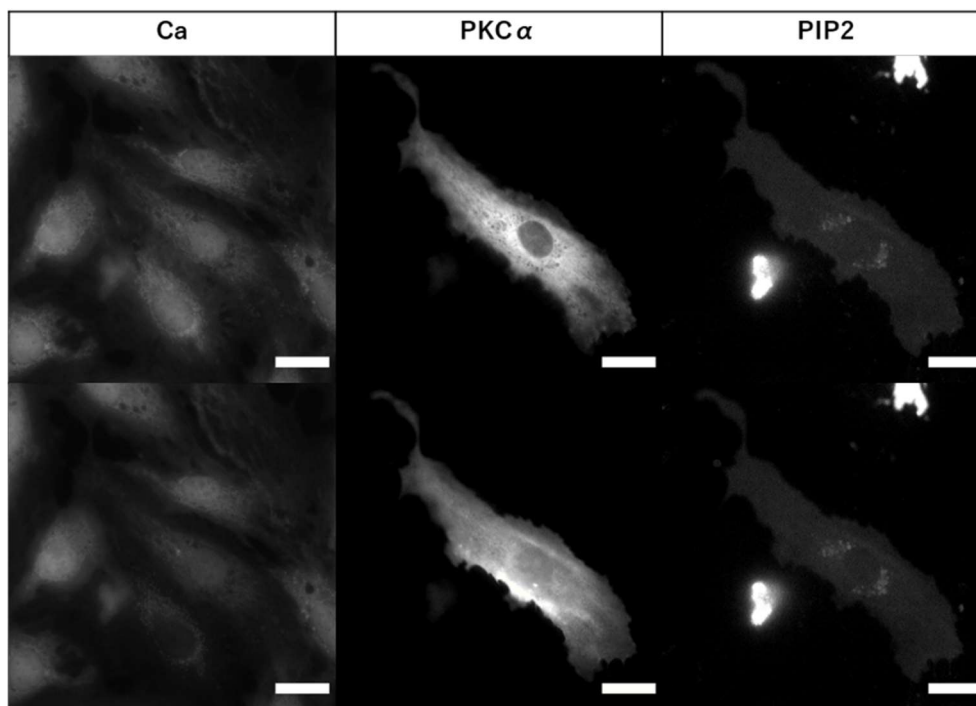


図 2 2 隣接細胞剥離時の HUVEC の Ca^{2+} /PKC α の応答 上段: 隣接細胞剥離直前, 下段: 隣接細胞剥離後 PKC α 集積時 (Scale bar : 20 μm)

HUVEC における Ca^{2+} , PKC α , PIP2 の経時変化を比較するために輝度値をプロットした(図 2 3). Ca^{2+} は BAEC での損傷実験と同様に輝度の一時低下の後, 基底状態にもどった. PKC α は near 側で集積して時間が経つにつれ基底状態に戻ったことが見受けられる. Far 側でも同様の変化が起きたが, near 側に比べ弱い反応であったことが分かる. しかし, 従来研究と異なり 1 次反応 \rightarrow 2 次反応といった反応の仕方ではなくほぼ同時に集積した. PIP2 は near 側で PKC の反応と同時期に少しの輝度減少を示した. このことは PIP2 の減少つまり細胞膜の DAG と PKC α が結合し, PKC α が活性化したことを表す.

