

細胞の異方性を決定づけるシグナル分子濃度差  
及びせん断応力の定量解析

2019 年度

平岩 巧

学位論文 博士（理学）

細胞の異方性を決定づけるシグナル分子濃度差  
及びせん断応力の定量解析

2019 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

平岩 巧

# 目次

<b>第1章 緒言</b>	<b>1</b>
1.1 本論文の構成	1
1.2 生体内の微小環境	2
1.2.1 液性因子の濃度勾配	2
1.2.2 張力による分裂方向制御	7
1.2.3 流体流れによって生じるせん断応力	9
1.2.3.1 せん断応力による細胞形態変化	11
1.2.3.2 せん断応力と遊走変化の関係	11
1.2.3.3 せん断応力と遺伝子発現制御の関係	11
1.2.3.4 せん断応力を感知するメカノセンサタンパク質	11
1.2.4 生体内微小環境の役割を明らかにする上での問題点	12
1.3 生体内微小環境の理解に向けたマイクロ流体デバイスの応用	13
1.3.1 マイクロ流体デバイスを用いた液性因子濃度勾配の制御	14
1.3.2 マイクロ流体デバイスを用いた細胞へのせん断応力刺激	17
1.3.2.1 微小流路内の細胞に生じるせん断応力	17
1.3.2.2 マイクロ流体デバイスの利点	20
1.3.2.3 マイクロ流体デバイス以外のせん断応力を与える 実験系	25
1.3.2.4 流れによるせん断応力以外の影響	25
1.4 本研究の目的	28
<b>第2章 Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂異方性の制御</b>	<b>29</b>
2.1 背景	29
2.2 方法	34
2.2.1 マイクロ流体デバイスの作製	34
2.2.2 濃度勾配の定量的評価手法	38
2.2.2.1 濃度勾配形状の定式化	38
2.2.2.2 細胞両端間における濃度差の導出	38
2.2.2.3 濃度差の経時的安定性の評価	39
2.2.3 細胞培養	41
2.2.4 免疫蛍光染色	41
2.2.4.1 一次抗体および二次抗体	41

2.2.4.2	Tp1479 LRP6 の免疫蛍光染色 . . . . .	41
2.2.4.3	ODF2 の免疫蛍光染色 . . . . .	42
2.2.4.4	Wnt3a の免疫蛍光染色 . . . . .	42
2.2.4.5	免疫蛍光染色画像の取得 . . . . .	42
2.2.4.6	高さによる輝度値の補正 . . . . .	42
2.2.5	Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂の異方性決定 . . . . .	45
2.2.5.1	デバイス内細胞培養 . . . . .	45
2.2.5.2	Dkk1 タンパク質による Wnt シグナルの阻害 . . . . .	47
2.2.5.3	デバイス内免疫蛍光染色 . . . . .	47
2.2.5.4	Tp1479 LRP6 活性化座標の同定 . . . . .	47
2.2.5.5	ODF2 局在座標の同定および異方性の決定 . . . . .	49
2.2.5.6	Wnt3a 非特異的吸着による分裂角度への影響評価 . . . . .	49
2.2.6	Wnt3a 濃度差と分裂角度の関係性に関する評価手法 . . . . .	52
2.3	結果 . . . . .	54
2.3.1	濃度勾配の定量的評価 . . . . .	54
2.3.2	Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂の異方性決定 . . . . .	59
2.3.3	偏りのある細胞分裂異方性が観察された際の Wnt3a 濃度差 の定量 . . . . .	64
2.4	考察 . . . . .	66
<b>第 3 章</b>	<b>せん断応力による神経芽腫細胞の遊走制御</b>	<b>70</b>
3.1	背景 . . . . .	70
3.2	方法 . . . . .	77
3.2.1	マイクロ流体デバイスの作製 . . . . .	77
3.2.2	Particle Image Velocimetry (PIV) . . . . .	80
3.2.3	流路内における静圧測定 . . . . .	82
3.2.4	細胞培養 . . . . .	82
3.2.5	デバイス内細胞培養 . . . . .	82
3.2.6	粘度調整によるせん断応力刺激 . . . . .	86
3.2.7	細胞への静圧刺激 . . . . .	88
3.2.8	細胞内カルシウムイオン濃度の経時的变化測定 . . . . .	88
3.2.9	siRNA 処理 . . . . .	88
3.2.10	免疫蛍光染色 . . . . .	89
3.2.10.1	一次抗体および二次抗体 . . . . .	89
3.2.10.2	$\beta 1$ integrin および FAK pY925 の免疫蛍光染色 . . . . .	89
3.2.10.3	N-Myc の免疫蛍光染色 . . . . .	89
3.2.11	画像取得および画像解析 . . . . .	90
3.2.12	遊走能および形態的特徴比較における統計解析 . . . . .	91
3.3	結果 . . . . .	95



3.3.1	マイクロ流体デバイスの評価 . . . . .	95
3.3.2	せん断応力を与えた際の IMR32 細胞の遊走変化 . . . . .	98
3.3.2.1	流量によるせん断応力の調整と細胞遊走への影響 . . . . .	98
3.3.2.2	粘度によるせん断応力の調整と遊走能への影響 . . . . .	105
3.3.3	せん断応力を与えた際の接着斑の形態的变化 . . . . .	108
3.3.4	MYCN-siRNA 処理時における接着斑の形態的特徴変化 . . . . .	111
3.4	考察 . . . . .	113
<b>第 4 章</b>	<b>結論</b>	<b>116</b>
4.1	結言 . . . . .	116
4.2	Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂異方性の制御 . . . . .	116
4.3	せん断応力による神経芽腫細胞の遊走制御 . . . . .	117
4.4	今後の展望 . . . . .	117

# 目次

1.1	液性因子の濃度勾配形成	4
1.2	液性因子の濃度勾配形成と形態形成	5
1.3	液性因子による分裂方向制御	6
1.4	張力による細胞分裂方向の制御	8
1.5	間質流に関する概念図	10
1.6	マイクロ流体デバイスによる液性因子濃度勾配の制御および分化制御	15
1.7	神経管内における詳細な神経分化パターンを再現するために開発されたマイクロ流体デバイス	16
1.8	二次元ポアズイユ流れの条件	19
1.9	並列流路の概略図および流路抵抗図	22
1.10	流路抵抗式の特徴	23
1.11	異なるせん断応力を同時に実現するマイクロ流体デバイス	24
1.12	回転平板を用いたせん断応力制御系	27
2.1	Wnt3a タンパク質による細胞分裂方向の制御	31
2.2	古典的/非古典的 Wnt シグナル	32
2.3	非対称分裂と母中心子の分配の関係性	33
2.4	マイクロ流体デバイスの寸法	35
2.5	モールド作製手法	36
2.6	濃度勾配の定量的評価手法	40
2.7	高さによる輝度値補正曲線の作成手法	44
2.8	マイクロ流体デバイスの設置手順	46
2.9	LRP6 活性化座標の同定方法	48
2.10	ODF2 の同定方法および分裂角度の定義	50
2.11	非特異的な Wnt3a 吸着による分裂角度への影響評価	51
2.12	Wnt3a 濃度差と分裂角度の関係性に関する評価	53
2.13	濃度勾配の評価結果	55
2.14	濃度勾配の変動係数	56
2.15	濃度差および濃度勾配時間安定性の評価結果	58
2.16	Wnt3a 濃度勾配による LRP6 活性化座標の同定結果	60
2.17	Wnt3a 濃度勾配による分裂角度への影響	62
2.18	非特異的な Wnt3a 吸着による分裂角度への影響	63

2.19	Wnt3a の濃度差と分裂角度の関係性	65
2.20	LEGI モデルの概略図および特徴	69
3.1	せん断応力による癌細胞の遊走能変化	73
3.2	腫瘍内圧力の上昇と間質流の増大	74
3.3	モールド作製手法	78
3.4	マイクロ流体デバイスの設置手順	84
3.5	遊走能指標の算出方法	85
3.6	粘度測定手法	87
3.7	接着斑の形態的特徴の取得方法	92
3.8	接着斑の空間的分布の定量化	93
3.9	流路内静圧測定手法	94
3.10	各流路内におけるせん断応力および静圧	97
3.11	各せん断応力を与えた際の細胞遊走の軌跡	100
3.12	各せん断応力を与えた際の遊走能指標の変化	101
3.13	高せん断応力下における遊走能指標の変化	102
3.14	高せん断応力を与えた際の細胞内カルシウムイオン濃度の変化	103
3.15	静圧による遊走能指標への影響	104
3.16	粘度によるせん断応力の調整および遊走能の変化	106
3.17	デキストラン添加による遊走能への影響	107
3.18	各せん断応力を与えた際における接着斑の形態的特徴変化	109
3.19	せん断応力を与えた際の $\beta 1$ integrin の空間的分布の偏り	110
3.20	MYCN siRNA 処理後における各せん断応力による接着斑形態的特徴および遊走能変化	112
3.21	せん断応力によって惹起されるシグナル伝達の予測図	115

# 表 目 次

2.1	モールド作製におけるパラメータ . . . . .	37
3.1	各せん断応力値に対する各癌細胞の応答 . . . . .	75
3.2	接着斑の形態的特徴と遊走能の関係性 . . . . .	76
3.3	モールド作製におけるパラメータ . . . . .	79
3.4	PIVにおける画像取得条件 . . . . .	81
3.5	モールドの測定結果 . . . . .	96

