

血管平滑筋細胞内ストレスファイバの配向再現メカニズムに関する研究

Study on the mechanism of reproducibility of stress fiber orientation in vascular smooth muscle cells

○ 佐藤聡俊 (名工大) 長山和亮 (名工大) 松本健郎 (名工大)

Akitoshi SATO, Nagoya Institute of Technology
Kazuaki NAGAYAMA, Nagoya Institute of Technology
Takeo MATSUMOTO, Nagoya Institute of Technology

Abstract: Stress fibers (SFs) play essential roles in various cellular events including cell movement, shape maintenance and cell function. They also reorganize themselves in response to variation in the mechanical environment. Recently, we found that SFs reorganized following their temporal disruption with cytochalasin D looked similar to those before disruption in vascular smooth muscle cells. This indicates that the cells may have a memory of SF orientation. We previously found that focal adhesion arrangement affects this memory of SF orientation, while microtubules acted as its eraser. However, the role of intermediate filaments (IFs) to the memory of SF orientation remained unclear. Here we investigated the effects of IFs during the reorganization process of SFs. We preconditioned the cells with cyclic stretch to make their SFs align in a same direction. We then disrupted SFs completely with cytochalasin D for 1 h, and let them reorganize in the drug-free medium for 3 h. IFs were also disrupted with acrylamide during the disruption or reorganization process of SFs. The reorganized SFs appeared as they had been in the presence of IFs, while SFs showed random orientation in the absence of IFs. Interestingly, the orientation of SFs tended to be coincident with that of IFs following the temporal disruption and the subsequent reorganization of both SFs and IFs, simultaneously. These results may indicate that IFs have a potential to interact with SFs and serve as a guide leading SFs to focal adhesions to facilitate their memory of orientation.

Key Words: Cytoskeletons, Stress fiber reorganization, Intermediate filaments, Cyclic stretch

1. 緒言

細胞内部にはストレスファイバ (SF) や微小管 (MT)、中間径フィラメント (IF) といった線維状の細胞骨格が細胞全体に張っていて、細胞の形態維持などに深く関係していると考えられている⁽¹⁾。特に SF はアクチンフィラメント (AF) と呼ばれるタンパク質で構成されており、それらが連なって束を形成しながら、張力を発生し、その形態を容易に変化させることができ、細胞の運動や配向状態などを制御していると考えられている。

ところで、当研究室では最近、SF を一旦、薬品処理によって選択的に破壊した後、薬品を洗い流し SF を再重合させると、その配向が破壊前の状態に復帰するという現象が生じることを見出した。この現象について調べてきたところ、基板に接着している焦点接着斑が残存しているほど、SF の配向が再現することが分かってきた。また、接着斑付近の MT は接着斑を分解し、その結果、SF の配向が復帰しようとするのを消す働きがあることも分かってきた⁽²⁾。一方、もう一つの主要な細胞骨格である IF が SF の配向再現性に影響を与えるのかはまだ詳細に明らかとなっていない。

IF は細胞骨格の中でも比較的安定な構造をしており、細胞の機械的強度を保つための受動的な構造体と考えられていて、自らはあまり動かないと思われていた。よって、MT や AF に比べ、IF を対象とした研究は少なかった。しかし、IF が SF や MT と相互作用しながらダイナミックに配向する特性を持つこと⁽³⁾が報告されており、IF が今まで考えられていたような不活性な構造ではなく、他の細胞骨格と協働して細胞の生命活動を調整する動的構造体であることが認識され始めている。すなわち、SF の配向再現性に対して IF が重要な役割を果たしている可能性も否定できない。

そこで本研究では、薬品によって SF を一旦破壊した後、再び重合させ、SF や IF の形態・配向の変化を調べることで SF の再重合および配向再現過程での IF の役割を調べた。また、SF の破壊・再重合過程で、IF も同時に破壊するな

