

チャンネルロドプシン遺伝子の導入により光刺激駆動する ニワトリ胚前肢の発生の変化

[1] 組織

代表者：清水 正宏
(大阪大学大学院基礎工学研究科)
対応者：小椋 利彦
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 169,420円,
旅費 230,580円

[2] 研究経過

ニワトリ胚の前肢部分にチャンネルロドプシン遺伝子を導入し、光刺激により駆動することで筋の発生の変化、出力特性の変化を調査することを目的とする。近年、細胞への機械刺激が、発生過程や形態に影響を与えることが報告されてきた。一方で、ニワトリ胚の筋構造は、卵の内部であっても、一定以上のステージへ進むとその筋は駆動能を有すると考えられる。そして、筋肉や腱の発生は、筋肉の自発的な収縮によってその成熟を促されている (Development, 138, 3247, 2011)。このとき、もし発生段階にある胚の筋を外部からの制御により駆動することができれば、それが機械刺激となり、ニワトリ胚の筋組織の発生過程や形態が変化する可能性がある。このようなことを検証するためには、外部から発生段階のニワトリ胚の筋を非侵襲的に駆動する方法が必要となる。電気刺激は、細胞に対して侵襲的であること、また局所的な刺激が難しいことから難がある。以上の事情から、本研究では、チャンネルロドプシン遺伝子をニワトリ胚の前肢領域に導入し、培養の過程で定期的に光刺激を導入部分に印加することで筋の駆動を誘発する方法を採用する。

本年度は、初動段階として、培養筋芽細胞株 C2C12 の集団への機械刺激と構造の変化の関係を、明らかにすることを目的とした。筋芽細胞に機械刺激を加え、応答を観察した。細胞集団の構造に影響を与えるパラメータとして、基質との接着力、細胞密度、機械刺激の印加時間を変化させ、それらの差異を調査した。このために、平成 27 年 1 月 29 日～1 月 31 日 (3 日間) に、東北大学加齢医学研究所神経機能情報研究分野小倉研究室において、研究打ち合わせ、ならびに、実験、サンプル回収を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

申請者は、培養細胞への機械刺激印可のために、進展機械刺激装置 (下図参照) を開発した。細胞を PDMS チャンバ上に培養し、PDMS チャンバに機械刺激を加える事で、細胞に刺激を加えた。パラメータとして基質接着力、細胞密度、機械刺激の印加時間を選び、これらの変化がもたらす差異を観察した。この差異から細胞集団が高次構造を形成する条件を求めた。基質接着力は細胞の移動に、細胞密度は筋芽細胞の分化や細胞間の張力に、印加時間は細胞の配向に関わる。PDMS と細胞の接着に必要なフィブロネクチン(FN)の濃度によって、基質との接着力を変化させ、チャンバに播種する細胞の量を調整することで、細胞密度を変化させた。また伸展開始から 24 時間ごとに観察し、伸展時間による影響を調査した。FN 溶液濃度 $0.050 \mu\text{g/mL}$ 、細胞密度 $1 \times 10^5/\text{chamber}$ で 72 時間伸展刺激を加えたところ、特異な構造が形成された。この構造の特徴は、伸展方向に対して並行に伸びる筋状の細胞の集団があること、その周りに伸展方向に対して垂直に配向している細胞が存在していることである。細胞密度が細胞の配向に影響を与えることから、この構造の形成には、細胞の疎密が大きく関わっている可能性が考えられる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本申請は、加齢医学研究所の推進する細胞生物学による生物メカニズムの機序の解明のみならず、制御工学、ロボット工学とも融合する領域横断的なプロジェクトである。

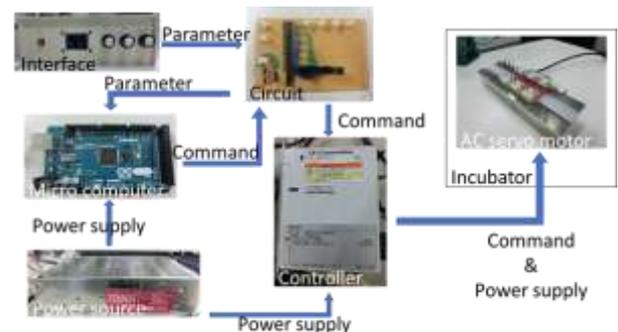


図 開発した伸展機械刺激印可装置

[4] 成果資料

(1) 民山浩輔, 清水正宏, 宮坂恒太, 小椋利彦, 中井淳一, 大倉正道: 細胞触覚センサのための小型蛍光観察システムの開発, 第 32 回日本ロボット学会学術講演会, 1P1-05(2014)