

博士學位論文

擬似的な超解像度画像解析手法による
生細胞内アクチンフィラメントの
微小ゆらぎの解析

令和5年度

日本大学大学院工学研究科機械専攻

岡 知 輝

目次

第1章	諸論	
1.1.	体組織の維持とその機能	1
1.2.	細胞内タンパク質構造体	4
1.3.	疾病の発生機序と力学刺激の関与	11
1.4.	細胞の力学刺激の感知のメカニズム	17
1.5.	本論文の目的	19
1.6.	本論文の構成	20
第2章	生細胞内アクチンフィラメントのゆらぎの観察	
2.1.	緒言	21
2.2.	実験方法	
2.2.1.	細胞の培養方法	22
2.2.2.	細胞継代方法	23
2.2.3.	細胞の遺伝子導入方法	24
2.2.4.	生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法	24
2.2.5.	アクチンフィラメントのゆらぎの解析方法	25
2.2.6.	顕微鏡空間分解能の評価	25
2.3.	実験結果	29
2.4.	考察	40
2.5.	結言	41
第3章	擬似的な超解像度画像解析手法を用いたゆらぎの解析	
3.1.	緒言	42
3.2.	実験方法	
3.2.1.	細胞の培養方法	43
3.2.2.	細胞継代方法	43
3.2.3.	生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法	44
3.2.4.	擬似的な超解像度画像解析手法	44
3.2.5.	アクチンフィラメントのゆらぎの解析方法	45
3.2.6.	アクチンフィラメントのゆらぎの周波数解析方法	46
3.3.	実験結果	50
3.4.	考察	60
3.5.	結言	62

第4章	アクチンフィラメントネットワーク内のゆらぎの関係性の解析	
4.1.	緒言	63
4.2.	実験方法	
4.2.1.	細胞の培養方法	64
4.2.2.	細胞継代方法	64
4.2.3.	生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法	65
4.2.4.	擬似的な超解像度画像解析手法	65
4.2.5.	アクチンフィラメントのゆらぎの解析方法	66
4.2.6.	ゆらぎの振幅の相関の解析方法	67
4.3.	実験結果	69
4.4.	考察	82
4.5.	結言	83
第5章	アクチンフィラメント接着部のひずみの解析	
5.1.	緒言	84
5.2.	実験方法	
5.2.1.	細胞の培養方法	84
5.2.2.	細胞の継代方法	85
5.2.3.	生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法	85
5.2.4.	アクチンフィラメント接着点のひずみ解析方法	86
5.3.	実験結果	88
5.4.	考察	93
5.5.	結言	95
第6章	今後の展望	96
第7章	結論	105
発表リスト		109
参考文献		113
謝辞		123

第 1 章

諸論

1.1. 体組織の維持とその機能

血管は、全身にはり巡らされ、体組織の細胞への栄養供給、ガス交換及び、老廃物の回収、運搬を担っている。血管は、図 1.1 に示すような外膜、中膜、内膜の構造をもつ動脈 (Artery) と静脈 (Vein) , 内膜のみの毛細血管

(Capillary) に分けられる (内田, et al., 2015) 。動脈は平滑筋によって血管径を変化することで血流量を調節することが可能である。静脈は動脈と比べて容量が大きく、逆流防止の静脈弁が存在する。毛細血管は約 8 μm の直径をもち、組織での物質透過性に深く関与している。血管の機能は、血液に直接、接している内皮細胞が関与している。内皮細胞は、血管作動性物質の産生、高分子物質の透過性の制御、血管損傷時などの修復 (Naito, et al., 2019) といった機能を持つ。

内皮細胞が産生する代表的な生理活性物質には、一酸化窒素 (Nitric Oxide ; NO) がある。一酸化窒素は、内皮細胞内の一酸化窒素合成酵素 (Nitric Oxide Synthase ; NOS) により、アミノ酸 L-アルギニンから合成される (牧野, 鈴木, 2000) 。合成された一酸化窒素は、血管平滑筋に作用し、血管を弛緩、拡張することで血圧を低下させる (Sharma, 2015) (Da Silva, et al., 2021) 。この他の一酸化窒素の効果は、血小板凝集の抑制、細胞接着因子の Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) と Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) の発現抑制などのアテローム性動脈硬化症の発症に関わる作用 (Khan, et al., 1996) (市瀬, 1998) がある。

血管の発生、形成には、受精卵から個体が形成する過程で血管が誘導される脈管形成 (Vasculogenesis) と損傷と組織内酸素低下による既存の血管から新しい血管が分岐、伸長する血管新生 (Angiogenesis) の2種類がある。組織が虚血状態になると転写活性化因子である低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor-1 ; HIF-1) の発現が増強し、血管内皮成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGF) , Angiopoietin-2 (Ang-2) などの因子の発現が誘導される (槍澤, 菅野, 2004) 。線維芽細胞は、分泌した Angiopoietin-1 (Ang-1) により内皮細胞上のレセプター型チロシンキナーゼ (Tie2) を刺激し、内皮細胞へ接着する (高倉, 2004) 。低酸素状態の組織から分泌した Ang -2 により、線維芽細胞と内皮細胞の接着状態を保つ Ang-1 の作用は減衰し、線維芽細胞は内皮細胞から離脱する。線維芽細胞が離脱した血管組織では、血管内皮成長因子による血管新生刺激が生じ、先端細胞 (Tip Cell) が誘導される (Phng and Gerhardt, 2009) 。この先端細胞は、糸状仮足を用いて低酸素領域を進み、その後を血管内皮成長因子によって活性化された増殖性の高い Side Population 細胞 (SP cell) が密着、増殖して茎 (Stalk) を形成する (Naito, et al., 2012) (Yokota, et al., 2015) 。この茎形成時は、先端細胞と茎部分の細胞が入れ替わり、それぞれは複雑に動いている (Sugihara, et al., 2015) 。切断された血管では、心臓側の血管の内腔圧がアクチンフィラメント (Actin Filament ; F-actin) による細胞遊走を阻害することで血管伸長が止まり、下流側の血管が血管新生することで血管は修復する (Yuge, et al., 2022) 。

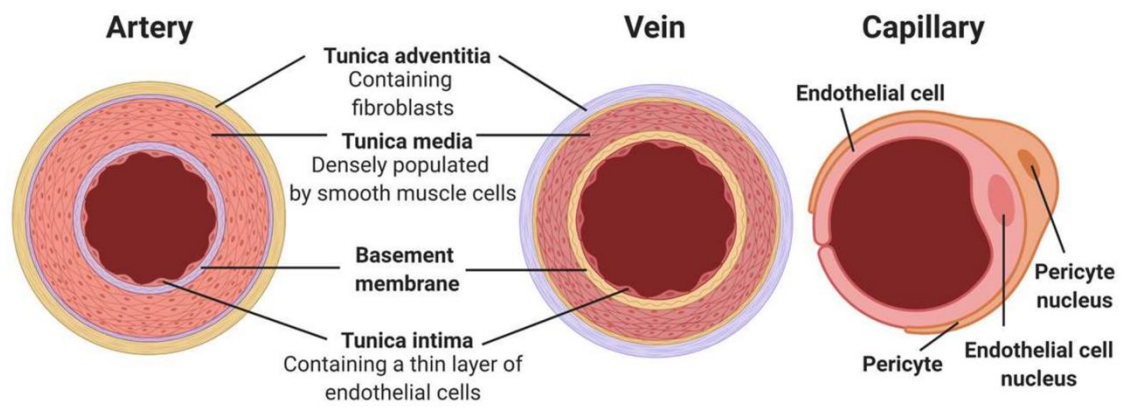


図 1.1 動脈血管，静脈血管及び，毛細血管の構造図 (Jouda, et al, 2022)

1.2. 細胞内タンパク質構造体 (Alberts, et al., 2017)

細胞内、細胞膜上の構造体の大きさ、その役割はさまざまである。これらは、細胞核 (Nucleus) やミトコンドリア (Mitochondrion) の様な巨大なものから細胞内物質輸送を担うキネシン (Kinesin) などの小さいものまでさまざまである。さらに、遺伝情報の伝達やタンパク質合成を行うリボ核酸 (Ribonucleic Acid ; RNA) は、非常に小さいながらも細胞遺伝子転写を担う重要な細胞要素である。これらの構造物が、各々の役割を果たすことによって細胞機能、体組織の機能が保たれている。

細胞核は、1つの細胞に基本1個存在し、細胞内で最大の構造体である。この細胞核には、デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic Acid ; DNA) の合成や遺伝子情報の保存が行われている。細胞核構造は、外膜と内膜の2重脂質膜で構成された核膜によって包まれている。核膜の裏側は、ラミン (Lamin) の網目構造が張り巡らされており、この構造によって細胞核膜の形状が保たれている。また、核の硬さ、弾力性は核内のDNAがバネのような働きをすることによって付与されていることが報告されている (Shimamoto, et al., 2017) 。この核膜には、核物質輸送を行う核膜孔複合体 (Nuclear Pore Complex ; NPC) (尾間, 原田, 2012) や細胞質内の細胞骨格と結合するリンク複合体 (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Complex ; LINC Complex) (Martino, F., et al., 2018) が存在する。核膜孔複合体は、DNAとヒストンの複合体であるクロマチンに結合し、遺伝子発現やDNA修復を行う。リンク複合体は、核膜内膜を貫通するSUNタンパク質とネスプリン (Nesprin) ファミリーによって構成されている。このネスプリンは、その種類によって、図1.2に示すようにアクチンフィラメント、中間系フィラメント (Intermediate Filament) , 微小管 (Microtubule) に結合する。

アクチンフィラメントは、細胞への機械的な強度の付与、各種シグナル伝達及び、細胞への遊走能力など多くの細胞機能に関与する。このタンパク質繊維構造体は、375個のアミノ酸とアデノシン三リン酸（Adenosine Triphosphate ; ATP）または、アデノシン二リン酸（Adenosine Diphosphate ; ADP）で構成されたGアクチンが集まり、形成された直径8 nmの二重螺旋構造の繊維状タンパク質構造体である。アクチンフィラメントの形成は、Gアクチンが3個以上集まった重合核の形成（遅滞期）から始まる。この重合核の末端にGアクチンが付加していくことで繊維構造を形成し（伸長期）、Gアクチンの付加と解離を調節して長さを安定する（平衡期）。アクチンフィラメントへのGアクチンの重合では、真上のGアクチンにマグネシウムイオンの作用により強固に結合し、周辺のGアクチンとのアミノ酸の相互作用を行い、リン酸の移行が生じる（Murakami, et al., 2010）。このように構築されたアクチンフィラメントは、安定した構造ではなく、Gアクチンが離脱、接着を繰り返している流動的な構造体である（Pollard and Borisy, 2003）。アクチンフィラメントによる構造体は、力学刺激によってその構造の変化が生じ、繰り返し伸展刺激による細胞内アクチンフィラメントの配向には、Solo（ARHGGEF40）が必要である（Fujiwara, et al., 2016）。アクチンフィラメントによって形成される構造は、細胞内の場所、関係する補助タンパク質によって異なり、さまざまである。この補助タンパク質による結合やその影響は、アクチンフィラメントの張力状態によって変化する（Harris, et al., 2018）。細胞中央付近では、数本のアクチンフィラメントとミオシンライトチェーン（Myosin Light-Chain）がより合わさった比較的に太く、収縮性をもつ繊維状構造体であるストレスファイバー（Stress Fiber ; SF）が存在する。このストレスファイバーは、細胞核に強固に結合しており、細胞内では張力を発生した状態で存在する（出口, 佐藤, 2008）（Nagayama, et al., 2011）。さらに力学刺激を感知し、張力を変化させることが知られている（Ohashi, et al., 2017）。細胞内の大半のアクチンフィラメントが密集する細

胞膜付近では、補助タンパク質 Arp2/3 複合体(Actin-Related Protein 2/3 Complex) やフィラメントによって網目構造が形成されている。この Arp2/3 複合体に分岐構造形成は、アクチンフィラメントの屈曲部で生じ、圧縮力に応答してネットワーク構造の耐久力の増強を行う (Risca, et al., 2012) 。これらのネットワーク構造は、細胞膜に Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) ファミリータンパク質によって接着しており、細胞膜に機械的な強度を付与しつつ、シグナル伝達の活性調節にも関与している。また、細胞膜の機械的な強度の付与には、アクチンとスペクトリン (Spectrin) 二量体などのタンパク質からなる構造物が関与している。アクチンフィラメント、ストレスファイバーまたは、 α -アクチニン (α -Actinin) は、細胞基底部に存在するタンパク質構造体の複合体である焦点接着斑 (Focal Adhesion) のビンキュリン (Vinculin) に接着する (Chen, et al., 2005) 。この焦点接着斑に含まれる膜貫通型タンパク質のインテグリン (Integrin) は、細胞膜を貫通して細胞外基質に接着する。細胞は、この焦点接着斑を介して細胞外基質の硬さを知り、その硬さで細胞内のアクチンフィラメントまたは、ストレスファイバーの張力を変化させると考えられている (Discher, et al, 2005) 。

微小管は、チューブリン (Tubulin) が重合した外直径が 25nm の中空の円筒構造である。この微小管は、細胞内物質輸送のレールとしての役割や細胞分裂の補助を行う。チューブリンは、445 から 450 個のアミノ酸からなる α -チューブリンと β -チューブリンが結合したヘテロ二量体である。このチューブリンが多数連なって構築したプロトフィラメントが 13 本並列し、微小管は形成される。この微小管は、多くの補助タンパク質により、重合、脱重合の調節や構造の安定化が保たれており、細胞内の必要とされる箇所適切な長さで分布している (Liu, et al., 2023) 。細胞内の物質輸送は、分子モーターであるキネシン (Kinesin Superfamily Proteins ; KIFs) が担っており、アデノシン三リン酸をエネルギーにして微小管に沿って移動する (仁田, 2018) 。このキネシンは数種

類存在し、細胞膜から細胞核方向に、またはその逆方向に物質輸送を行うもの、微小管の脱重合を行うものがある。微小管は、微小管-アクチン架橋タンパク質（Microtubule-Actin Cross-Linking Factor 1 ; MACF 1）を介してアクチンフィラメントと接着し、細胞骨格のネットワークを形成している（Jørgensen, et.al., 2014）。

中間径フィラメントは、繊維構造種類によってホモダイマー、ヘテロダイマー及び、ヘテロ型の集合体によって形成された直径約 10 μm の繊維構造体である（Chernyatina, et al., 2015）。細胞に機械的強度を付与や細胞核の位置の固定に関わっているとされている。近年では、細胞分裂時の中間フィラメントを構成しているケラチン（Keratin）の量が分裂後の細胞系譜を決定するのに重要な要素であると報告されている（Lim, et al., 2020）。この繊維構造体は、他の細胞骨格と比べ、安定した構造体であり（Chernyatina, et al., 2015）、細胞基底部の基質接着部に形成するヘミデスモソーム（Hemidesmosome）に接着する（Ohashi, et al., 2017）。

表皮や腸内の表面などの上皮組織（Epithelial Tissue）では、細胞同士が強固に結合した細胞層である上皮（Epithelium）を形成している。この上皮組織は、細胞結合によって細胞が結合しており、組織を構成しているだけでなく細胞間の機械的、化学的のシグナル伝達を行なっている。この細胞間結合で細胞骨格が接着している結合は、図 1.3 に示すアドヘレンスジャンクション（Adherens Junction）とデスモソーム（Desmosome）である。このアドヘレンスジャンクションにはアクチンフィラメントが、デスモソームには中間径フィラメントが連結している。アドヘレンスジャンクションまたはデスモソームは、タンパク質のカドヘリンまたはデスモグレイン、デスモコリンで構成されており、これらはマジックテープのように接着している。アドヘレンスジャンクションは、上皮以外の結合部位では斑点状または線状である。上皮では、頂端部表面の下にアドヘレンスジャンクションが並んだ接着帯を形成している。

中間径フィラメントが接着しているデスモソームは，力学刺激を多く受ける心筋や表皮の上皮に存在し，機械的強度を付与している．

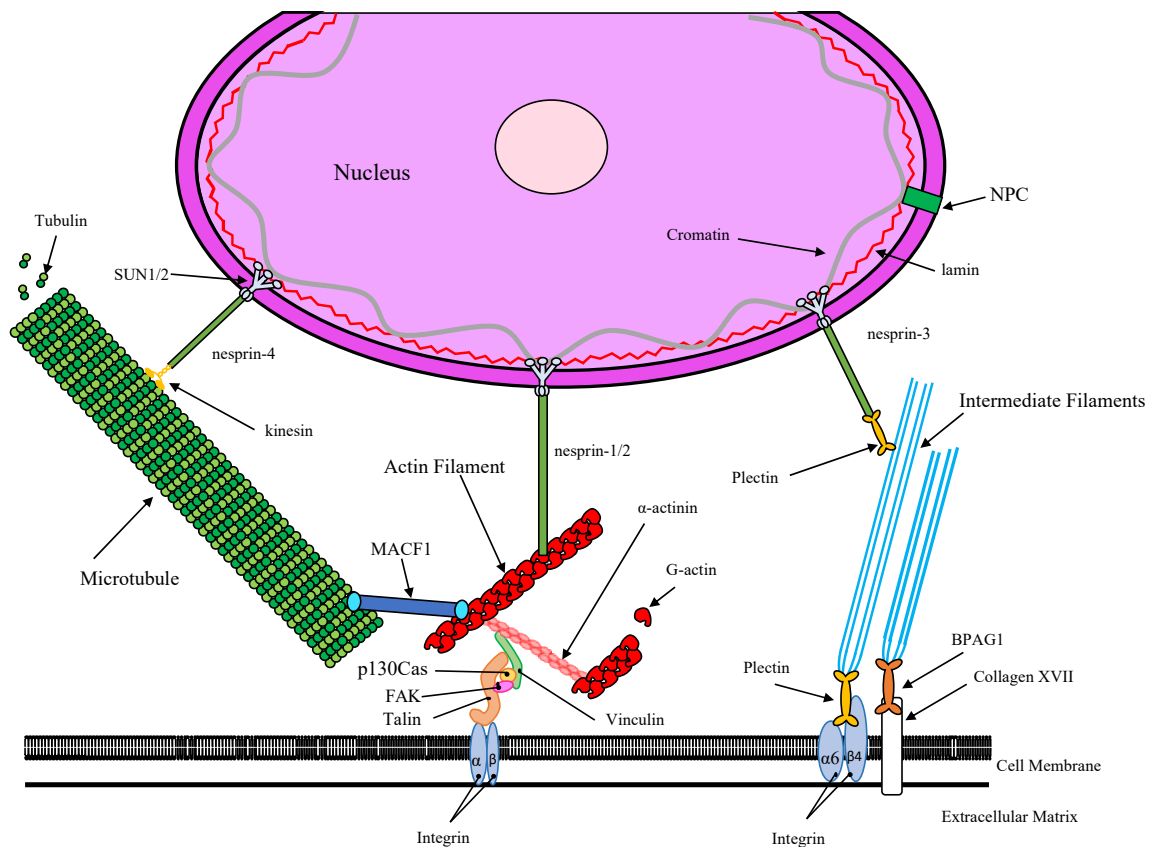


図 1.2 細胞内タンパク質による構造体の概略図

(Martino, F., et al., 2018) (藤原, et al., 2016)

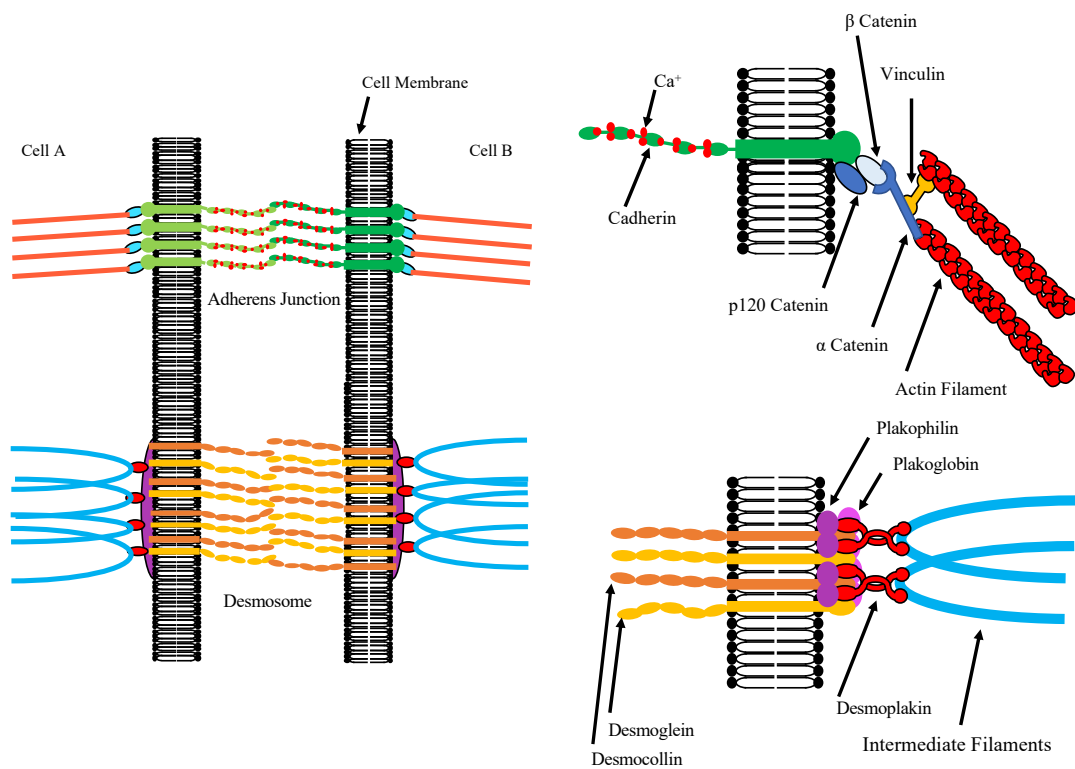


図 1.3 細胞間結合タンパク質構造体の概略図 (Alberts, et al., 2017)

1.3. 疾病の発生機序と力学刺激の関与

血管に起因する心疾患と脳血管疾患は、図 1.4 に示しように令和 4 年 (2022) での日本の死因の 21.7%を占めており (厚生労働省, 2022), 1 位の悪性新生物に迫る死因割合である。この脳血管疾患による死者は、心疾患に比べ少ないものの予後が悪く、再発件数も少なくない (金子, et al., 1992) (樋口, 安保, 2008)。これらの血管疾患は、即座に発生するのではなく、生まれた直後から動脈硬化症の発生プロセスは開始する。この動脈硬化症が進行することによって、血管疾患の発生の危険性が増大する。動脈硬化症は、発生した動脈やその原因によって病態や病理組織が異なる (和田, 2017)。動脈硬化症は、病理学的にアテローム性動脈硬化症 (Atherosclerosis), Mönckeberg 型中膜硬化症 (Mönckeberg Medial Sclerosis), 細動脈硬化症 (Arteriolosclerosis), 繊維筋性内膜過形成 (Fibromuscular Intimal Hyperplasia) に分類される。この中のアテローム性動脈硬化症では、生体内の複雑な血流パターンによる血管内皮細胞の機能変化, 動脈内膜での酸化脂質の蓄積が起因となり, プラークが発生する。このプラークは, 脂肪線条 (脂肪斑), 繊維斑, 粥腫, 複合病変に分類 (上田, et al., 2013) され, 病変の進行に伴い切り替わっていく。アテローム性動脈硬化症の初期に目視可能な脂肪線条は, 動脈内皮構造の表面にコレステロールが沈着した 1 mm~数 cm の隆起性の線状隆起である。この病変は 10 代の動脈でも確認される。繊維斑は, 3 mm ~ 1.5 cm の隆起病変であり, 癒合することによってその大きさを増す。このプラークでは, マクロファージなどの細胞成分, コラーゲンなどの細胞外結合組織及び, コレステロールが沈着している。さらにアテローム動脈硬化症が進むと複合病変に変化する。この複合病変では, アテロームが肥大化することによってプラークは大きくなり, アテロームの一部または全体の石灰化を伴うことが多い。石灰化を伴った病変は, 動脈の弾性を低下させ, 固く変化させる。このアテローム性動脈硬化症には, 図

1.5 (a) に示すように好発部位 (DeBakey, 1985) が存在し、頸動脈分岐部や冠動脈のような太い動脈や下肢の血管分岐などがある。これらの血管が分岐した部位では、図 1.5 (b) 及び、図 1.5 (c) に示すような複雑な渦が生じ、血流の速度、せん断応力が著しく低下した淀みが生じている (福嶋, et al., 1986)

(Tada, 2019) . 血管の分岐角度が大きいほど流速は低下し、渦が発生している場所での内皮細胞は、図 1.6 (a) に示すように流れが一定方向の場所と比べて円形を呈し (Okano, et al., 1992) , 内皮細胞の損傷や機能変化が生じる

(Ross, 1993) . 通常の内皮細胞表面は、タンパク質と可溶性血漿が三次元配列した糖鎖表層 (Glycocalyx Surface) に覆われており、低比重リポタンパク質

(Low Density Lipoprotein ; LDL) やアルブミン (Albumin) などの高分子の内皮の透過を制限している (Ueda, et al., 2004) (岡田, 2020) . 低密度リポタン

パク質コレステロールは活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) により、酸化低比重リポタンパク質コレステロールに変化する。内皮細胞の糖鎖表層は、低せん断応力領域や高血糖など刺激を受け続けることにより、薄くなり、

剥離が生じ、内皮細胞層を透過する酸化低比重リポタンパク質が増大する。さらに、損傷した内皮細胞または、免疫細胞は炎症性サイトカインを放出する。

この炎症性サイトカインにより、炎症した内皮細胞には、接着タンパク L-selectin と L-selectin Ligand の相互作用により、単球が緩く付着する。 (Grailer, et al., 2009)

さらに内皮細胞表面には VCAM-1, ICAM-1 が発現し、それらにより単球はより強固に内皮細胞に接着し、血管壁内に浸潤する。酸化低比重リポ

タンパク質コレステロールは、図 1.6 (b) のように単球から分化したマクロファージのスカベンジャーレセプター (Scavenger Receptor ; SRs) である A- I / II

と CD36 を介して貪食され、マクロファージ内にコレステロールエステル (Cholesterol Ester ; CE) として蓄積する (Kunjathoor, et al., 2002) (Wang, et al., 2019) .

このコレステロールエステルを蓄えたマクロファージは、泡沫細胞となり、内皮細胞下に蓄積する。この泡沫細胞の蓄積により、血管表面には

プラークが形成される。さらに、この病変は細胞壁内のマクロファージや内皮細胞が炎症性サイトカインの放出を繰り返すことによって、炎症反応は慢性化する。この慢性的な炎症反応によって、アテローム性動脈硬化症の病変はさらに肥大化する。

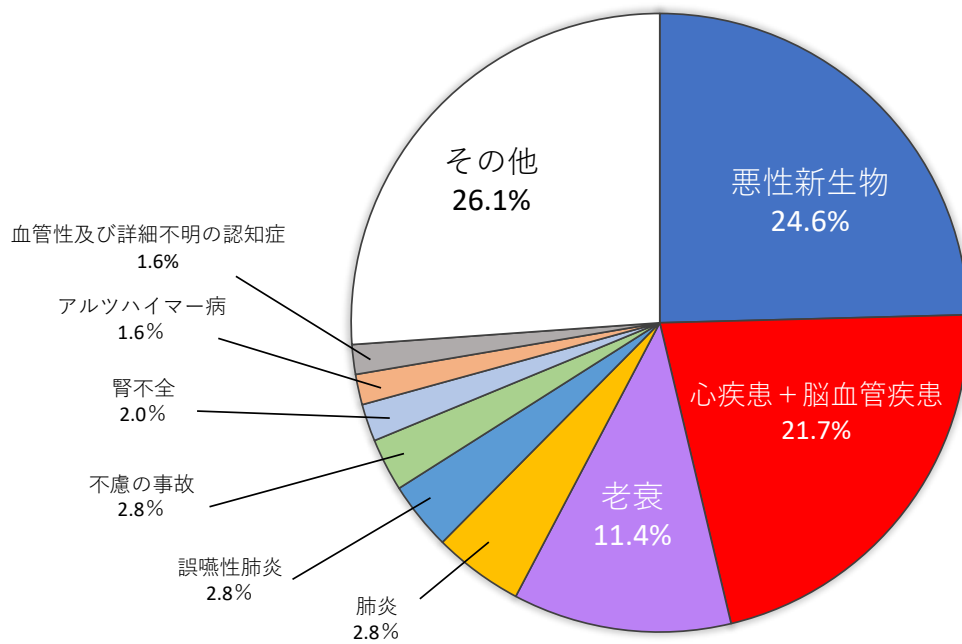
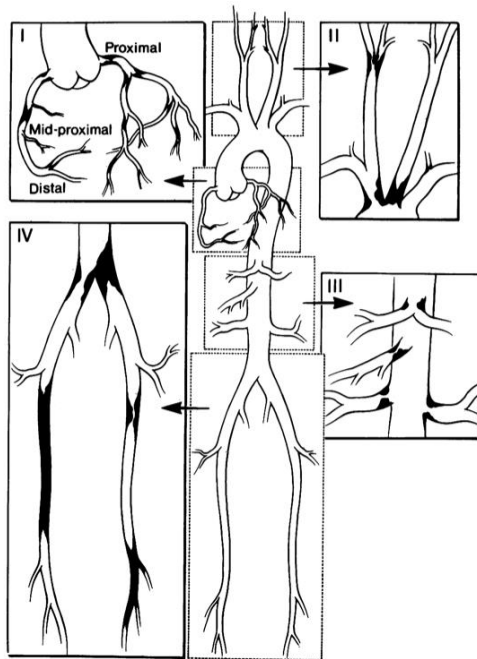