どして、SF の配向再現性にどのような影響を与えるか調べた。また、細胞の部分ごとに SF と IF の配向の一致割合を定量化し、両者の相互作用について検討した。

2. 実験方法

2-1 試料の準備

試料としてラットの胸大動脈由来の培養平滑筋細胞 (Smooth muscle cells, SMCs) を用いた。DMEM 培地 (Wako) に 10% のウシ胎児血清 (ICN)、1 unit/ml の抗生物 (Penicillin-Streptomycin, Gibco) を加えた培養液を使用し、インキュベータ内で 37°C、湿度 100%、5%CO₂-95%Air の環境を保ち、継代・培養して試験に用いた。

2-2 繰返引張負荷試験

本研究では、まず、細胞に繰返引張ひずみを負荷すると SF が基板のひずみゼロ方向に優先的に配向する性質⁽⁴⁾を利用して、以下の手順で予め SF 配向の均一化を試みた。細胞培養チャンバ底面のシリコン膜 (20 mm x 20 mm、厚さ約 0.1 mm) 上にフィブロネクチン (100mg/ml, F1141-5MG, Sigma) をコートして細胞の接着性を高めた。そして、細胞をシリコン膜上に播種してインキュベータ内で 24 時間静置培養した。その後、チャンバを市販の培養細胞伸展負荷装置 (ST-75, ストレックス) に取り付けて、伸展率 8%、周波数 1 Hz にて三角波状の繰返引張ひずみを 24 時間負荷した。シリコン膜のひずみを実測した結果、繰返引張によるひずみゼロ方向⁽⁴⁾は引張方向に対して約 59°と算出された。

2-3 SF と IF の破壊と再重合

これまでの研究で、SF をサイトカラシン D (Cyto-D, 2 mg/ml) を含む培地に 1 時間浸すと線維構造が完全に破壊され、その後、薬品を洗い流し通常培地で 3 時間培養すると SF の線維構造が回復することを確認している⁽²⁾。これを

考慮し本研究では、SFの配向再現性に対するIFの役割を調べるため、次に示す4種類の試料を準備した。i) 繰返引張負荷直後の群。ii) 繰返引張負荷後、直ちにSFを1時間破壊処理して、3時間再重合させた群。iii) ii) に対して、SFと同時にIFも1時間破壊処理した後、3時間再構築させた群。iv) ii) に対して、IFの破壊処理を4時間持続した群。IFを破壊する時は、アクリルアミド(30 mM)をDMEM培地に加え、再重合させる場合には、薬品を洗い流して通常培地に交換して培養した。

2-4 SFの配向解析

上記4群の細胞を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、0.5% Triton Xで細胞膜に透過処理をした。そして、細胞内のSFをAlexa flour 546 Phalloidin (Invitrogen)で蛍光染色した。また、IFをVimentin一次抗体(1mg/ml, Millipore)とAlexa flour 488 蛍光標識二次抗体(Invitrogen)を用いて免疫蛍光染色した。染色した試料を倒立顕微鏡(IX71, Olympus)のステージに設置し、IFとSFの蛍光画像をCCDカメラ(DP70, Olympus)で撮影した。個々の細胞の蛍光画像に対し、2次元高速フーリエ変換(2次元FFT)解析ソフトウェア(2DFFT⁽⁵⁾)を用いてSFとIFの配向性を定量的に解析した。なお、配向性は引張方向を基準とし、0°-90°の範囲でSFとIFの10°ごとの分布を求め、ヒストグラムに表した。

2-5 細胞全体および局所におけるSFとIFの配向一致割合の算出

SFとIFの配向がどの程度一致するのか調べるため、同一細胞のSFとIFの画像に対し、前述の2DFFTを用いて0°-180°の範囲で10°ごとのSFとIFの出現頻度ヒストグラムを求めた。そして、同じ角度範囲のSFとIFの出現頻度を比較し、その差の絶対値を求め、両者の配向の一致割合 α を次式のように定義して求めた。すなわち、個々の細胞について、ある角度範囲 θ_1 ($\theta_1 = 0^\circ - 10^\circ$), $\theta_2 = 10^\circ - 20^\circ \dots$, $\theta_{18} = 170^\circ - 180^\circ$)におけるSFとIFの出現頻度をそれぞれ、 $S\theta_i$ (%)、 $I\theta_i$ (%)としたときの、

$$\alpha = 100 - \frac{\sum_{i=1}^{18} |S_{\theta_i} - I_{\theta_i}|}{2} \quad (\theta_1 = 0^\circ - 10^\circ, \theta_2 = 10^\circ - 20^\circ, \dots, \theta_{18} = 170^\circ - 180^\circ) \quad (1)$$