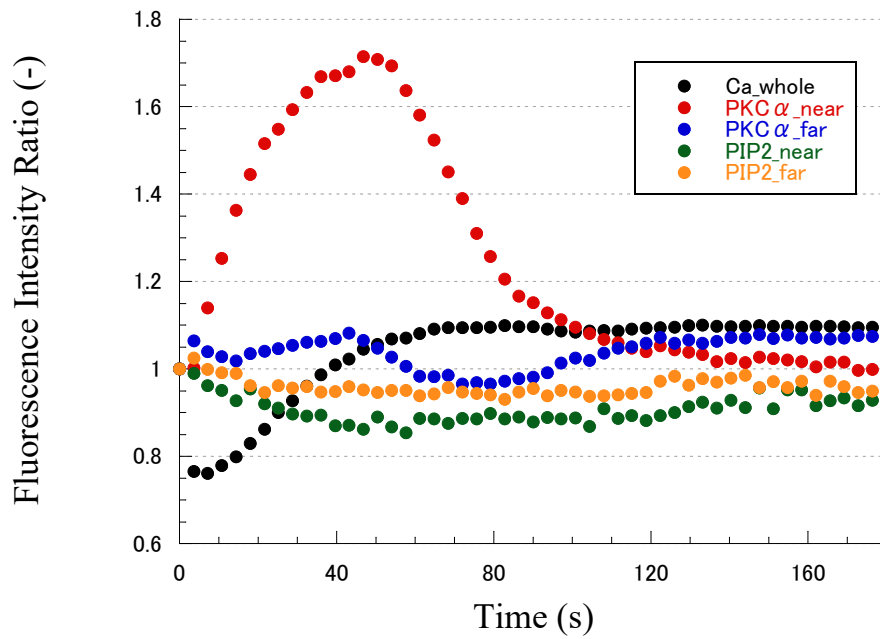
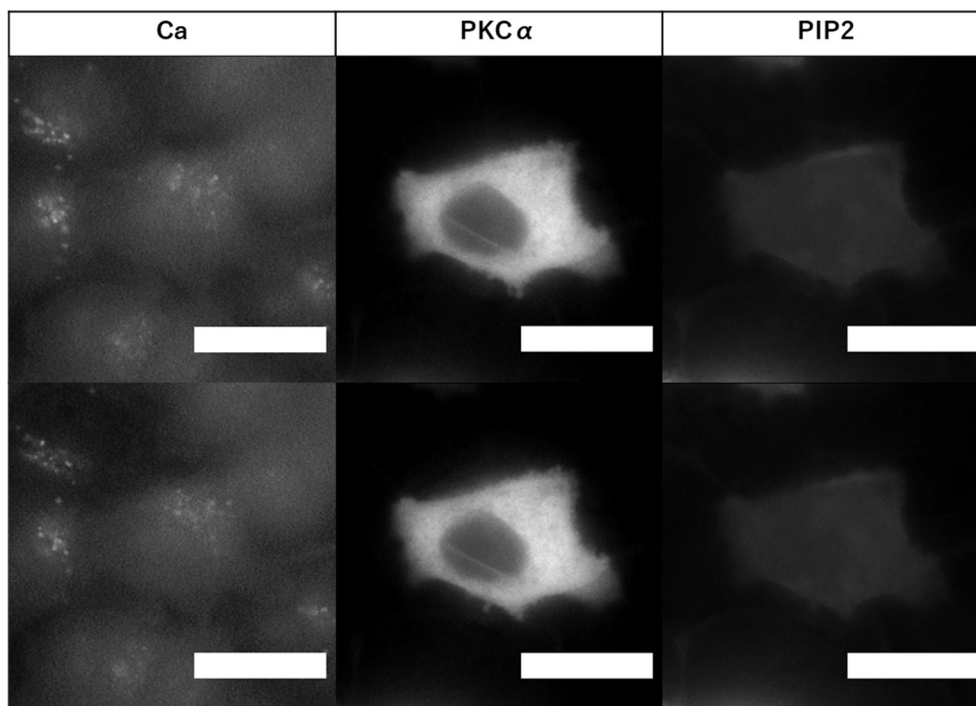