図 1.4 令和 4 年度日本死因の割合（厚生労働省，2022）

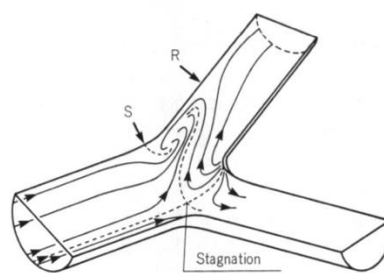


(a) 動脈硬化症の好発部位

M.E. DeBakey, et al., Ann Surg, 1985

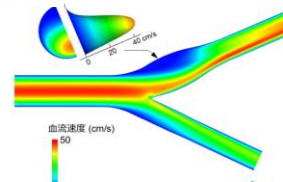
福嶋 孝義, et al., 流れの可視化, 1986

Shigeru Tada, et al., World Scientific, 2019

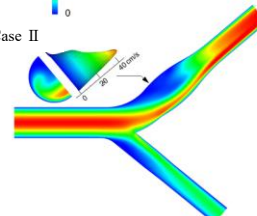


(b) 動脈分岐部での渦の発生

(a) Case I

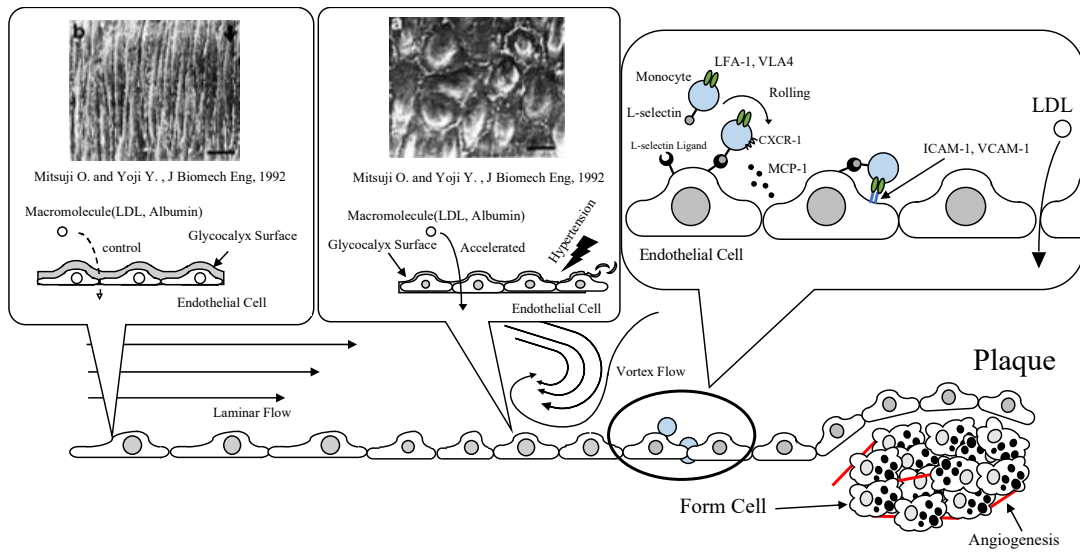


(b) Case II

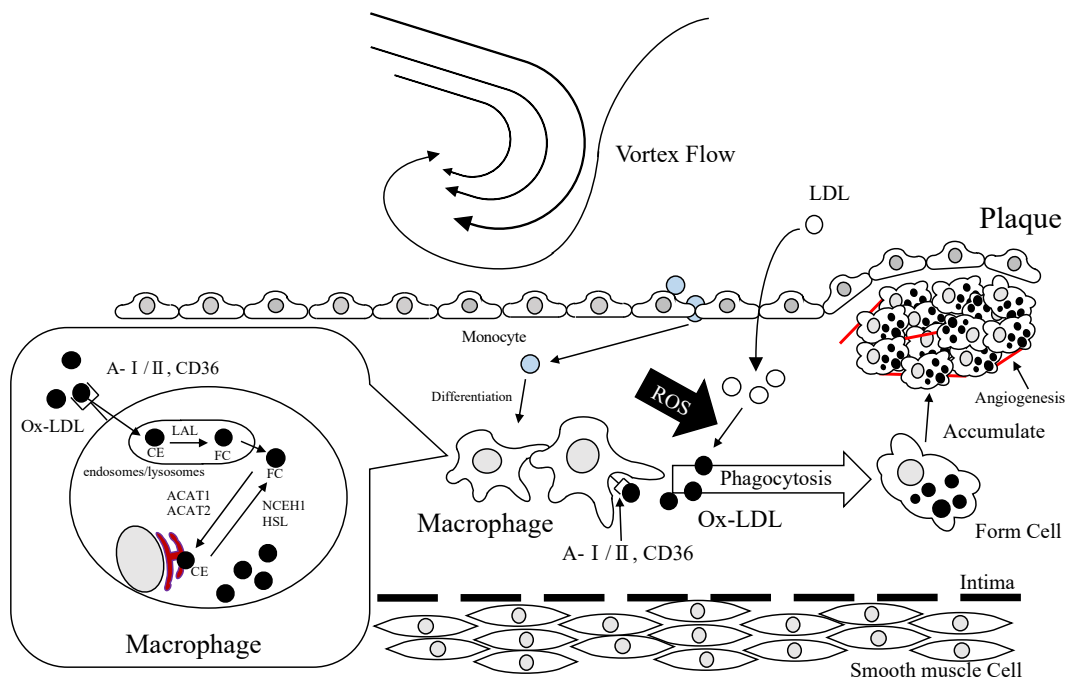


(c) 動脈分岐部でのせん断応力分布

図 1.5 動脈硬化症の好発箇所とその流れ場での血流挙動



(a) 流れの変化に対する細胞の形態変化の概略図



(b) 渦発生部位での動脈硬化症発生プロセス概略図

図 1.6 動脈硬化症好発部位における細胞変化

(Grailer, et al., 2009) (Wang, et al., 2019)

1.4. 細胞の力学刺激の感知のメカニズム

細胞の力学刺激の感知のメカニズム，それによる細胞の形態変化は，多くの研究で観察されてきた．圧縮力の負荷，流れのせん断応力負荷やその方向変化により，細胞の周囲環境の力学状態の変化が生じた場合，細胞内のアクチンフィラメントを含むタンパク質構造体による構造には，ひずみが生じる．2~10 Pa の流体せん断応力が細胞に負荷された場合，細胞内のストレスファイバーに作用する力は数~数十 pN 程度であることが報告されている (Ueki, et al., 2010) . この構造変形をきっかけとし，細胞膜に点在するカルシウムイオンチャンネルが活発化し，1秒未満で細胞内カルシウムイオンレベルが上昇する (Shen, et al., 1992) (工藤, et al., 2011) . 複数の細胞が隣接した状態内の1つの細胞が刺激された場合でも，細胞間ネットワークによりカルシウムイオンレベルの変化は周囲の細胞に伝播し，その後これら細胞内のイオンレベルは低下し，収束する．次に，細胞内のタンパク質のリン酸化が生じる．このタンパク質のリン酸化は，連鎖反応し，目的のタンパク質まで続く (Hashimoto, et al., 2019) . この結果，細胞内のタンパク質構造体の構造は変化し，細胞外環境に適応した新しい構造に置き換わる．このように，細胞が外環境の力学状態を感知していることは明らかである．

細胞に力学的刺激が負荷された時，細胞内の各タンパク質構造体には，さまざまな変化が生じる．結合タンパク質構造体のアドヘレンスジャンクションのカドヘリンは，細胞-細胞間の相互作用による張力が発生すると細胞膜のカドヘリンに接着している α -カテニン (α -Catenin) が引っ張られる．この時に，細胞質側のアクチンフィラメントからも張力を受け，折り畳まれた α -カテニンは伸び，覆われていたビンキュリンのアクチンフィラメント結合部位が露出する (Yonemura, et al., 2010) . この露出した結合部に新たなアクチンフィラメントが結合することにより，細胞結合部位の連結はより強固になる．さらに，アド

ヘレンスジャンクションにビンキュリンが補充されることによる細胞間張力の調整もされる。内皮細胞への流れのせん断応力や浸透圧が負荷された時に、細胞膜の接着分子である PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) のリン酸化が生じることが報告されている (Osawa, et al., 2002)。この細胞膜の PECAM-1 のリン酸化が細胞内の PECAM-1 に伝播し、その下流シグナル回路への信号伝達を開始することが考えられている。細胞に繰り返し伸展刺激を負荷すると、焦点接着斑のインテグリン $\alpha_v\beta_1$ には、タンパク質 Thrombospondin-1 (THBS-1) が結合することが報告されている (Yamashiro, et al., 2020)。この結合は、細胞増殖に関与する転写調整因子である Yes-Associated Protein (YAP) の核内への移動に必要とされている。このことに加え、焦点接着斑のビンキュリンがアクチンフィラメントとタリンからのシグナルによって活性化されること (Chen, et al., 2006) や p130Cas が張力によってリン酸化が生じること (Sawada, et al., 2006) が報告されている。これらのことから焦点接着斑は、細胞のメカノセンサの一種と考えられている。

遺伝子保存、合成がされている細胞核も力学刺激の感知をしていることが示唆されている。アクチンフィラメントと細胞核をつなぐ nesprin-1 の発現を抑制した細胞核は、通常細胞より小さく、伸展刺激負荷下での細胞核のひずみは増加する (Anno, et al., 2012)。この細胞核の大きさとひずみの増加から、通常細胞では、細胞核がアクチンフィラメントからの張力を受けていることが示唆された。

前述した細胞内の力学刺激の伝達や細胞の形状保持を担っているアクチンフィラメントを含む細胞骨格もメカノセンサの1つと考えられている。アクチンフィラメントは、発生している張力の状態で脱重合を促進するタンパク質であるコフィン (Coffin) によって切断される (Hayakawa, et al., 2011)。アクチンフィラメントに張力が発生していない状態に比べ、張力が発生している状態 (~30pN) では、切断までの時間が長い、または切断がされない。微小管は、

引っ張り，曲げ，圧縮の力学状態で，微小管上のキネシンの移動速度が変化することが報告されている (Nasrin, et al., 2021) . さらに中間径フィラメントも細胞への力学刺激を負荷した瞬間に変形する様子が観察していることから細胞の力学刺激の感知に関与していることが考えられている (Wang and Pelling, 2012) .

細胞の力学刺激の負荷時に応答するタンパク質構造体とその応答は，断片的に知られてきている．しかし，タンパク質の詳細な構造，それらの反応の関係，力学刺激の感知のメカニズムでのそれぞれ役割は，未だに詳細には知られていない．このように，細胞の力学刺激の感知のメカニズムを詳細に説明できるエビデンスは，未だ報告されていない．

1.5. 本論文の目的

以上で述べたように細胞の力学刺激の感知は，体組織の維持や疾病の発生やその発達に関与している．この細胞の力学刺激の感知のメカニズムは，詳細に分かっていないが，さまざまなタンパク質構造体へのアクチンフィラメントを介した力学刺激の伝達が行われていることが知られている．さらに，細胞の力学刺激に対する細胞の形態変化により，このアクチンフィラメントの構造は変化する．このようなことから，細胞内アクチンフィラメントによる力学刺激の伝達やその構造変化が細胞の力学刺激の感知において非常に重要な現象である．本論文では，生きた株化細胞内のアクチンフィラメントを可視化することによって，アクチンフィラメントの状態を観察し，細胞内の力学状態を解析した．これにより，細胞の力学刺激の感知のメカニズムでのアクチンフィラメントの役割を力学的な観点から検討した．

1.6. 本論文の構成

本論文では前述した目的をもとに、アクチンフィラメントのゆらぎの解析を行なった実験的研究の結果について述べる。

第1章は、緒言である。

第2章は、緑色蛍光タンパク質 Lifeact-GFP を遺伝子導入した生細胞内のアクチンフィラメント上の観察点1点でのゆらぎの解析を行なった結果を示す。

第3章は、擬似的な超解像度画像解析を使用し、顕微鏡の空間分解能を向上させて行なったアクチンフィラメントのゆらぎの解析結果を示す。

第4章は、アクチンフィラメントで形成されたネットワーク構造内の複数本のアクチンフィラメントのゆらぎ、それらの関係性を擬似的な超解像度解析手法で解析した結果を示す。

第5章は、アクチンフィラメントの接着点で発生するゆらぎによるひずみの解析結果を示す。

第6章は、今後の研究展望を述べる。

第7章は、本論文の結論をまとめた。

第 2 章

生細胞内アクチンフィラメントの観察

2.1. 緒言

先述した通り，体組織の維持や病気の発生，発達と力学刺激の関係性は，強く非常に重要である．このため，細胞の力学刺激の感知や応答，それによる形態変化は，多くの研究で観察，解析されてきた．しかし，これらの原因となる細胞の力学刺激の感知のメカニズムは，徐々に明らかになってきてはいるが，断片的で詳細は知られていない．細胞の力学刺激の感知のメカニズムを知るためには，細胞が活動し，タンパク質構造が固定されていない生きた細胞内のタンパク質構造体の変化を観察，解析する必要がある．既存の研究では，細胞内のアクチンフィラメントをホルマリンによって固定し，ファロイジンによって着色して観察する方法が多い．また，生きた細胞で観察した研究は，力学刺激負荷実験の前と後の細胞内のアクチンフィラメントの構造や長い積算時間で撮影した静止画像で観察した研究のみである．しかし，力学刺激が負荷された瞬間の細胞内では，タンパク質の構造体がひずみ，カルシウムイオンレベルの上昇やタンパク質のリン酸化，タンパク質構造体の分解，再構成が複雑に生じる．さらに，細胞内外，細胞膜上のタンパク質には，熱ゆらぎが存在する．この現象は，細胞内に取り込まれた蛍光ビーズのランダムな動き (Rienzo, et al., 2014) や細胞膜上タンパク質のランダムな動き (Alenghat and Golan, 2013) が報告されている．さらに，ミオシンヘッドのゆらぎによる筋組織の収縮 (Iwaki, et al., 2009) のように体組織は，タンパク質のゆらぎを巧みに利用して

いる。このように細胞内のタンパク質構造体は、静的な構造体ではなく、熱によってゆらいでいる動的な構造体である。このことから、生きた状態の細胞内のタンパク質構造体を動的な構造体として観察、解析する必要がある。本研究では、生きた細胞内のアクチンフィラメントを緑色蛍光タンパク質 Lifeact-GFP (Riedl, et al., 2008) を遺伝子導入して可視化した。この Lifeact-GFP は、蛍光タンパク質がアクチンフィラメントに接着するための結合ペプチド Lifeact が低分子量であり、接着が緩やかである。このことから、アクチンフィラメント挙動への影響が軽微であることが特徴として挙げられる。細胞は、マウス胎児皮膚由来株化細胞 (NIH3T3) を使用した。株化細胞は、導入した遺伝子が発現した状態で多くの回数の継代が可能である。流れのせん断応力に対する応答は、ヒト臍帯静脈内皮細胞を使用することが適切であるが、実験方法の確立のためにマウス胎児皮膚由来株化細胞を使用細胞に選定した。この細胞内の蛍光タンパク質によって可視化したアクチンフィラメントのゆらぎをシャッター速度 10 枚/s のリアルタイムで観察、解析した。

2.2. 実験方法

2.2.1. 細胞の培養方法

実験には、マウス胎児皮膚由来株化細胞を使用した。ここで、株化細胞とは、元の正常細胞の機能を保ちつつ、癌細胞のような無制限の増殖性を持った細胞である。このマウス株化細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞に比べ細胞の生命力が強く、遺伝子導入した状態で多くの回数の継代が可能である。このため、実験方法の確立のためにマウス胎児皮膚由来株化細胞を使用した。細胞の培地には、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dalbecco's Modified Eagle's Medium ; DMEM) (Gibco, USA) を使用した。このダルベッコ改変イーグル培地の粉末は、950 mL 蒸留水に炭酸水素ナトリウム 3.7 g と共によく混合して調製し、塩

酸を加えて pH を調整した。この pH 調整した培地は、液総量が 1 L になるように蒸留水を加え、濾過滅菌機 (VIOLAMO, USA) で滅菌した。マウス胎児皮膚由来株化細胞の培養に使用する培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 100 mL に対して、10 mL の新生児仔ウシ血清 (Newborn Calf Serum ; NBCS) (HyClone, USA) と 1 mL の 10000 units/ml ペニシリンストレプトマイシン (10000 units/ml Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) を加え、調整した。細胞培養に使用する 25 cm² 培養用フラスコ (VIOLAMO, USA) にオートクレーブで滅菌した 0.1 %ゼラチン溶液を 3 mL 入れ、紫外線下で 30 m 分間静置することでフラスコ内にゼラチン層を形成した。液体窒素で保管していた細胞は、37°C に保たれた恒温槽で解凍し、即座に使用した。ゼラチンコートしたフラスコに、解凍した細胞を含んだ溶液 1 mL とダルベッコ改変イーグル培地 + 新生児仔ウシ血清 + ペニシリンストレプトマイシンの培地 4 mL を入れた。この細胞を播種したフラスコは、温度 37 °C、湿度 100 % 及び、CO₂ 濃度 5 % に保たれたインキュベータ内に静置し、培養した。細胞解凍をした翌日に、細胞がフラスコ底面に付着していることを確認し、培地 5 mL を交換した。

2.2.2. 細胞継代方法

底面を細胞が 8 割ほど覆った状態になったフラスコは、新しいフラスコに細胞を移し、細胞数を増やす継代作業を行った。ここでは、細胞濃度を 4 倍に希釈して細胞を継代する方法を記す。リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline ; PBS) (-) 液は、粉末状のリン酸緩衝生理食塩水 (-) (NISSUI, Japan) を蒸留水 1 L に溶かし、濾過滅菌で滅菌して調整した。細胞を培養したフラスコ内の培地を除き、37 °C に温めたリン酸緩衝生理食塩水 (-) 溶液 3 mL によってフラスコ内を 2 回洗浄した。洗浄したフラスコにトリプシン (Gibco, USA) を 200 µL 入れ、5 分間静置し、細胞を剥離した。このフラスコに培地

20 mL 入れた。細胞を含んだ培地は、ゼラチンコートしたフラスコ 4 個に 5 mL ずつ分けた。遺伝子導入や実験に使用する細胞は、6 穴ディッシュ

(VIOLAMO, USA) または、直径 20 mm ガラスボトムディッシュ (IWAKI, Japan) に細胞を含んだ培地 2 mL を入れた。このフラスコまたは、ディッシュは、温度 37 °C、湿度 100 % 及び、CO₂ 濃度 5 % に保たれたインキュベータ内に静置した。

2.2.3. 細胞の遺伝子導入方法

生細胞内アクチンフィラメントの可視化のために、緑色蛍光タンパク質 Lifeact-GFP (ibidi, USA) をマウス胎児皮膚由来株化細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入は、脂質試薬 Lipofectamin 3000 セット (Invitrogen, USA) をマニュアルに則って使用し、行った。遺伝子導入した細胞は、抗生物質 GENETICIN (Thermo Fisher Scientific, USA) によって選別した後に、ダルベッコ改変イーグル培地 + 新生児仔ウシ血清 + ペニシリンストレプトマイシンの培地で培養、継代した。

2.2.4. 生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法

図 2.1 に生細胞内のアクチンフィラメントの撮影に使用した顕微鏡、図 2.2 にその顕微鏡システムの概略図を示す。撮影は、暗室で行った。顕微鏡 IX70 (OLIMPUS, Japan) のステージ上に簡易インキュベータを設置し、37 °C まで加温した。N₂ + O₂ + CO₂ 混合ガスのボンベの栓を開き、インキュベータ内の CO₂ 濃度を 5 % に保った。簡易インキュベータ内に Lifeacti-GFP を遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞を培養したガラスボトムディッシュを静置した。細胞内のアクチンフィラメントは、488 nm レーザーユニットから照射し、共焦

点レーザーユニット Yokogawa CSU10 (Yokogawa, Japan) を通したレーザーによって励起した。アクチンフィラメントの蛍光像は、露光時間 70 ms, シャッター速度 0.1 s の条件で CMOS カメラ (andor, UK) により撮影した。

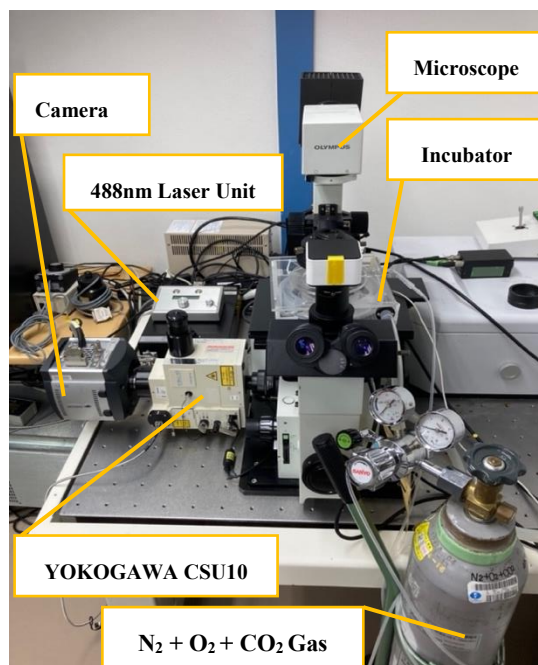
2.2.5. アクチンフィラメントのゆらぎの解析方法

図 2.3 にアクチンフィラメントのゆらぎの解析方法を示す。撮影された蛍光画像は、画像解析ソフトウェア Image J (NIH, USA) の画像処理ツール Gaussian Blur によりスムージングを行なった。このガウシアンフィルタは、カーネル内の重みづけをガウス関数に従って行う。このガウス関数内の標準偏差 σ を 0.7 に設定した。蛍光画像のアクチンフィラメントの中間点に輝度分布の観察線を設けた。この観察線は、アクチンフィラメントが両端を固定した弦の振動のようにゆらぐと仮定してフィラメント構造に垂直になるように設定した。この観察線上の輝度分布の輝度のピーク値にアクチンフィラメントが存在するとして、その位置座標を取得した。アクチンフィラメントの位置を蛍光輝度分布のピーク値の座標にした理由は、蛍光物上の蛍光輝度をピークにしてガウス関数状に蛍光輝度強度が分布するためである。この輝度のピーク値の座標の変化をアクチンフィラメントのゆらぎとした。

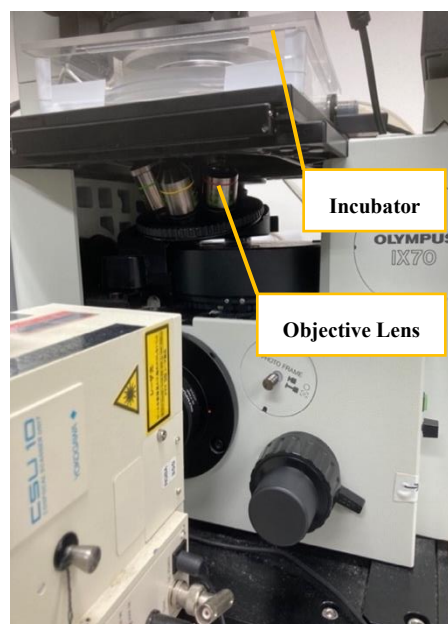
2.2.6. 顕微鏡空間分解能の評価

式 (2.1) に顕微鏡の空間分解能 α を評価するレイリーの分解能の式 (野島, 2016) を示す。N.A. は、対物レンズの光を集めることが可能な範囲を示す開口数であり、 λ は蛍光タンパク質の励起レーザーの光の波長である。

$$\alpha = \frac{\lambda}{\text{N.A.}} \quad (2.1)$$



(a) 撮影に使用した顕微鏡正面



(b) 撮影に使用した顕微鏡側面



(c) カメラコントロール用 PC

図 2.1 アクチンフィラメント撮影用実験装置

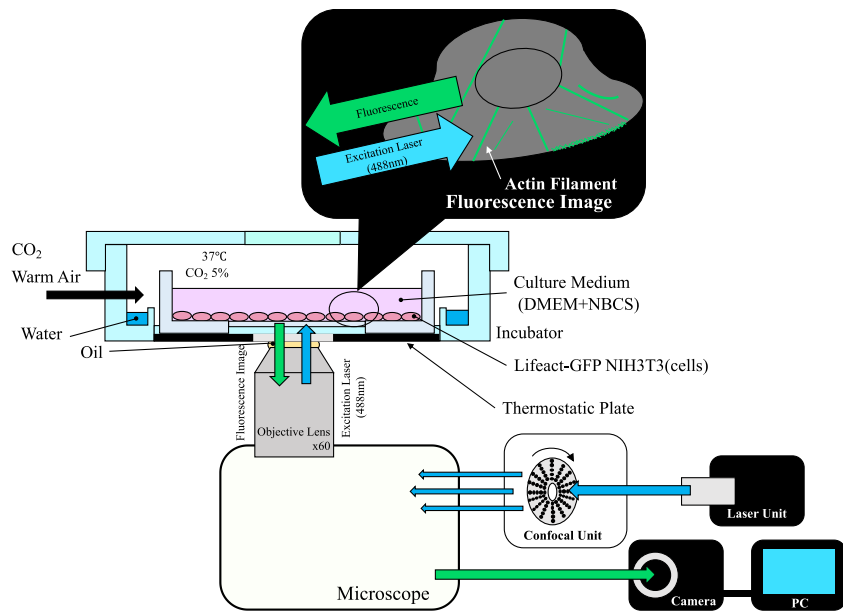
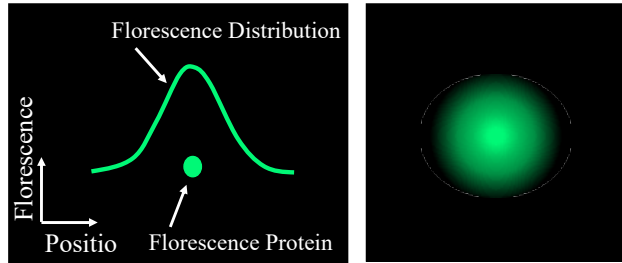
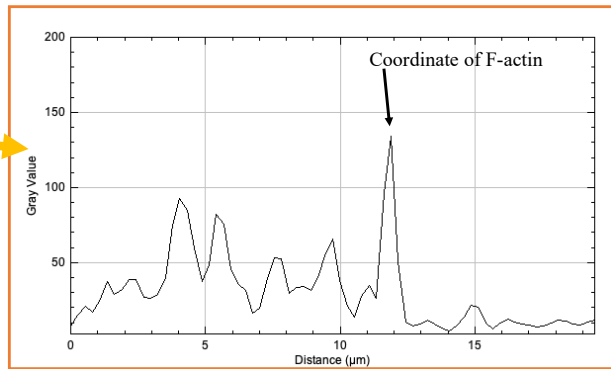
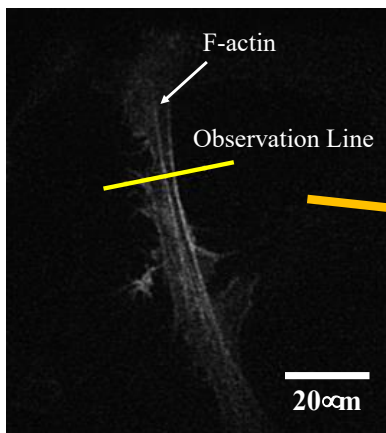


図 2.2 アクチンフィラメント撮影装置の概略図



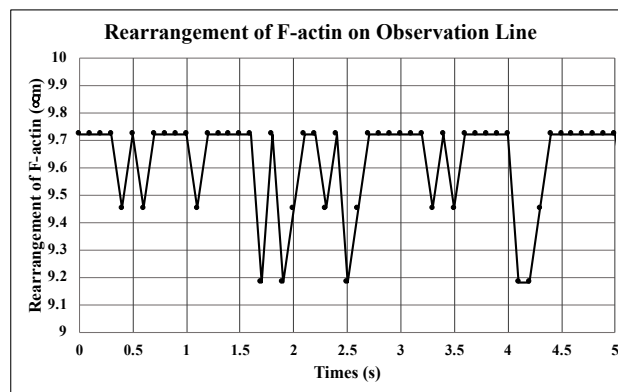
(a) 蛍光輝度分布

(b) 蛍光画像



(c) 観察線上の蛍光画像の輝度分布図

Plot Coordinates



(d) アクチンフィラメントのゆらぎ

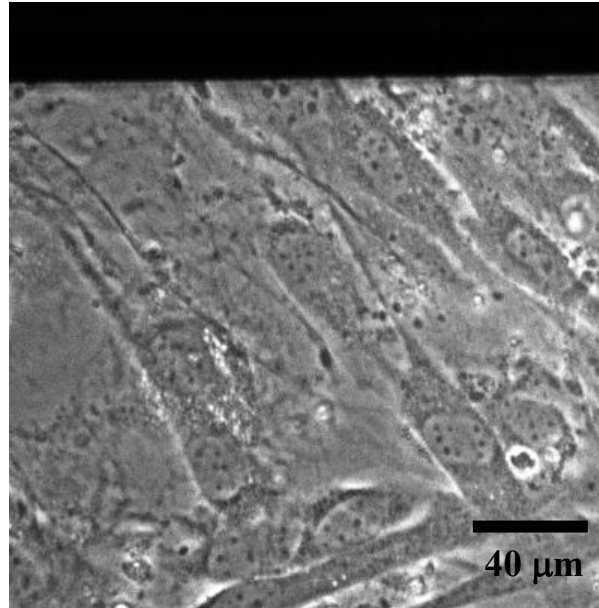
図 2.3 アクチンフィラメントのゆらぎの解析

2.3. 実験結果

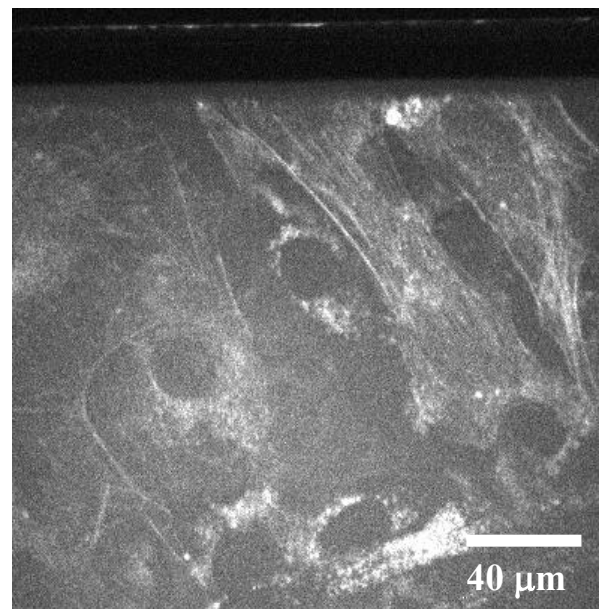
図 2.4 (a) に、 緑色蛍光タンパク質 Lifeact-GFP を遺伝子導入したマウス胎児由来株化細胞を 40 倍の油浸系対物レンズで撮影した位相差画像の代表例を示す。細胞は、ガラスボトムディッシュを細胞が覆った状態まで培養した。図 2.4 (b) に、図 2.4 (a) のマウス胎児由来株化細胞内のアクチンフィラメントを波長 488 nm 青色レーザーで励起した蛍光画像を示す。このような位相差画像と蛍光画像の細胞数を細胞核からカウントした。表 2.1 に示すように、15 組の画像からカウントした細胞数からマウス胎児由来株化細胞の Lifeact-GFP の発現率は約 61 %であった。図 2.5 に樹脂包埋された直径 0.5 μm 蛍光ビーズの蛍光画像を示す。この蛍光ビーズ上の輝度分布図を図 2.6 に示す。矢印で示す輝度のピーク値の座標が蛍光ビーズの位置座標である。図 2.7 に蛍光ビーズの蛍光輝度の 0.1 s ごとの座標変化を示す。蛍光ビーズの位置座標は、x 座標上の 5.13 μm の位置で 10 s 間変化はなかった。

図 2.8 に 60 倍の油浸系対物レンズで撮影した生細胞内のアクチンフィラメントの蛍光画像を示す。図 2.8 (a) は、露光時間 1 s で撮影した生細胞内のアクチンフィラメントの静止画である。図 2.8 (b) は、露光時間 70 ms, シャッター速度 0.1 s で撮影したアクチンフィラメントの動画の 1 枚である。画像上に矢印で示す白い線がアクチンフィラメントである。ここで、CMOS カメラを使用して撮影した蛍光画像のピクセル数は、縦 512 pixels, 横 512 pixels であった。この蛍光画像を標準偏差 0.7 のガウシアンフィルタで処理した画像も同じピクセル数, 縦 512 pixels, 横 512 pixels であった。図 2.9 に露光時間 70 ms で撮影したアクチンフィラメントの動画の 1 枚を示す。図 2.9 のアクチンフィラメントは、細胞中央付近と細胞膜付近に分け、それぞれの観察線上でゆらぎの解析を行なった。図 2.10 (a) にゆらぎによる観察線上の細胞中央付近のアクチンフィラメントの 10 s 間の位置変化, 図 2.10 (b) に蛍光輝度の変化を示す。アク

チンフィラメントは、観察線上の座標 $9.72\ \mu\text{m}$, $9.45\ \mu\text{m}$ 及び, $9.18\ \mu\text{m}$ を移動しており、蛍光輝度の変化はランダムであった。図 2.11 (a) にゆらぎによる観察線上の細胞膜付近のアクチンフィラメントの 10 s 間の位置変化, 図 2.11 (b) に蛍光輝度の変化を示す。アクチンフィラメントは、観察線上の座標 $7.56\ \mu\text{m}$, $7.83\ \mu\text{m}$ を移動しており、蛍光輝度の変化はランダムであった。



(a) Lifeact-GFP を遺伝子導入した NIH3T3 の位相差画像



(b) 可視化した NIH3T3 内のアクチンフィラメント

図 2.4 アクチンフィラメントの Lifeact-GFP の発現率

表 2.1 NI3T3 の Lifeact-GFP の発現率

Lifeact-GFPの発現率			
	細胞数	発現細胞数	発現率(%)
1	15	8	53.3
2	12	8	66.7
3	10	6	60.0
4	12	7	58.3
5	10	6	60.0
6	13	9	69.2
7	16	12	75.0
8	16	9	56.3
9	9	5	55.6
10	13	7	53.8
11	8	6	75.0
12	15	11	73.3
13	12	4	33.3
14	9	6	66.7
15	12	8	66.7
平均	12.1	7.5	61.5