をSFとIFの配向一致割合 α として求めた。上記の群i-iiiの試料について、それぞれ α を求め平均値を算出し、群iに対する相関検定をt検定により行った。

次に、細胞の局所的な部分に着目して同様の手法でSFとIFの配向一致割合を比較した。まず、SFの線維構造が比較的鮮明な画像を群i-ivのそれぞれから選び、解析を容易にするため、画面上で核中心を通る細胞長軸を定義し、その長軸が水平になるように画像を回転させた。そして、同一細胞のSFとIFの画像から、核を含む細胞中心部分(Nucleus region)、細胞中腹部(Mid region)、細胞端部(Peripheral region)の3種の領域を正方形に切り出した(Fig. 1)。領域の大きさは、核の輪郭から5 μ m程の部位まで含むように一辺が20-30 μ mの正方形として細胞ごとに設定した。細胞中腹部と細胞端部については核を挟んだ両側を対象としたが、核の位置が細胞の片側に著しく偏っている場合、あるいは他の細胞が近くにいて局所部分の画像を切り出すのは難しい場合には、より広い側だけを計測対象とした。そして、2次元FFT解析後、細胞の局所におけるSFとIFの配向一致割合を算出した。

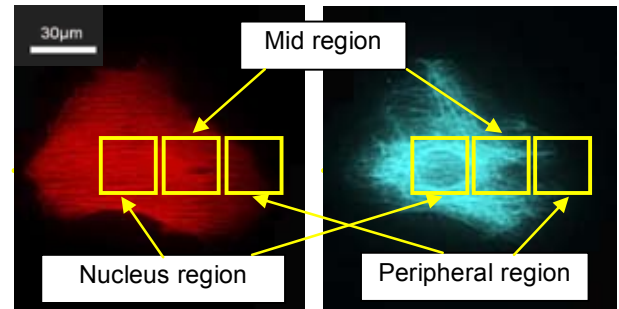


Fig. 1 The regions in which the orientation of SFs and IFs were analyzed and compared. Dashed lines represent the prescribed cell major axis for the local region analysis.

3. 結果および考察

群i-ivについて、細胞内のSFとIFの代表画像をFig. 2に示す。群i-iiiの細胞内には、細胞全体に太い直線状のSF、核の周りに多く分布し若干蛇行しているような線維状のIFも観察された(Fig. 2 A-F)。また、SFの破壊・再重合過程にIFを破壊し続けているiv)群では、IFが完全に線維構造を失っており、核付近に集まっているように見え、SFも線維構造は見られず、細胞全体に点状に不鮮明に見えた(Fig. 2 G, H)。

各群について、40-90個ほどの細胞を対象として、SFの配向角分布を解析した結果をFig. 3に示す。まず、群iとiiを比較してSFの配向再現性について述べる。群iの方が出現頻度の高い角度の区分もあるが、全体として両群ともSFは引張方向(0°)付近の出現頻度が著しく低く、基板のひずみ変化が最小となる60°から90°まで広範囲に渡って出現頻度が高くなった。このことから、IFに処理をせずに、SFを1時間破壊処理した後、3時間再重合させると、SFの配向がほぼ再現されることが分かった。次に、群iと群ii, ivを比較して、IFがSFの再重合に与える影響について述べる。Fig. 3を見ると、群iiiのSFの配向角分布は、群iと比べて出現頻度に有意差が見られた角度の区分もあったが、全体としてほぼ同様の傾向となった。しかし群ivでは、群iと有意差が見られた角度の区分が多く、引張方向ではSFの出現頻度が高くなり、直交方向では低くなった。このことから、SFとIFを同時に破壊・再重合する場合にはSFの配向再現性が保たれ、IFの線維構造が失われ続けている環境ではSFの配向再現性がされないと考えられる。