図 2.3 HUVEC の Ca²⁺/PKC α /PIP2 の蛍光輝度経時変化

横軸に時間，縦軸に蛍光輝度比．縦軸の値は損傷直前のフレームの輝度値で正規化した．

3.5.2 低悪性度膀胱癌細胞における隣接細胞剥離時の Ca^{2+} /PKC α /PIP2 の応答

低悪性度の膀胱癌細胞 (KU-7) において、隣接細胞剥離を行った際の Ca^{2+} , PKC α , PIP2 の様子を [図 2 4](#) にそれぞれ示した。KU-7 では細胞間張力除去に成功した場合、 Ca^{2+} の輝度の一時的な低下は観察できたが、PKC α , PIP2 の局在変化は near 側, far 側両方で見られなかった。



[図 2 4](#) KU-7 の Ca^{2+} , PKC α , PIP2 の応答 上段：隣接細胞剥離直前，下段：隣接細胞剥離後 PKC α 集積時 (Scale bar : 20 μm)

膀胱癌細胞における Ca^{2+} , PKC α , PIP2 の輝度経時変化を比較するために輝度値をプロットした ([図 2 5](#))。KU-7 では Ca^{2+} は隣接細胞損傷後輝度が低下した後緩やかな上昇を見せたが、PKC α は near 側, far 側両方において有意な変化は見られなかった。PIP2 も同様の結果となった。正常細胞では輝度変化が起きたが、低悪性度膀胱癌細胞では Ca^{2+} 以外の輝度変化が起きなくなった。

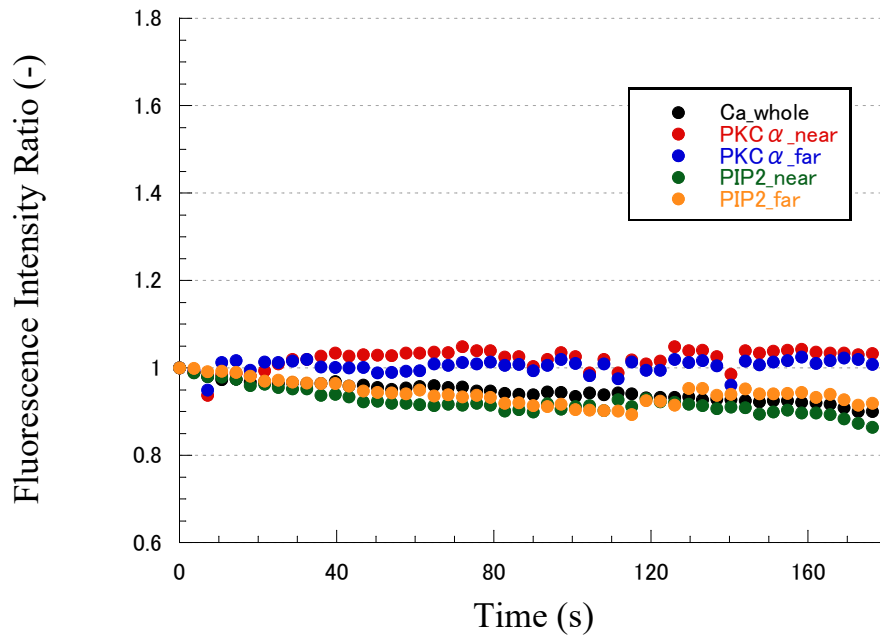


図 2 5 KU-7 の Ca²⁺/PKC α /PIP2 の蛍光輝度経時変化

横軸に時間，縦軸に蛍光輝度比，縦軸の値は損傷直前のフレームの輝度値で正規化した。

3.5.3 高悪性度膀胱癌細胞における隣接細胞剥離時の Ca^{2+} / $\text{PKC}\alpha$ / $\text{PIP}2$ の応答
 高悪性度の膀胱癌細胞 (TCCSUP) において, 隣接細胞剥離を行った際の Ca^{2+} , $\text{PKC}\alpha$, $\text{PIP}2$ の様子を図 2 6 にそれぞれ示した. TCCSUP では, $\text{PKC}\alpha$ は HUVEC と同様の局在変化が観察できた. $\text{PIP}2$ でも輝度変化は確認できなかった. Ca^{2+} は正常細胞, 低悪性度膀胱癌細胞では輝度の一時変化の後基底状態に戻っていたが, 回復具合が弱いといった特徴が見られた.