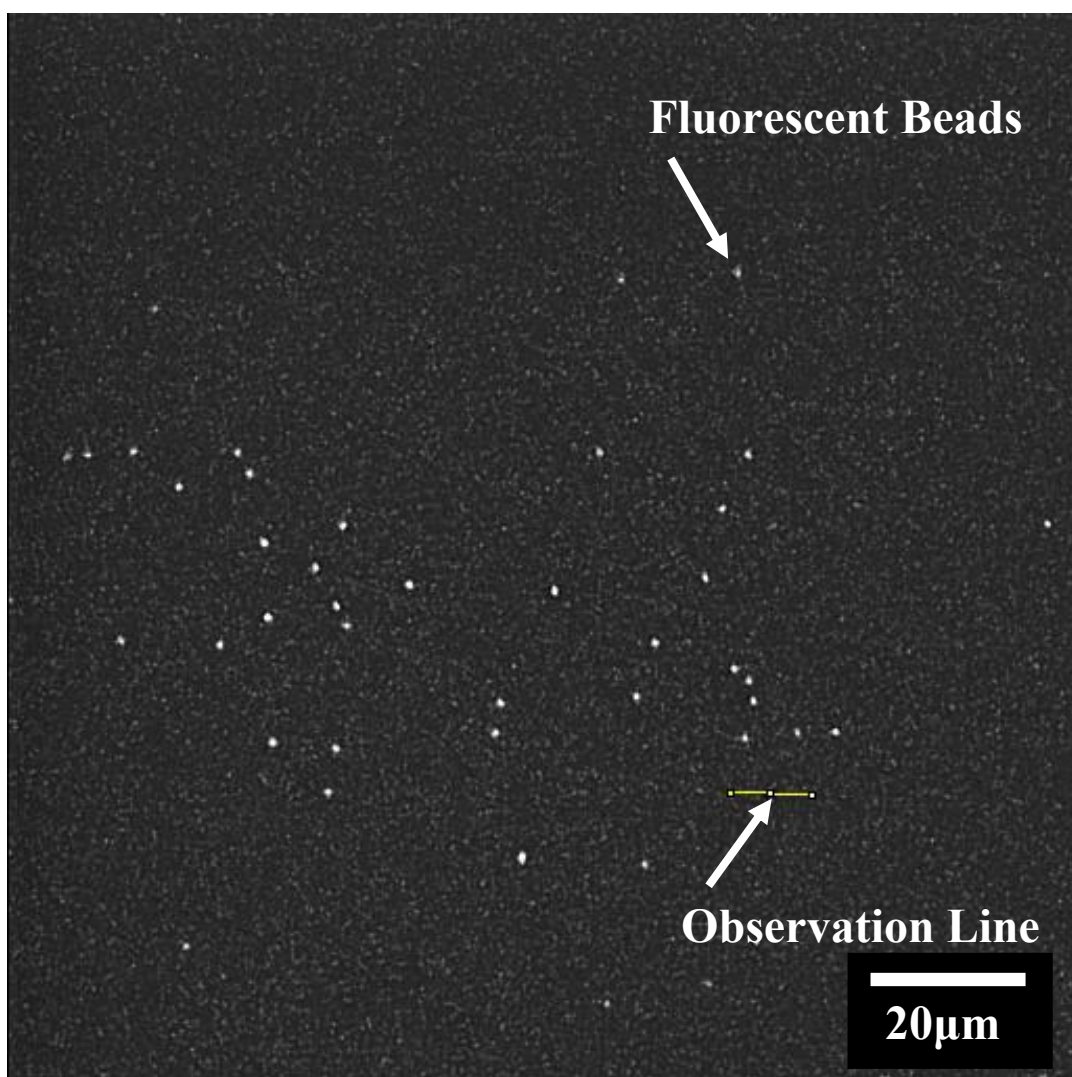


図 2.5 直径 0.5 μm 蛍光ビーズの蛍光画像

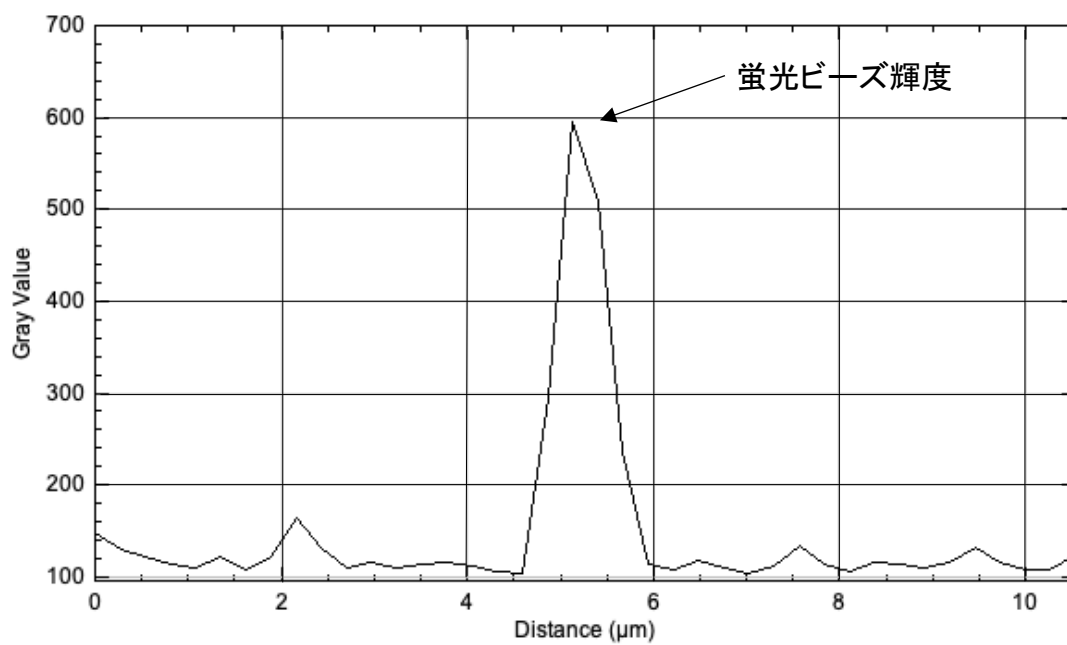


図 2.6 蛍光ビーズ上の蛍光輝度分布

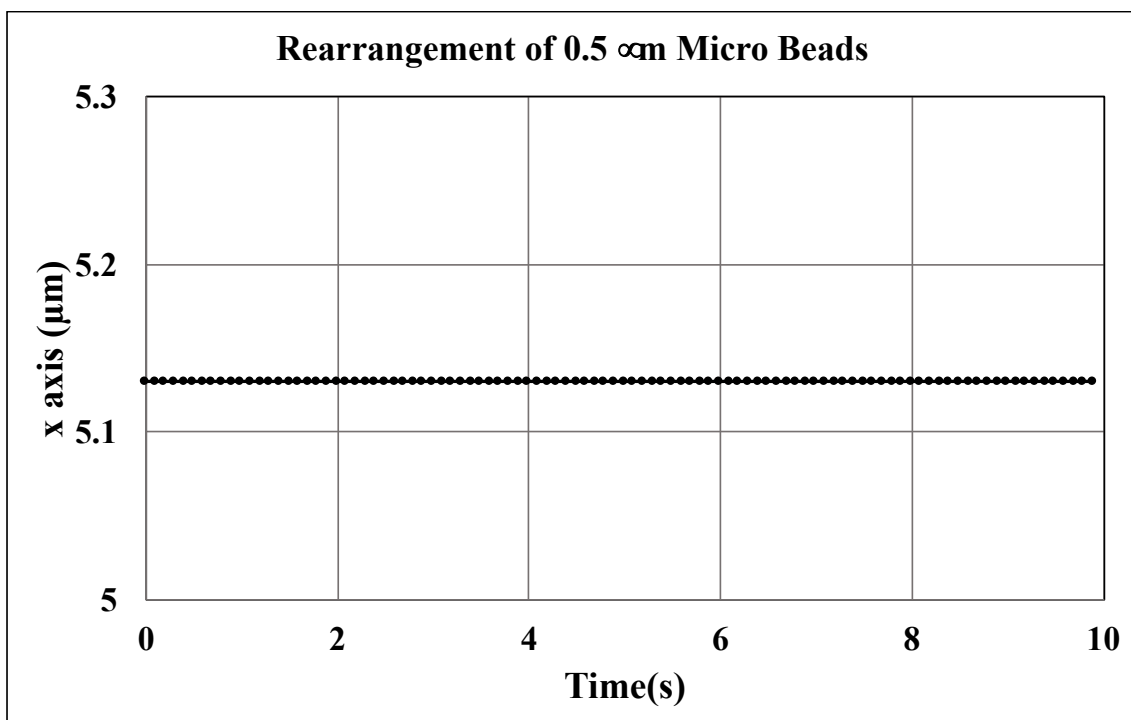
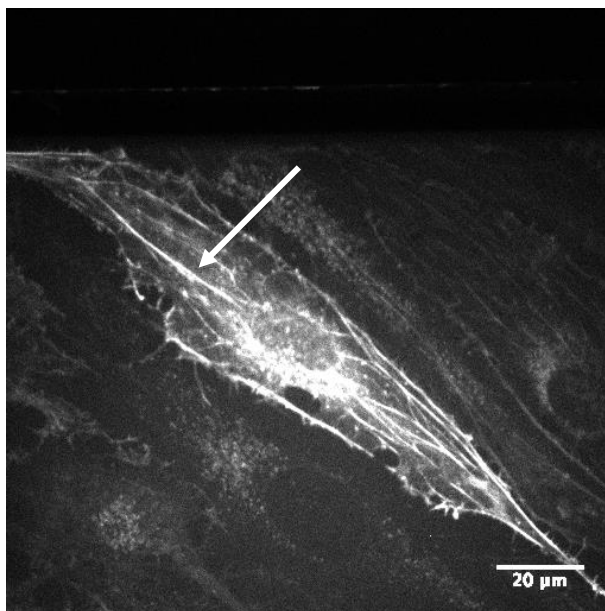
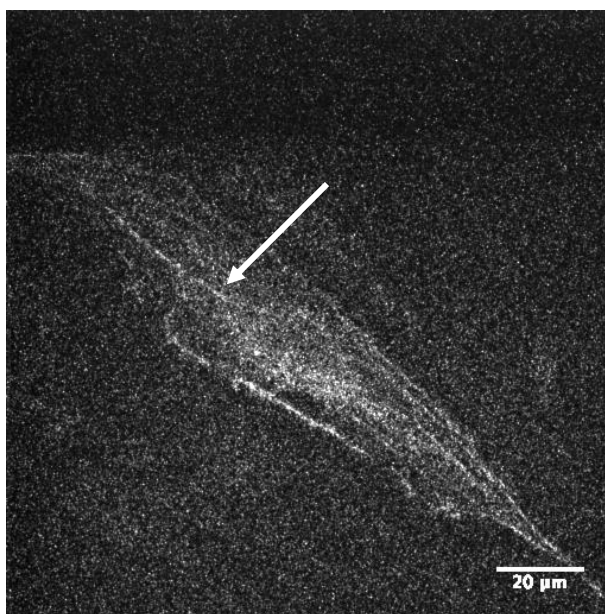


図 2.7 直径 0.5 μm 蛍光ビーズの x 軸方向の変位



(a) 露光時間 1 s 生細胞内アクチンフィラメントの蛍光画像



(b) 露光時間 70 ms アクチンフィラメントの蛍光画像

図 2.8 生細胞内アクチンフィラメント画像

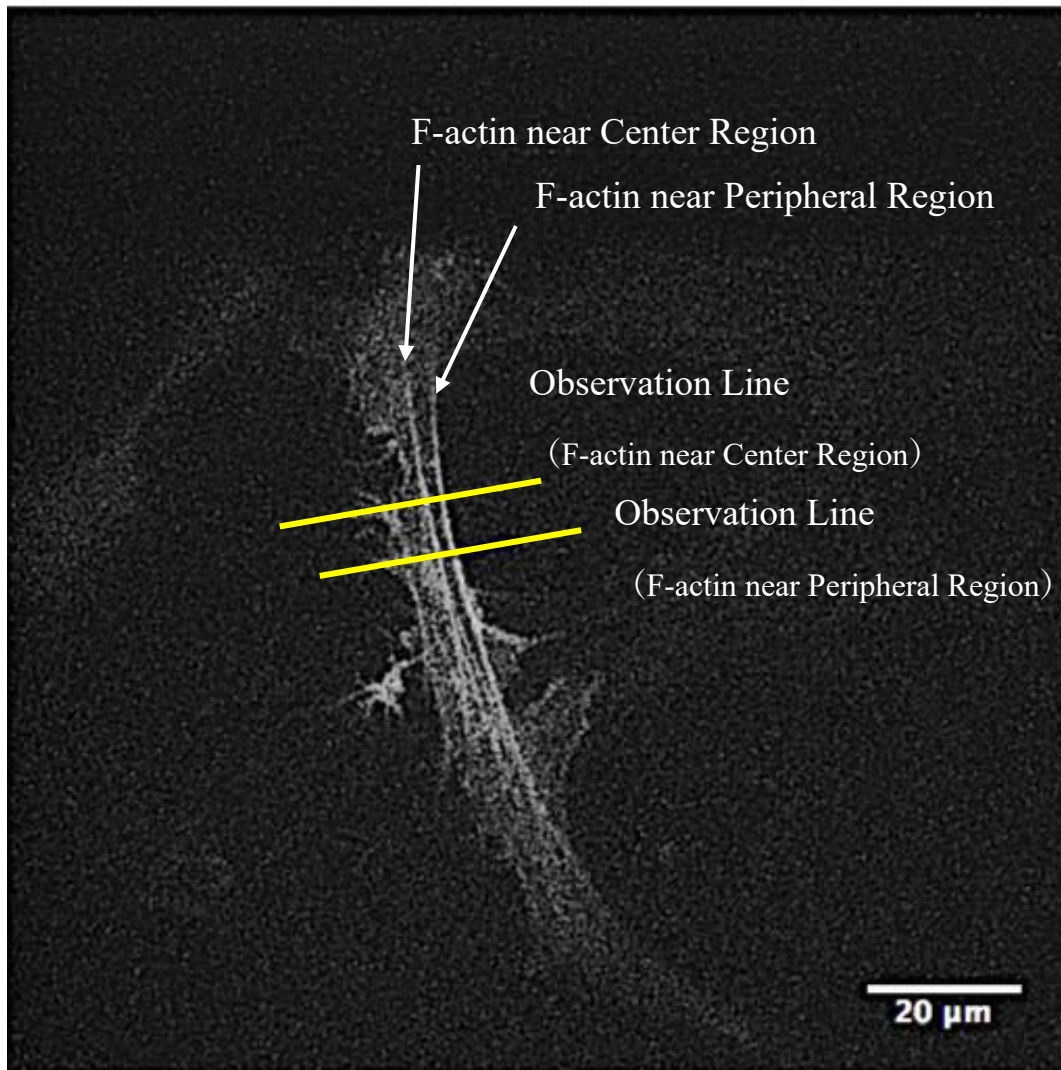
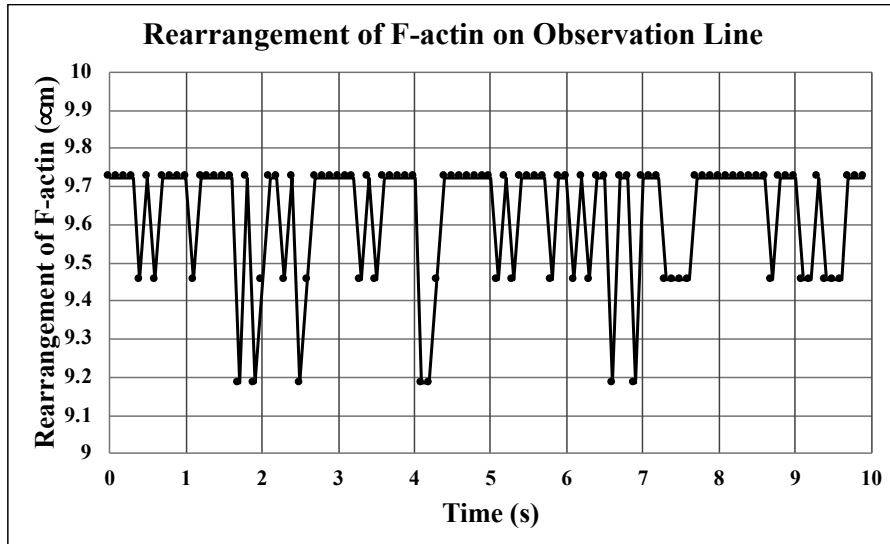
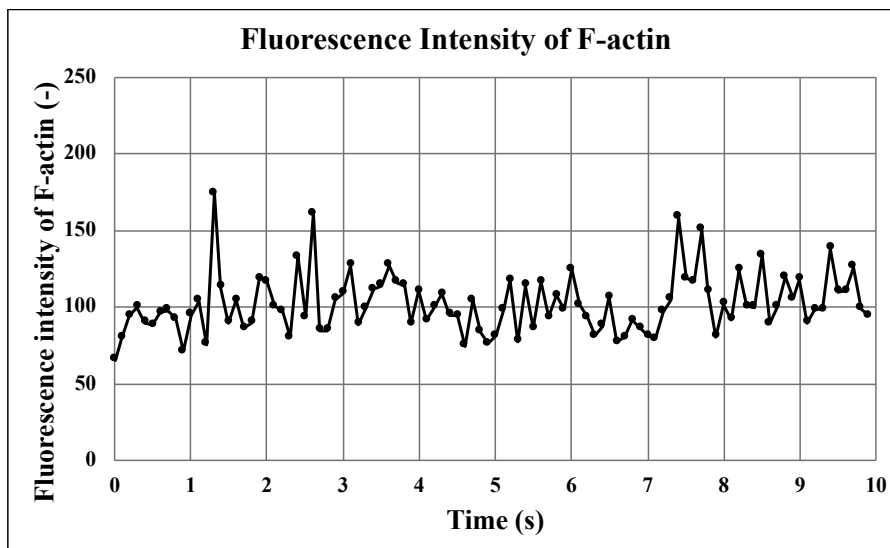


図 2.9 露光時間 70 ms で撮影した生細胞内のアクチンフィラメント及び、ゆらぎ観察線

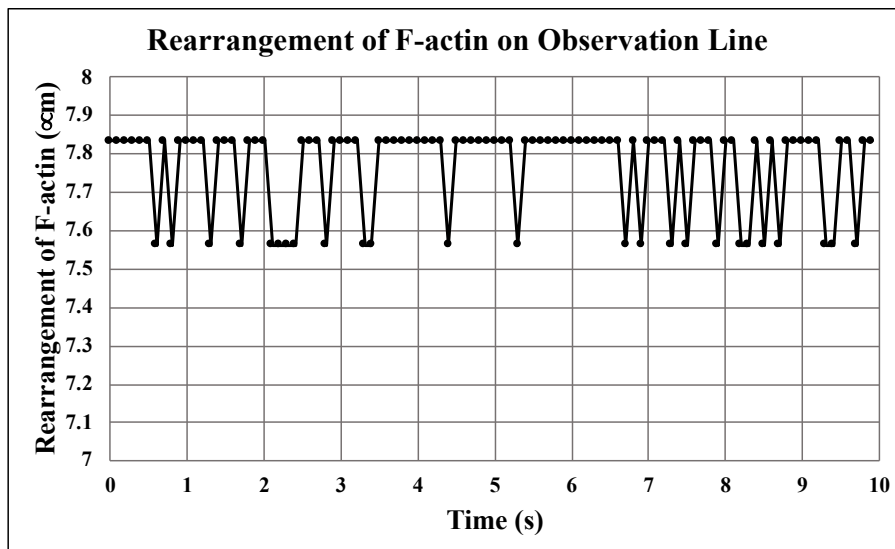


(a) アクチンフィラメントの観察線上での位置変化

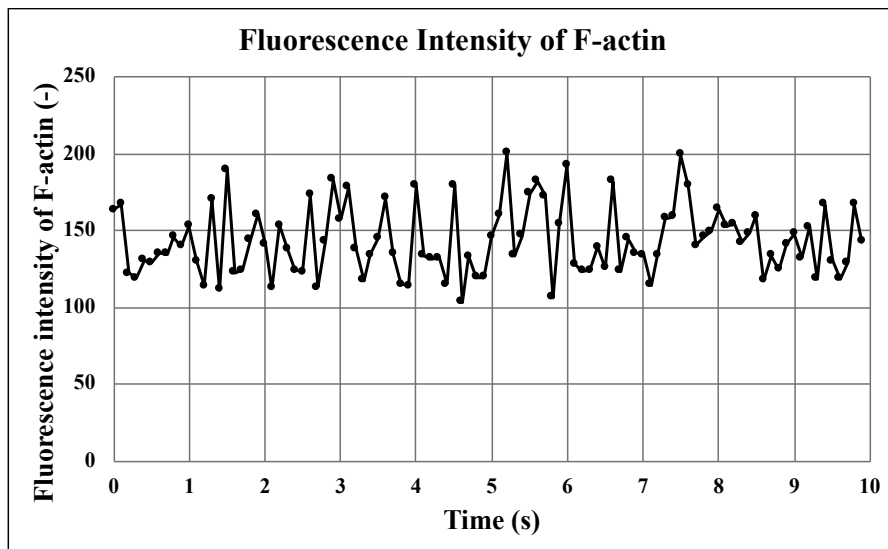


(b) アクチンフィラメントの蛍光変化

図 2.10 細胞中央付近のアクチンフィラメントのゆらぎ



(a) アクチンフィラメントの観察線上での位置変化



(b) アクチンフィラメントの蛍光変化

図 2.11 細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎ

2.4. 考察

本研究では、緑色蛍光タンパク質 Lifeact-GFP をマウス胎児皮膚由来株化細胞 NIH3T3 に遺伝子導入し、生細胞のアクチンフィラメントのゆらぎの観察、解析を行なった。細胞へ Lifeact-GFP を遺伝子導入した結果、表 2.1 に示すように約 62%の細胞で遺伝子導入した緑色蛍光タンパク質の発現を確認した。図 2.4 のように蛍光したアクチンフィラメント構造が確認された細胞に隣接して、Lifeact-GFP が発現していない細胞も存在していた。さらに Lifeact-GFP の発現した細胞の中でも、アクチンフィラメントが蛍光していた細胞と細胞質のみが蛍光していた細胞を確認し、その蛍光の強さもさまざまであった。図 2.5 で観察した樹脂包埋された直径 $0.5 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズの位置座標は、図 2.7 のグラフのように $x = 5.13 \mu\text{m}$ からの変化はなかった。このことから、顕微鏡ステージは揺れておらず、蛍光ビーズの位置変化は生じていなかった。

図 2.8 に示すように生細胞内のアクチンフィラメントが観察された。図 2.8 (a) のように露光時間 1 s で撮影したアクチンフィラメントの静止画では、細胞膜に沿った細いアクチンフィラメントも観察可能であった。露光時間 0.7 s, シャッター速度 0.1 s で撮影した図 2.8 (b) は、静止画像に比べアクチンフィラメントの像が粗くなった。図 2.8 (a) 内に矢印で示すような太いアクチンフィラメントは図 2.8 (b) でも観察可能であった。しかし、細いアクチンフィラメント像は、観察時間内でフィラメント像が途切れるまたは、像全体の確認が不可能であった。また、アクチンフィラメント周囲の細胞質の蛍光も確認した。図 2.9 のように比較的アクチンフィラメント像が観察時間内で鮮明に観察可能な細胞の蛍光画像でゆらぎの観察を行った。これらのゆらぎの観察は、蛍光画像上で視認可能なアクチンフィラメントの両端座標の中間点に観察線をアクチンフィラメントに垂直になるように設けて行った。これは、アクチンフィラメントの両端が固定されており、弓形にゆらいでいると仮定して行なった。こ

の結果、細胞中央付近のアクチンフィラメント及び、細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎは、3座標間または2座標間のみで位置変化が生じていた。これらの結果には、本研究で使用した顕微鏡の空間分解能が影響していることが考えられる。顕微鏡の空間分解能は、対物レンズの光を集めることが可能な範囲を示す開口数 N.A. と励起レーザーの光の波長 λ からレイリーの分解能の式によって求められる。本研究で使用した蛍光顕微鏡の励起レーザー波長は 488 nm, 60倍油浸レンズの開口数 N.A. は 1.4 であった。これらのパラメーターから使用した蛍光顕微鏡の空間分解能は、約 0.2 μm と求まる。これは、本研究で観察した生細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の最小値の約 0.3 μm と同等の値であった。このことから、顕微鏡の空間分解能より小さい値の振幅でアクチンフィラメントはゆらいでいることが考えられる。このため、アクチンフィラメントのゆらぎを詳細に観察するためには、空間分解能を向上させる必要がある。さらに、本研究で使用した Lifeact-GFP のアクチンフィラメントへの接着は弱いため、接着、離脱を繰り返すターンオーバーが生じている。この Lifeact-GFP のターンオーバー現象や撮影に使用したカメラの電氣的なノイズが観察したアクチンフィラメント輝度分布に影響を与えていることも考えられる。

2.5. 結言

蛍光タンパク質 Lifeact-GFP で可視化した生細胞内のアクチンフィラメントは、約 0.3 μm または、約 0.5 μm の振幅でゆらいでいた。このゆらぎの最小振幅は、蛍光顕微鏡の空間分解能と同等であり、アクチンフィラメントはこの空間分解能の数値より小さい値の振幅でゆらいでいることが考えられた。また、Lifeact-GFP のターンオーバーやカメラの電氣的なノイズがゆらぎの解析に影響を与えていることも考えられた。

第 3 章

擬似的な超解像度画像解析手法を用いたゆらぎの解析

3.1. 緒言

第 1 章で生細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの観察解析を行なった結果、ゆらぎの振幅は、レイリーの分解能の式（野島，2016）から求められる波長 488 nm 青色レーザー光の蛍光顕微鏡の空間分解能とほぼ等しい値であった。このため、画像解像度を上昇させてアクチンフィラメントのゆらぎを詳細に解析する必要がある。画像解像度を上昇させる方法として超解像度顕微鏡を使用したタンパク質構造体の観察方法がある。これは、光活性化局在性顕微鏡法（Photoactivated Localization Microscopy ; PALM）（Shroff, et al., 2008）、誘導放出抑制顕微鏡法（Stimulated Emission Depletion ; STED）（Shang, et al., 2017）などが有名である。これらは専用の顕微鏡が必要であり、通常の顕微鏡では、適用が不可能である。さらに、超解像度画像を撮影するためには、1 枚の蛍光画像につき数秒以上の撮影時間が必要である。このため、通常顕微鏡で撮影した画像の解像度を上昇させ、リアルタイムでアクチンフィラメントを観察、解析する方法を考案した。この手法は、超解像度画像解析手法の Integrating exchangeable single-molecule localization（IRIS）（Kiuch, et al., 2015）を参考にした。この手法は、数秒間撮影した蛍光画像上で観察された蛍光粒子の位置情報を取得し、タンパク質構造体の像を描写することによって解像度を上昇させる。この手法を応用して、擬似的に蛍光画像の解像度を向上させた。この手法では、撮影した蛍光画像の 1 枚から超解像画像を作成するため、シャッター速

度 0.1 秒で高速撮影した画像でのリアルタイムのタンパク質構造体のゆらぎの観察，解析が可能である．この手法により，生細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの高解像度観察を試みた．

3.2. 実験方法

3.2.1. 細胞の培養方法

実験には，Lifeact-GFP を遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞 (NIH3T3) を使用した．細胞培養に使用する培地は，ダルベッコ改変イーグル培地 100 mL に対して，10 mL の新生児仔ウシ血清 (Newborn Calf Serum ; NBCS) と 1 mL の 10000 units/ml ペニシリンストレプトマイシン (10000 units/ml Penicillin-Streptomycin) を加えて調製した．細胞培養に使用する 25 cm² 培養用フラスコに 0.1 %ゼラチン溶液を 3 mL 入れ，紫外線下で 30 分間静置し，ゼラチンコートした．ゼラチンコートしたフラスコに，解凍した細胞を含んだ溶液 1 mL とダルベッコ改変イーグル培地 + 新生児仔ウシ血清 + ペニシリンストレプトマイシンの培地 4 mL を入れた．このフラスコは，温度 37°C，湿度 100 %及び，CO₂濃度 5 %に保たれたインキュベータ内に静置した．細胞を解凍した翌日に，細胞がフラスコ底面に付着していることを確認し，培地 5 mL を交換した．

3.2.2. 細胞継代方法

底面を細胞が 8 割ほど覆った状態になったフラスコは，新しいフラスコに細胞を移し，細胞数を増やす継代作業を行なった．細胞を培養したフラスコ内の培地を除き，37°Cに温めたリン酸緩衝生理食塩水 (-) 溶液でフラスコ内を 2 回洗浄した．洗浄したフラスコにトリプシンを 200 µL を入れ，5 分間静置し，細

胞を剥離させた。このフラスコに培地 20 mL 入れた。細胞を含んだ培地は、ゼラチンコートしたフラスコ 4 個に 5 mL ずつ分けた。実験に使用する細胞は、直径 20 mm ガラスボトムディッシュに培地 2 mL と播種した。これらのフラスコまたは、ガラスボトムディッシュは、温度 37 °C、湿度 100 % 及び、CO₂ 濃度 5 % に保たれたインキュベータ内に静置した。

3.2.3. 生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法

アクチンフィラメントの撮影は、暗室で行った。顕微鏡 IX70 のステージ上に簡易インキュベータを設置し、37 °C まで加温した。N₂ + O₂ + CO₂ 混合ガスボンベの栓を開き、インキュベータ内の CO₂ 濃度を 5 % に保った。簡易インキュベータ内に Lifeact-GFP を遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞を培養したガラスボトムディッシュを静置した。細胞内のアクチンフィラメントは、488 nm レーザーユニットから照射し、共焦点レーザーユニット Yokogawa CSU10 を通した波長 488 nm のレーザーによって励起した。アクチンフィラメントの蛍光像は、CMOS カメラによって、露光時間 70 ms、シャッター速度 0.1 s の条件で撮影した。

3.2.4. 擬似的な超解像度画像解析手法

撮影された蛍光画像は、画像解析ソフトウェア Image J の画像処理ツール Gaussian Blur によって画像のスムージングを行なった。ガウス関数の標準偏差 σ を 0.7 に設定した。図 3.1 に示すように、アクチンフィラメントに垂直になる様に画像上の輝度分布観察線を画像端から設け、輝度分布を解析した。この輝度分布上のアクチンフィラメントの輝度のピーク値の座標をアクチンフィラメントの位置座標とした。この座標をアクチンフィラメント上で 10 点前後取得

し、これらの座標から近似曲線を得た。この近似曲線の関数は、アクチンフィラメントは張力を発生している変曲点のない構造体として二次関数を使用した。この近似曲線の二次関数をアクチンフィラメントとしてゆらぎを解析した。

3.2.5. アクチンフィラメントのゆらぎの解析方法

0.1 s 間のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅 L は、擬似的な超解像度画像解析手法により得られた近似曲線の二次関数から求めた。図 3.2 に示すように変位後のアクチンフィラメントの近似曲線の二次関数の法線上の位置変化をゆらぎの振幅とした。式 (3.1) に変位前のアクチンフィラメントの近似曲線、式 (3.2) に変位後のアクチンフィラメントの近似曲線の二次関数を示す。

$$f_1(x) = a_1x^2 + b_1x + c_1 \quad (3.1)$$

$$f_2(x) = a_2x^2 + b_2x + c_2 \quad (3.2)$$

変位後のアクチンフィラメント上の点 $B (p_2, f_2(p_2))$ の法線を式 (3.3) から求めた。

$$y = -\frac{1}{f_2'(p_2)}(x - p_2) + f_2(p_2) \quad (3.3)$$

この法線と変位前のアクチンフィラメントの二次関数の交点の x 座標 p_1 を式 (3.4) によって求めた。

$$p_1 = \frac{-b_1 \pm \sqrt{b_1^2 - 4a_1c_1}}{2a_1} \quad (3.4)$$

a_1

$$b' = b_1 + \frac{1}{f_2'(p_2)}p_2$$

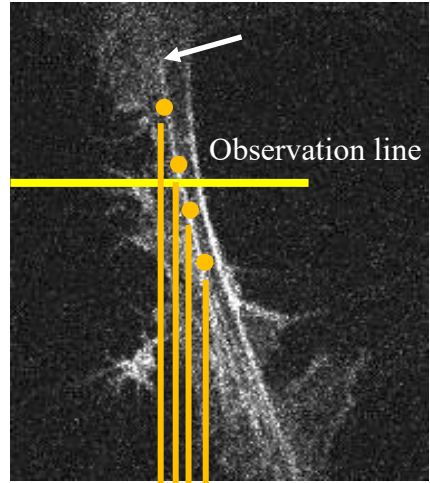
$$c' = c_1 - f_2'(P_2) - \frac{1}{f_2'(P_2)} P_2$$