次に、群i-iii群を対象とし、細胞全体および細胞局所について解析したSFとIFの配向一致割合 α をTable 1に示す。細胞全体でのSFとIFの配向一致割合には、群iとiiには有意な差が見られなかったのに対し、群iiiでは群iに比べて有意に高く、SFとIFの配向がより良く一致するという結果になった。細胞の局所に注目すると、繰返引張負荷直後である群iでは、細胞中腹部、核付近、細胞端部という順に α が高かった。これは、核付近でIFの線維が多いこと、細胞端部でIFの線維が少ないことからこのような結果になったと考えられる(Fig. 2)。一方、群iiでは、細胞中腹部と核付近の差がなくなり、細胞の中腹部での α が群iより高くなった。さらに群iiiでは核付近の α も群iと比べ高くなった。また、群iに比べ群ii, iiiでは α の標準偏差が小さくなり、細胞間での α のバラツキが減少する傾向が見られた。このように、SFを一旦破壊して再重合させると、SFとIFの配向一致割合が高くなり、さらにこの過程で同時にIFも破壊・再重合させると、両者の配向が細胞の全領域について良く一致していった。特に核付近のIFもSFの配向と良く一致していく傾

向が見られた。

最近では、平滑筋細胞収縮時にSFとともにIFが配向することなどが報告されており、SFとIFの相互作用の可能性が指摘されている⁽⁶⁾。本研究において、Fig. 2の画像を見ると、群i, iiでは細胞核付近で、IFは不鮮明に見えるのに対し、群iiiでは核輪郭部のIFは鮮明で、またSFに沿った直線状の太いIFも数カ所で見られた (Fig. 2E, F)。このことからSFとIFを同時に破壊して同時に再重合させると、IFの一部がSFに沿って直線状に再構築されるのかもしれない。以上のように、SFとIF間には機械的な相互作用が生じている可能性があり、IFがSFの配向記憶において重要な役割を担っていると考えられる。

今後は、SFとIFの破壊・再構築の各段階をより短い時間間隔で細胞を観察、解析していき、両者の相互作用についてさらに詳細に調べていく。また、これらの細胞骨格間に存在していると考えられているプレクチン⁽⁷⁾などの細胞骨格安定化タンパク質の局在を調べるなどして、細胞骨格安定化タンパク質がSFの配向再現メカニズムにどう影響を与えるかについて明らかにしていきたいと考えている。

参考文献

- (1) Duncan R L, Turner C H, Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain, *Calcified Tissue Int* 57, pp. 344-358, 1995.
- (2) Yang Y F, Nagayama K, Matumoto T, On the intercellular memory of stress fiber orientation: Effects of microtubules and focal adhesions on the repolymerization process of stress fibers, *Proc SBC 2008*, 193194.pdf, 2008.
- (3) Helfand B T, Mendez M G, Pugh J, Delsert C, Goldman R D, A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells, *Mol Biology Cell* 14 (12), pp. 5069-5081, 2003.
- (4) Takemasa T, Yamaguchi T, Yamamoto Y, Sugimoto K, Yamashita K, Oblique alignment of stress fibers in cells reduces the mechanical stress in cyclically deforming fields, *Europe J Cell Biology* 77, pp. 91-99, 1998.
- (5) <http://h1sparc1.kais.kyoto-u.ac.jp/~murata/study/2dff1.html>
- (6) Tang D D, Intermediate filaments in smooth muscle, *Am J Physiol* 294, pp. C869-C878, 2008.
- (7) Wiche G, Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics, *J Cell Sci* 111, pp. 2477-2486, 1998.