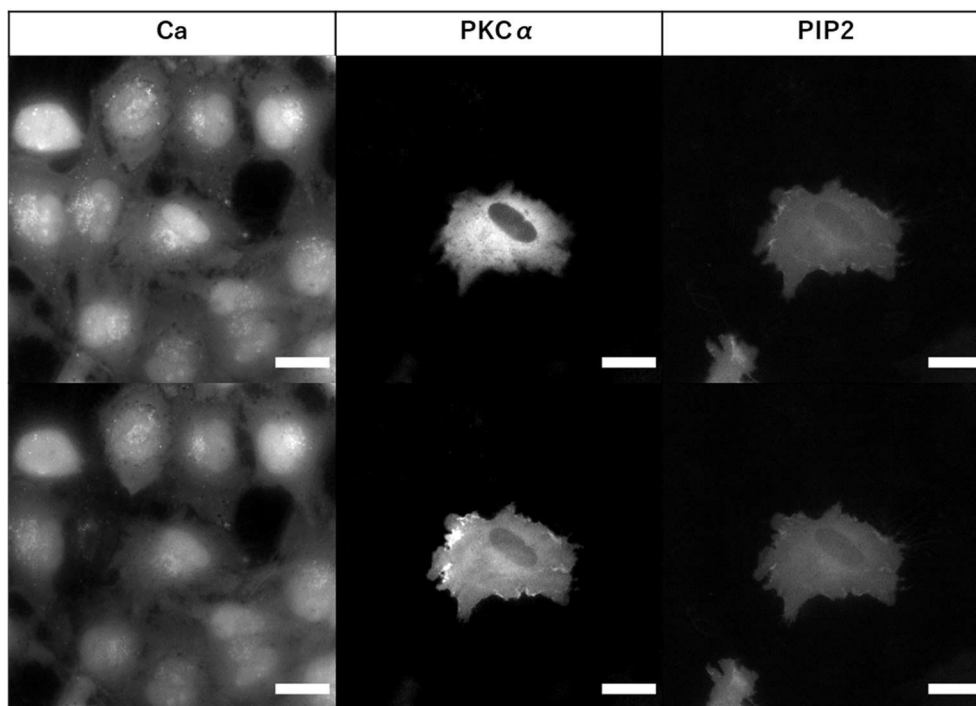


図 2 6 TCCSUP の隣接細胞剥離時の Ca^{2+} , $\text{PKC}\alpha$, $\text{PIP}2$ の応答

上段: 隣接細胞剥離直前, 下段: 隣接細胞剥離後 $\text{PKC}\alpha$ 集積時 (Scale bar: 20 μm)

高悪性度膀胱癌細胞における Ca^{2+} , $\text{PKC}\alpha$, $\text{PIP}2$ の輝度経時変化を比較するために輝度値をプロットした(図 2 7). Ca^{2+} はこれまでの 2 細胞と異なり, ある程度輝度が低下した後, 輝度の回復が確認できなかった. $\text{PKC}\alpha$ は near 側, far 側共に HUVEC のような輝度変化が見られた. $\text{PIP}2$ も HUVEC 同様の結果となっており $\text{PKC}\alpha$ が DAG と結合して活性化されたことが見てとれる.