式(3.5)により，アクチンフィラメント上の座標点 A ($p_1, f_1(p_1)$)，点 B ($p_2, f_2(p_2)$) 間の距離を求めた．この点 A と点 B の距離を 0.1 s 間のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅とした．

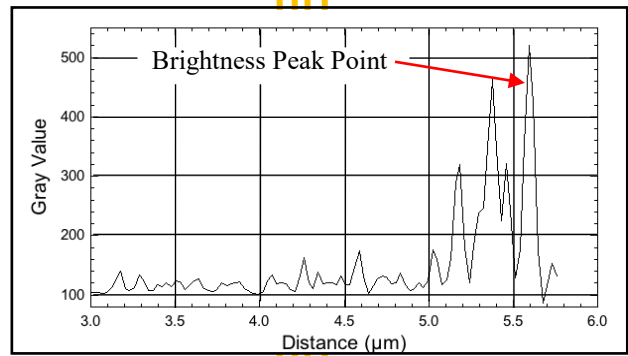
$$\text{Amplitude} = \sqrt{(p_2 - p_1)^2 + (f_2(p_2) - f_1(p_1))^2} \quad (3.5)$$

3.2.6. アクチンフィラメントのゆらぎの周波数解析方法

アクチンフィラメントのゆらぎの周波数は，擬似的な超解像度画像解析手法で求めたゆらぎによる x 軸方向のアクチンフィラメントの位置変化から求めた．アクチンフィラメントのゆらぎの往復運動とその時間には，ある程度の規則性があると仮定した．この仮定をもとに，図 3.3 に示すように 1 周期のゆらぎにかかる時間からゆらぎの周波数を決定した．このゆらぎの周波数は，10 s 間観察した 1 周期ごとの周波数の平均である．

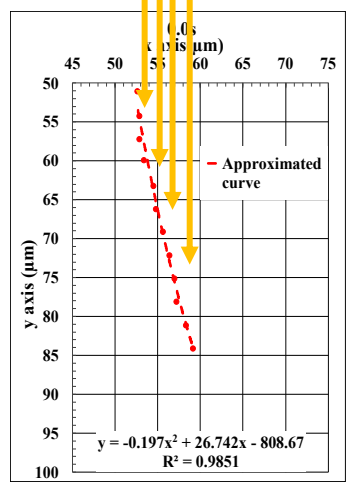


(a) 生細胞内のアクチンフィラメント蛍光画像



Plotting Coordinates of F-actin

(b) 蛍光輝度分布図の輝度のピーク値



(c) アクチンフィラメントの擬似的な超解像度画像

図 3.1 擬似的な超解像度画像解析手法の手順

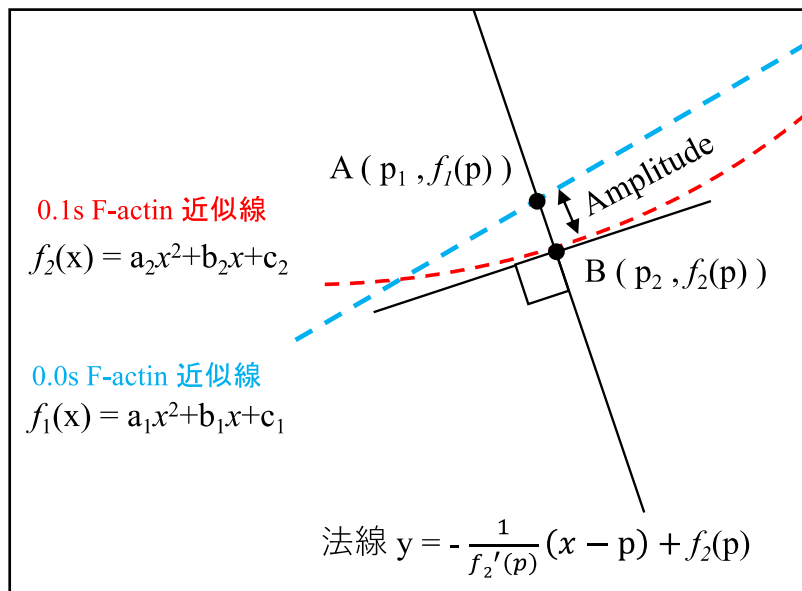


図 3.2 アクチンフィラメントのゆらぎの振幅の計算

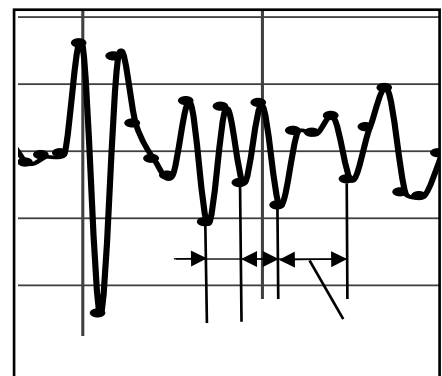
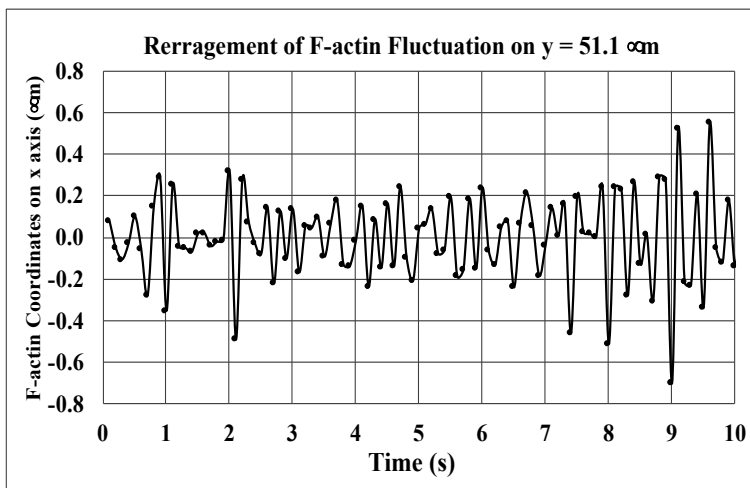


図 3.3 アクチンフィラメントのゆらぎの周波数の解析

3.3. 実験結果

図 3.4 に生細胞内のアクチンフィラメントの蛍光画像を示す。この細胞内のアクチンフィラメントを中央付近と膜付近に分け、擬似的な超解像度画像を製作した。代表例として、図 3.5 (a) に細胞中央付近、図 3.5 (b) に細胞膜付近のアクチンフィラメントの 0.0 s の擬似的な超解像度画像を示す。これらの近似曲線の決定係数 R^2 は、0.9 以上の値であった。図 3.6 にアクチンフィラメントの蛍光画像と擬似的な超解像度画像の比較画像を示す。これらの比較画像から、アクチンフィラメント像の高い一致を確認した。図 3.7 に Image J の輝度分布解析ツールの解像度を示す。図 3.7 (a) の蛍光画像内での観察線上で解析した輝度分布図を図 3.7 (b) に示す。この Image J の輝度解析ツールの輝度分布の解析解像度は、 $0.08 \mu\text{m}$ であった。図 3.8 (a) に $y = 51.1 \mu\text{m}$ 上、図 3.8 (b) に $y = 69.8 \mu\text{m}$ 上で観察した細胞中央付近のアクチンフィラメントのゆらぎによる x 軸方向の変位を示す。図 3.8 (a) 内で矢印が示す箇所は、図 3.8(b) と比較した結果、ゆらぎによるアクチンフィラメントの位置変化の有無などが異なった時間である。このように、アクチンフィラメント上でゆらぎのパターンが異なり、端付近のゆらぎの振幅は中間部分に比べて大きかった。図 3.9 (a) に $y = 51.1 \mu\text{m}$ 、図 3.9 (b) に $y = 69.8 \mu\text{m}$ での細胞中央付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅変化を示す。図 3.10 (a) に $y = 51.1 \mu\text{m}$ 上、図 3.10 (b) に $y = 69.8 \mu\text{m}$ 上で観察した細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎによる x 軸方向の変位を示す。図 3.10 (a) 内にて矢印で示す時間は、図 3.8 と同様な図 3.10 (b) とは異なるゆらぎのパターンを確認した時間である。このアクチンフィラメントのゆらぎは、端付近のゆらぎの振幅は中間部分に比べて大きかった。図 3.11 (a) に $y = 51.1 \mu\text{m}$ 、図 3.11 (b) に $y = 69.8 \mu\text{m}$ での細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅変化を示す。図 3.12 (a) に別細胞の膜付近のアクチンフィラメントの蛍光画像、図 3.12 (b) にその擬

似的な超解像度画像を示す。図 3.12 (a) 内で示す $y = 79.2 \mu\text{m}$, $y = 90.2 \mu\text{m}$ の観察線でアクチンフィラメントのゆらぎを観察, 解析した。図 3.13 (a) に $y = 79.2 \mu\text{m}$, 図 3.13 (b) に $y = 90.2 \mu\text{m}$ でのアクチンフィラメントの x 軸方向の位置変化を示す。図 3.13 (a) 内で矢印が示す時間は, 図 3.8 と同様な図 3.13 (b) とは異なるゆらぎのパターンを確認した時間である。このアクチンフィラメントのゆらぎは, 端付近のゆらぎの振幅は中間部分に比べて大きかった。図 3.14 (a) に $y = 79.2 \mu\text{m}$, 図 3.14 (b) に $y = 90.2 \mu\text{m}$ での細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅変化を示す。これらのアクチンフィラメントゆらぎの周波数をアクチンフィラメントの往復運動から解析した結果, 約 3 Hz であった。

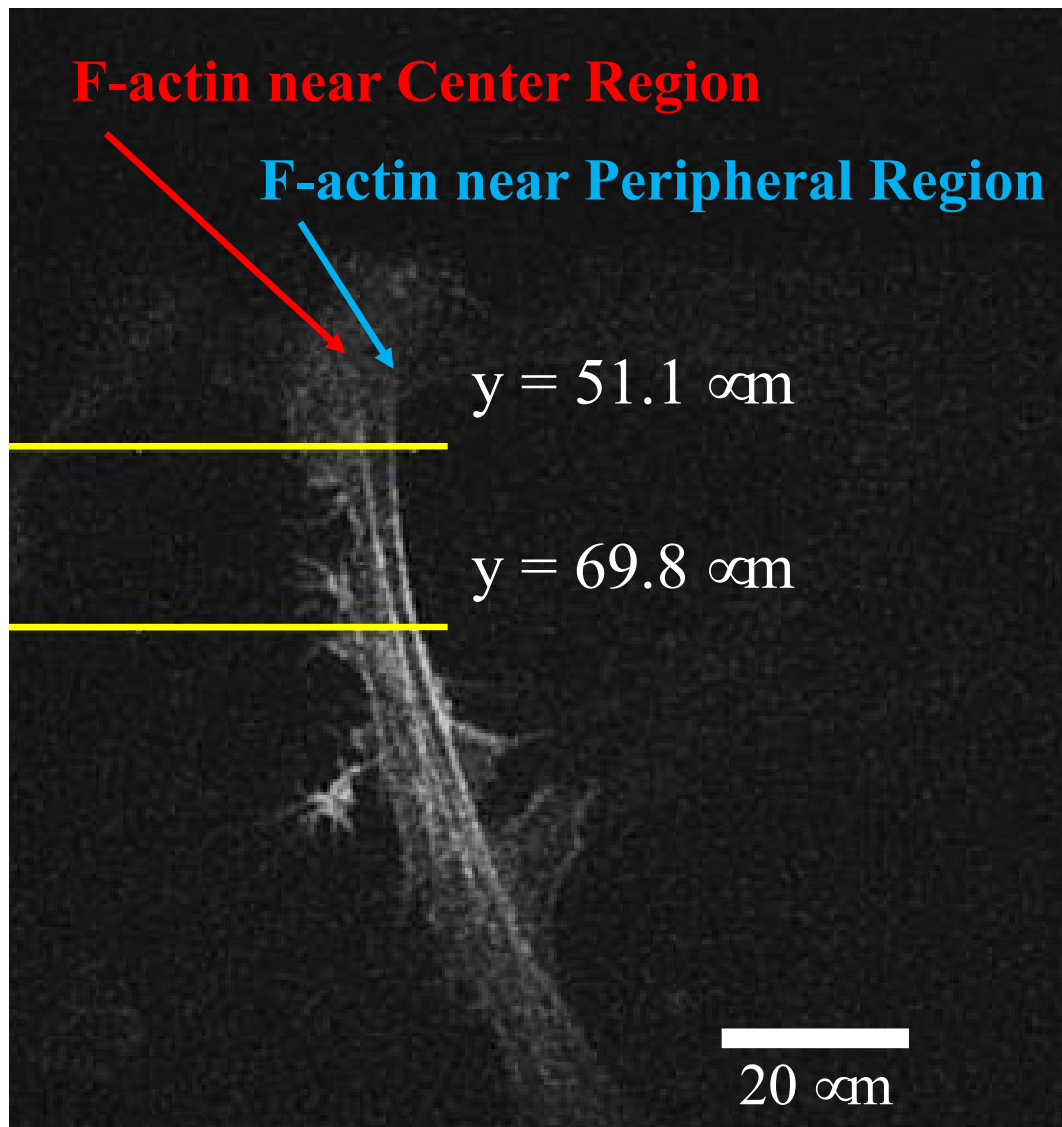
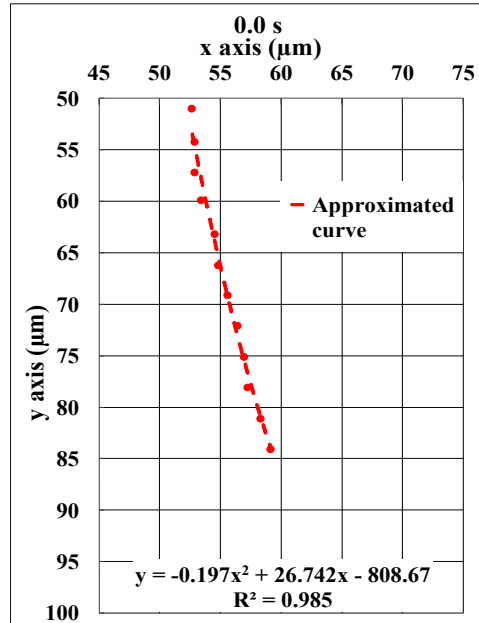
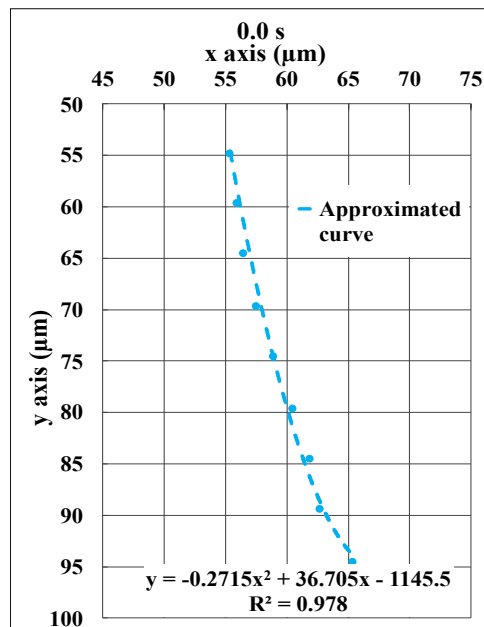


図 3.4 生細胞内のアクチンフィラメントの蛍光画像



(a) 細胞中央付近のアクチンフィラメント超解像度画像



(b) 細胞膜付近のアクチンフィラメント超解像度画像

図 3.5 生細胞内アクチンフィラメントの超解像度画像の代表例

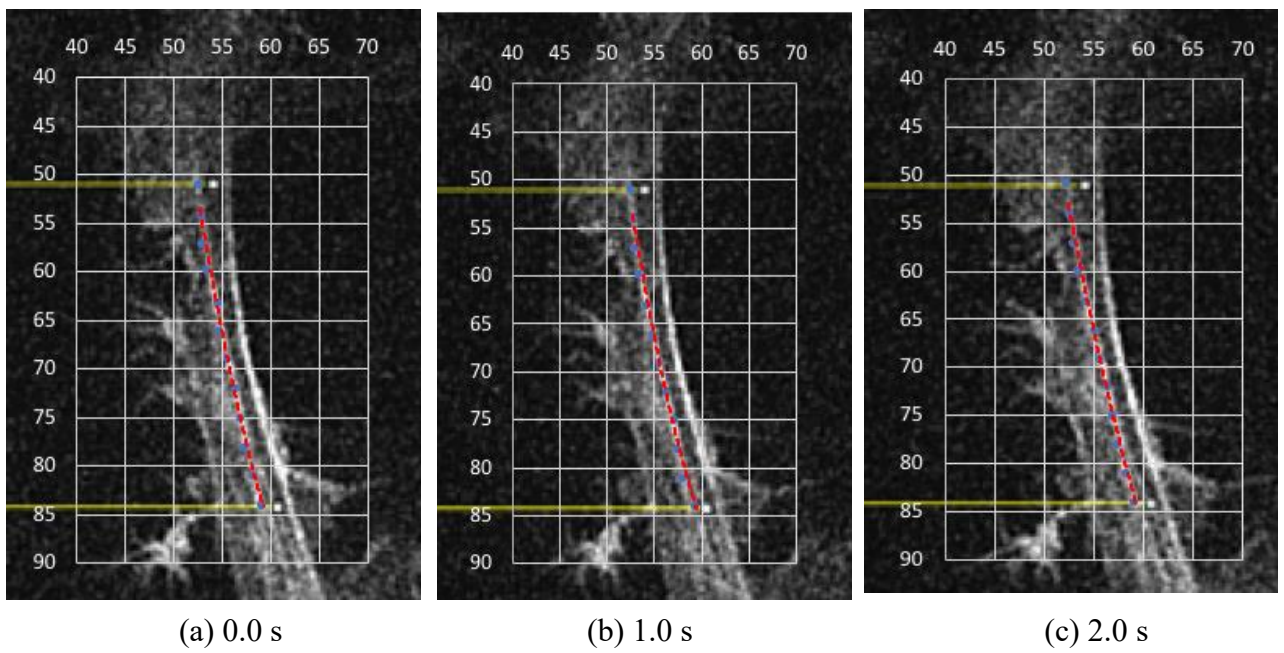


図 3.6 擬似的な超解像度画像と蛍光画像の比較

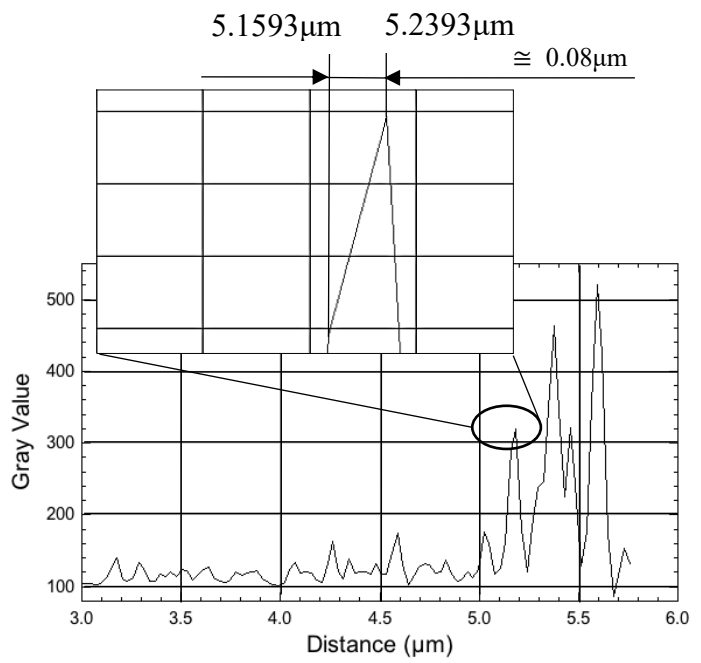
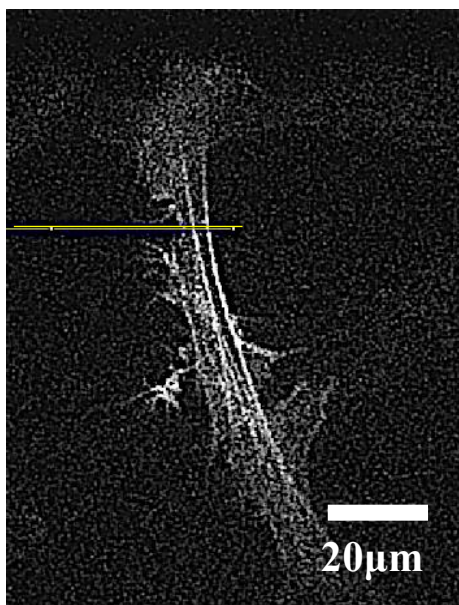
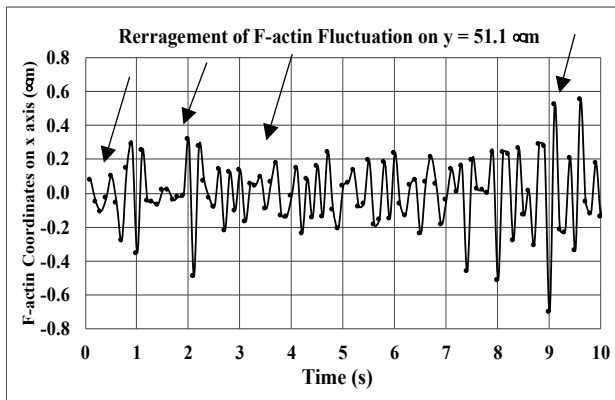
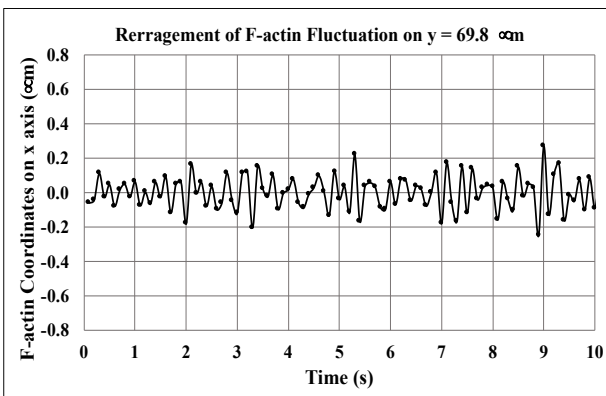


図 3.7 Image J の輝度解析ツールの解析解像度

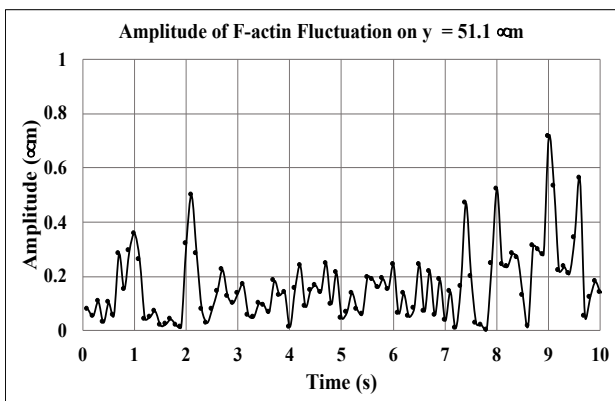


(a) $y = 51.1 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

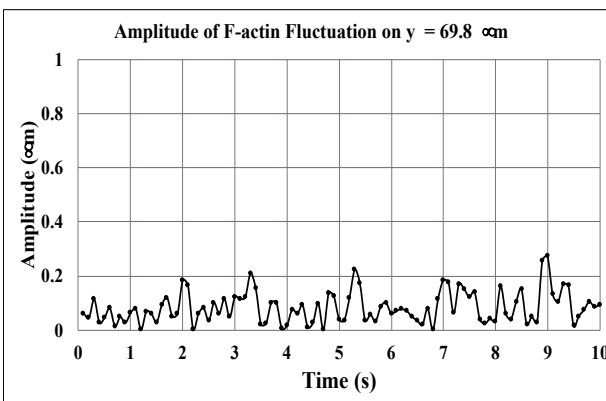


(b) $y = 69.8 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

図 3.8 細胞中央付近アクチンフィラメントの x 軸上変位

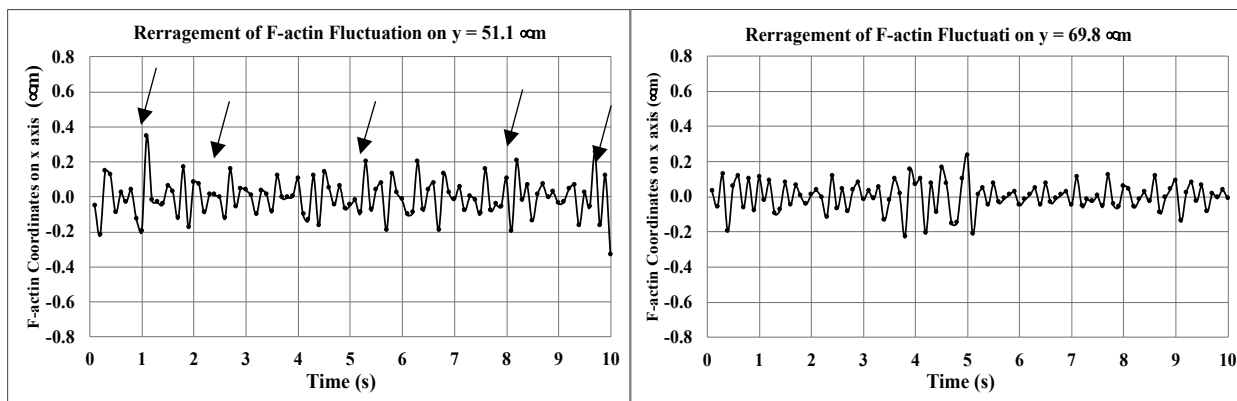


(a) $y = 51.1 \mu\text{m}$ でのゆらぎ



(b) $y = 69.8 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

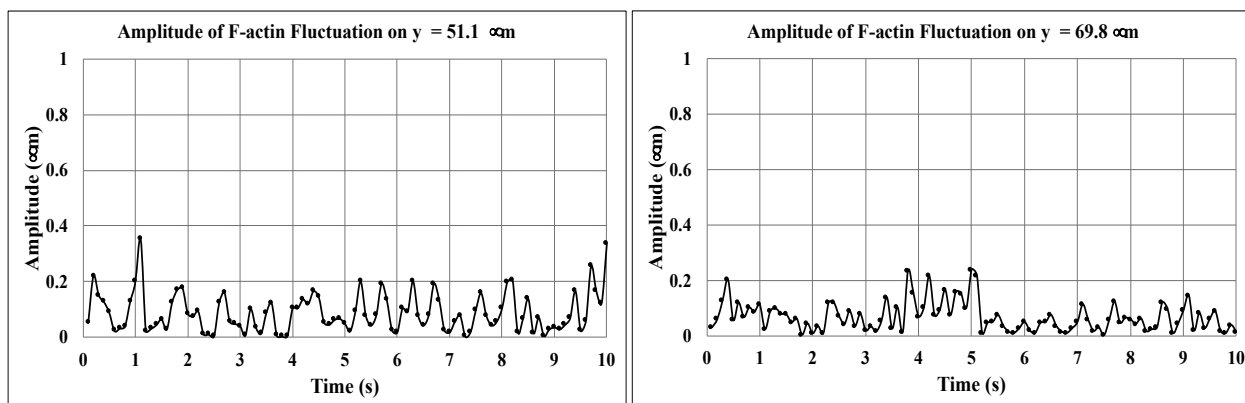
図 3.9 細胞中央付近のアクチンフィラメントの振幅変化



(a) $y = 51.1 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

(b) $y = 69.8 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

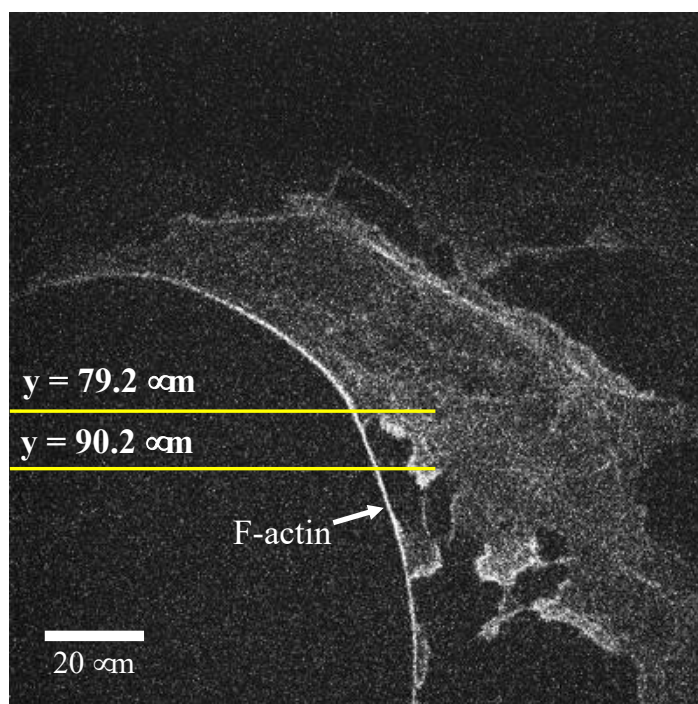
図 3.10 細胞膜付近アクチンフィラメントの x 軸上変位



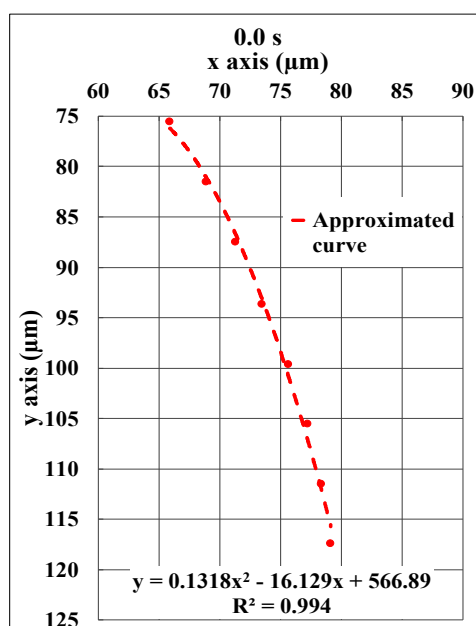
(a) $y = 51.1 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