# 第1章 緒言

## 1.1 本論文の構成

近年、実験技術や解析技術の向上に伴い、液性因子の濃度勾配や流体の流れによって構成される微小環境が、細胞の分裂方向や遊走方向の決定に影響を与えていることが示唆され始めている。分裂方向や遊走方向といった細胞における異方性の決定は、組織形成や癌細胞の転移に関わることが知られている。これらの異方性の決定は、液性因子の濃度勾配によって生じる濃度差や流体の流れによって発生するせん断応力が影響を及ぼしていると考えられる。しかし、現在までにどの程度の濃度差やせん断応力が細胞の異方性決定に必要とされるかといった定量的な知見は乏しい。このような背景から、本論文では細胞の異方性決定機構の解明を目的として、微小環境の構成要素である濃度勾配によって生じる濃度差と流体の流れによって生じるせん断応力が、細胞の異方性決定に対して与える影響について定量的な解析を行なった。

第1章では緒言として、液性因子の濃度勾配や流体の流れが細胞に対して与える影響について紹介する。そして、微小環境を構成するこれらの要素の役割について理解する上で、明らかとなっていない点について指摘し、次いで本研究の目的について述べる。

第2章では細胞外環境における Wnt3a タンパク質の濃度差が細胞分裂の異方性に対して与える影響について報告する。

第3章ではせん断応力による神経芽腫細胞の遊走変化や悪性度指標である N-Myc タンパク質の発現量がせん断応力による遊走変化に与える影響について報告する。

第4章では第2章及び第3章で明らかにした結果の生物学的意義について述べ、実験系の改良及びより詳細なメカニズムの理解に向けての展望について議論する。

## 1.2 生体内の微小環境

生体内の微小環境は、分泌タンパク質や低分子化合物によって形成される濃度勾配、間質流や血液などの流体といったように様々な要素から構成されている。これらの要素が細胞周辺に存在することで形態形成や癌細胞の転移に影響を及ぼしている。例として、分泌タンパク質や低分子化合物といった液性因子が拡散や輸送によって濃度勾配を形成することで細胞運命を制御し、初期発生における前後・背腹軸の決定に関与することが古くから知られている [1]。また、微小環境の構成要素である間質流の異常によって癌細胞の転移が促進されていることも報告されている [2]。上記のように細胞周辺の微小環境は細胞に対して大きな影響を及ぼすことから、生命現象の理解に向けて微小環境の役割やその影響について明らかにすることは有意義である。

本研究では分泌タンパク質や低分子化合物によって形成される濃度勾配と流体の流れに着目する。なぜなら、液性因子の濃度勾配や流体の流れは空間的な異质性を有していることから、組織形成や細胞の方向制御に関する重要な役割を担っていると考えられるためである。本節では生体内微小環境として知られている液性因子の濃度勾配や流体の流れについて取り上げ、これらの要素が細胞に対して与える影響について述べる。また、濃度勾配や流体の流れが有する役割を理解する上で明らかになっていない点や技術的な問題点について触れる。

### 1.2.1 液性因子の濃度勾配

生体内において、液性因子は拡散 (diffusion)、トランスサイトーシス (transcytosis)、細胞膜ナノチューブ (cytoneme) によって輸送される。このような輸送により、液性因子の濃度勾配が形成されることが知られている (図 1.1, [3])。形成された液性因子の濃度勾配は形態形成に影響を及ぼす。生物の形態形成は大きく二段階に分けられる。最初の段階は、前後・背腹軸の決定過程である。そして次の段階は、各軸に沿って配置された原基が組織として分化していく過程である。液性因子の濃度勾配がこれらの形態形成過程に深く関わっていることを以下で述べる。

液性因子の濃度勾配による軸決定に関する研究は、ショウジョウバエ初期胚を用いて古くから行われてきた。ショウジョウバエにおける初期胚の前側は、転写因子である Bicoid タンパク質や Hunchback タンパク質の濃度勾配によって決定される。一方で、後側は転写因子である Nanos タンパク質と Caudal タンパク質の濃度勾配によって決定される (図 1.2A, [4])。脊椎動物の初期発生における各軸の決定は、原腸陥入あたりから開始する。その際も液性因子の濃度勾配は、非常に重要な役割を担う。例えば、脊椎動物の初期胚では、原腸陥入が生じる時期に形成体 (オーガナイザー) から拡散した Chd (Chordin) タンパク質が濃度勾配を形成する。そして、勾配状に分布した Chd タンパク質は、腹側化を促す BMP タンパク質を阻害することで背腹軸の決定が生じる (図 1.2B, [1, 5])。さらに、脊椎動

物の神経板における前後軸の決定には、Wnt タンパク質および Wnt タンパク質のアンタゴニストの濃度勾配が関与している (図 1.2C, [6])。

形態形成における二段階目では、決定された各軸に沿って領域特異的に細胞の分化が開始する。例えば、脳および脊髄の原基である神経管では、前後軸や背腹軸に沿って異なる分化パターンが生じ、脳や脊髄の各領域が生み出される。このような各領域の決定には、液性因子の濃度勾配が関わっている (図 1.2D, [7-10])。したがって、液性因子の濃度勾配が形成することによって組織レベルの異方性が決定されていると考えられる。

近年では、実験技術の向上により組織レベルだけでなく数細胞レベルで濃度勾配が形成されていることが確認されはじめている。このような数細胞レベルの濃度勾配は形態形成における組織の微細構造を生み出していると考えられている。例えば、Farin らは 2016 年に腸陰窩 (intestinal crypt) 内の Wnt3 タンパク質濃度が数細胞スケールの短い勾配状に分布していることを明らかにした [11]。数細胞スケールの短い濃度勾配が生じた原因は、細胞分裂やタンパク質分解によるものである (図 1.2 E)。腸陰窩先端に局在している幹細胞は、このような局所的な濃度勾配によって維持されていると考えられている。

形態形成において、分裂方向の決定は秩序立った組織の微細構造を形成する上で重要となる。いくつかの先行研究では、液性因子の濃度勾配が細胞分裂の方向制御を行なっていることを示唆している。まず 2006 年に Siegrist らは、ショウジョウバエの中樞神経系形成における神経幹細胞の非対称分裂方向が上皮基底側から分泌される何かしらの液性因子によって決定されるというモデルを提唱した (図 1.3A, [12])。その後、2012 年には Yoshiura らはショウジョウバエの神経幹細胞の非対称分裂方向が、細胞外の液性因子によって惹起される GPCR (G-protein coupled receptor) シグナルによって決定されていることを明らかにした (図 1.3B, [13])。また、ゼブラフィッシュの原腸陥入時に胚盤葉上層細胞が動物極-植物極 (A-V) 軸に沿って分裂することが知られており、この現象も細胞外に存在する液性因子である Wnt タンパク質によって制御されていると考えられている (図 1.3C, [14])。これらの先行研究では、各液性因子が濃度勾配を形成しているか否かについては言及されていない。しかし、図 1.1 や前述した研究例から、これらの液性因子は生体内で濃度勾配を形成していることが考えられる。

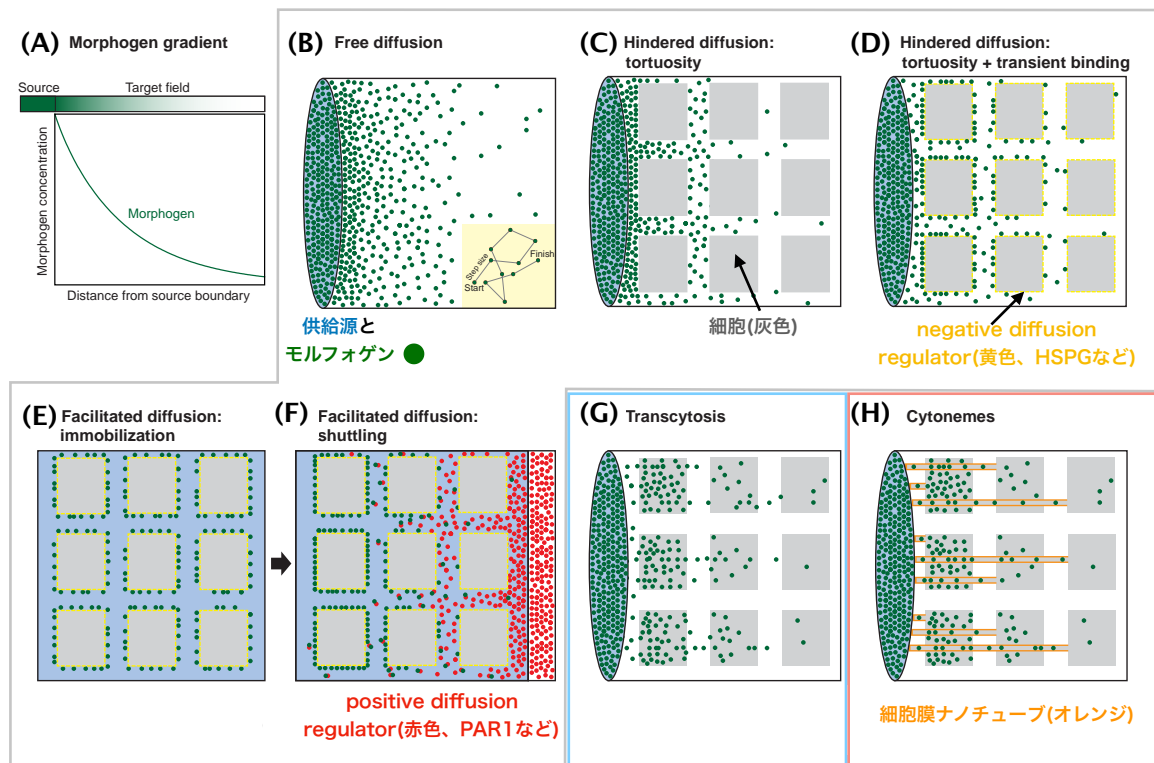


図 1.1: 液性因子の濃度勾配形成

(A) 供給源から輸送されて形成される液性因子濃度勾配。(B-H) 液性因子濃度勾配の形成に関わる輸送形態。灰色枠内は拡散によって生じる濃度勾配、青色枠内はトランスサイトosisによって細胞間を輸送することで生じる濃度勾配、赤色枠内は細胞膜ナノチューブを介した輸送によって生じる濃度勾配を示している。(B) 自由拡散による濃度勾配形成。液性因子 (緑丸) が供給源から自由拡散によって空間内に液性因子の濃度勾配が形成される。(C) 空間内に細胞などの障害物が存在しているため、液性因子は蛇行しながら拡散される。(D) 障害物表面に液性因子をトラッピングする物質 (negative diffusion regulator, ヘパラン硫酸プロテオグリカン: HSPG など) が存在しているため、液性因子は一過的に障害物にトラッピングされつつ蛇行を繰り返す。(E) 液性因子の供給源が均一存在しており、障害物表面に negative diffusion regulator が存在するため、液性因子は空間内にある程度均一に分布する。(F) (E) の状態に加えて negative diffusion regulator から液性因子を解離させる物質 (positive diffusion regulator: PAR1 など) が供給源から拡散されることによって、液性因子は濃度勾配分布を示す。(G) 液性因子が細胞内に取り込まれ (エンドサイトosis)、反対側の隣接細胞に向けて放出 (エキソサイトosis) することによって濃度勾配が形成される。(H) 細胞膜ナノチューブを介して供給源から液性因子が各細胞に輸送される際にも液性因子の濃度勾配が生じる。[3] より改変。