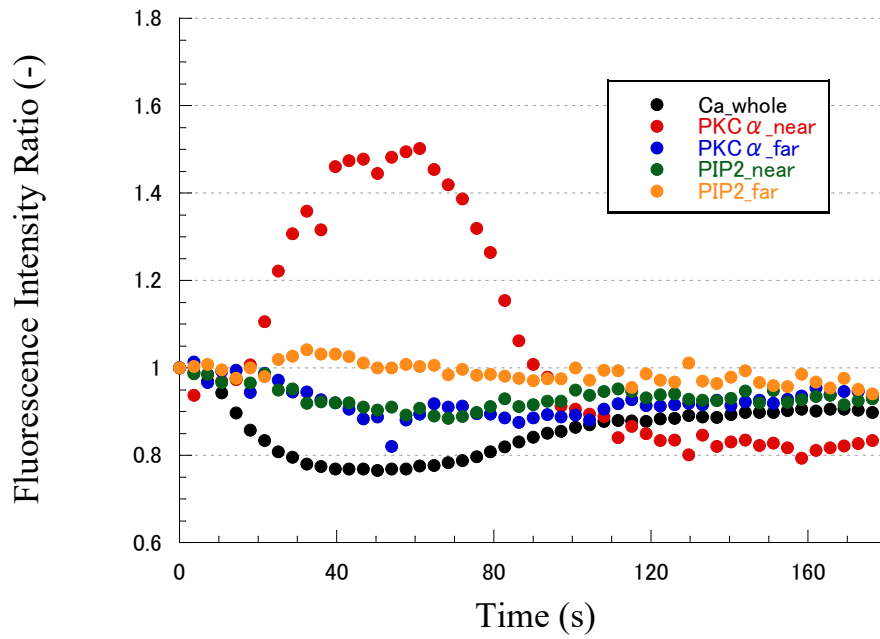


図 2 7 TCCSUP の Ca²⁺/PKC α /PIP2 の蛍光輝度経時変化

横軸に時間，縦軸に蛍光輝度比，縦軸の値は損傷直前のフレームの輝度値で正規化した。

3.5.4 正常細胞と膀胱癌細胞の比較

図 2 8 に、3 細胞で PKC α のピーク値を Tukey-Kramer Test で比較し、有意差検定を行った。その結果 3 細胞間それぞれで有意な差が確認できた。

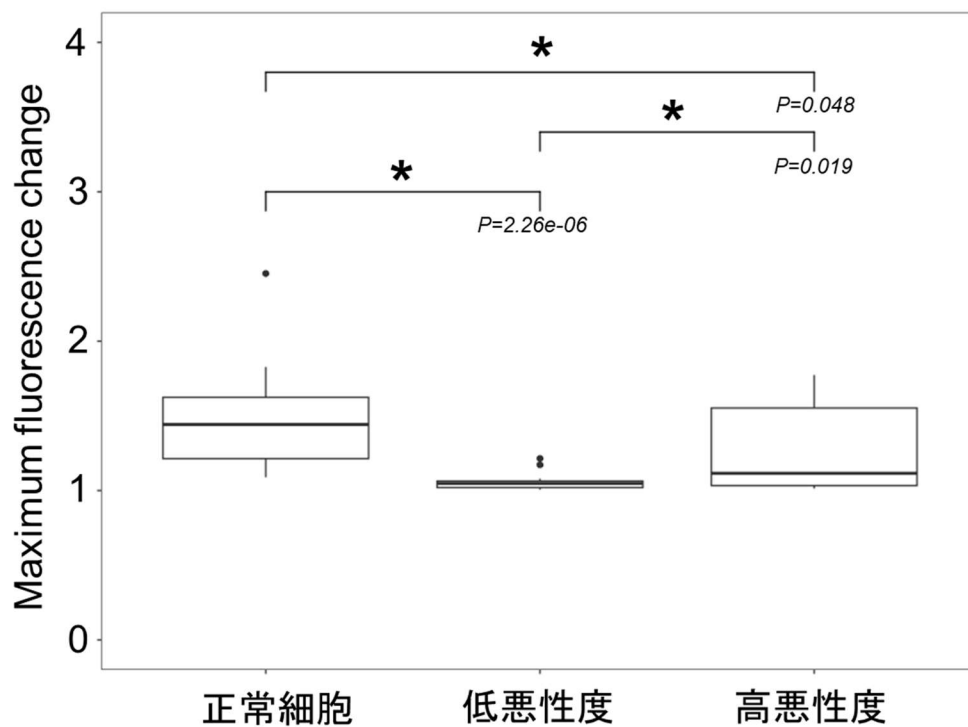


図 2 8 Tukey-Kramer Test $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。
3 細胞間それぞれで near 側の PKC α の反応に有意差は存在した。