(b) $y = 69.8 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

図 3.11 細胞膜付近のアクチンフィラメントの振幅変化

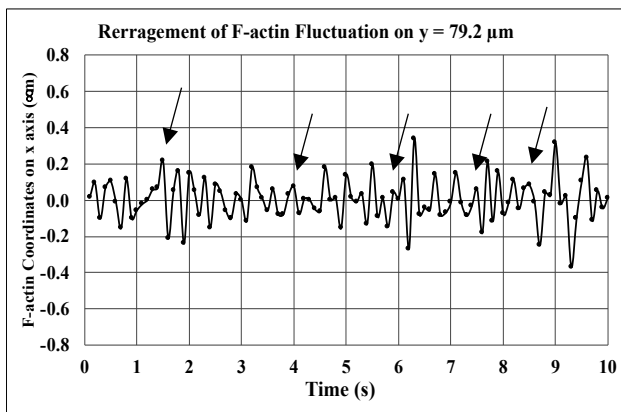


(a) 生細胞内の細胞膜付近アクチンフィラメント

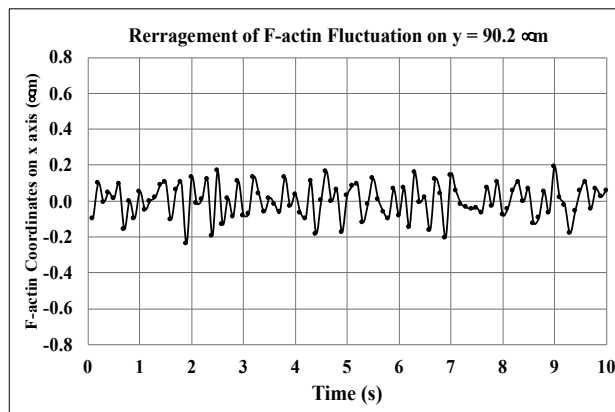


(b) 細胞膜付近アクチンフィラメントの超解像度画像

図 3.12 生細胞膜付近のアクチンフィラメント画像

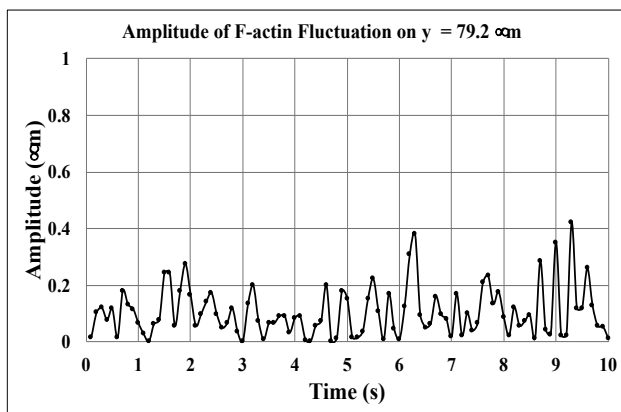


(a) $y = 79.2 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

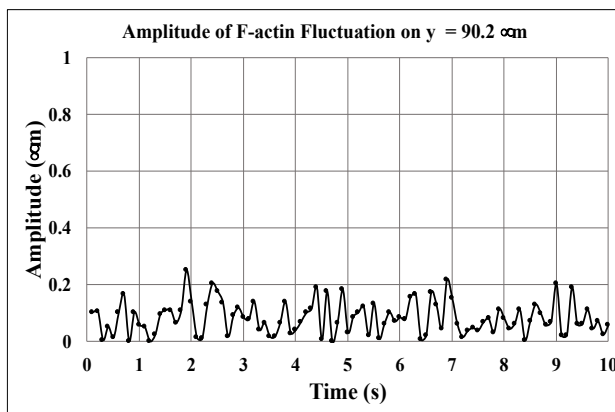


(b) $y = 90.2 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

図 3.13 細胞膜付近アクチンフィラメントの x 軸上変位



(a) $y = 79.2 \mu\text{m}$ でのゆらぎ



(b) $y = 90.2 \mu\text{m}$ でのゆらぎ

図 3.14 細胞膜付近アクチンフィラメントの振幅変化

3.4. 考察

本研究では、アクチンフィラメントの蛍光画像に擬似的な超解像度画像解析手法を使用し、高解像度画像でのアクチンフィラメントのゆらぎの観察を試みた。図 3.5 の擬似的な超解像度画像は、図 3.4 の細胞の中央付近、膜付近のアクチンフィラメント画像を元に作製した。超解像度画像は、アクチンフィラメントが張力を発生した構造体であることから二次関数の近似曲線を使用した。これらの二次関数の近似曲線の決定係数 R^2 は、0.9 以上であったことから座標点に沿った近似曲線であった。さらに、図 3.6 に示すように蛍光画像と擬似的な超解像度画像のアクチンフィラメントの一致性が高かった。このことから、擬似的な超解像度画像解析手法で得られた像の再現度は高かった。さらに、図 3.7 に示すように解析ソフト Image J の輝度分布の解析ツールの解像度は、約 $0.08 \mu\text{m}$ であった。この解析ツールでの位置座標を参考にしたことにより、擬似的な超解像度画像解析手法では、空間分解能を擬似的に 2.5 倍向上した。この擬似的な超解像度画像の近似曲線の二次関数をアクチンフィラメントとして観察することによって、アクチンフィラメントのゆらぎをより詳細に解析を可能にした。

図 3.8, 図 3.9, 図 3.10, 図 3.11 に示すように細胞の中央付近、膜付近でアクチンフィラメントのゆらぎを観察した。このゆらぎは、図 3.13, 図 3.14 に示すように他の細胞の膜付近のアクチンフィラメントでも観察された。図 3.9, 図 3.11, 図 3.14 のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅から、蛍光顕微鏡の空間分解能 $0.2 \mu\text{m}$ より小さい値の振幅の評価が行えた。図 3.8, 図 3.10, 図 3.13 に示すようにアクチンフィラメントの x 軸上のゆらぎの変化は、1 本のアクチンフィラメント上でも観察した位置によって異なるゆらぎの変化のパターンを見せた。これは、1 本のアクチンフィラメント上の場所ごとでの構造の違いが関係していると考えられる。観察したアクチンフィラメントは、画像では確認

できないアクチンフィラメントが接着し、1本のアクチンフィラメント上で力学状態が異なる。また、細胞内の場所によってアクチンフィラメント、ストレスファイバーの力学特性が異なることが報告されている (Tanner, et al., 2010)。これらの理由から、1本のアクチンフィラメント上で他のアクチンフィラメントなどから影響を受けたことにより、異なったゆらぎのパターンが観察されたと考えられる。

本研究では、観察したアクチンフィラメントの x 軸上の往復運動からゆらぎの周波数を約 3 Hz とした。これは、フーリエ解析によってアクチンフィラメントのゆらぎに特定の周波数が確認されなかったためである。このゆらぎに特定の周波数が確認できなかった理由として、観察したアクチンフィラメント自体の構造や観察方法が関係していると考えられる。本研究で観察したアクチンフィラメントは、比較的太いフィラメント構造であったためミオシンライトチェーンを含んだストレスファイバーであったことが考えられる。単純な細いアクチンフィラメントに比べ、複雑な構造のストレスファイバーを観察したことでゆらぎが複雑になったと考えられる。また、実験装置の性能から 10 Hz のシャッター速度でアクチンフィラメントのゆらぎを二次元平面上で観察した。しかし、アクチンフィラメントゆらぎは、三次元方向にランダムに変化し、より高速にゆらいでいることが考えられる。このため、ゆらぎの評価に使用したデータが断片化し、実際の周波数が解析できなかったと考えられる。このため、より速いシャッター速度でアクチンフィラメントを三次元的に観察し、ゆらぎを解析することが望ましい。

3.5. 結言

本章では、アクチンフィラメントのゆらぎを擬似的な超解像度画像解析手法によって解析した。この擬似的な超解像度画像解析手法により、蛍光顕微鏡の空間分解能より小さい値の振幅のゆらぎの観察、解析した。このアクチンフィラメントゆらぎは、1本のフィラメント構造上でも異なるパターンが確認され、他のアクチンフィラメントやタンパク質構造体からの影響を受けていることが示唆された。さらに、アクチンフィラメントのゆらぎをより詳細に観察するためには、より高速なシャッター速度での三次元的な観察が必要である。

第4章

アクチンフィラメントネットワーク内のゆらぎの関係性の解析

4.1. 緒言

第3章では、他のアクチンフィラメントやタンパク質構造体からの張力などの影響で、アクチンフィラメント上の場所によって異なるゆらぎのパターンを確認した。細胞内では、アクチンフィラメント同士、微小管、細胞核や焦点接着斑と接着し、ネットワーク構造を構築している。このネットワーク構造と細胞膜を介して、細胞内の力学刺激の伝達を行っていることが知られている

(Colin and Helmke, 2008) (Uray and Uray, 2021)。この力学刺激を伝達しているネットワーク構造では、タンパク質構造体同士がお互いで影響を与え合うことから、それらの挙動には何らかの関係性があることが考えられる。このため、1本のアクチンフィラメントではなく、ネットワーク構造全体でアクチンフィラメントの関係性の解析が必要である。本章では、生細胞内のアクチンフィラメントネットワーク構造内のゆらぎの振幅の変化の相関を解析し、その関係性を調べた。

4.2. 実験方法

4.2.1. 細胞の培養方法

実験には、Lifeact-GFP を遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞 (NIH3T3) を使用した。細胞培養に使用する培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 100 mL に対して、10 mL の新生児仔ウシ血清 (Newborn Calf Serum ; NBCS) と 1 mL の 10000 units/ml ペニシリンストレプトマイシン (10000units/ml Penicillin-Streptomycin) を加えて調製した。細胞培養に使用する 25 cm² 培養用フラスコに 0.1 %ゼラチン溶液を 3 mL 入れ、紫外線下で 30 分間静置し、ゼラチンコートした。ゼラチンコートしたフラスコに、解凍した細胞を含んだ溶液 1mL とダルベッコ改変イーグル培地 + 新生児仔ウシ血清 + ペニシリンストレプトマイシンの培地 4 mL を入れた。このフラスコは、温度 37°C、湿度 100%及び、CO₂濃度 5 %に保たれたインキュベータ内に静置した。細胞を解凍した翌日に、細胞がフラスコ底面に付着していることを確認し、培地 5 mL を交換した。

4.2.2. 細胞継代方法

底面を細胞が 8 割ほど覆った状態になったフラスコは、新しいフラスコに細胞を移し、細胞数を増やす継代作業を行なった。細胞を培養したフラスコ内の培地を除き、37°Cに温めたリン酸緩衝生理食塩水 (-) 溶液でフラスコ内を 2 回洗浄した。洗浄したフラスコにトリプシンを 200 µL を入れ、5 分間静置し、細胞を剥離させた。このフラスコに培地 20 mL 入れた。細胞を含んだ培地は、ゼラチンコートしたフラスコ 4 個に 5 mL ずつ分けた。実験に使用する細胞は、直径 20 mm ガラスボトムディッシュに培地 2 mL と播種した。これらのフラス

コまたは、ガラスボトムディッシュは、温度 37 °C、湿度 100 %及び、CO₂濃度 5 %に保たれたインキュベータ内に静置した。

4.2.3. 生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法

アクチンフィラメントの撮影は、暗室で行った。顕微鏡 IX70 のステージ上に簡易インキュベータを設置し、37°Cまで加温した。N₂+O₂+CO₂混合ガスポンベの栓を開き、インキュベータ内のCO₂濃度が5%を保った。簡易インキュベータ内にLifeact-GFPを遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞を培養したガラスボトムディッシュを静置した。細胞内のアクチンフィラメントは、488 nm レーザーユニットから照射し、共焦点レーザーユニット Yokogawa CSU10 を通した波長 488 nm のレーザーによって励起した。アクチンフィラメントの蛍光像は、CMOS カメラによって、露光時間 70 ms、シャッター速度 0.1 s の条件で撮影した。

4.2.4. 擬似的な超解像度画像解析手法

撮影された蛍光画像は、画像解析ソフトウェア Image J の画像処理ツール Gaussian Blur によって画像のスムージングを行なった。このガウス関数の標準偏差 σ を 0.7 に設定した。アクチンフィラメントに垂直になる様に画像上に設けられた輝度分布の観察線上の輝度分布を解析した。この輝度分布上のアクチンフィラメントの輝度のピーク値の座標をアクチンフィラメントの位置座標とした。この座標をアクチンフィラメント上で 10 点前後取得し、これらの座標から二次関数の近似曲線を得た。この近似曲線の二次関数をアクチンフィラメントとしてゆらぎを解析した。

4.2.5. アクチンフィラメントのゆらぎの解析方法

0.1 s 間のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅 L は、擬似的な超解像度画像解析手法により得られた近似曲線の二次関数から求めた。変位後のアクチンフィラメントの近似曲線の二次関数の法線上の位置変化をゆらぎの振幅とした。式 (4.1) に変位前のアクチンフィラメントの近似曲線、式 (4.2) に変位後のアクチンフィラメントの近似曲線の二次関数を示す。

$$f_1(x) = a_1x^2 + b_1x + c_1 \quad (4.1)$$

$$f_2(x) = a_2x^2 + b_2x + c_2 \quad (4.2)$$

変位後のアクチンフィラメント上の点 $B (p_2, f_2(p_2))$ の法線を式 (4.3) から求めた。

$$y = -\frac{1}{f_2'(p_2)}(x - p_2) + f_2(p_2) \quad (4.3)$$

この法線と変位前のアクチンフィラメント二次関数の交点の x 座標 p_1 を式 (4.4) によって求めた。

$$p_1 = \frac{-b_1 \pm \sqrt{b_1^2 - 4a_1c_1}}{2a_1} \quad (4.4)$$

a_1

$$b' = b_1 + \frac{1}{f_2'(p_2)} p_2$$
$$c' = c_1 - f_2'(p_2) - \frac{1}{f_2'(p_2)} p_2$$

式(4.5)により，アクチンフィラメント上の座標点 A ($p_1, f_1(p_1)$) ，点 B ($p_2, f_2(p_2)$) 間の距離を求めた．この点 A と点 B の距離を 0.1 s 間のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅とした．

$$\text{Amplitude} = \sqrt{(p_2 - p_1)^2 + (f_2(p_2) - f_1(p_1))^2} \quad (4.5)$$

4.2.6. ゆらぎの振幅の相関の解析方法

図 4.1 にアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の相関解析方法を示す．式 (4.6) により，観察時間内のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の平均値 \bar{L} を求めた．この式内のデータ数 n は，0.1 s のシャッター速度で 10 s 間撮影したため 100 となる．

$$\bar{L} = \frac{L_1 + L_2 + L_3 + \dots + L_n}{n} \quad (4.6)$$

式 (4.7) により，アクチンフィラメントのゆらぎ振幅の相関係数 r を求めた．ここでの L_{Ai} ， L_{Bi} は，それぞれのアクチンフィラメントのゆらぎの振幅である． \bar{L}_A ， \bar{L}_B は，それぞれのアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の平均値である．

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (L_{Ai} - \bar{L}_A)(L_{Bi} - \bar{L}_B)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (L_{Ai} - \bar{L}_A)^2 (L_{Bi} - \bar{L}_B)^2}} \quad (4.7)$$

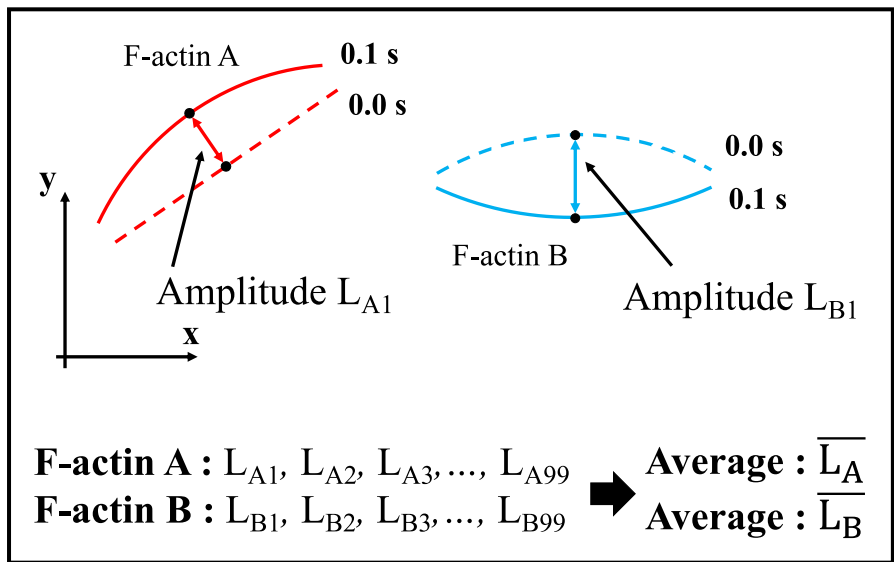
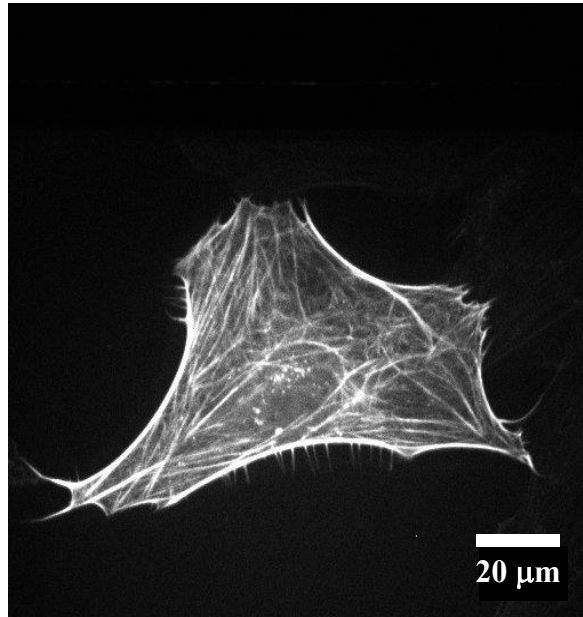


図 4.1 アクチンフィラメントのゆらぎの相関解析

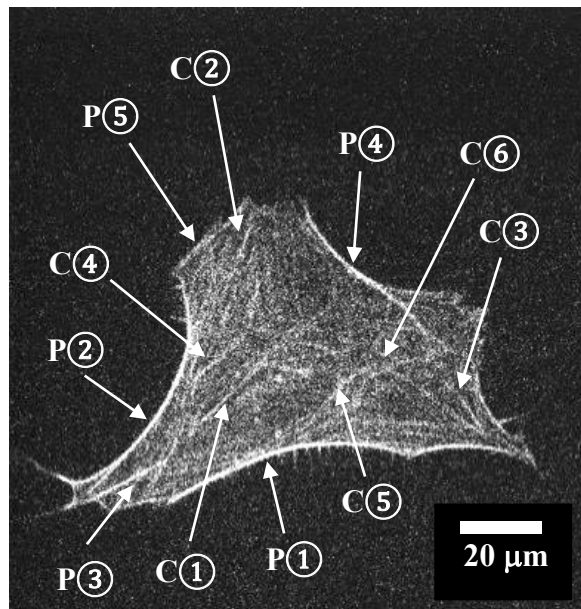
4.3. 実験結果

図 4.2 に、観察した生細胞内アクチンフィラメントのネットワーク構造を示す。図 4.2 (a) は、露光時間 1 s で撮影した生細胞内アクチンフィラメントネットワーク構造であり、図 4.2 (b) は露光時間 70 ms, シャッター速度 0.1s で撮影したアクチンフィラメントネットワーク構造である。図 4.2 (b) でフィラメント構造が確認可能なアクチンフィラメントを細胞中央付近 (C①~⑥) と細胞膜付近 (P①~P⑤) に分け、ゆらぎの解析を行なった。図 4.3 にアクチンフィラメントネットワーク構造の擬似的な超解像度画像を示す。これらの近似曲線の決定係数 R^2 は、0.9 以上である。図 4.4 に細胞中央付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の代表例として、F-actin C①と F-actin C③の 10 s 間のゆらぎの振幅の変化を示す。図 4.5 に細胞中央付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の代表例として、F-actin P①と F-actin P③の 10 s 間のゆらぎの振幅の変化を示す。表 4.1 に細胞中央付近と細胞膜付近のアクチンフィラメントの最大振幅、最小振幅及び、平均値を示す。このゆらぎの観察で、細胞中央付近及び、細胞膜付近でアクチンフィラメントのゆらぎを確認した。このアクチンフィラメントのゆらぎには、細胞中央付近と細胞膜付近の場所の違いによる異なる傾向は確認されなかった。表 4.2 にネットワーク内のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の相関係数を示す。ゆらぎの振幅の相関係数は、最大で 0.23 や -0.21 と弱い相関であり、ほとんどのアクチンフィラメントのゆらぎには相関はなかった。図 4.6 に他の細胞のアクチンフィラメントを示す。黄色の観察線を $y = 51.1 \mu\text{m}$ と $y = 61.1 \mu\text{m}$ に設け、それぞれの y 座標上でゆらぎの相関を求めた。図 4.7 (a) に $y = 61.1 \mu\text{m}$ 上での細胞中央付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の変化を示す。図 4.7 (b) に $y = 61.1 \mu\text{m}$ 上での細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の変化を示す。表 4.3 に図 4.6 の細胞中央付近と細胞膜付近の $y = 51.1 \mu\text{m}$ と $y = 61.1 \mu\text{m}$ でのアクチンフィラメント

のゆらぎの振幅の相関係数を示す。これらの y 座標上で、細胞中央付近と細胞膜付近のアクチンフィラメントのゆらぎの相関はなかった。図 4.8 に細胞中央付近と細胞膜付近のアクチンフィラメントを示す。表 4.4 に示すように、これらのアクチンフィラメントのゆらぎの振幅には相関はなかった。図 4.9 (a) にアクチンフィラメントのネットワーク画像を示す。図 4.9 (b) の矢印で指し示す隣り合ったアクチンフィラメントのゆらぎの解析を行なった。図 4.10 に図 4.9 で示したアクチンフィラメントネットワーク構造の擬似的な超解像度画像を示す。表 4.5 に図 4.10 の擬似的な超解像度画像から解析したそれぞれのアクチンフィラメントのゆらぎの最大、最小及び、平均振幅を示す。これらのアクチンフィラメントのゆらぎの振幅変化の相関を表 4.6 に示す。これらのアクチンフィラメントゆらぎの振幅変化の相関係数は、最大で-0.29 の弱い相関であり、ネットワーク構造内で相関はほとんどなかった。



(a) 露光時間 1s 生細胞内アクチンフィラメントネットワークの静止画



(b) 露光時間 70ms, シャッター速度 0.1s 生細胞内アクチンフィラメント画像

図 4.2 生細胞内のアクチンフィラメントのネットワーク構造

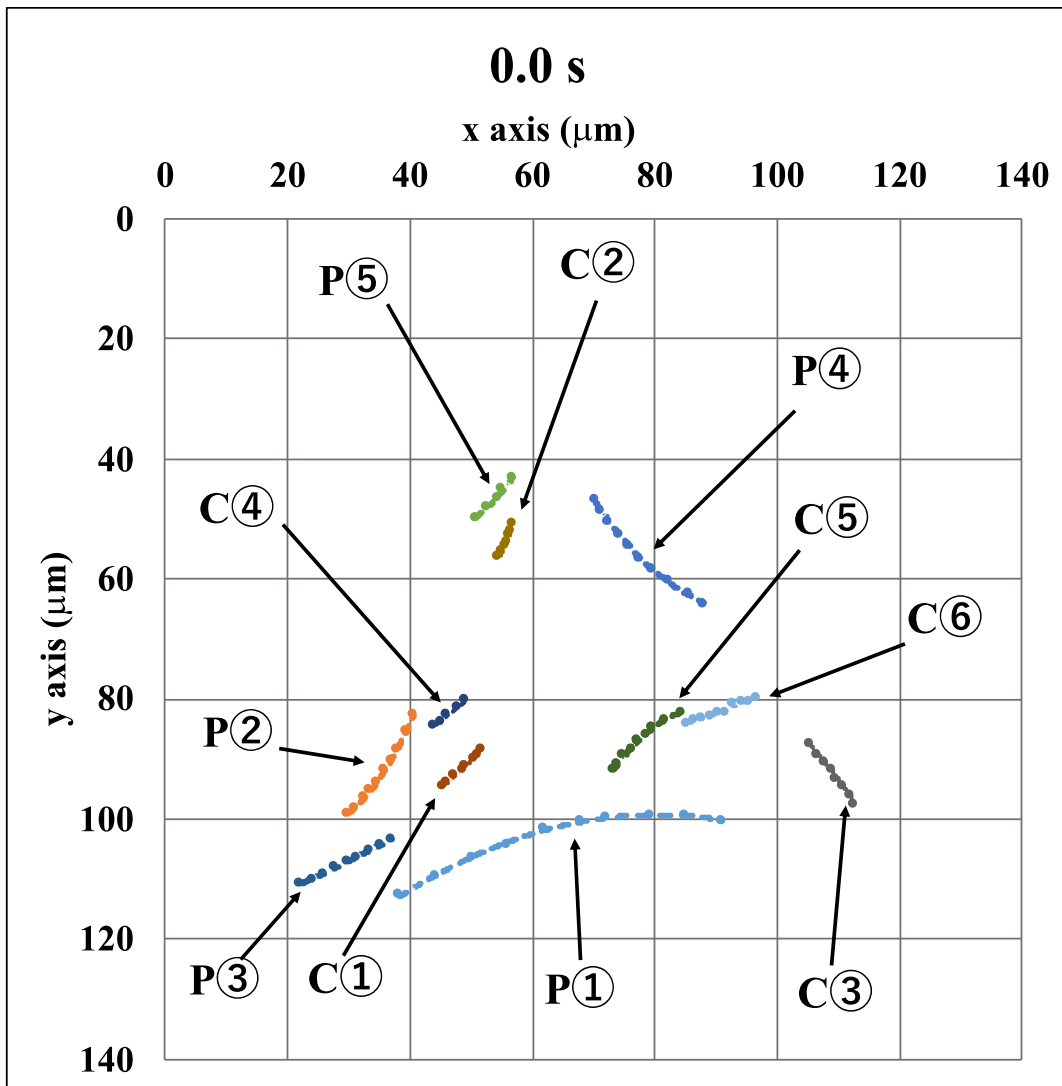
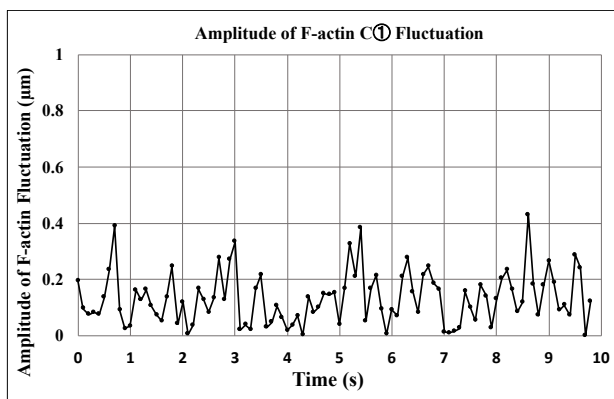
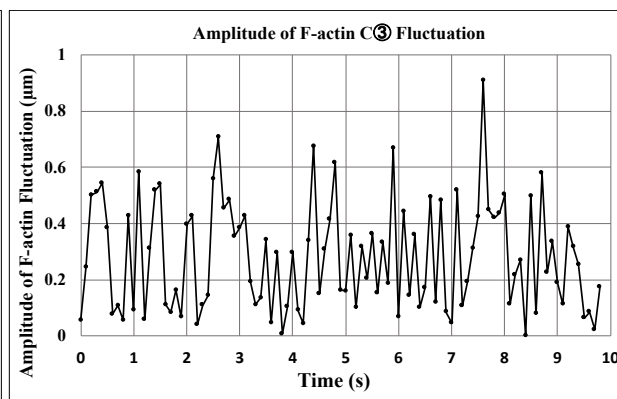


図 4.3 アクチンフィラメントネットワーク構造の擬似的な超解像度画像

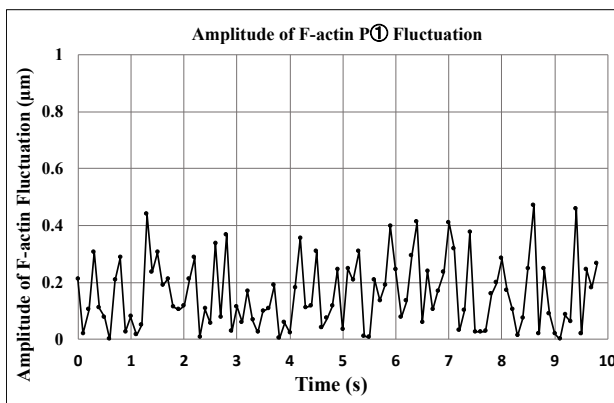


(a) アクチンフィラメント C①の振幅変化

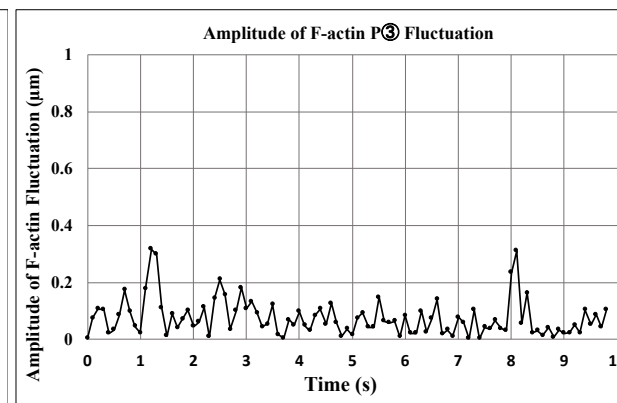


(b) アクチンフィラメント C③の振幅変化

図 4.4 生細胞中央付近のアクチンフィラメント振幅変化



(a) アクチンフィラメント P①の振幅変化



(b) アクチンフィラメント P③の振幅変化

図 4.5 生細胞膜付近のアクチンフィラメント振幅変化

表 4.1 生細胞内アクチンフィラメントのゆらぎの最大振幅, 最小振幅及び,
平均振幅

Actin Filament Fluctuation Amplitude				
		Maximum Amplitude [μm]	Minimum Amplitude [μm]	Average [μm]
Center Region	C①	0.43	0	0.13
	C②	0.67	0	0.17
	C③	0.91	0	0.28
	C④	0.63	0	0.17
	C⑤	0.99	0	0.27
	C⑥	0.85	0	0.29
Peripheral Region	P①	0.47	0	0.16
	P②	0.26	0	0.07
	P③	0.32	0	0.08
	P④	0.94	0	0.29
	P⑤	0.86	0	0.21

表 4.2 生細胞内アクチンフィラメントネットワーク構造内でのゆらぎの振幅
の相関

		Center Region					Peripheral Region				
		C②	C③	C④	C⑤	C⑥	P①	P②	P③	P④	P⑤
Center Region	C①	0.02	-0.01	0.23	-0.18	0.02	0.06	-0.05	0.23	0.03	0.14
	C②		-0.11	-0.03	-0.07	0.11	0.18	-0.02	0.07	0.02	-0.04
	C③			-0.04	-0.03	-0.21	0.00	0.04	0.20	0.15	-0.02
	C④				0.04	0.10	0.06	-0.16	0.20	0.00	0.02
	C⑤					0.10	-0.12	0.04	0.01	0.02	-0.09
	C⑥						0.07	-0.02	-0.11	0.18	-0.12
Peripheral Region	P①							-0.10	0.04	-0.07	0.07
	P②								0.00	0.03	0.05
	P③									0.07	0.01
	P④										0.10