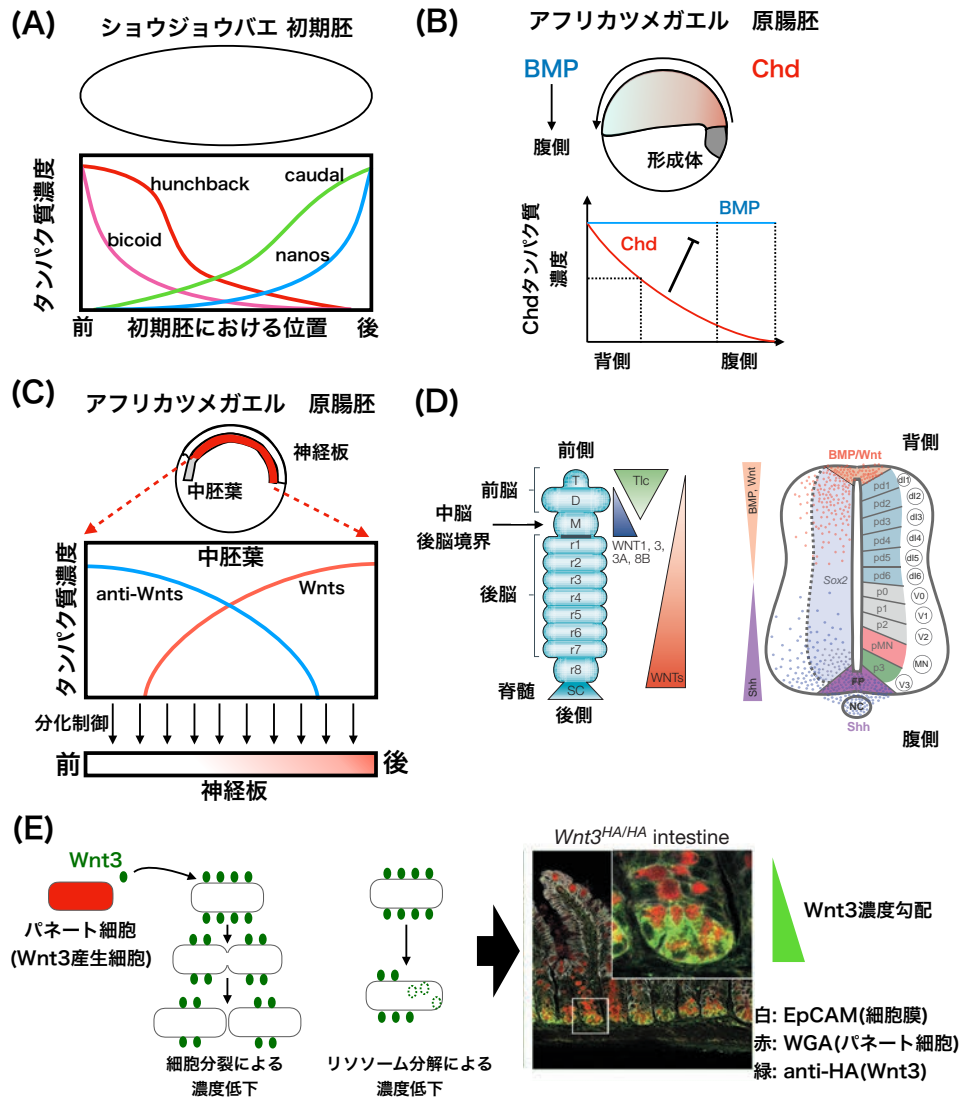


図 1.2: 液性因子の濃度勾配形成と形態形成

(A) ショウジョウバエ初期胚で観察される前後軸の決定に関与するタンパク質濃度勾配 [4]。  
 (B) アフリカツメガエルの原腸胚における背腹軸の決定に関与するタンパク質濃度勾配。最初は BMP が広い領域で一様に分布しているが、形成体から分泌された Chd が濃度勾配を形成することで、濃度勾配依存的に BMP を抑制する。このような制御関係により背腹軸の決定が生じる [1, 5]。  
 (C) アフリカツメガエル原腸胚における神経板の前後軸決定に関与するタンパク質濃度勾配。Wnt シグナルを阻害するタンパク質と Wnt シグナルを活性化するタンパク質が中胚葉で濃度勾配を形成することで、神経板の前後軸決定が生じる [6]。  
 (D) 神経管における前後軸、背腹軸の決定に関与するタンパク質濃度勾配。[7, 10] より改変。  
 (E) 腸陰窩における Wnt3 タンパク質の濃度勾配。パネート細胞から分泌された Wnt3 が細胞分裂による濃度低下やリソソーム分解によって、次第に濃度が減少し、結果として短距離で濃度勾配を形成している (右画像)。[11] より改変。

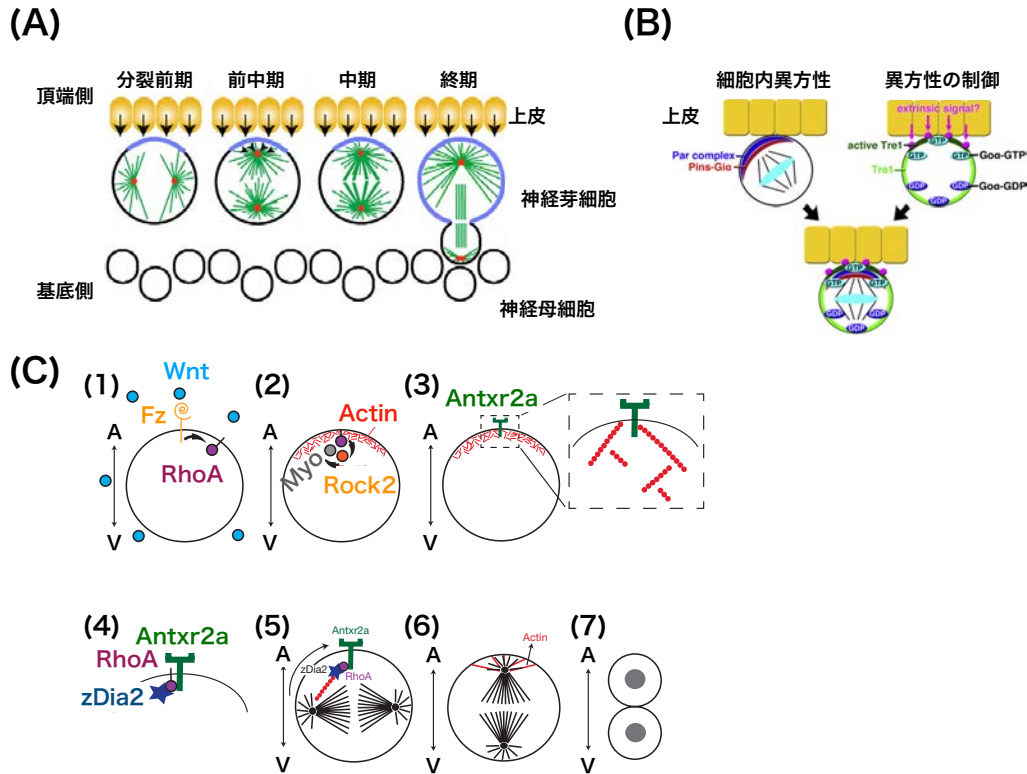


図 1.3: 液性因子による分裂方向制御

(A) ショウジョウバエの中枢神経系形成における液性因子による分裂制御。黒矢印は上皮から分泌された液性因子。[12] より改変。(B) ショウジョウバエの神経幹細胞の分裂方向制御。神経幹細胞は異方性を有している (左図)。細胞内の異方性は、上皮から分泌された液性因子によって、GPCR である Tre1 が活性化されることで制御される (右図)。[13] より改変。(C) ゼブラフィッシュ胚盤葉上層細胞の液性因子による分裂方向制御。(1) 細胞表面の Fz 受容体に Wnt タンパク質が結合し、局所的に RhoA を活性化。(2) 局所的に活性化された RhoA は Rock2 とミオシンを活性化することで、F-アクチンキャップを形成し、A-V 軸に配向させる。(3) 形成した F-アクチンキャップは Antrax toxin receptor 2a(Antxr2a) と結合する。(4) Antxr2a は活性型 RhoA と結合し、フォルミンファミリータンパク質である zDia2 を活性化する。(5) 活性化した zDia2 によってトルクが生じ、紡錘体の回転を制御する。(6) 紡錘体が A-V 軸にアライメントされる。(7) A-V 軸に沿って細胞分裂が生じる。[14] より改変。