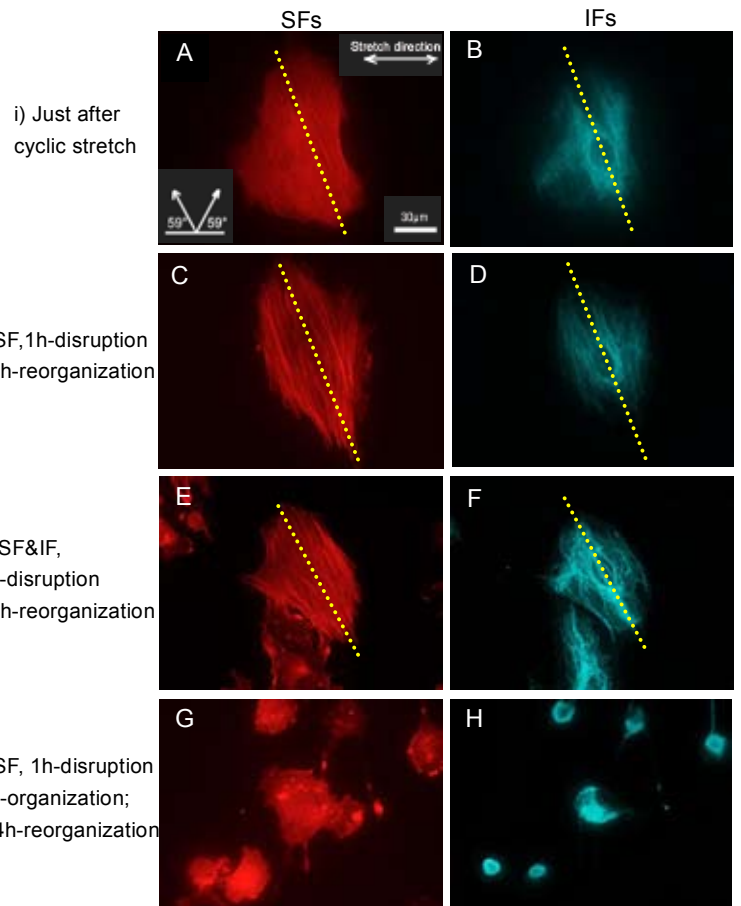


Fig. 2 Typical examples of fluorescence images of SFs and IFs (A-H). Dashed lines represent the prescribed cell major axis for the local analysis.

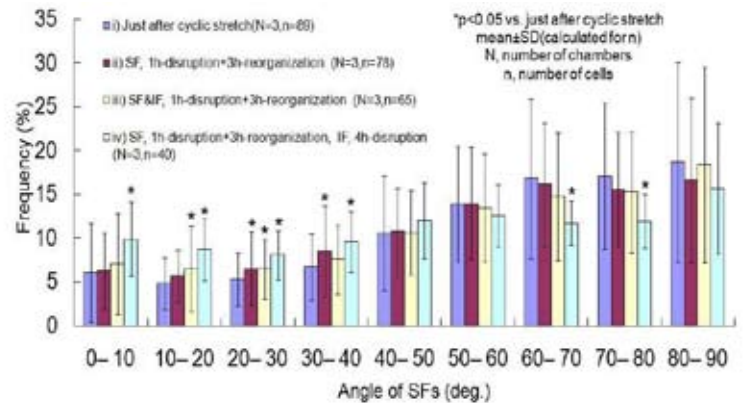


Fig. 3 The orientation distributions of SFs

Table 1 The matching rate between the orientation of SFs and IFs. (mean±SD)

		Specimens		
		i) Just after cyclic stretch	ii) SF, 1h-disruption +3h-reorganization	iii) SF&IF, 1h-disruption +3h-reorganization
Matching rate α (%)	Whole cell (n=65-89)	75.4±8.1	76.3±7.7	79.1±6.3 *
	Nucleus region (n=20)	89.3±4.1	91.7±3.1	92.1±2.5 *
	Mid region (n=20)	90.5±4.0 #	92.4±2.4 *	92.7±2.4 *
	Peripheral region (n=20)	85.9±4.8 #	89.5±4.8 *, #	87.6±5.4 #

*p<0.05 vs. just after cyclic stretch in each region of analysis; #p<0.05 vs. nucleus region in each specimen group.