4. まとめ

分子標的となるガン促進タンパク質, および対照としてガン抑制タンパク質の力学刺激下での応答を計測するシステムを作製することができた. また, PKC α の反応も観察することができた. また, カバーガラス上で正常細胞と癌細胞で PKC 応答が異なり, PKC の応答には KIF5B の関与が明らかとなった. YAP, PTEN に関しては, 変形させると核内に移動することが明らかとなった.

また, 膀胱癌細胞を用いて正常細胞と比較すると, 力学刺激に対する PKC の応答が異なることが明らかとなった.

5. 発表成果一覧

論文

1. Saori SASAKI, Zhaoyi DU, Ryu TAKAHASHI, Qi SUN, Tatsuya SATO, Toshihiro SERA, and Susumu KUDO

The effect of stiff substrates on the collective migration of A549 cells, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Volume 18 Issue 4 Pages 23-00298, 2023, 10.1299/jbse.23-00298

2. Quanzhi LU, Saori Sasaki, Toshihiro Sera, and Susumu Kudo

Spatiotemporal distribution of PTEN before directed cell migration in monolayers, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* (accepted)

3. Shigesato Inoue, Junpei Nagao, Kouhei Kawamoto, Keiko Kan-o, Satoru Fukuyama, Saori Sasaki, Susumu Kudo, Isamu Okamoto, and Toshihiro Sera

Stretch Alters the Actin Cytoskeleton and Intracellular Trafficking in Overstretching alveolar epithelial type II cells decreases surfactant secretion via actin polymerization and intracellular trafficking alteration, *Heliyon* (under review and revising)

学会発表

1. 北川智晃, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, 力学場変化時の PKC α の応答解析, 日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会, 2022. 06.

2. 肖博元, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, 隣接細胞損傷時における細胞骨格が YAP 動態に及ぼす影響について, 日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会, 2022. 06.

3. 森岡真悠, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, Keratin 構造の違いによる PKC α 局在への影響, 日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会, 2022. 06.

4. 盧泉至, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, PIP3 および PTEN の移動現象に及ぼす細胞間張力の影響, 第 33 回バイオフィロンティア講演会, 2022. 12.

5. 尾崎郁美, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, 細胞微小変形時のモータータンパク質の挙動, 第 46 回日本バイオレオロジー学会年会, 2023. 06.

6. 森岡真悠, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, PKC α 局在時における Keratin 構造の影響, 第 46 回日本バイオレオロジー学会年会, 2023.06.
7. 楊井威信, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, 力学刺激下における変異型 PKC α の時空間分布計測, 日本生理人類学会第 84 回大会, 2023.06.
8. Susumu Kudo, Effect of mechanical stimuli on intracellular protein localization, 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (JSB2023, 2023.08.
9. Boyuan Xiao, Saori Sasaki, Toshihiro Sera, Susumu Kudo, YAP dynamics during adjacent cell wound, 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (JSB2023, 2023.08.
10. Quanzhi Lu, Saori Sasaki, Toshihiro Sera, Susumu Kudo, PTEN translocation in response to the unloading of intercellular tension, 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (JSB2023, 2023.08.
11. 小野瀬 孝一, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, 細胞間接着剥離における PKC アイソフォーム細胞内移動現象の違い, 第 34 回日本機械学会バイオフィロントニア講演会, 2023.12.
12. 肖 博元, 佐々木沙織, 世良俊博, 工藤奨, 隣接細胞損傷時における Importin- β の YAP 核移動現象に及ぼす影響, 第 34 回日本機械学会バイオフィロントニア講演会, 2023.12.