### 1.2.2 張力による分裂方向制御

近年、生体内における細胞分裂方向を制御する要素は濃度勾配以外にも存在していると考えられている。その一つの要素として細胞表面に生じる張力が注目されている。2007年に、Théryらは、ソフトリソグラフィ技術を利用し細胞の接着場を制限することで、retraction fiberを介して力学的に分裂方向が制御されていることを明らかにした(図1.4A, [15])。その後、2011年にFinkらは光ピンセットを用いることで微小パターン上で培養された分裂中細胞の片側に約7 nNの力が生じていることを明らかにし、さらに同等の力を人為的に与えることで分裂方向に影響を及ぼすことを発見した(図1.4B, [16])。そして、2016年にBosveldらはショウジョウバエの上皮組織ではトリセルラージャンクションの位置に依存して紡錘体にかかる力が決定され、分裂方向の制御が行われていることを明らかにした(図1.4C, [17])。このように、細胞周辺からの機械的刺激によって分裂方向が制御されていることが明らかにされつつある。

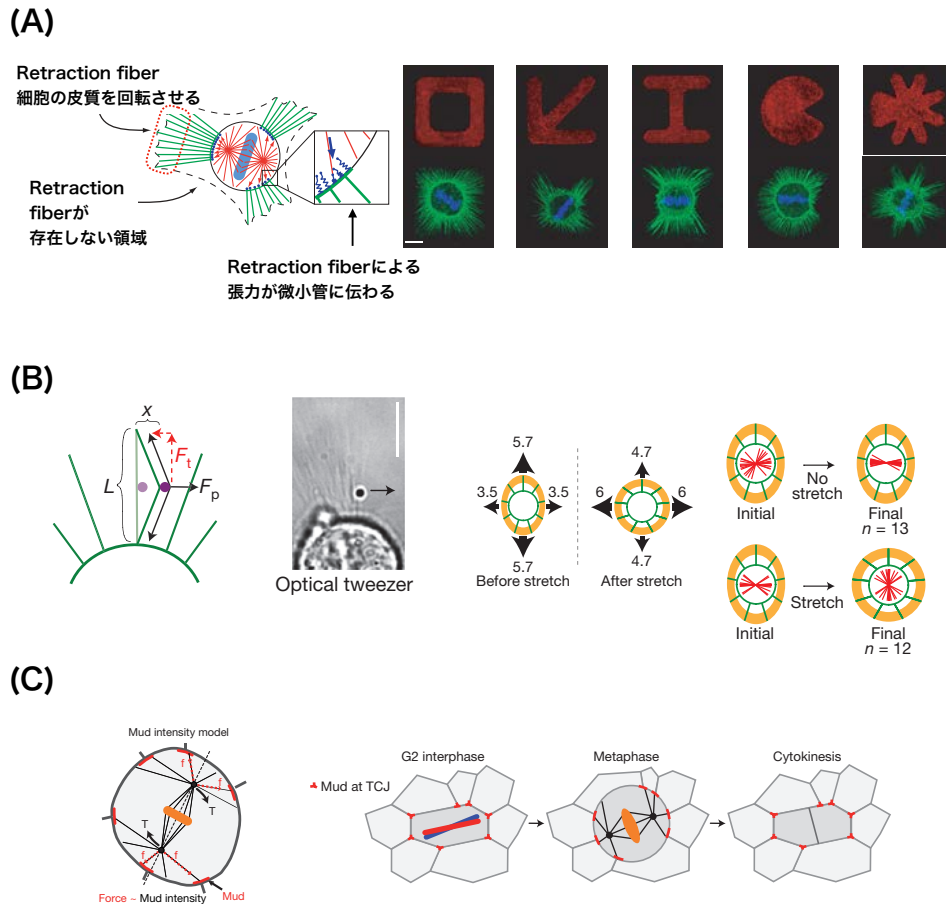


図 1.4: 張力による細胞分裂方向の制御

(A) Retraction fiber による分裂方向制御 (左図)。足場を人為的に制限することで分裂方向が制御される (右図)。[15] より改変。(B) 光ピンセットによる retraction fiber に生じる張力の測定。L: retraction fiber の長さ、 $x$ : ビーズの変位、 $F_p$ : 光ピンセットによる牽引力、 $F_t$ : retraction fiber による張力。 $x \ll L$ の条件で、 $F_t = F_p \times L / (4x)$ が成り立つため、retraction fiber に生じる張力を測定することが可能となる (左図)。シリコン薄膜上にパターンニングした楕円形足場に細胞を培養した際に生じる張力 (黒矢印、単位 nN)。分裂中の細胞に対して張力を人為的に加えると、細胞分裂方向 (赤線) が等方的に分布する [16]。(C) ショウジョウバエの上皮組織における細胞分裂方向制御。トリセルラージャンクション (TCJ) と呼ばれる領域にダイニン結合タンパク質 Mud が局在し、Mud タンパク質の局在した量に依存した張力が星状体微小管に生じ、紡錘体にトルクを発生させる (左図)。トリセルラージャンクションの位置によって細胞分裂の方向が決定される (右図) [17]。

### 1.2.3 流体流れによって生じるせん断応力

生体内の細胞は、細胞周辺の微小環境から機械的刺激を受けることで遊走、配向、分化が制御されている。このような機械的刺激の一つとして、流体の流れによって生じるせん断応力が挙げられる。せん断応力とは、外力を加えた時に物体のある面の平行方向に生じる応力である。したがって、物体の表面近傍に流れが生じている場合にも物体にはせん断応力が生じる。

生体内における流体流れとして、間質流 (interstitial flow) や血流が存在する。間質流とは、毛細血管の動脈側から静脈側やリンパ管に向かって組織内を流れる流体であり、栄養の供給や老廃物の除去を行うといった役割を担っている (図 1.5)。したがって、生体内に流体流れが存在するということは、流れに曝された細胞表面にはせん断応力が働くことを意味する。流体流れによって生じるせん断応力は、細胞に対して機械的刺激として働き、細胞の分化、形態、遊走能に影響を及ぼすことが知られている。本小節では、せん断応力が細胞に対してどのような影響を与えるかについて取り上げる。また、流れによって生じるせん断応力の力学的特徴については第 1.3.2.1 小節で述べる。

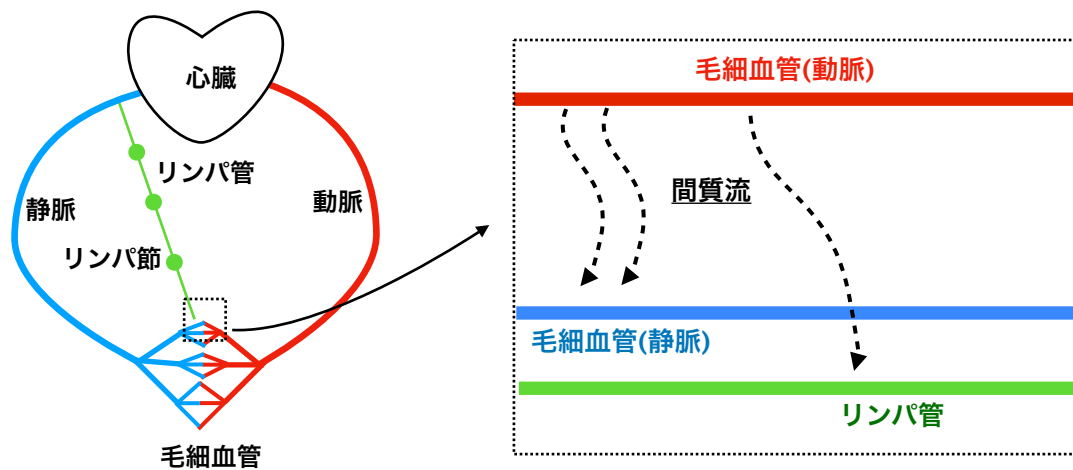


図 1.5: 間質流に関する概念図

左図: 生体内における心臓血管系とリンパ系の関係を示した概念図。リンパ管は、毛細血管付近まで伸びている。右図: 毛細血管付近で生じる間質流。動脈側の毛細血管から漏れ出た間質液は、静脈側の毛細血管やリンパ管によって回収される。この時、組織内に流れ(間質流)が生じる。

### 1.2.3.1 セン断応力による細胞形態変化

血管内皮細胞に対してせん断応力を与えると、細胞骨格がリモデリングされ、細胞の長軸が流れ方向に配向される [18,19]。このような血管内皮細胞の配向は、血管形成における冠状動脈のサイズに影響を及ぼすと考えられている [20]。また、栄養膜細胞 (trophoblastic cell) に対してせん断応力を与えると Ezrin タンパク質が細胞の頂端面に局在し、微絨毛の形成が促進される [21]。このように、せん断応力は生体内の細胞形態にも大きな影響を与えることが考えられる。

### 1.2.3.2 セン断応力と遊走変化の関係

近年では、細胞にせん断応力を与えると細胞は流れの方向に沿って遊走することが報告されている。たとえば、間葉系幹細胞や血管内皮細胞は流れの下流側に遊走するのに対し、血管内皮細胞は流れに対して上流に遊走することが報告されている [20,22]。せん断応力によって制御される細胞遊走は、正常な組織を形成するために重要な役割を担っていると考えられている [20]。また、せん断応力は前立腺癌細胞や乳癌細胞の遊走能を向上することが報告されている [23,24]。上述のように、せん断応力は生体内における細胞遊走を制御しているといえる。

### 1.2.3.3 セン断応力と遺伝子発現制御の関係

せん断応力が細胞分化を制御している例として、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) から血管内皮細胞 (endothelial cell) への分化が挙げられる [25]。間葉系幹細胞にせん断応力を与えると、KLF-2 転写因子の発現が促進され、血管内皮細胞への分化が進行することが知られている [26,27]。せん断応力は、分化制御以外にも血管内皮細胞における細胞接着因子 (cell adhesion molecule) の遺伝子発現制御を行なっている [28]。このようなせん断応力による遺伝子発現制御は、発生段階における血管システムの形成や出生後の血管の維持に関わると考えられている [29]。