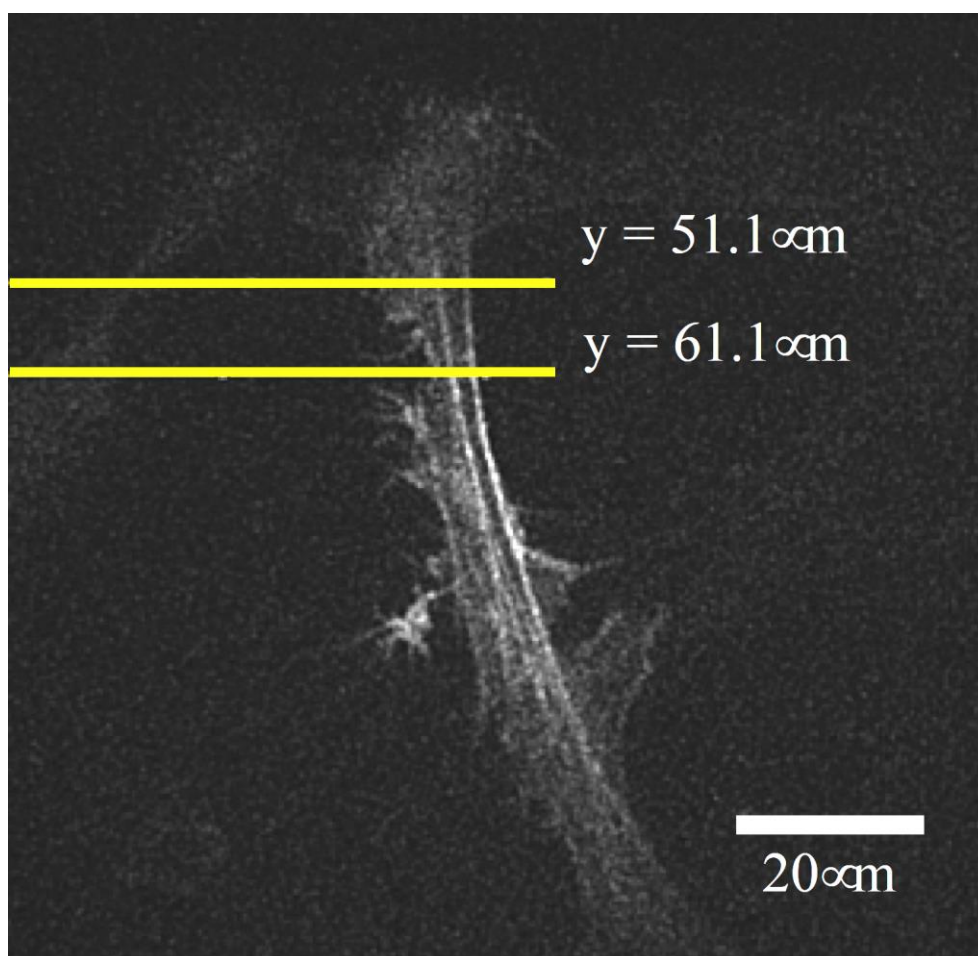
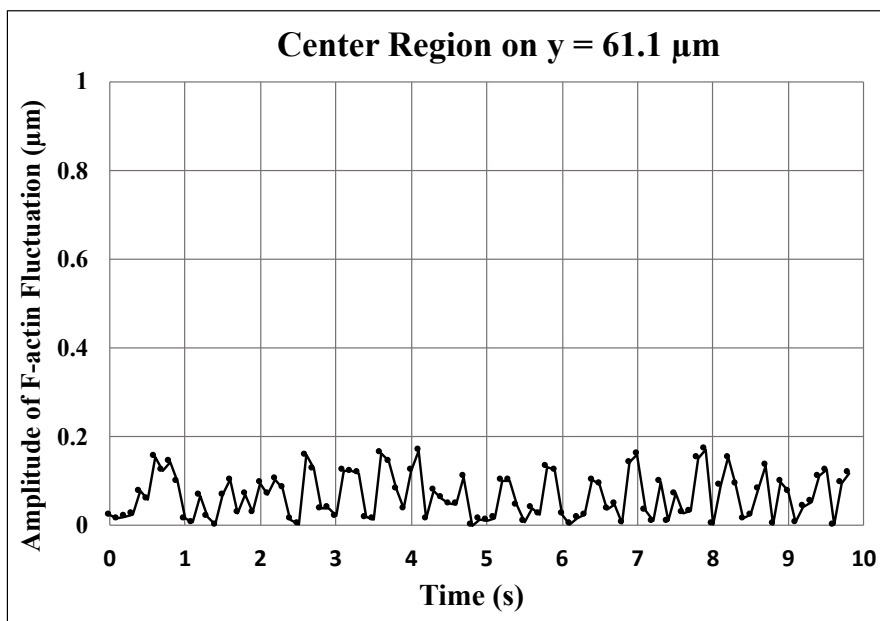
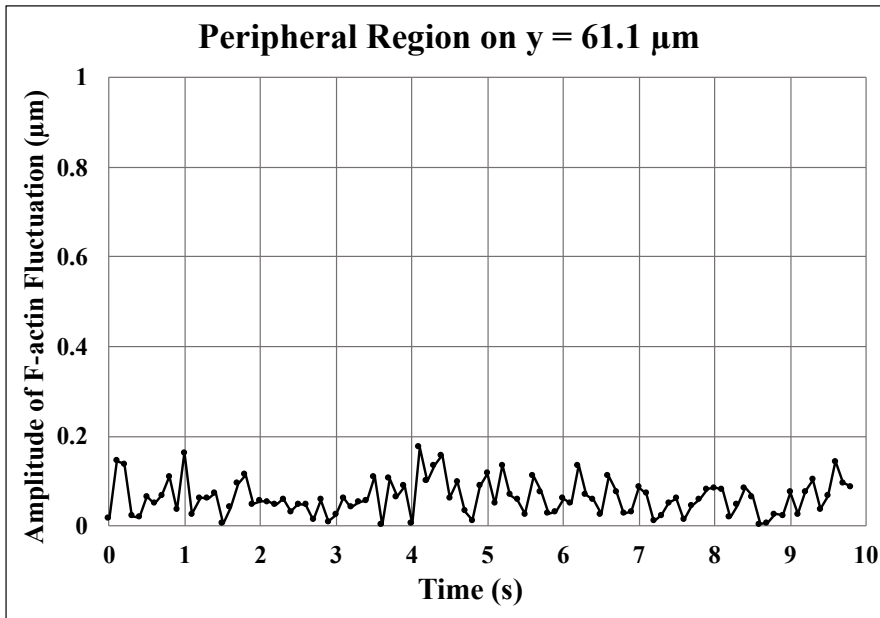


図 4.6 アクチンフィラメントのゆらぎの観察線座標



(a) 細胞中央付近のアクチンフィラメントゆらぎ



(b) 細胞膜付近のアクチンフィラメントゆらぎ

図 4.7 座標 $x = 61.1 \mu\text{m}$ 上でのアクチンフィラメントのゆらぎの振幅変化

表 4.3 アクチンフィラメントのゆらぎ振幅の相関係数

Correlation Coefficient of F-actin Fluctuation	
$y = 51.1 \text{ } [\mu\text{m}]$	-0.03
$y = 61.1 \text{ } [\mu\text{m}]$	0.14

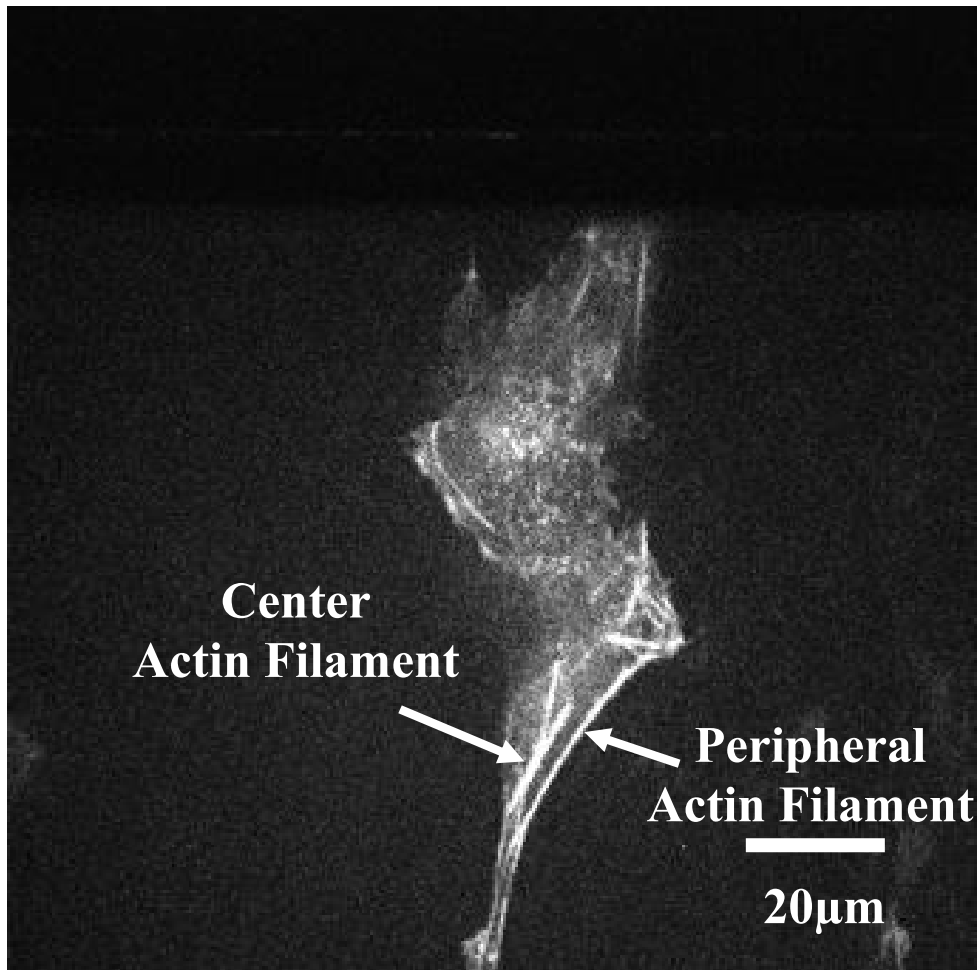
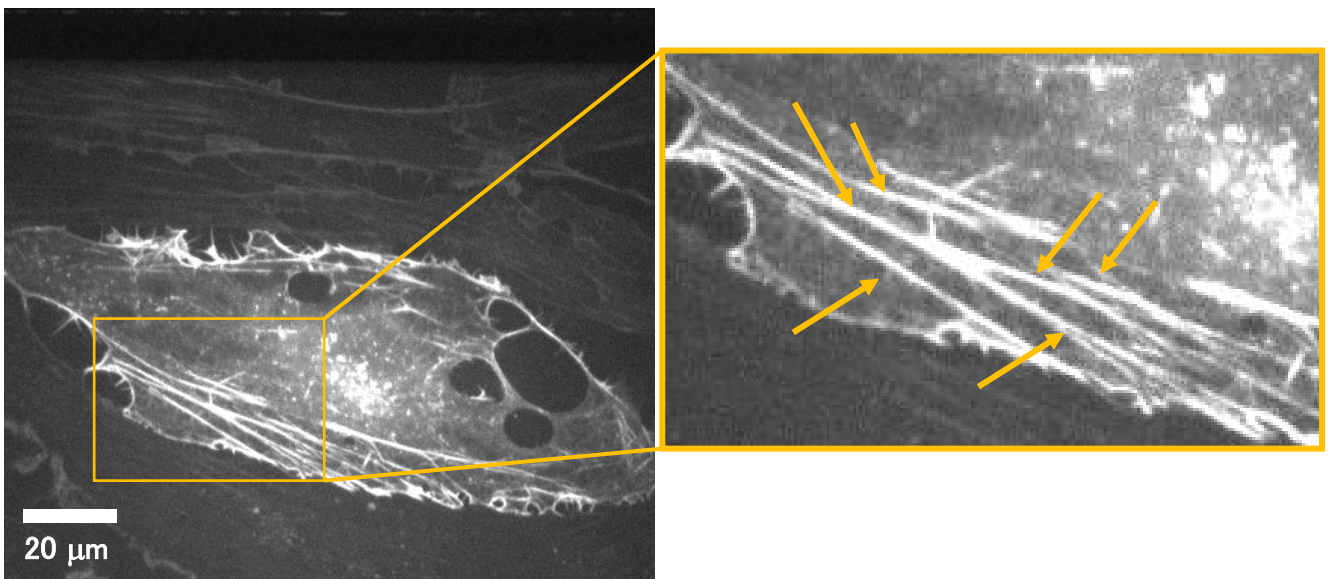


図 4.8 細胞中央付近，細胞膜付近のアクチンフィラメント

表 4.4 アクチンフィラメントのゆらぎの最大，最小，平均振幅及び，振幅の相関係数

Actin Filaments Fluctuation Amplitude			
	Maximum Amplitude [μm]	Minimum Amplitude [μm]	Average [μm]
Center Region	0.54	0	0.19
Periphrral Region	0.51	0	0.17
Correlation Cefficient		0.04	



(a) アクチンフィラメントネットワーク全体像 (b) ネットワーク内の観察対象アクチンフィラメント

図 4.9 生細胞内アクチンフィラメントネットワーク画像

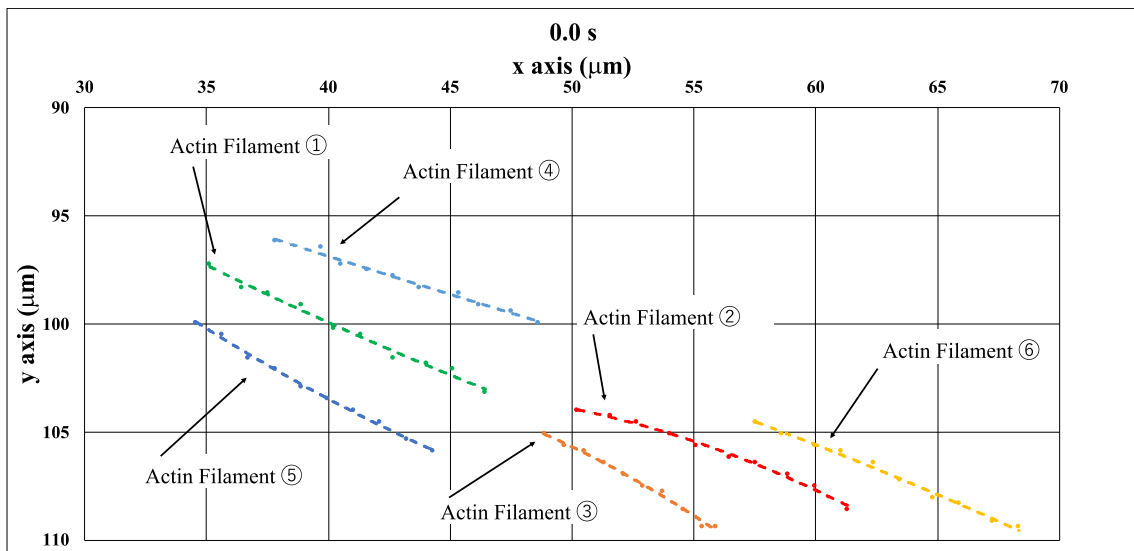


図 4.10 アクチンフィラメントネットワーク構造の擬似的な超解像度画像

表 4.5 アクチンフィラメントのゆらぎ振幅の最大, 最小及び, 平均振幅

F-actin Fluctuation Amplitude			
	Maximum Amplitude [μm]	Minimum Amplitude [μm]	Average [μm]
F-actin ①	0.57	0	0.15
F-actin ②	0.48	0	0.15
F-actin ③	0.61	0	0.19
F-actin ④	0.57	0	0.20
F-actin ⑤	0.58	0	0.15
F-actin ⑥	0.78	0	0.21

表 4.6 ネットワーク内のアクチンフィラメントのゆらぎ振幅の相関係数

Correlation Coeicients of Actin Filaments Fluctuation					
	F-actin ②	F-actin ③	F-actin ④	F-actin ⑤	F-actin ⑥
F-actin ①	-0.09	0.08	0.09	-0.11	0.09
F-actin ②		-0.05	0.12	0.07	-0.02
F-actin ③			-0.29	0.05	0.04
F-actin ④				-0.01	-0.10
F-actin ⑤					-0.14

4.4. 考察

ネットワーク構造内でのアクチンフィラメントのゆらぎの解析を行なった。図 4.2 (a) に示す静止画像では、細いフィラメント構造から太いフィラメント構造が確認されたが、図 4.2 (b) の動画では像が粗く、細いアクチンフィラメントは観察できなかった。図 4.3 は、4.2 (b) から得られた擬似的な超解像度画像である。この擬似的な超解像度画像のアクチンフィラメント像は、比較的に長いものから短いものまでさまざまであった。アクチンフィラメント両端からの中間点がゆらぎの振幅が最も大きくなるとした。この前提のもと、画像で確認可能なアクチンフィラメント両端からの中間点でゆらぎを観察した。表 4.1 に示されたように細胞中央付近と細胞膜付近のアクチンフィラメントの最大値や平均値に細胞中央付近、細胞膜付近の細胞内の場所ごとでのゆらぎの傾向の違いは確認されなかった。これは、観察したアクチンフィラメント周りの他のアクチンフィラメントやタンパク質構造体の構造の違いによる影響が大きく関係していることが考えられる。さらに本研究で観察したタンパク質構造体は、アクチンフィラメントのみで二次元平面上であった。このため、三次元的にアクチンフィラメント及び、他のタンパク質構造体のネットワーク構造を把握し、ゆらぎを観察する必要がある。

細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの振幅の変化の相関をネットワーク構造内で解析した。これらのゆらぎの解析は、動画で像が確認可能であったアクチンフィラメントのみである。図 4.3 のネットワーク構造内でのゆらぎの相関係数は、最大で 0.23 であり、相関はほとんどなかった。表 4.3 や表 4.4 のように、他の細胞内のアクチンフィラメントでも強い相関は確認されなかった。これは、図 4.9 のような比較的に隣り合ったアクチンフィラメントのネットワーク構造内でも同様であった。このことから、アクチンフィラメントは、細胞内のネットワーク構造が一体になってゆらいでいるのではなく、独立してゆら

いることが考えられる。この独立したゆらぎは、それぞれがランダムにゆらいでいることが考えられる。このことから、アクチンフィラメントが接着しているタンパク質構造体、またはアクチンフィラメント同士の接着箇所には、細胞に流れや伸展などの力学刺激が負荷されていない状態でもゆらぎによるひずみ、応力が発生していると考えられる。また、今回のゆらぎの関係性の解析は、10 Hz のシャッター速度、二次元平面で観察したアクチンフィラメントのゆらぎである。より高い時間解像度または、三次元的に観察したゆらぎのデータから得られる相関係数は、今回の実験結果と異なるゆらぎの関係を示す可能性も考えられる。

4.5. 結言

本章では、擬似的な超解像度画像解析手法により解析したアクチンフィラメントのゆらぎの関係性をネットワーク構造内の複数本のアクチンフィラメントで解析した。このネットワーク構造内でのアクチンフィラメントのゆらぎの相関は非常に弱かった。これにより、ネットワーク構造体が一体となってゆらいでいるのではなく、それぞれのアクチンフィラメントが独立してゆらいでいることが示唆された。

第 5 章

アクチンフィラメント接着部のひずみの解析

5.1. 緒言

第 4 章では、生細胞内のネットワーク構造内でのアクチンフィラメントのゆらぎの解析を行った結果、それぞれのアクチンフィラメントは独立してゆらいることが示唆された。このことから、細胞内のアクチンフィラメントが接着している箇所には、細胞に力学刺激が負荷されていない静置培養状態でもひずみ、それによる応力が発生していることが考えられた。本章では、生細胞内のアクチンフィラメントで鮮明に確認されたアクチンフィラメントの接着部位でのゆらぎによるひずみを解析した。このひずみの解析によって、細胞内のアクチンフィラメントが接着している箇所の力学状態を調べた。

5.2. 実験方法

5.2.1. 細胞の培養方法

実験には、Lifeact-GFP を遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞 (NIH3T3) を使用した。細胞培養に使用する培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 100 mL に対して、10 mL の新生児仔ウシ血清 (Newborn Calf Serum ; NBCS) と 1 mL の 10000 units/ml ペニシリンストレプトマイシン (10000units/ml Penicillin-Streptomycin) を加えて調製した。細胞培養に使用する 25 cm² 培養用フラスコに 0.1%ゼラチン溶液を 3 mL 入れ、紫外線下で 30 分

間静置し，ゼラチンコートした．ゼラチンコートしたフラスコに，解凍した細胞を含んだ溶液 1 mL とダルベッコ改変イーグル培地 + 新生児仔ウシ血清 + ペニシリンストレプトマイシンの培地 4 mL を入れた．このフラスコは，温度 37°C，湿度 100%及び，CO₂濃度 5%に保たれたインキュベータ内に静置した．細胞を解凍した翌日に，細胞がフラスコ底面に付着していることを確認し，培地 5 mL を交換した．

5.2.2 細胞の継代方法

底面を細胞が 8 割ほど覆った状態になったフラスコは，新しいフラスコに細胞を移し，細胞数を増やす継代作業を行なった．細胞を培養したフラスコ内の培地を除き，37°Cに温めたリン酸緩衝生理食塩水 (-) 溶液でフラスコ内を 2 回洗浄した．洗浄したフラスコにトリプシンを 200 µL を入れ，5 分間静置し，細胞を剥離させた．このフラスコに培地 20 mL 入れた．細胞を含んだ培地は，ゼラチンコートしたフラスコ 4 個に 5 mL ずつ分けた．実験に使用する細胞は，直径 20 mm ガラスボトムディッシュに培地 2 mL と播種した．これらのフラスコまたは，ガラスボトムディッシュは，温度 37 °C，湿度 100 %及び，CO₂濃度 5 %に保たれたインキュベータ内に静置した．

5.2.3. 生細胞内アクチンフィラメントの撮影方法

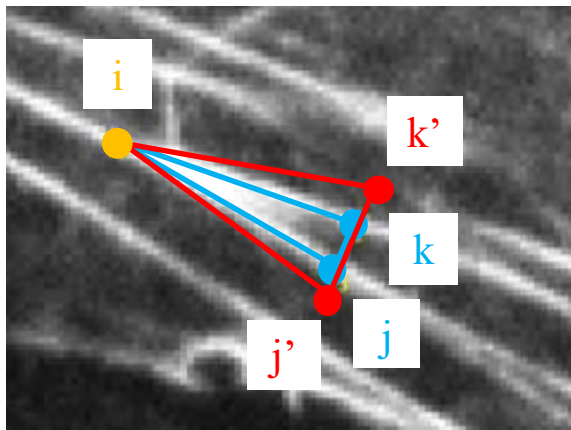
アクチンフィラメントの撮影は，暗室で行った．顕微鏡 IX70 のステージ上に簡易インキュベータを設置し，37°Cまで加温した．N₂+O₂+CO₂混合ガスボンベの栓を開き，インキュベータ内の CO₂濃度が 5%を保った．簡易インキュベータ内に Lifeact-GFP を遺伝子導入したマウス胎児皮膚由来株化細胞を培養したガラスボトムディッシュを静置した．細胞内のアクチンフィラメントは，

488 nm レーザーユニットから照射し，共焦点レーザーユニット Yokogawa CSU10 を通した波長 488 nm のレーザーによって励起した．アクチンフィラメントの蛍光像は，CMOS カメラによって，露光時間 70 ms，シャッター速度 0.1 s の条件で撮影した．

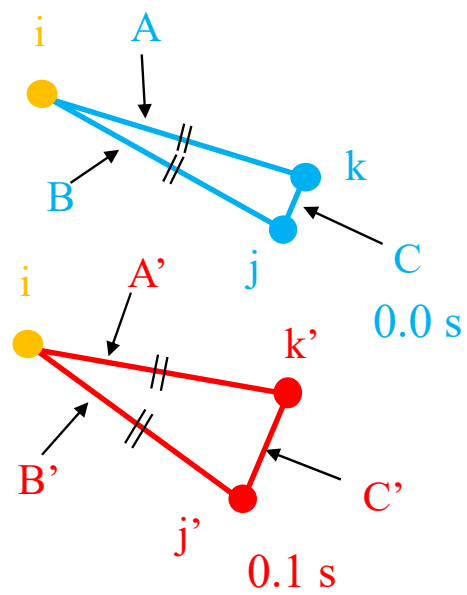
5.2.4. アクチンフィラメント接着点のひずみ解析方法

図 5.1 に 3 本のアクチンフィラメントが接着した点でのひずみの解析方法を示す．図 5.1 (a) のように 3 本の各アクチンフィラメント上に観察点 i, j 及び k を設定した．図 5.1 (b) のように辺 A と辺 B の長さが点 i から $10 \mu\text{m}$ になる座標に観察点 j, k をそれぞれのアクチンフィラメント上に設定した．ここで，観察点 i の位置座標及び，辺 A と辺 B の長さは観察時間内で変化しない．この三角形の辺 C の長さの時間経過での変化をアクチンフィラメントのひずみの変化として解析した．式 (5.1) により，観察点 $j (x_j, y_j)$ と $k (x_k, y_k)$ 間の辺 C の長さを求めた．

$$C = \sqrt{(x_j - x_k)^2 + (y_j - y_k)^2} \quad (5.1)$$



$$A = B = A' = B'$$

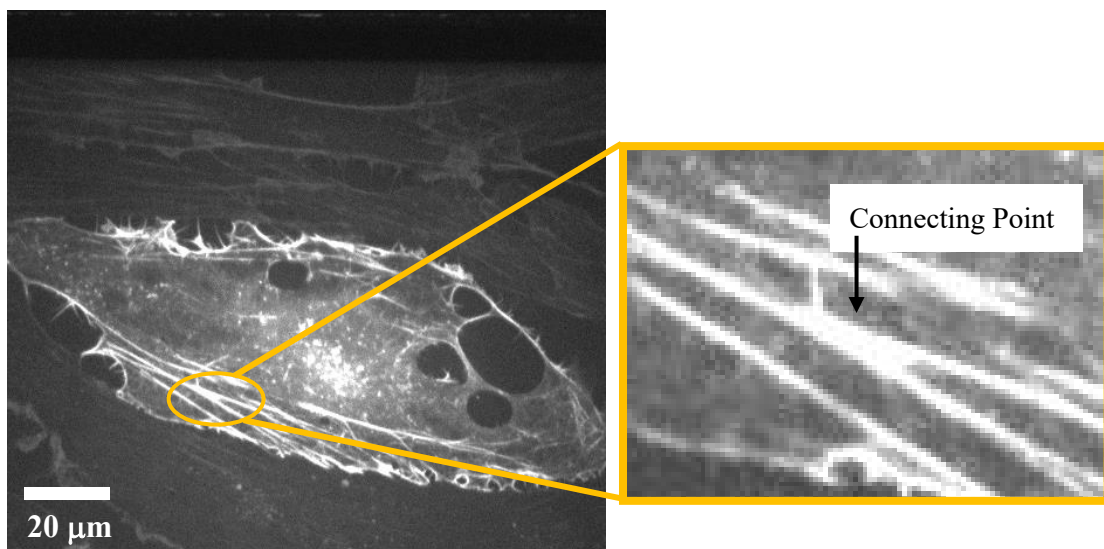


(a) アクチンフィラメント上の座標 (b) アクチンフィラメント上の座標の関係性

図 5.1 3 本のアクチンフィラメント接着点でのひずみ解析

5.3. 実験結果

図 5.2 (a) にアクチンフィラメントの接着点で発生するひずみの解析を行なったアクチンフィラメントネットワーク構造の画像を示す。図 5.2 (b) に解析したアクチンフィラメントの接着点を示す。矢印が指す 3 本のアクチンフィラメントの接着点のひずみを解析した。図 5.3 に接着点の 3 本のアクチンフィラメントの擬似的な超解像画像を示す。接着点付近での像が不鮮明なため、アクチンフィラメント②は接着点まで超解像画像で描写が出来なかった。図 5.4 に接着点を構成している 3 本のアクチンフィラメント上に設定した観察点 i, j 及び, k の座標を示す。観察点 i の座標は, $x = 41.6 \mu\text{m}$ で固定し, 観察点 j, k の座標は観察点 i から $10 \mu\text{m}$ の距離になる座標 $x = 50 \mu\text{m}$ 付近に設定した。これらの座標は, それぞれのアクチンフィラメント像が明瞭な場所に設定した。図 5.5 に 2 s 間の座標点 j-k 間の辺 C の変化を示す。使用した画像の観察時間は, 観察時間内の 2 秒間のアクチンフィラメント像が鮮明であった時間を選択した。座標点 j-k 間の辺 C の長さは観察時間でランダムに変化した。図 5.6 に観察点 i, j 及び, k でのアクチンフィラメントゆらぎによる変位の方向を示す。このゆらぎの方向は, それぞれのアクチンフィラメントで時間によってランダムであった。



(a) 生細胞アクチンフィラメント全体画像 (b) 3本のアクチンフィラメントの接着点

図 5.2 3本のアクチンフィラメント接着点画像

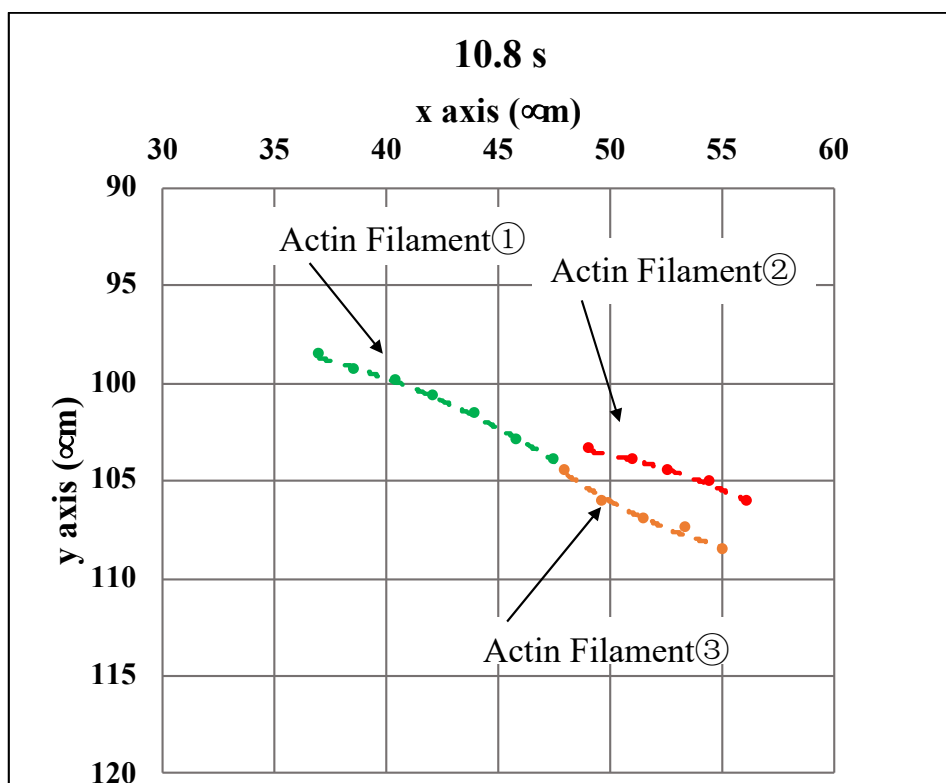


図 5.3 3 本のアクチンフィラメント接着点の擬似的な超解像度画像

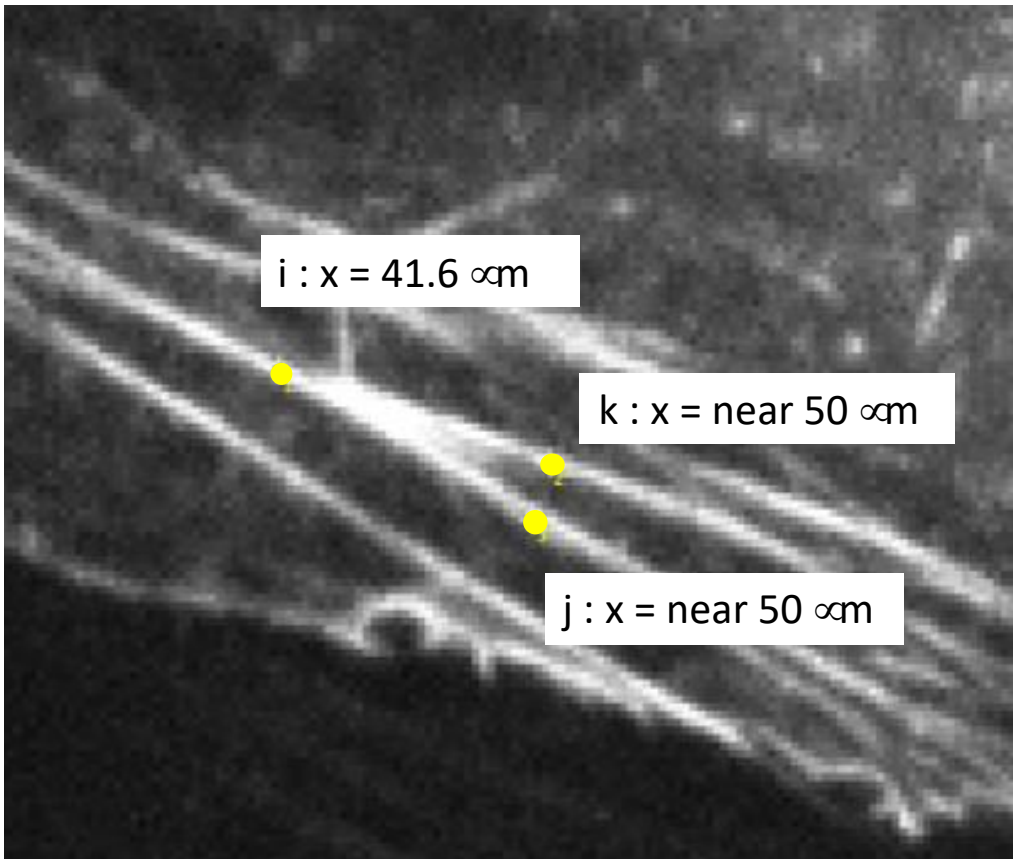


図 5.4 3 本のアクチンフィラメント上のそれぞれの観察点の x 座標

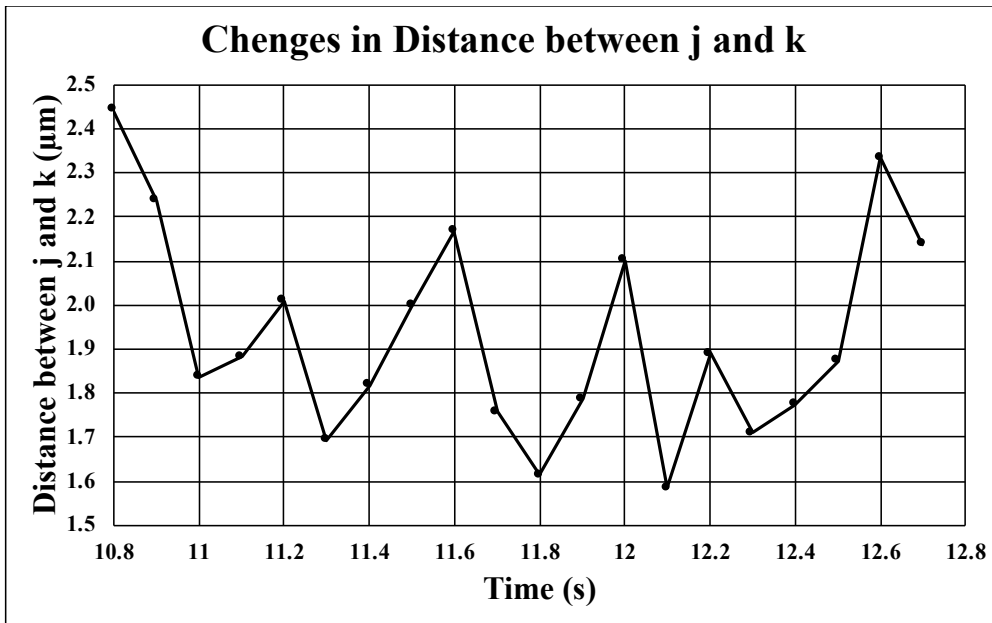


図 5.5 アクチンフィラメントの距離変化

sec	Fluctuation Direction									
	10.9	11.0	11.1	11.2	11.3	11.4	11.5	11.6	11.7	
Point i	↙	↗	↙	↙	↗	↗	↗	↗	↙	
Point j	↙	↙	↗	↙	↙	↗	↙	↗	↙	
Point k	↙	↗	↗	↙	↗	↙	↗	↙	↗	
sec	11.8	11.9	12.0	12.1	12.2	12.3	12.4	12.5	12.6	
Point i	↗	↗	↙	↗	↙	↗	↙	↗	↙	
Point j	↗	↗	↙	↗	↙	↗	↙	↗	↙	
Point k	↙	↗	↗	↙	↗	↗	↙	↙	↗	