### 1.2.3.4 セン断応力を感知するメカノセンサタンパク質

せん断応力を感知するメカノセンサとして、TRP チャネル [30]、Integrin [31]、Yes-associated protein(YAP) [23]、Caveolin [24]、Heparan sulfate proteoglycans(HSPG) [32] といった細胞膜に存在するタンパク質が挙げられる。これらのタンパク質を介することで、せん断応力などの機械的刺激を生化学的シグナルに変換していると考えられている。

### 1.2.4 生体内微小環境の役割を明らかにする上での問題点

前述のように生体内で生じている液性因子の濃度勾配や流体によるせん断応力は、組織や細胞レベルにおける異方性の決定に寄与している。しかし、現在までに異方性決定に影響を与えるためには、どれほどの濃度勾配やせん断応力が必要かといった定量的な理解は乏しい。特に、生体内における細胞分裂や細胞遊走といった1細胞レベルの異方性決定には、どれほどの濃度勾配やせん断応力が必要かといったことについては不明な点が多い。この原因として、生体内の微小環境が多くの要素から構成されている上に、要素同士がお互いに作用しているため、要素レベルの理解が困難であるという問題が挙げられる。また、生体内における1細胞レベルの経時的観測が困難であるといった問題も挙げられる。したがって、微小環境を生体外で人為的に制御することによって上記の問題を解決することが望まれる。

しかしながら、従来の生物学的手法を用いて微小環境を制御することは困難である。たとえば液性因子の濃度勾配が細胞に与える影響について調べるためには、数百  $\mu\text{m}$  ~ 数  $\text{mm}$  の精確な濃度勾配の形成が必要となる。しかし、このような濃度勾配を従来の静置培養系で維持することは非常に困難である。具体的に考えてみると、培養液中 (粘度:  $0.0007 \text{ Pa}$  [33]) で自由拡散を行なっている液性因子 (例:  $D_{Wnt3a} = 6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  [33]) は僅か数秒で数百  $\mu\text{m}$  ~ 数  $\text{mm}$  の位置に到達する。このような条件下では細胞に対して一定の濃度勾配を長時間与え続けることは不可能である。また、せん断応力の影響を明らかにするために精確な流体制御が必要となってくる。したがって、上記の問題を解決するために微小環境の制御を可能とする実験系が必要となる。



## 1.3 生体内微小環境の理解に向けたマイクロ流体デバイスの応用

前小節では生体内の微小環境を理解する上での問題点、および *in vitro* の系で微小環境を制御する際の問題点について取り上げた。このような問題を解決するために、生物学分野ではマイクロ流体デバイスの利用が盛んとなっている。マイクロ流体デバイスとは、フォトリソグラフィ技術を利用して作製したマイクロメートルオーダーの流路を有するデバイスである。マイクロメートルオーダーの流路では、レイノルズ数 (Reynolds number) が非常に小さいといった特徴が挙げられる。レイノルズ数は、慣性力と粘性力の比から求められる流体の振る舞いを特徴付ける無次元数である。レイノルズ数が低い場合 (< 1000)、流体は層流と呼ばれる。矩形流路におけるレイノルズ数は、以下のように定義されている。

$$Re = \frac{\rho v D_H}{\mu} \quad (1.1)$$

$\rho$  は流体の密度 ( $\text{kg/m}^3$ )、 $v$  は流体の平均流速 ( $\text{m/s}$ )、 $D_H$  は水力直径 ( $\text{m}$ )、 $\mu$  は粘度 ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) である。また、水力直径 ( $D_H$ ) は以下のように定義される。

$$D_H = \frac{4A}{P} \quad (1.2)$$

$A$  は流路の断面積 ( $\text{m}^2$ )、 $P$  は流路の潤辺 ( $\text{m}$ ) である。層流から乱流への遷移は、レイノルズ数が 1000 程度で生じる。すなわち微小流路内では、非常に大きい流速に設定しない限り乱流が発生しない (式 1.1 参照)。以上のようにマイクロ流体デバイスでは層流を容易に発生させることが可能なため、微小環境を精確に制御することが可能となる。

### 1.3.1 マイクロ流体デバイスを用いた液性因子濃度勾配の制御

第 1.2.1 小節では発生過程における液性因子濃度勾配の重要性について取り上げた。このような背景から、マイクロ流体デバイスを用いて液性因子濃度勾配を制御することで、濃度勾配と細胞分化の関係性を明らかにすることを目的とした研究が盛んに行われている。2009 年には、Park らは神経管内に分布している Shh と BMP4 の濃度勾配をマイクロ流体デバイス内で再現した。そして濃度勾配下で神経前駆細胞を培養することによって、濃度勾配に応じた神経細胞への分化制御に成功した (図 1.6, [34])。さらに、2016 年に Demers らは神経管内におけるレチノイン酸、Shh、BMP4 の空間分布をマイクロ流体デバイス内で再現することにより、神経管内に存在する運動ニューロン (MNs) への空間的な分化制御に成功している (図 1.7, [35])。このようなマイクロ流体デバイスを用いた研究により、生体内における各液性因子の濃度勾配が持つ役割について明らかにされはじめてきている。

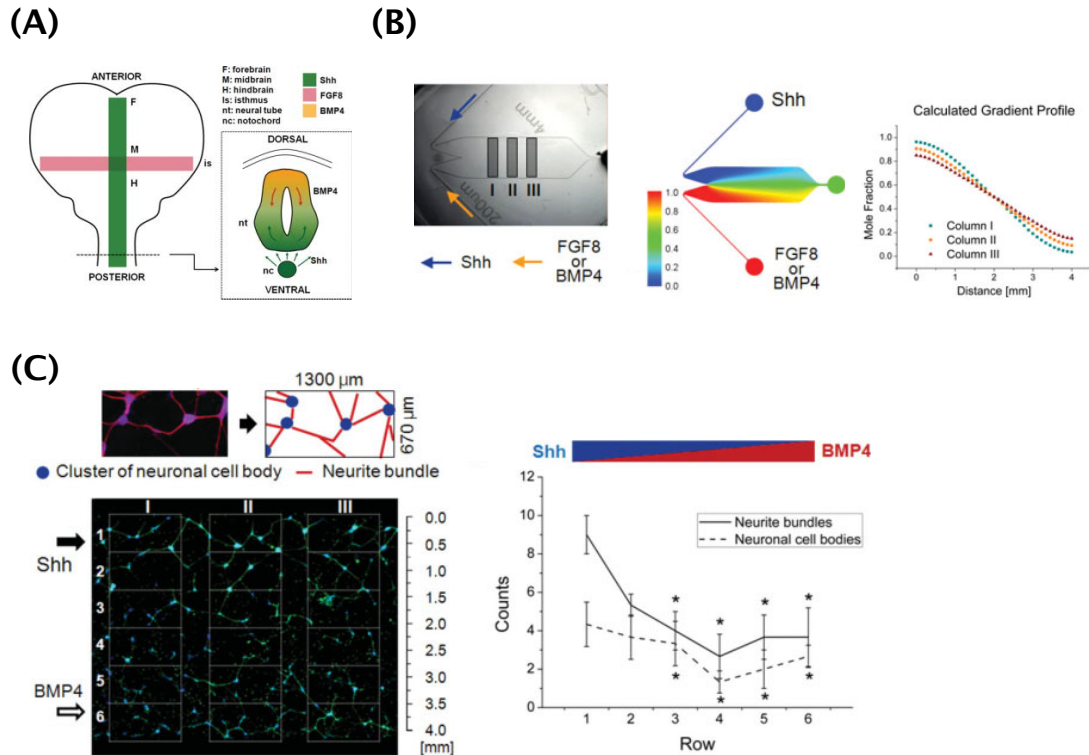


図 1.6: マイクロ流体デバイスによる液性因子濃度勾配の制御および分化制御

(A) 神経管内で生じている液性因子濃度勾配の概略図。左図は神経管前後軸 (Anterior-Posterior) で観測される各液性因子の分布。右図は、神経管の背腹軸 (Dorsal-Ventral) で観測される各液性因子の濃度勾配。Shh は脊索 (nc) から分泌されることによって、神経管内で濃度勾配を形成している。一方、BMP4 は背側 (Dorsal) より分泌され、Shh とは相反する濃度勾配を形成する。(B) 神経管内で観測される液性因子濃度勾配を再現するためのマイクロ流体デバイス。Shh と BMP4 を、それぞれ反対側の流入口から加え、液性因子の濃度勾配を形成させている。左図は実際のマイクロ流体デバイス。中央図はシミュレーションによって確認した濃度勾配。右図は、左図における領域 I, II, III 内のシミュレーション結果から得られた濃度勾配。(C) 流路内の神経前駆細胞に対して、濃度勾配刺激 (Shh+BMP4) を与えた後の細胞体と神経突起の空間的分布。Shh 高濃度側では分化した神経細胞の細胞体 (概略図; 青丸) や突起 (概略図; 赤線) が多く存在し、BMP4 高濃度側では細胞体や突起が減少した。[34] より改変。

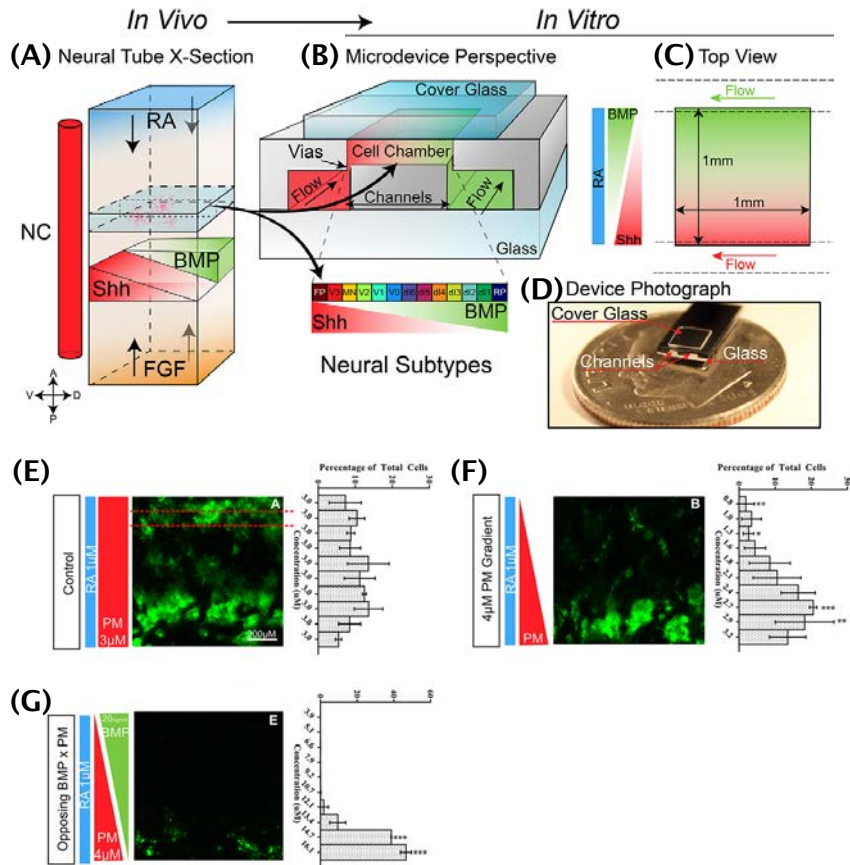


図 1.7: 神経管内における詳細な神経分化パターンを再現するために開発されたマイクロ流体デバイス

(A) 神経管内で生じている詳細な液性因子濃度分布。図 1.6 と比較して、より詳細な液性因子濃度分布を想定している。(B) 作製するマイクロ流体デバイス。神経管内で観測される液性因子濃度勾配を再現するための微小流路に関する概略図。(C) マイクロ流体デバイス内で再現した液性因子濃度勾配パターン。(D) 実際のマイクロ流体デバイス。(E-F) 各培養条件における運動ニューロン分化マーカー (HB9<sup>+</sup>-GFP, 緑色) の発現パターン。生体内の液性因子濃度勾配を再現した条件 (G) では、運動ニューロンマーカーが空間的に限局している。RA:レチノイン酸、PM:パルモルファミン;Shh シグナルを惹起するアゴニスト。[35] より改変。

### 1.3.2 マイクロ流体デバイスを用いた細胞へのせん断応力刺激

生体内では流体によるせん断応力が細胞に対して機械的刺激として働き、様々な表現型に影響を及ぼしている(第1.2.3小節参照)。このような背景から、マイクロ流体デバイスを用いることでせん断応力が細胞に対してどのような影響を与えるか調べられてきた。本小節では微小流路内で二次元培養されている細胞に生じるせん断応力の導出を行なった後にマイクロ流体デバイスを用いる利点について述べる。

#### 1.3.2.1 微小流路内の細胞に生じるせん断応力

せん断応力は以下の式のように速度勾配 ( $dV/dz$ ) に比例することが知られている。

$$\tau = -\mu \frac{dV(z)}{dz} \quad (1.3)$$

上記の関係式を満たす流体のことをニュートン流体と呼ぶ。 $\mu$  は粘度 (Pa·s)、 $V(z)$  は  $z$  方向の速度分布、 $z$  は高さを示す。せん断応力の単位は Pa である。上式より、せん断応力を求める際には速度分布  $V(z)$  を求める必要がある。速度分布はナビエ・ストークス方程式から求めることが可能である。

ナビエ・ストークス方程式とは、ニュートン流体の運動方程式である。流れ場の任意の位置 ( $x, y, z$ ) における流れの速度を  $\mathbf{V}(x, y, z, t)$  とすれば、ナビエ・ストークス方程式は以下のように記述される。

$$\rho \frac{D\mathbf{V}}{Dt} = \mathbf{F} - \nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{V} \quad (1.4)$$

右辺第一項を外力項、第二項を圧力項、第三項を粘性項と呼ぶ。 $\nabla^2$  はラプラス演算子である。また、左辺の  $D/Dt$  は実質微分 (substantial derivative) と呼び、

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + u \frac{\partial}{\partial x} + v \frac{\partial}{\partial y} + w \frac{\partial}{\partial z} \quad (1.5)$$

と定義される。 $u, v, w$  は、それぞれ  $x, y, z$  方向の速度成分である。したがって、実質微分は  $x, y, z$  方向における加速度成分を求めていることになる。右辺第一項を局所項 (local term) と呼び、定常流であれば局所項はゼロである。また、右辺第二項から第四項までを対流項 (convective term) と呼び、どの場所でも流体の速度が一定の場合はゼロとなる。ナビエ・ストークス方程式 (式 (1.4)) は、(1) 非圧縮性流体 ( $\rho = \text{const}$ : 体積が膨張圧縮しない)、(2) 平行平板内を流れる定常流 ( $D\mathbf{V}/Dt = 0$ : 加速度がゼロである、 $\mathbf{F} = 0$ : 流れに対して外力が加わらない)、(3)  $z = 0, z = h$  の境界において流れの速度はゼロである、という3つの条件下で厳密解を求めることが可能である。上記3つの条件から解析的に得られた速度分布を二次元ポアズイユ流れと呼ぶ (図 1.8)。二次元ポアズイユ流れは以下の式で記述される。

$$V(z) = -\frac{1}{2\mu} \frac{dp}{dx} (hz - z^2) \quad (1.6)$$

式(1.6)を式(1.3)に代入することで、せん断応力を求めることが可能である。しかし、微小流路内の圧力勾配を実験的に求めることは困難であるため式変形を行う必要がある。まず、二次元ポアズイユ流れにおける最大流速を求める。二次元ポアズイユ流れの流速が最大となる高さは  $h/2$  であるため、式(1.6)の  $z$  に  $h/2$  を代入すると、

$$V_{max} = -\frac{h^2}{8\mu} \frac{dp}{dx} \quad (1.7)$$

と求まる。次に、式(1.7)を式(1.6)に代入すると、二次元ポアズイユ流れは、

$$V(z) = \frac{4V_{max}}{h^2} (hz - z^2) \quad (1.8)$$

と求まる。ここで微小流路内で二次元培養された接着細胞について考える。細胞の高さが微小流路の高さよりも十分に低ければ、細胞に生じるせん断応力は流路底面に生じるせん断応力として近似することが可能である。したがって、細胞に生じるせん断応力を求めるために式(1.8)を式(1.3)に代入し、 $z=0$ におけるせん断応力を求めると

$$\tau = \frac{4\mu V_{max}}{h} \quad (1.9)$$

が導出される。また、アスペクト比 ( $h/w$ ) の低い矩形流路内の流速分布は、二次元ポアズイユ流れとして近似できる [36]。したがって、低アスペクトの微小流路では最大流速  $V_{max}$  を測定することで流路内で培養された細胞に生じるせん断応力を求めることが可能である。

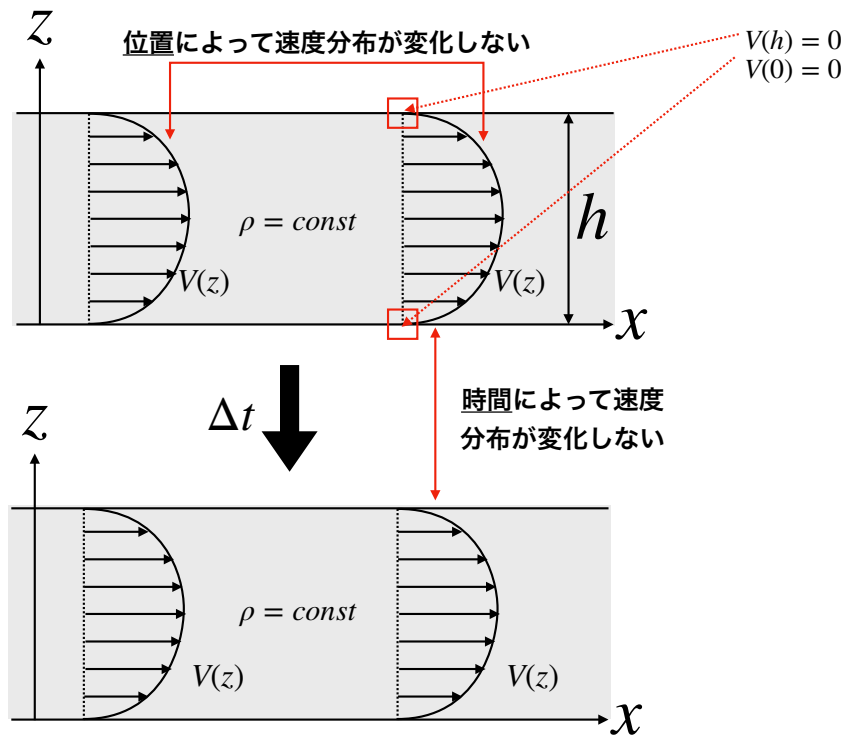


図 1.8: 二次元ポアズイユ流れの条件

二次元ポアズイユ流れをナビエ Stokes 式から導出できる条件として、位置によって速度分布が変化しないこと、時間によって速度分布が変化しないこと、流体の密度が一定であること、壁面における流速がゼロであることが必要である。 $V(z)$  は流速分布、 $h$  は平行平板流路の高さを表している。