図 5.6 それぞれのアクチンフィラメント上の観察点のゆらぎ方向の変化

5.4. 考察

第4章でアクチンフィラメントが独立してゆらいでおり、フィラメント構造同士または、他タンパク質構造体との接着点でひずみが生じていることが示唆された。この示唆から、図5.3で示す3本のアクチンフィラメントの接着点でのゆらぎによって発生するひずみの解析を行なった。この接着点は、動画でも鮮明であり、2秒間の観察、解析が可能なネットワーク構造を選択した。図5.4に示す擬似的な超解像度画像のActin Filament②が接着点まで描写できなかった理由として、接着点の付近の像が太く、フィラメント構造の端の位置が不明瞭であったためである。さらに観察した接着点は、2本のフィラメント構造の接着点であることが考えられるが、アクチンフィラメント像からは接着点の構造を判断できなかったため、3本のアクチンフィラメントの接着点とした。図5.5に示すように時間経過で、Actin Filament②とActin Filament③上の観察点間の距離が変化していたことから、接着点ではゆらぎにより、伸展、圧縮のひずみがランダムに繰り返し減つ性していることが観察された。これらの観察点*i*, *j* 及び *k* では、図5.6のようにアクチンフィラメントはランダムな方向にそれぞれゆらいでいた。このひずみは、アクチンフィラメント同士の接着部のみではなく細胞内に存在するLINC複合体や焦点接着斑などの細胞の力学刺激の感知に関与している可能性のあるタンパク質構造体でも発生していることが考えられる。これらのタンパク質構造体のゆらぎによって発生している細胞内のひずみの状態が細胞の力学刺激の感知に影響を与えていると考えられる。他の研究では、細胞への流れ負荷時に生細胞内の中間径フィラメントのゆらぎが停止する現象が確認されている (Helmke, et al., 2000)。この研究でのシャッター速度は1 Hzよりも遅いが、この結果からアクチンフィラメントでもゆらぎの停止が生じることが考えられる。このアクチンフィラメントのゆらぎが細胞への力学刺激負荷時に停止し、細胞内で発生していたひずみが一時的に消失する現象

は、細胞内の力学状態が変化することから細胞の力学刺激の感知のメカニズムに関与している事が考えられる。このことから、流れによるせん断応力などの負荷による細胞内のタンパク質構造の変形、応答を実時間で観察、解析することは、細胞の力学刺激の感知のメカニズムを知るために非常に重要であることが考えられる。

本研究でのゆらぎによるひずみの解析は、2次元平面上のアクチンフィラメント画像を0.1 sの時間解像度で観察、解析した。しかし実際には、アクチンフィラメントは三次元的により早い周期でゆらいでいることが考えられる。この実験装置による空間的、時間的の制約を解決してゆらぎの観察をするために、モデルを併用したゆらぎの解析が必要である。アクチンフィラメントは、微小管と接着し、張力と圧縮力が釣り合い成り立つテンセグリティ構造を形成していることが考えられている (Wang, et al., 1993) 。このアクチンフィラメント (Deguchi, et al., 2006) (Ueda, et al., 2022) と微小管 (Wells and Aksimentiev, 2010) の物性値を考慮したテンセグリティモデル (Buntara S. G., 2020) を構築し、ゆらぎによるひずみを解析する。微小管のヤング率などは、細胞内のタンパク質状態によって変化する (Kabir, et al., 2014) ことが報告されているので、細胞骨格の物性値の決定には注意が必要である。このモデルを用いた数値解析と実験データを照らし合わせることによって、アクチンフィラメント、タンパク質ネットワーク構造全体の詳細なゆらぎを含めた力学状態の解析が可能であると考えられる。

5.5. 結言

本章では、アクチンフィラメント接着点で発生するひずみの解析を行なった。3本のアクチンフィラメントの接着点では、圧縮と伸展のひずみがランダムに繰り返し発生していた。このことから、静置培養状態であっても細胞内にはゆらぎによるひずみが発生していることが示唆された。さらに、流れを負荷した瞬間にゆらぎが停止することが報告されていることから、細胞内のひずみの発生状態が力学刺激の感知に関与していることが考えられた。

第 6 章

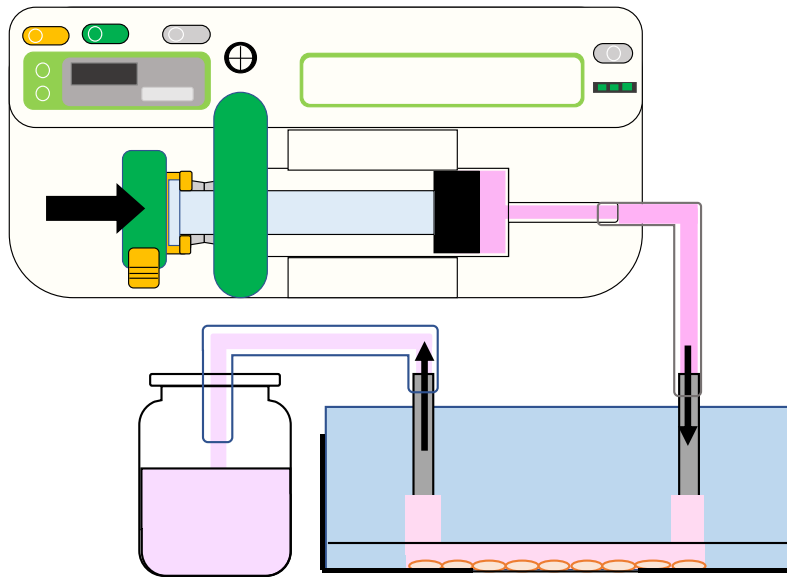
今後の展望

本論文の実験では、静置培養状態の生細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの観察、解析を行なった。今後の研究では、細胞に血流を想定した流れのせん断応力を負荷し、その瞬間のアクチンフィラメントの変形をリアルタイムでの観察、解析する必要がある。内皮細胞は、血流のせん断応力が負荷されると細胞形状は流れ方向に細長く変形し、細胞内のアクチンフィラメントも流れ方向に配向することが知られている。しかし、内皮細胞に流れを負荷した瞬間のアクチンフィラメントの変形を観察した研究はない。内皮細胞のせん断応力などの力学刺激を感知するメカニズムを詳細に知るためにも、力学刺激負荷時の細胞内の力学状態を詳細に解析する必要がある。

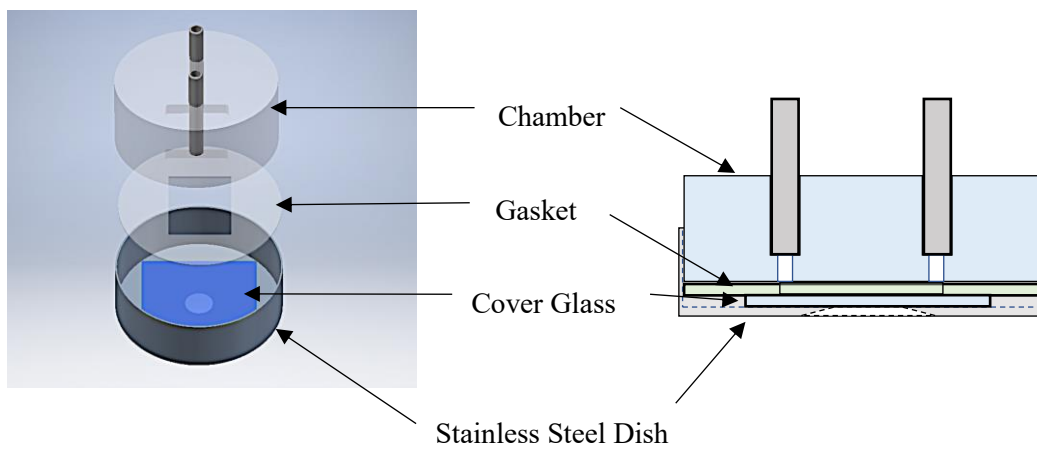
この内皮細胞内のアクチンフィラメントの変形の観察が不可能であった理由として、流れを負荷した瞬間の圧力によりガラスボトムディッシュ底面にひずみが生じる現象がある。このひずみは、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の微小なものであるが蛍光画像でのピント位置から観察対象がずれるには十分な数値であった。このため、図 6.1 (a) と図 6.1 (b) に示すような培養ディッシュを変形の少ないステンレス製のディッシュに変更した流れ実験装置の構築を行なった。このディッシュは、蛍光顕微鏡の油浸対物レンズの直径ほどの穴を開けたステンレス性ディッシュにカバーガラスを貼ることにより、極力変形が生じないようにした。このステンレスディッシュ、流路のガスケット及び、流れを負荷するフローチャンバーを図 6.1 (c) の様にステンレスプレートで強固に固定した。図 6.2 (a) にステンレスディッシュ、図 6.2 (b) にガラスボトムディッシュ上の細胞にせん断応力 $0.1\ \text{Pa}$ の流れを負荷した瞬間の位相差画像を示す。ガラスボトムディッ

シユでは、流れ負荷した瞬間にピントが大幅に変化した。これに対して、ステンレスディッシュでの流れ負荷時には、ガラスボトムディッシュに比べピントのズレはなかった。図 6.3 にステンレスディッシュ上の蛍光タンパク質 Lifact-GFP を遺伝子導入した NIH3T3 に 0.1 Pa の流れを負荷した瞬間の蛍光画像を示す。画像上に矢印で示す様な細胞膜付近に比較的太いアクチンフィラメントが確認した。これらのアクチンフィラメント像は、流れ負荷時のピントのずれは確認されなかった。図 6.4 にステンレスディッシュ上の Lifact-GFP を遺伝子導入した NIH3T3 に中程度の太さの動脈を考慮したせん断応力 1 Pa の流れ（増田，藤原，1994）（安藤，2002）を負荷した瞬間の蛍光画像を示す。画像内で矢印が指し示す黒い円状の影は細胞核であり，周りの細胞質が蛍光していた。このように流れ負荷時に細胞核と発光した細胞質の輪郭に変化がなかったことから，流れ瞬間にステンレスディッシュの変形はなかった。このように，ステンレスディッシュの変形に関する問題は解決したが他の課題も存在する。流れ負荷時に像がスライドして戻る現象が生じた。この現象は，シリンジの初期動作時に設定値以上の流量を駆出していたことや回路を構成するシリコンチューブに圧力が蓄積し，その圧力が解放されることにより生じたと考えられる。また，本研究は実験システムの構築のためにマウスの皮膚株化細胞を使用した。流れのせん断応力に応答する血管内皮細胞を使用することが望ましい。このため，現在は内皮細胞の株化細胞での流れ負荷実験の準備も進めている。この実験によって，得られた細胞内のアクチンフィラメントのネットワーク構造は，モデルを作製し，実験データと比較しながら解析していく予定である。第 5 章で述べた様に細胞内のアクチンフィラメントと微小管によって構成された構造はテンセグリティ構造に似ているとされている。細胞内のアクチンフィラメントと微小管の構造体にテンセグリティ構造を適用し，ゆらぎを考慮した構造変形の解析を行う予定である。このモデルの適用では，4 章での図 4.2 と図 4.9 の様なネットワーク構造を参考にすることが望ましい。さらにアクチン

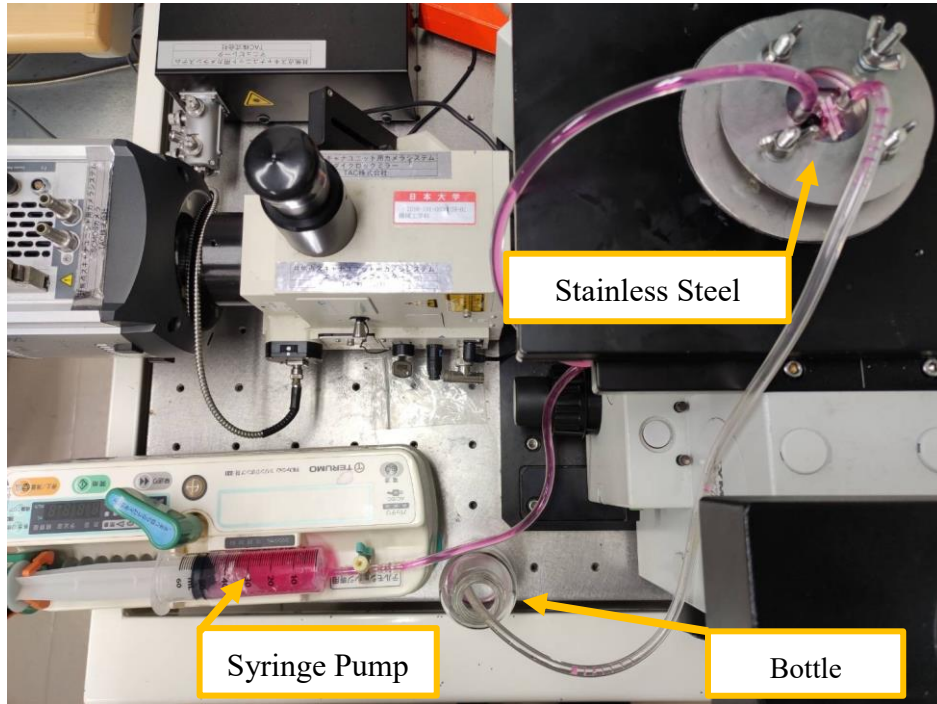
フィラメントはそれぞれのバンドルで直径が異なることや繊維構造体のヤング率などのパラメータが細胞内のタンパク質状態で変化することを考慮しなくてはならない。さらに、本研究で観察した細胞蛍光画像ではフィラメント構造の端の位置が不明であり、ネットワーク構造を1色の蛍光タンパク質を用いた蛍光画像から構築することが不可能である。このため、焦点接着斑やアドヘレンスジャンクションに異色の蛍光タンパク質を付着させ、タンパク質構造体のネットワーク構造の全体像を把握する必要がある。このような課題を考慮し、解決していくことで、図 6.5 の様な細胞単体または、複数細胞のタンパク質構造体ネットワークモデルを構築して細胞内の力学状態の解析を試みる予定である。



(a) 流れ負荷実験装置の概略図

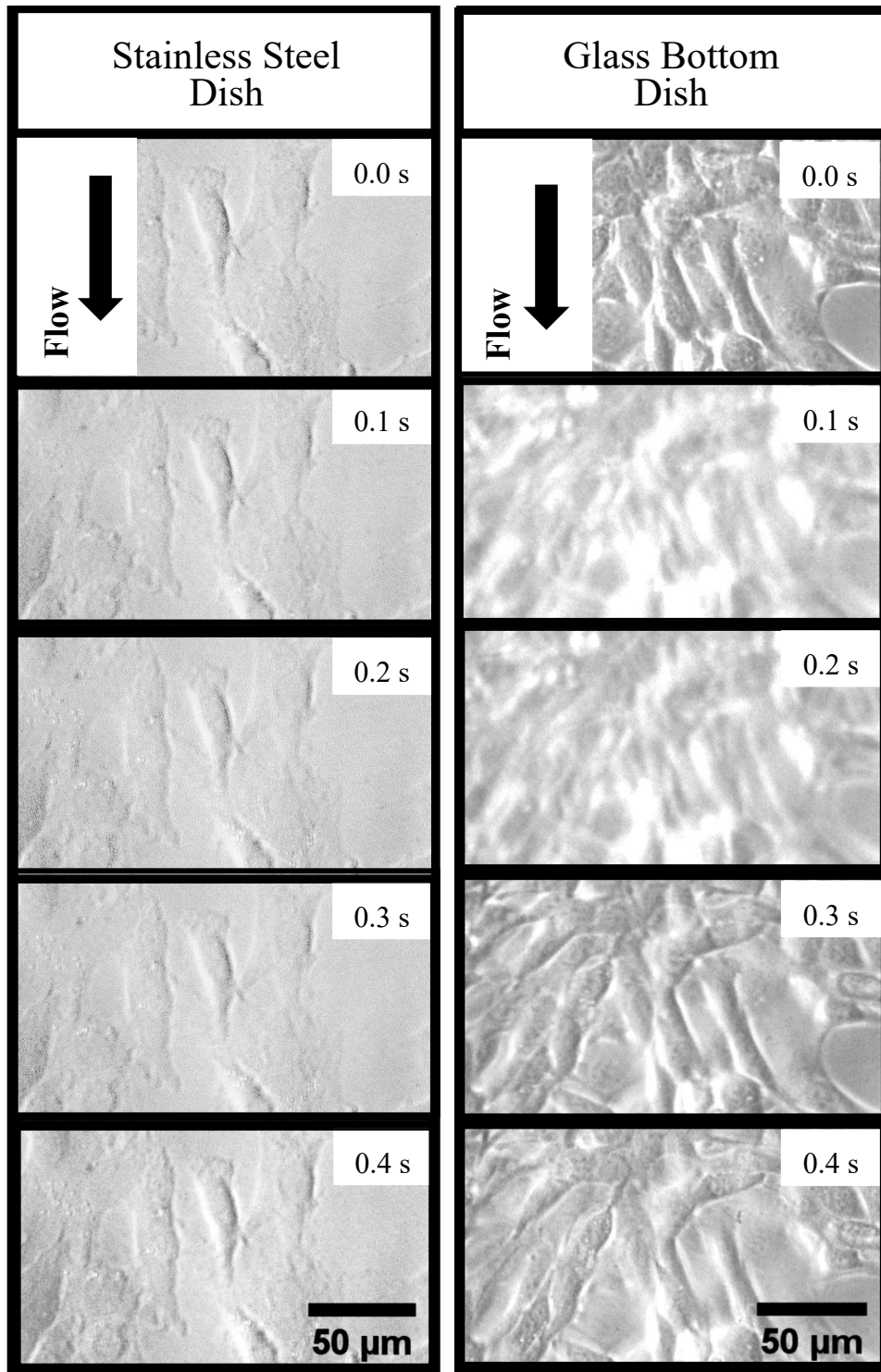


(b) 流れ負荷実験装置の流れ場



(c) 顕微鏡上の流れ負荷装置

図 6.1 流れ負荷実験の装置



(a) ステンレスディッシュ

(b) ガラスボトムディッシュ

図 6.2 流れ負荷時の位相差像のピント変化

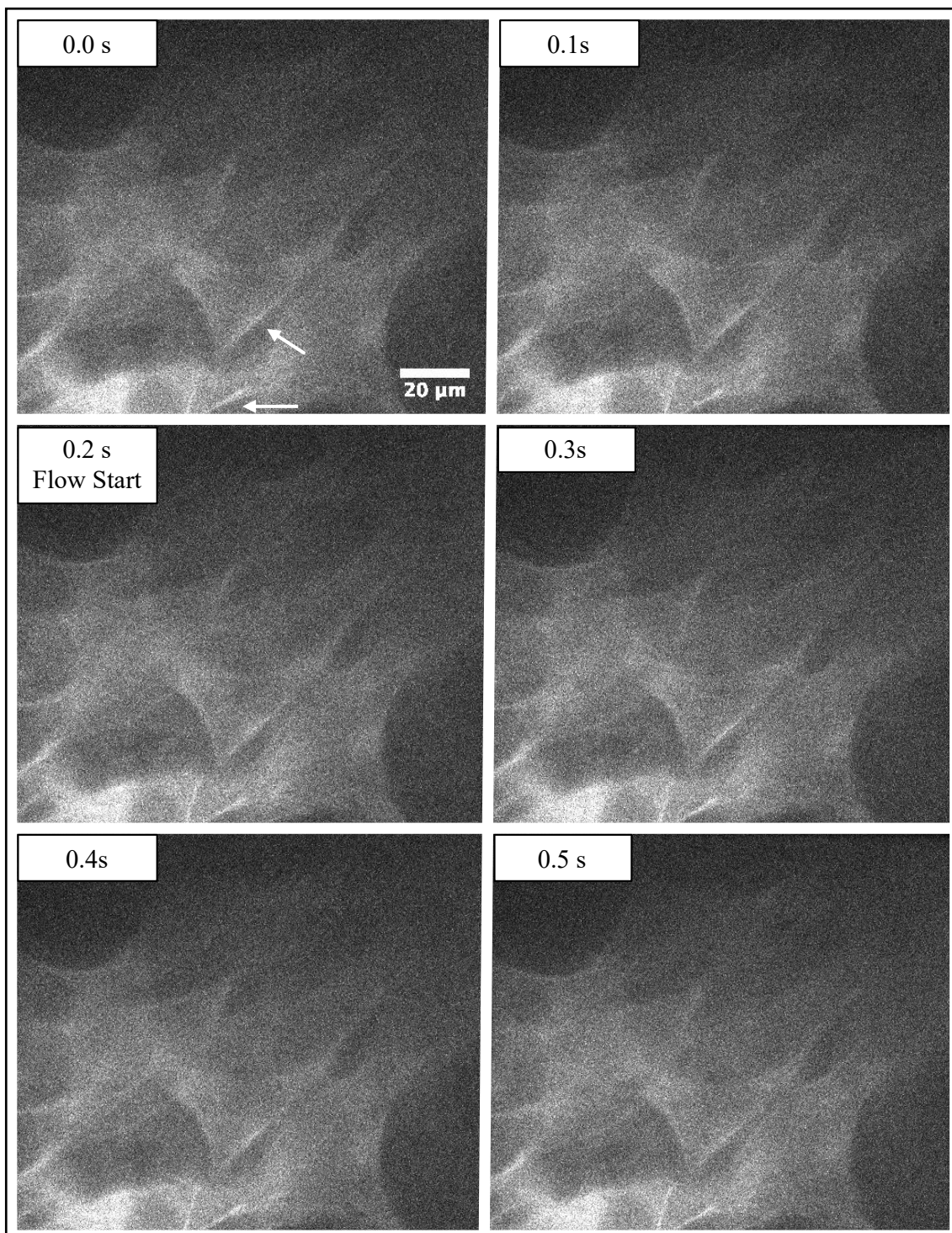


図 6.3 流れ負荷時の細胞蛍光画像の変化

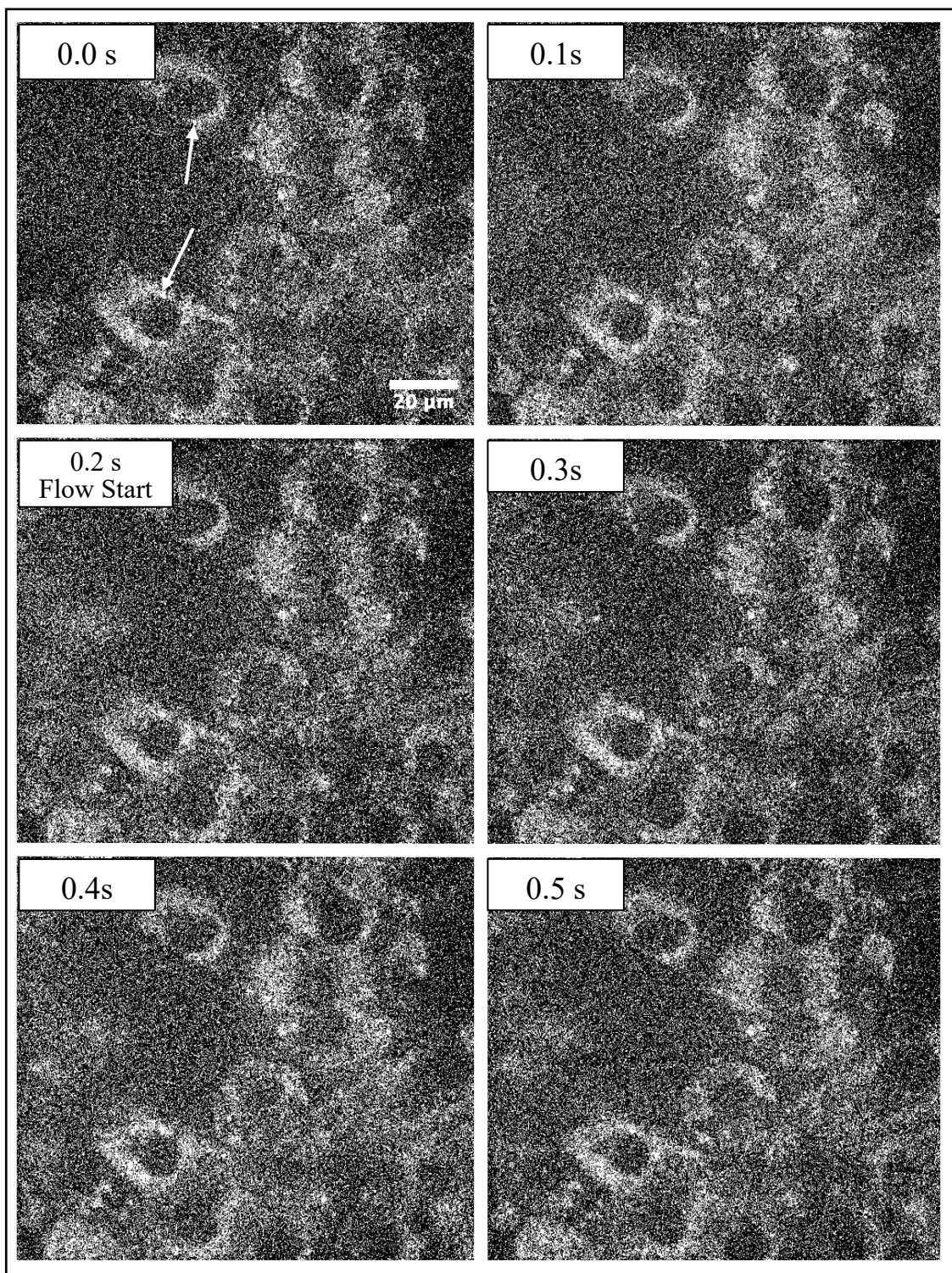
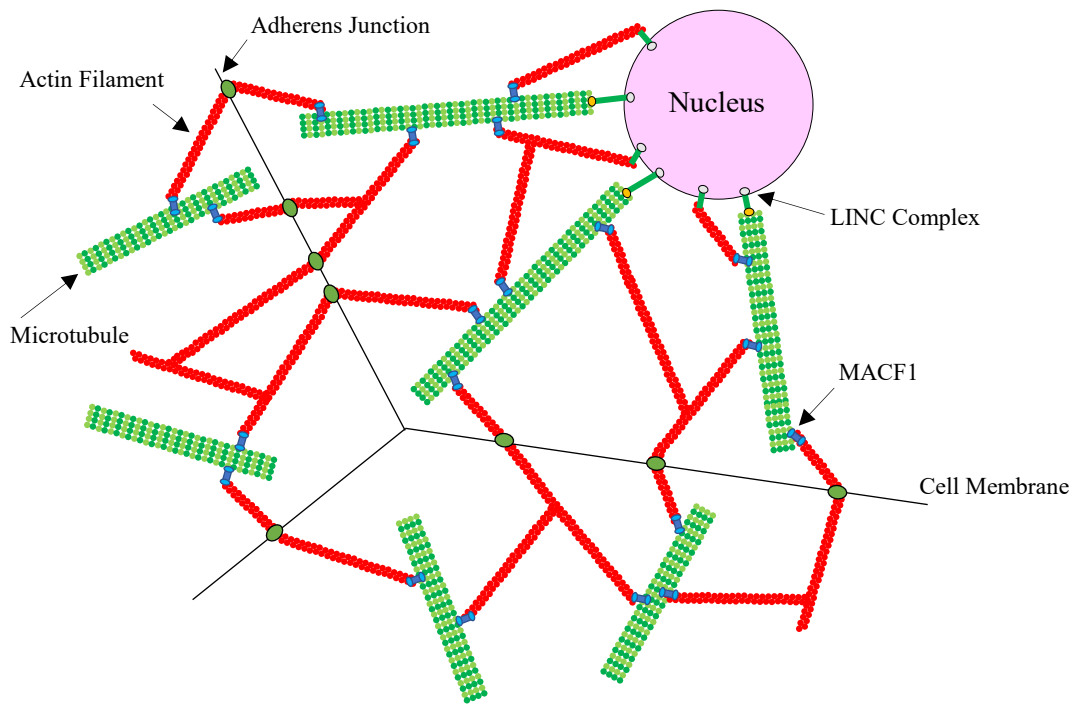
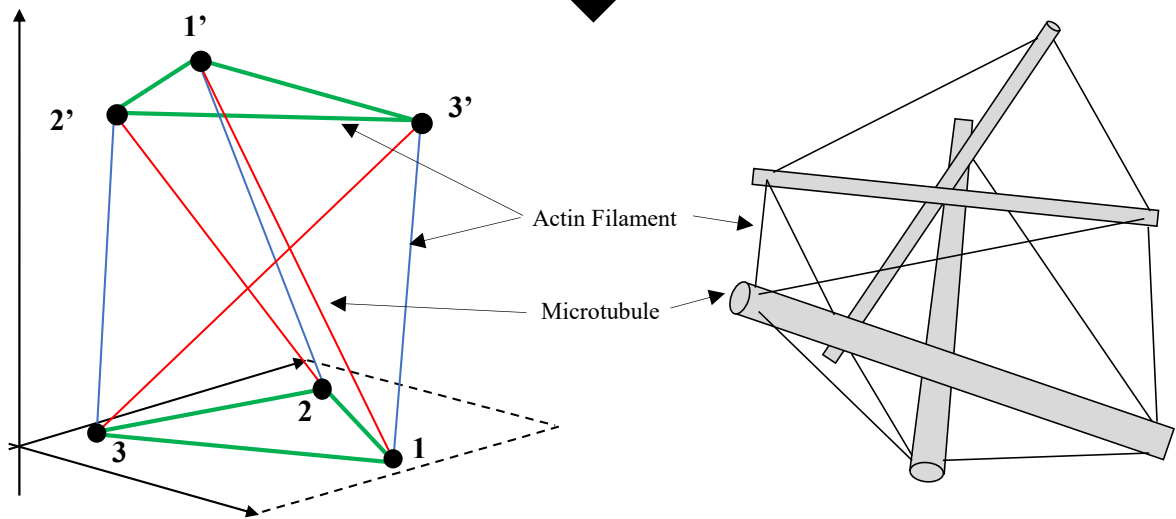
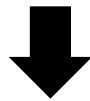