### 1.3.2.2 マイクロ流体デバイスの利点

マイクロ流体デバイスを用いて細胞にせん断応力を与える際には、いくつかの利点が存在する。一つ目は、流路内の流れが層流になるため安定したせん断応力を細胞に与えることが可能であるという点である。二つ目は、流路寸法が非常に小さいため僅かな流量で大きなせん断応力を細胞に対して与えることが可能であるという点である (式 (1.9) 参照)。三つ目は、デバイスが小型であるため光学顕微鏡システムに導入することが容易であり、細胞へのせん断応力刺激と測定を同時に実現することが可能であるという点である。そして最後に、マイクロ流体デバイスを用いることで一度の実験で幅広いせん断応力を実現することができるという点が挙げられる。以下に最後の理由について述べる。N本の並列流路を有するマイクロ流体デバイスでは、 $i$ 番目の流路に分配される流量 ( $Q_i$ ) は以下の分配法則に従う [37](図 1.9)。

$$Q_i = Q_{total} \frac{1}{R_i \sum_{j=1}^N \frac{1}{R_j}} \quad (1.10)$$

$i$  および  $j$  は並列流路の番号、 $Q_{total}$  はデバイスに流入する全流量、 $R_i$  は流路番号  $i$  における流路抵抗である。各流路に分配される流量は、流路抵抗値によって決定される (式 (1.10) 参照)。流路抵抗値は、流路寸法によって決定される流体の流れにくさを表す値である。矩形流路内に定常状態の圧力駆動流を流した際の流路抵抗 ( $R$ ) は、以下の式のように求められる [37]。

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 w \left( 1 - \frac{192h}{\pi^5 w} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\tanh\left((2n+1)\frac{\pi w}{2h}\right)}{(2n+1)^5} \right)} \quad (1.11)$$

$\mu$  は粘度、 $L$  は流路の長さ、 $w$  は流路幅、 $h$  は流路高さである。式 (1.11) の特徴について述べる。まず、式 (1.11) をまとめると

$$R = \frac{12\mu L}{h^3 w (1 - T)} \quad (1.12)$$

$$T = \frac{192h}{\pi^5 w} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\tanh\left((2n+1)\frac{\pi w}{2h}\right)}{(2n+1)^5} \quad (1.13)$$

となる。T はアスペクト比 ( $h/w$ ) を変数とした関数として定義することが可能であることがわかる。アスペクト比 ( $h/w$ ) を説明変数として従属変数 T についてプロットすると図 1.10 のようになる ( $n=2$ )。図 1.10 からわかるように、低アスペクト比



であると流路抵抗値  $R$  は  $12\mu L/wh^3$  に近似できる。一方で、アスペクト比 ( $h/w$ ) が高くなると流路抵抗値は近似することができなくなるため式 (1.11) を用いて流路抵抗値を求める必要がある。また、流路抵抗値は流路の幅 ( $w$ )、長さ ( $L$ ) および高さ ( $h$ ) を変化させることで調整できる (式 (1.11) 参照)。特に流路高さ ( $h$ ) は、最大で  $O(h^3)$  で流路抵抗値に影響を及ぼすため僅かな調節によって流路抵抗値を大きく変化させることが可能である。したがって、流路寸法 (流路抵抗値) の異なる  $N$  本の並列流路を用意することで一度に幅広いせん断応力を実現することが可能となる。このような並列流路を有するマイクロ流体デバイスを利用し細胞に対して異なるせん断応力を与えることで、せん断応力によって細胞の増殖速度が異なることを明らかにした研究例も存在する (図 1.11, [37])。

しかし、応答を示すために必要とされるせん断応力の大きさは多くの細胞で不明であることが多い。したがって、幅広いせん断応力を一度に実現可能なマイクロ流体デバイスは、せん断応力の影響や役割を理解する上で非常に有用である。

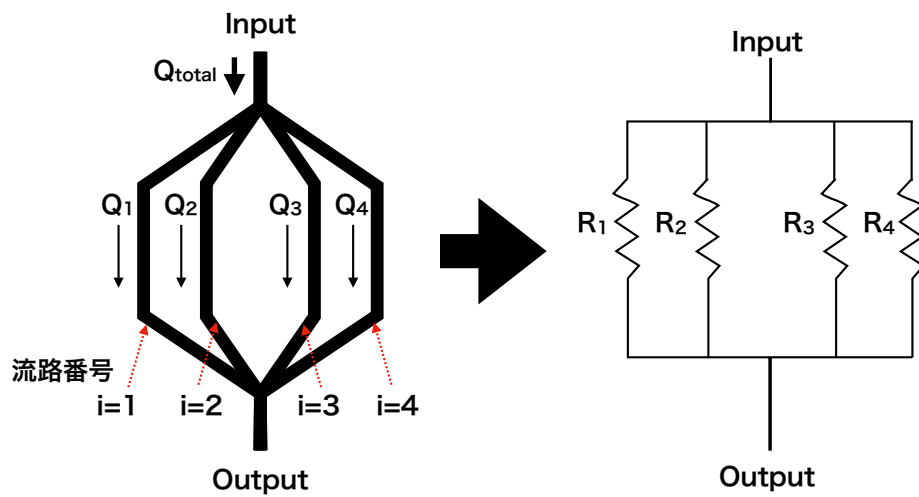


図 1.9: 並列流路の概略図および流路抵抗図

左図: 並列流路の概略図。流入口 (Input) より流入した流体は、流量  $Q_i$  で各流路に分配される。右図: 流路抵抗図。各流路の流路抵抗値は  $R_i$  として表される。

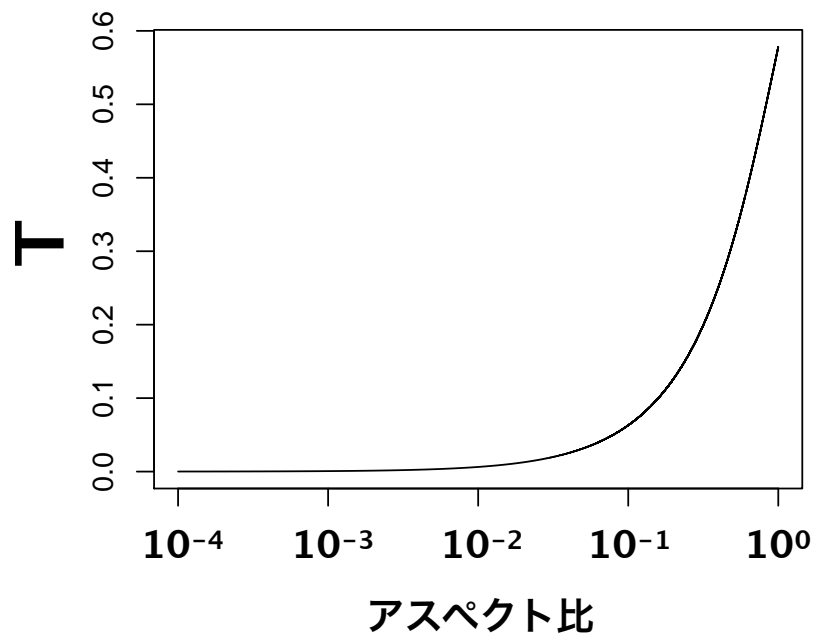


図 1.10: 流路抵抗式の特徴

式(1.13)における従属変数  $T$  のプロット。 $T$  は説明変数であるアスペクト比 ( $h/w$ ) によって非線形に変化する。

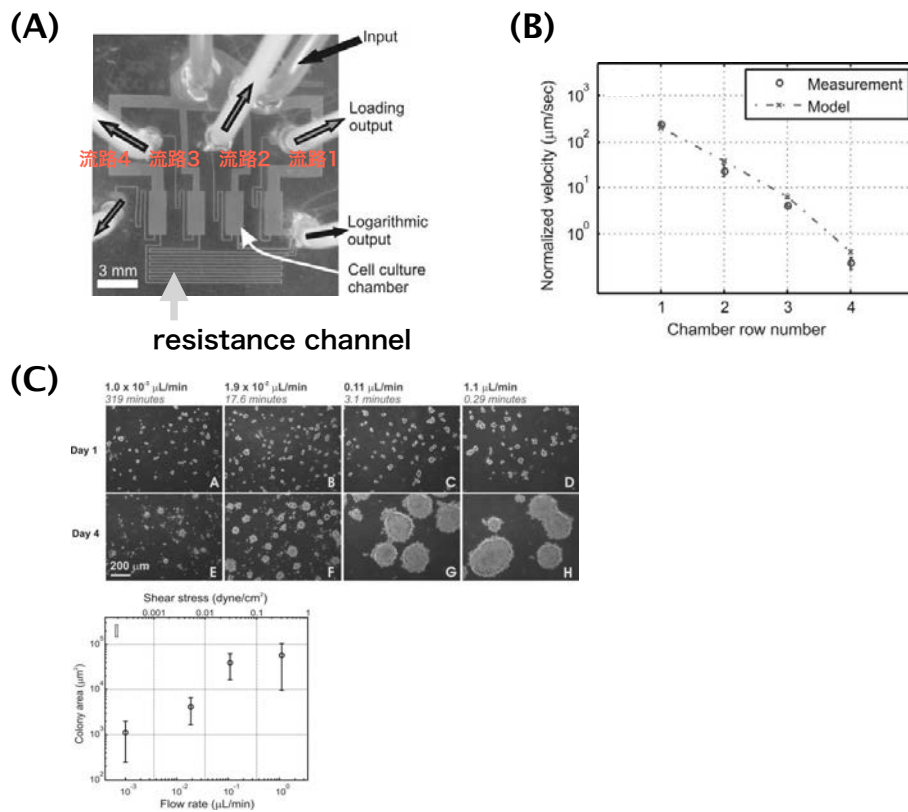


図 1.11: 異なるせん断応力を同時に実現するマイクロ流体デバイス

(A) resistance channel の長さや幅によって cell culture chamber 内におけるせん断応力の調節を行うデバイス。(B) 各 cell culture chamber 内における流速。破線は Matlab と FEMLAB による数値計算によって求めた流速である。エラーバーは標準偏差を示している。(C) マウス ES 細胞を各流量で培養した結果。上図は各測定時期 (Day1, Day4) における実際の顕微鏡画像。下図は各せん断応力 (各流量) におけるコロニーの面積。せん断応力 (流量) の大きさに依存してコロニーの面積が大きくなる。[37] より改変。