図 6.4 蛍光画像での流れ負荷時の細胞像変化



(a) 細胞内の細胞骨格, タンパク質構造体のネットワーク構造



(b) テンセグリティ構造体

図 6.5 細胞内タンパク質構造体ネットワーク構造へのテンセグリティモデルの適用例 (Buntara S. G., 2020)

第7章

結論

アテローム性動脈硬化症の発症，進展には，血流によるせん断応力などの力学刺激を血管内腔を覆う血管内皮細胞が感知し，応答することが深く関係している．特に，血液の渦流れに晒された内皮細胞は炎症し，低比重リポタンパク質と単球の浸透，浸潤が活発化になり，アテローム性動脈硬化症の要素のプラークが発生，肥大化する．細胞の力学刺激の感知のメカニズムには，繊維状タンパク質構造体のアクチンフィラメントによる細胞内局所への力学刺激の伝達が深く関与していることが指摘されている．このため，細胞内の力学状態や細胞形態変化を評価する1つの指標として，静的構造体とされたアクチンフィラメントの構造変化は，ホルマリンで活動を停止させた細胞内や力学刺激の負荷前と負荷後の生きた細胞の積算画像で観察，解析がなされてきた．しかしながら，アクチンフィラメントは，熱により微小にゆらいでいる動的な構造体である．このため，細胞の力学刺激の感知のメカニズムを知るためには，動的構造体としたアクチンフィラメントを介した細胞内の力学刺激の伝達と力学分布を観察，解析することが非常に重要である．

本論文では以上のことを踏まえ，細胞内の力学刺激の感知のメカニズムを解明するために，細胞局所に力学刺激の伝達を行っているアクチンフィラメントを動的構造体としての観察，解析した．

第2章では，マウス皮膚株化細胞に蛍光タンパク質 Lifeact-GFP を遺伝子導入することで生細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの実時間解析を行なった．Lifeact-GFP を遺伝子導入した細胞で蛍光タンパク質を発現した細胞は約60%であった．また，可視化したアクチンフィラメントの蛍光強度は，細胞に

よって異なり、蛍光強度が弱くゆらぎの解析が不可能な細胞もあった。

ゆらぎの解析では、アクチンフィラメント上の1点でゆらぎを解析した。この結果、最小約 $0.3 \mu\text{m}$ の振幅のアクチンフィラメントのゆらぎを観察した。このゆらぎの振幅は、蛍光顕微鏡の空間分解と同等値である。この空間分解能の限界により、アクチンフィラメントのゆらぎは、詳細に解析されていなかったと考えた。さらに、アクチンフィラメントのゆらぎの解析には、フィラメント構造からの Lifeact-GFP のターンオーバーや顕微鏡カメラの電氣的ノイズの影響を受けていると考えられた。

第3章では、微小なアクチンフィラメントのゆらぎを詳細に解析するために、擬似的な超解像度画像解析手法を導入し、蛍光画像の空間分解能を向上させた。この擬似的な超解像度画像解析手法で得られたアクチンフィラメントの二次関数の近似線の決定係数 R^2 は 0.9 以上であった。蛍光画像と超解像度画像の比較では、双方のアクチンフィラメント像の高い一致性を見せた。これらのことから、この擬似的な超解像度画像解析手法は適した方法であった。この擬似的な超解像度画像解析手法により、画像の解析解像度を 2.5 倍上昇した。これにより、空間分解能 $0.2 \mu\text{m}$ 以下の振幅のゆらぎをリアルタイムで解析、評価した。この擬似的な超解像度画像解析手法によって解析したゆらぎは、1本の F-actin 上で異なり、端付近は中間部分に比べてゆらぎの振幅が大きかった。これは、他のアクチンフィラメントやタンパク質構造体からの張力により、1本のアクチンフィラメントでも力学状態が異なることで生じたと考えられる。

第4章では、ネットワーク構造内のアクチンフィラメント間のゆらぎの関係を複数細胞で調べた。ゆらぎの振幅変化の相関係数をアクチンフィラメントネットワーク構造内で解析した結果、最大でも -0.29 と弱い相関で、ほとんどのゆらぎに相関がないことを確認した。これは、比較的隣接したアクチンフィラメント間でも同様であった。この結果から、細胞内のアクチンフィラメントのネットワーク構造体は、全体が一体となってゆらいでいるのではなく、それぞれ

れのアクチンフィラメントが独自にゆらいでいることが示唆された。このことから、アクチンフィラメント同士または、他のタンパク質構造体との接着点では、細胞に流れによるせん断応力などの力学刺激が負荷されていない静置培養状態でもゆらぎによるひずみが発生していることが考えられた。

第5章では、3本のフィラメント構造が接着している箇所が発生するゆらぎによるひずみを調べた。この接着点でのひずみは、観察時間で圧縮と伸展をランダムに繰り返していた。さらに、この接着した3本のアクチンフィラメントのゆらぎの方向は、それぞれがランダムに変化していた。このように、細胞が静置された状態でもアクチンフィラメントの接着点では、ゆらぎによる圧縮、伸展が繰り返され、ランダムに力学状態が変化していることが示唆された。

以上の章の結果をまとめると、擬似的な超解像度画像解析手法で観察したアクチンフィラメントは、他のアクチンフィラメントまたは、タンパク質構造体から影響を受けながらもそれぞれ独立して微小にゆらいでおり、これらの接着点ではひずみが発生していることが示唆された。このゆらぎによるひずみは、細胞の力学刺激感知に関与していると考えられている細胞核上のLINC複合体や焦点接着斑などのタンパク質構造体でも発生していると考えられる。さらに、第5章で述べたように他の研究では、細胞に流れを負荷した瞬間の中間径フィラメントのゆらぎの停止が観察されている。このことから、接着点でゆらぎによりひずみが発生している力学状態からひずみが消失した力学状態に変化することが、細胞内のタンパク質の活性化や細胞の力学刺激の感知のメカニズムに関与していると考えられる。

この様な仮説を立証するためにも、第6章で述べた流れ負荷実験やネットワークモデルを使用したゆらぎによる細胞内の力学状態の解析が必要である。現時点では、流れ負荷瞬間の生細胞内のアクチンフィラメントの実時間観察はなされてなく、実際に生じている構造変形を含む現象は観察されていない。このことから、せん断応力に応答可能な内皮細胞を使用し、生きた細胞内のアクチ

ンフィラメントの変形を擬似的な超解像度画像解析手法を用いた実時間で観察する必要がある。さらに、焦点接着斑に含まれるビンキュリンやアクチンを張力センサとして使用する蛍光共鳴エネルギー移動 (Florescence Resonance Energy Transfer ; FRET) 解析 (Grashoff, et al., 2010) (Rahimzadeh, et al., 2011) や細胞内のカルシウムレベルの解析を併用することで、より詳しい細胞内現象の評価が可能になる。また、本研究では二次元平面上でアクチンフィラメントを 0.1 s のシャッター速度で観察した。しかし、アクチンフィラメントは、より高速で三次元方向にゆらいでいることが考えられる。このため、アクチンフィラメントのゆらぎを時間的、空間的な制約を除いて解析するために、弾性体と圧縮体で構成されるテンセグリティ構造体を参考にしたモデルの作製を考えている。このモデルの要素を実際の細胞内のネットワーク構造に近づけて解析することで、アクチンフィラメントのゆらぎの解析の 1 つの指標とする。これらの研究により得られた情報から、細胞の力学刺激感知のメカニズムでのアクチンフィラメントの詳細な役割を知り、その重要性を立証をする。

発表リスト

1 主論文

第3章 Tomoteru Oka, Yasuyuki Oguma, and Noriyuki Kataoka “Real-Time Analysis of F-actin Fluctuation in Living Cells with Quasi Super-Resolution Technique”, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol.17, No.3, Paper No. 22-00081, July 2022, pp. 1-10.

第4章 Tomoteru Oka, Kouki Furukawa, Yasuyuki Oguma, Buntara Sthenly Gan, and Noriyuki Kataoka, “Actin Filaments That Form Networks in Living Cells Fluctuate Rapidly and Independently of Each Other”, International Journal of Biomedical Science and Engineering, Vol.11, No.3, Sept. 2023, pp.33-43.

2 国際会議における口頭発表

(1) Tomoteru Oka, Buntara Sthenly Gan, and Noriyuki Kataoka, “Real-Time Observation of F-actin Fluctuation in Living Cell”, 8th World Congress of Biomechanics, July 2018.

(2) Tomoteru Oka, Buntara Sthenly Gan, and Noriyuki Kataoka, “Image Analysis of F-actin Small Fluctuation in Living Cell”, Biomedical Engineering Society 2018 Annual Meeting, Sept. 2018.

発表リスト

- (3) Tomoteru Oka, Yasuyuki Oguma, Buntara Sthenly Gan, and Noriyuki Kataoka, “Analysis of F-actin Fluctuation in Network Structure in the Cell”, The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Dec. 2021.
- (4) Yoshihisa Kawano, Tomoteru Oka, Noriyuki Kataoka, and Buntara Sthenly Gan, “A Cellular Cytoskeleton Vibration Driven by Axial Vibration of Microtubules and Lateral Vibration of Actin Filaments”, The 8th International Conference on Advanced Technology Innovation 2023, Apr. 2023.

3 国内会議における口頭発表

- (1) 岡 知輝, 片岡 則之, “生細胞内アクチンフィラメントの微小ゆらぎの計測”, 第56回日本生体医工学会大会, 2017年5月.
- (2) 岡 知輝, 片岡 則之, “生細胞アクチンフィラメントの微小ゆらぎの解析”, 第28回バイオフィロンティア講演会, 2017年10月.
- (3) 岡 知輝, 片岡 則之, “超解像度画像解析手法を用いた生細胞内のアクチンフィラメントのゆらぎの実時間解析”, 第31回バイオエンジニアリング講演会, 2018年12月.
- (4) 岡 知輝, 郷間 拓哉, 鶴巻 諒, 中三川 友希, 片

岡 則之，超解像度画像解析手法を用いた生細胞内 F-actin の周波数解析，第 32 回バイオエンジニアリング講演会，2019 年 12 月．

- (5) 岡 知輝，小熊 靖之，片岡 則之，“擬似的な超解像度画像解析手法を用いた F-actin ネットワーク構造の解析”，生体医工学シンポジウム 2020，2020 年 9 月．
- (6) 岡 知輝，小熊 靖之，ガン ブンタラ ステンリー，片岡 則之，“擬似的な超解像度画像解析手法を用いた生細胞内 F-actin ネットワーク構造のゆらぎの実時間解析”，第 33 回バイオエンジニアリング講演会，2021 年 6 月．
- (7) 岡 知輝，片岡 則之，“低温状態における血管内皮細胞の形態応答”，日本機械学会東北支部 第 57 期秋期講演会，2021 年 10 月．
- (8) 大槻 将也，尾川原 康輔，古川 皓喜，岡 知輝，片岡 則之，“流れ負荷時の生細胞内 F-actin の実時間観察方法の確立”，第 34 回バイオエンジニアリング講演会，2022 年 6 月．
- (9) 岡 知輝，ガン ブンタラ ステンリー，片岡 則之，“数値モデルを用いた細胞骨格構造体の動的解析”，第 34 回バイオエンジニアリング講演会，2022 年 6 月．

- (10) 古川 皓喜, 岡 知輝, 片岡 則之, “生細胞内の複数のアクチンフィラメントのゆらぎの相関関係の解析”, 第 35 回バイオエンジニアリング講演会, 2023 年 6 月.
- (10) 大槻 将也, 松本 拓馬, 岡 知輝, 片岡 則之, “流れ負荷時の生細胞内 F-actin の実時間観察手法の確立”, 第 57 回日本生体医工学会東北支部大会, 2023 年 11 月.

参考文献

- Alenghat, F. J. and Golan, D. E., Membrane protein dynamics and functional implications in mammalian cells, *Curr Top Membr*, Vol. 72 (2013), pp. 82-120.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Robert, K. and Walter, P.編, 細胞の分子生物学 第6版 (2017), pp.889-962.
- Anno, T., Sakamoto, N. and Sato, M., Role of nesprin-1 in nuclear deformation in endothelial cells under static and uniaxial stretching conditions, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 424, No.1 (2012), pp. 94-99.
- Buntara S. G., *Computational Modeling of Tensegrity Structures*, Springer (2020), pp. 171-191.
- Chen, H., Choudhury, D. M. and Craig, W. S., Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin, *Vol. 281, No. 52 (2006)*, pp. 40389-40398.
- Chen, H., Cohen, D. M., Choudhury, D. M., Kioka, N. and Craig, S., W., Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells, *J Cell Biol*, Vol. 169, No. 3 (2005), pp. 459-470.
- Chernyatina, A. A., Guzenko, D. and Strelkov, S. V., Intermediate filament structure the bottom-up approach, *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 32 (2015), pp. 65-72 , doi: 10.1016/j.ceb.2014.12.007.
- Choi, C. K. and Helmke B. P., Short-term shear stress induces rapid actin dynamics in living endothelial cells, *Mol Cell Biomech*, Vol. 5, No. 4 (2008), pp.247-258.
- DeBakey, M. E., Lawrie, G. M., and Glaeser, D. H., Patterns of atherosclerosis and their surgical significance, *Ann Surg*, Vol. 201, No. 2 (1985), pp. 115-131.
- Da Silva, G. M., Da Silva, M. C., Nascimento, D. V. G., Silva, E. M. L., Gouvêa, F. F. F., Lopes, L. G. De F., Araújo, A. V., Pereira, K. N. F. and De Queiroz, T. M, Nitric oxide as a central molecule in hypertension: focus vasorelaxant activity of

- new nitric oxide donors, *Biology(Basel)*, Vol. 10, No. 10 (2021), doi:
10.3390/biology10101041.
- Discher, D. E., Janmey, P. and Wang, Y., Tissue cells feel and respond the stiffness of their substrate, *Science*, Vol. 310, No. 5751 (2005), pp. 1139-1143.
- Fujiwara, S., Ohashi, K., Mashiko, T., Kondo, H. and Mizuno, K., Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement, *Mol Boil Cell*, Vol.27, No.6 (2016), pp. 954-966.
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T. and Schwartz, M. A., Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics, *Nature*, Vol. 466, No. 7303 (2010), pp. 263-266.
- Grailer, J. J., Koder, M. and Steeber, D. A., L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation, *Vol. 56, No. 3 (2009)*, pp. 141-147.
- Harris, A. R., Jrreij, P. and Fletcher, D. A., Mechanotransduction by the actin cytoskeleton: converting mechanical stimuli into biochemical signals, *Annu Rev Biophys*, Vol. 47 (2018), pp. 617-631.
- Hashimoto, Y., Kinosita, N., Greco, T. M., Federspiel, J. F., Beltran, P. M. J., Ueno, N. and Cristea, I. M., Mechanical force induces phosphorylation-mediated signaling that underlies tissue response and robustness in xenopus embryos, *Cell Syst*, Vol. 8, No. 3 (2019), pp. 226-241.
- Hayakawa, K., Tatsumi, H. and Sokabe, M., Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament, *Vol. 195, No. 5 (2011)*, pp. 721-727.

- Helmke, B. P., Goldman, R. D. and Davies, P. F., Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow, *Circ Res*, Vol. 86, No.7 (2000), pp. 745-752.
- Iwaki, M., Iwane, A. H., Shimokawa, T., Coole, R. and Yanagida, T., Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps, *Nat Chem Biol*, Vol. 5, No. 6 (2009), pp. 403-405.
- Jouda, H., Murillo, L. L. and Wang, T., Current progress in vascular engineering and its clinical applications, *Cells*, Vol. 11, No. 3 (2022), doi :org/10.3390/cells11030493.
- Jørgensen, L. H., Mosbech, M., Færgeman, N. J., Graakjaer, J., Jacobsen, S. V. and Schrøder, H. D., Duplication in the microtubule-actin cross-linking factor 1 gene causes a novel neuromuscular condition, *Sci Rep*, Vol. 4, No. 5180 (2014), doi : 10.1038/srep05180.
- Kabir, A. M. R., Inoue, D., Hamano, Y., Mayama, H., Sada, K. and Kakugo, A., Biomolecular motor modulates mechanical property of microtubule, *Biomacromolecules*, No. 15, Vol. 5 (2014), pp1797-1805.
- Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W. and Medford, R. M., Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 93, No. 17 (1996), pp. 9114-9119.
- Kiuchi, T., Higuchi, M., Takamura, A., Maruoka, M. and Watanabe, N., Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes, *Nat Methods*, Vol. 12, No. 8 (2015), pp. 743-746.
- Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Adersson, L., Stephanie, K., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F. and Freeman, M. W., Scavenger receptors class A- I / II and CD36 are the principal receptors responsible for the

- uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages, *J Biol Chem*, Vol. 277, No.51 (2002), pp. 49982-49988.
- Lim, H. Y. G., Alvarez, Y. D., Gasnier, M., Wang, Y., Tetlak, P., Bissiere, S., Wang, H., Biro, M. and Plachta, N., Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo, *Nature*, No. 585 (2020), pp. 4040-409. doi: 10.1038/s41586-020-2647-4.
- Liu, H. and Shima, T., Preference of CAMSAP3 for Expanded Microtubule Lattice Contributes to Stabilization of The Minus End, *Life Sci Alliance*, Vol. 6, No. 5 (2023), doi: 10.26508/lsa.202201714.
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S. and Forte, G., Cellular mechanotransduction: From tension to function, *Front Physiol*, Vo. 9, No. 824 (2018), doi: 10.3389/fphys.2018.00824.
- Matsumoto, N., Sekiya, M., Tohyama, K., Ishiyama-Matsuura, E., Sun-wada, G., Wada, Y., Futai, M. and Nakanishi-Matsui, M., Essential Role of the $\alpha 3$ Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment, *Sci Rep*, Vol. 8, No. 1 (2018), doi: 10.1038/s4158-018-24918-7.
- Murakami, K., Yasunaga, T., Noguchi, T. Q. P., Gomibuchi, Y., Ngo, K. X., Uyeda, T. Q. P. and Wakabayashi, T., Structural Basis for Actin assembly, Activation of ATP Hydrolysis, and Delayed Phosphate Release, *Cell*, Vol. 143, No.2 (2010), pp.275-287.
- Nagayama, K., Yahiro, Y. and Matsumoto, T., Stress fibers stabilize the position of intranuclear DNA through mechanical connection with the nucleus in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett*, Vol. 585, No. 24 (2011), pp. 3992-3997.
- Naito, H., Iba, T., Wakabayashi, T., Tai-Nagara, I., Suehiro, J., Jia, W., Eino, D., Sakimoto, S., Muramatsu, F., Kidoya, H., Sakurai, H., Satoh, T., Akira, S., Kubota,

- Y. and Takakura, N., TAK1 prevents endothelial apoptosis maintains vascular integrity, *Dev cell*, Vol. 48, No. 2 (2019), pp.151-166.
- Naito, H., Kidoya, H., Sakimoto, S., Wakabayashi, T. and Takakura, N., Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels, *BMBO J*, Vol. 31, No. 4 (2012), pp. 842-855.
- Nasrin, S. R., Ganser, C., Nisihkawa, S., Kabir, A. M. R., Sada, K. Yamashita, T., Ikeguchim M., Uchihashi, T., Hess, H. and Kakugo, A., Deformation of microtubules regulates translocation dynamics of kinesin, *Sci Adv*, Vol. 7, No. 42 (2021), doi: 10.1126/sciadv.adf2211.
- Ohashi, K., Fujiwara, S. and Mizuno, K., Roles of the cytoskeleton, Cell adhesion and rho signaling in mechanosensing and mechanotransduction, *J Biochem*, Vol. 161, No. 3 (2017), pp. 245-254.
- Okano, M. and Yoshida, Y., Morphometric studies of endothelial cells dividers of aortic arch of rabbits : prediction of regional blood flow profile, *J Biomech Eng*, Vol. 114, No. 3 (1992), pp. 301-308.
- Osawa, M., Masuda, M., Kusano, K. and Fujiwara, K., Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule?, Vol. 158, No. 4 (2002), pp.773-785.
- Phng, L. and Gerhardt, H., Angiogenesis: A team effort coordinated by notch, *Dev Cell*, Vol. 16, No. 2 (2009), pp. 196-208.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G., Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell*, Vol. 112, No. 4 (2003), pp. 453-465.

- Rahimzadeh, J., Meng, F., Sachs, F., Wang, J., Varma, D. and Hua, S. Z., Real-time observation of flow-induced cytoskeletal stress in living cells, *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 301, No. 3 (2011), pp. C646-652.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, Y. D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Solder, R., Lifeact-GFP: a versatile marker to visualize F-actin, *Nat Methods*, Vol. 5, No. 7 (2008), pp. 605-607.
- Rienzo, C. D., Piazza, V., Gratton, E., Beltram, F. and Cardarelli, F., Protein short-range protein brownian motion in the cytoplasm of living cells, *Nat Commun*, Vol. 23, No. 5 (2014), di: 10.1038/ncomms6891.
- Risca, V. Wang, E. B., Chaydhuri, O., Chia, J. J., Geissler, P. L. and Fletcher, D. A., Actin filament curvature biases branching direction, *Proc natl Acad Sci USA*, Vol. 109, No. 8 (2012), pp.2913-2918.
- Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature*, Vol. 362, No. 6423 (1993), pp801-809.
- Sawada, Y., Tamda, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S. and Sheetz, M. P., Force Sensing by mechanical extention of the Src family kinase substrate p130Cas, *Cell* Vol. 127, No. 5 (2006), pp. 1015-1026.
- Shang, L., Gao, P., Wang, H., Popescu, R., Gerthsen, D. and Nienhaus, G. U., Protein-based fluctuation nanoparticles for super-resolution STED imaging of live cell, *Chemical Science*, Vol. 8, No. 3 (2017), pp. 2396-2400.
- Sharma, V., Berkehamer, S., and Lakshminrusimha, S., Persistent pulmonary hypertension of the newborn Maternal health, *Neonatology and perinatology* (2015), doi: 10.1186/s40748-015-0015-4.

- Shen, J., Lusinskas, F. W., Connolly, A., Dewey Jr, C. F. and Gimbrone Jr, M. A., Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells, *Am J Physiol*, Vol. 262, No. 2 (1992), pp. C384-C390.
- Shimamoto, Y., Tamura, S., Mastmoto, H. and Mawshima K., Nucleosome-nucleosome interactions via histone tails and linker DNA regulate nuclear rigidity, *Mol Biol Cell*, Vol. 28, No.11 (2017), pp. 1580-1589.
- Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A. and Betzig, E., Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics, *Nat Methods*, Vol. 5, No. 5 (2008), pp. 417-423.
- Sugihara, K., Nishhiyama, K., Fukuhara, S., Uemura, A., Arima, S., Kobayashi, R., Köhn-Luque, A., Mochizuki, N., Suda, T., Ogawa, H. and Kurihara, H., Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical, *Cell Rep*, Vo. 13, No. 9 (2015), pp.1814-1827.
- Tada, S., Computational study of the influence of bifurcation angle on haemodynamics and oxygen transport in the carotid bifurcation, *World Scientific*, Vol. 31 No. 3(2019), pp. 1980024-1-1980024-8.
- Tanner, K., Boudreau, A., Bissell, M. J. and Kumar, S., Dissecting regional variations in stress fiber mechanics in living cells with laser nanosurgery, *Biophys J*, Vol. 99, No.9 (2010,), pp. 2775-2783.
- Ueda, A., Shimomura, M., Ikeda, M., Yamaguchi, R. and Tanishita, K., Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells, *Am J physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 287, No. 5 (2004), pp. 2287-2294.
- Ueki, Y., Uda, Y., Sakamoto, N. and Sato, M., Measurements of strain on single stress fibers in living endothelial cells induced by fluid shear stress, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 395, No. 3 (2010), pp. 441-446.

- Uray, I. P. and Uray, K., Mechanotransduction at the plasma membrane-cytoskeleton interface, *Int J Mol Sci*, Vol. 22, No. 21 (2021). doi: 10.3390/ijms222111566.
- Wang, N., Butler, P. J. and Ingber, D. E., Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton, *Science*, No. 260, Vol. 5111 (1993), pp1124-1127.
- Wang, J. and Pelling, A. E., An approach to visualize the deformation of the intermediate filament cytoskeleton in response to locally applied forces, *ISRN Cell Biol* (2012), doi: 10.5402/2012/513546.
- Wang, D., Yang, Y., Lei, Y., Tzvetkov, N. T., Liu, X., Yeung, A. W. K., Xu, S. and Atanasov, A. G., Targeting foam cell formation in atherosclerosis: therapeutic potential of natural products , *Pharmacol Rev*, Vol. 71, No. 4 (2019), pp. 596-670.
- Yamashiro, Y., Thang, B. Q., Ramirez, K., Shih, S. J., Kohhata, T., Ohata, S., Nguyen, T. A. V., Sumio, O., Nagayama, K. and Yanagisawa, H., Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP in the vascular remodeling, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 117 ,No. 18 (2020), pp. 9896-9905.
- Yokota, Y., Nakajima, H., Wakayama, Y., Muto, A., Kawakami, K., Fukuhara, S. and Mochizuki, N., Endothelial Ca⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic in vivo, *Elife* (2015), doi: 10.7554/elife.08817.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. and Shibata, M., Alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development, *Nat Cell Biol*, Vol. 12 (2010), pp. 533-542. doi: 10.1038/ncb2055.
- Yuge, S., Nishiyama, K., Arima, Y., Hanada, Y., Oguri-Nakamura, E., Hanada, S., Ishii, T., Wakayama, Y., Hasegawa, U., Tsujita, K., Yokokawa, R., Wakayama, Y., Hasegawa, U., Tsujita, K., Yokokawa, R., Miura, T., Itoh, T., Tsujita, K., Mochizuki, N. and Fukuhara, S., Mechanical loading of intraluminal pressure

- mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins, Nat Commun, Vol. 13, No. 1 (2022), doi: 10.1038/s41467-022-30197-8.
- 安藤譲二, メカニカルストレスの血管への作用, 日本血栓止血学会誌, Vol. 13, No. 3 (2002), pp. 227-236.
- 上田善彦, 佐藤英一, 植田初江, 動脈硬化の病理, 日本アフェレシス学会雑誌, Vol. 32, No. 1 (2013), pp. 7-14.
- 内田さえ, 左伯由香, 原田玲子編, 人体の構造と機能 第4版 (2015), pp.29-44, 164-180.
- 岡田英志, 血管内皮グリコカリックスとは, 外科と代謝・栄養, Vol. 54, No. 2 (2020), pp. 97-99.
- 尾間由佳子, 原田昌助, 細胞核の構造とエピジェネティック制御, 化学と生物, Vol. 50, No. 4 (2012), pp. 262-268.
- 金子厚, 森蛟祐, 古見耕一, 角田透, 脳血管障害の長期予後について-比例ハザードモデルによる検討を中心に-, 脳卒中, Vol. 14, No.1 (1992), pp. 25-34.
- 工藤奨, 細渕誠人, 紅床省吾, 隅井干城, 島田知弥, 寺田麻理枝, 谷下 一夫, セン断応流れ場での IP3 誘導による内皮細胞間 Ca²⁺応答伝播, 日本機械学会論文集(B編), Vol. 77, No. 784 (2011), pp. 2431-2441.
- 厚生労働省, 令和4年(2022)人口動態統計月報年計(概数)の概況 第10表, <<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai22/index.html>>, (参照日 2023年12月7日).
- 市瀬史, NO ガスの血小板抑制作用に臨床的意義に関する考察, Medical Gas, Vol.1, No. 1 (1998), pp. 81-83.
- 高倉伸幸, 血管新生-血液細胞による血管新生の制御-, 炎症・再生, Vol. 24, No. 5 (2004), pp. 553-561.

- 出口真次, 佐藤正明, ストレスファイバのマイクロ・バイオメカニクス, 生体医工学, Vol. 46, No. 1 (2008), pp. 11-15.
- 樋口謙次, 安保雅博, 急性期脳血管障害患者における歩行予後因子の検討-発症10日目の坐位保持能力から-, 理学療法学, Vol. 35, No. 7(2008), pp. 313-317.
- 仁田亮, キネシン型分子モーターの多彩な機能を支える分子構造基盤, 顕微鏡, Vol. 53, No. 2 (2018), pp. 85-91.
- 野島博編, 改訂第3版 顕微鏡使い方ノート 初めての観察からイメージングの応用まで (2016), p. 36.
- 福嶋孝義, 原川清仁, 本間達二, 動脈分岐部における流れのパターン, 流れの可視化, Vol. 6, No. 23 (1986), pp. 62-68.
- 藤原佐知子, 大橋一正, 水野健作, メカノセンシングにおける細胞骨格, 細胞接着の機能, 生化学, Vol. 88, No. 4 (2016), pp. 443-451.
- 牧野圭佑, 鈴木利典, 一酸化窒素の生化学, 化学と生物, Vol. 38, No.1 (2000), pp. 14-19.
- 増田道隆, 藤原敬己, 血管内皮細胞は血液の流れにどの様に応答するか, 化学と生物, Vol. 32, No.6 (1994), pp. 386-390.
- 槍澤大樹, 菅野仁, 循環系の基礎と臨床 (2)血管新生, 東女医大誌, Vol. 87, No. 1・2 (2017), pp. 5-12.
- 和田龍一, 動脈硬化症の病理, 日本医科大学医学会雑誌, Vol. 13, No. 4 (2017), pp. 190-193.

謝辞

著者をバイオメカニクスの分野に導き、本研究の進行において多大な時間、懇切丁寧にご指導していただきました日本大学工学部片岡則之教授には、心からの感謝の意を表しさせていただきます。

本論文をまとめるにあたり、貴重なご意見を受け賜りました日本大学工学部佐々木直栄教授には、心よりの感謝を申し上げさせていただきます。

本論文のまとめやセミナーや学会発表で本研究に貴重なご意見を受け賜りました茨城大学長山和亮教授には心よりの感謝を申し上げさせていただきます。

アクチンフィラメントのゆらぎの数値解析と本論文のまとめに貴重なご意見を受け賜りました日本大学工学部ガンブントラストエンリー教授には心よりの感謝を申し上げさせていただきます。

流れ負荷実験における流路内流れの数値解析のご教授と本論文のまとめに貴重なご意見を受け賜りました日本大学工学部下権谷祐児准教授には、心よりの感謝を申し上げさせていただきます。

本研究を進めるにあたり、セミナーや学会発表会場で貴重なご意見をいただきました都立大学坂本尚哉准教授には、心よりの感謝を申し上げさせていただきます。

本研究における画像解析手法に、貴重なご意見を受け賜りました日本大学工学部小熊靖之准教授には、心よりの感謝を申し上げさせていただきます。

著者が本研究を始め現在に至るまで、研究室で共に切磋琢磨した多くの学部生、大学院生に心よりの感謝を申し上げさせていただきます。