### 1.3.2.3 マイクロ流体デバイス以外のせん断応力を与える実験系

せん断応力を与えることを目的としたマイクロ流体デバイス以外の実験系として回転板を利用した実験系が挙げられる。図 1.12 のような回転円錐板を用いた実験系では、回転円錐板と固定平板の間にせん断応力が生じる。固定平板上で培養された細胞に与えられるせん断応力  $\tau$  は以下の式によって算出可能である [38]。

$$\tau = \frac{\mu\omega}{\alpha} \quad (1.14)$$

$\mu$  は液体の粘度 (Pa·s)、 $\omega$  は角速度 (rad/s)、 $\alpha$  は円錐の角度 (rad) である。回転円錐板を用いた実験系では、空間的に一様なせん断応力を与えることが可能である。しかし、せん断応力刺激と細胞の観察を同時に行う場合に、回転板が光軸上に存在するといった問題や、光学顕微鏡システム内に回転円錐板を導入することが困難であるといった問題が生じる。また、長時間の培養を行う場合、培地の入れ替えが生じないため細胞から分泌されたタンパク質の影響を受けるといった問題が生じる。さらに、幅広いせん断応力を一度に実現することが困難であるといった問題点がある。

### 1.3.2.4 流れによるせん断応力以外の影響

微小流路内で二次元培養を行なっている細胞に対して圧力駆動流を与えると、細胞はせん断応力以外にも (1) 圧力と (2) 物質供給の影響を受ける。圧力駆動流を用いてせん断応力刺激を与える際には、これらの因子が細胞に対してどれほどの影響を与えるかについて考慮する必要がある。まず細胞に働く力は、流路方向の力と流路壁面方向の力に分けることができる。そして、流路方向の力はせん断応力が支配的である一方、流路壁面方向に働く力は静圧が支配的であることが示されている [39]。したがって細胞に対して流れを与える際には、せん断応力以外にも静圧の影響について考慮する必要がある。次に、細胞への物質供給についてである。液体中に存在する細胞の表面には非攪拌水層 (diffusion boundary layer) と呼ばれる薄い水の層が存在する。成長因子のような物質が非攪拌水層表面に到達すると、物質は非攪拌水層内を自由拡散することで細胞表面に接近する。したがって非攪拌水層の厚み ( $\delta_D$ ) は、物質が細胞表面に到達するまでの時間に大きく影響を及ぼす。そして非攪拌水層の厚み  $\delta_D$  は、流速に依存して変化することが知られている。ゆえに、流れを利用してせん断応力を与える場合、流速によって変化する非攪拌水層の厚みについて考慮する必要がある。非攪拌水層の厚み  $\delta_D$  は以下の式から求められる [40]。

$$\delta_D \approx \delta_u Sc^{-1/3} \quad (1.15)$$

$\delta_u$  は境界層 (boundary layer) の厚み (m)、 $Sc$  はシュミット数である。シュミット数は、動粘度  $\nu$  (m<sup>2</sup>/s) と物質の拡散係数  $D$  (m<sup>2</sup>/s) の比 ( $\nu/D$ ) から求められる。境界層の厚み  $\delta_u$  は以下の式から求められる。

$$\delta_u \approx Re^{-1/2} L = \left( \frac{uL}{\nu} \right)^{-\frac{1}{2}} L \quad (1.16)$$

$Re$  はレイノルズ数 ( $uL/\nu$ )、 $L$  は代表長さである。式 (1.16) を式 (1.15) に代入し、式を整理すると非攪拌水層の厚み  $\delta_D$  は近似的に

$$\delta_D \approx \left( \frac{\nu}{uL} \right)^{\frac{1}{2}} \left( \frac{D}{\nu} \right)^{\frac{1}{3}} L = \nu^{\frac{1}{6}} u^{-\frac{1}{2}} L^{\frac{1}{2}} D^{\frac{1}{3}} \quad (1.17)$$

と表せる。式 (1.17) から明らかなように、流速  $u$  のみを 2 倍に設定すると、非攪拌水層の厚み  $\delta_D$  は  $1/\sqrt{2}$  となる。続いて平均二乗変位の式 (下式) を利用して、物質が非攪拌水層表面から細胞表面に到達するまでの時間を導出する。三次元空間内を自由拡散する粒子の平均二乗変位は、以下の式によって定義される。

$$\langle \mathbf{r}(t)^2 \rangle = 6Dt \quad (1.18)$$

$\langle \rangle$  はアンサンブル平均を表し、 $\mathbf{r}(t)$  は時刻  $t$  での粒子の位置である。したがって、流速を  $n$  倍に設定すると物質は約  $1/n$  倍の時間で細胞表面に到達することとなる。ゆえに、流速の調節は細胞への物質供給に影響を及ぼすと考えられる。一方で動粘度  $\nu$  を  $n$  倍に調整すると、物質は約  $1/\sqrt[3]{n}$  倍の時間で細胞表面に到達する。このように動粘度の変化は非攪拌水層の厚みに影響を与えにくいため、粘度制御は流速制御に比べて物質供給に与える影響が少ない。しかし、粘度調整の欠点として (1) 飽和による調整限界が存在するという問題や (2) 培養液やバッファの組成を変化させてしまうといった問題が挙げられる。したがって細胞に対してせん断応力を与える際には、流速制御による実験を行なったのちに粘度制御による補完的な確認を行うことが好ましい。

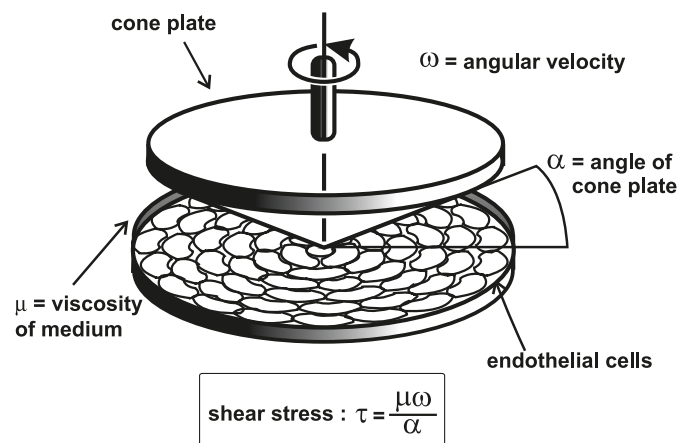


図 1.12: 回転平板を用いたせん断応力制御系

回転円錐板 (cone plate) が角速度 ( $\omega$ ) で回転し、底面に培養された細胞に対してせん断応力刺激を与える [38]。

## 1.4 本研究の目的

第 1.2 節では、細胞の異方性が微小環境の影響を受けていることについて述べた。細胞の異方性が微小環境によってどのように決定されているか明らかにすることは、組織形成機構や癌細胞の転移機構を理解する上で非常に有意義である。しかし、生体内微小環境は非常に複雑且つ微小な空間スケールであるため、従来の生物学的手法を用いて生体内微小環境が担う役割を明らかにすることは困難である(第 1.2.4 小節参照)。そこで、本研究では第 1.3 節で紹介したマイクロ流体デバイスという微細加工技術に着目した。マイクロ流体デバイスを利用することにより微小環境を人為的に制御し、生体内微小環境が有する役割について明らかにすることを本研究の目的とする。

近年、生体内における細胞分裂方向は液性因子の濃度勾配によって制御されていることが示唆されている(第 1.2.1 小節)。しかし、現在までに液性因子の濃度勾配下で分裂方向が制御されているか確認した研究事例はない。本研究ではマイクロ流体デバイスを利用して液性因子の濃度勾配を形成し、濃度勾配によって細胞分裂の方向が制御可能か明らかにする。さらに、細胞分裂の方向制御のために細胞両端間でどれほどの液性因子の濃度差が必要か検証する。そして、得られた実験結果をもとに生体内における細胞の分裂方向がどのようにして決定されているか考察を行う。

次に、細胞への力学的刺激として働くせん断応力に着目した。せん断応力は生体内の微小環境を構成する要素の一つである。近年、間質流によって生じるせん断応力が癌細胞の遊走能変化や転移に関わっていると考えられている(1.2.3.2 小々節)。しかし、未だに多くの癌細胞がせん断応力によって遊走能や転移能を変化させるか明らかにされていない。本研究では、一度の実験で対数スケールで異なるせん断応力を与えることが可能なデバイスを作製し、どれほどのせん断応力を与えることで癌細胞の遊走能が変化するか明らかにするための実験系を構築する。さらに、せん断応力を与えた際に癌細胞の細胞遊走制御機構にどのような変化が生じるか明らかにする。そして、せん断応力によって転移が促進される原因について考察を行う。

本研究では、まず細胞分裂や細胞遊走といった細胞の異方性を伴う事象が細胞周辺の微小環境によって影響を受けるのか明らかにする。そして、細胞の異方性を制御するために必要な微小環境について定量的に解析することで、生体内微小環境が担う役割について明らかにすることを目指す。



## 第2章 Wnt3a濃度勾配による細胞分裂異方性の制御

### 2.1 背景

近年、発生機構の理解に向けて生体内における細胞分裂方向が何によって決定されているか明らかにすることを目的とした研究が行われてきた。例えば、機械的刺激である張力は細胞分裂方向を制御していることが報告されている(第1.2.2小節参照)。しかし、非対称分裂という分裂様式が存在することからもわかるように細胞分裂には異方性が存在しており、これらの異方性が機械的刺激によって制御されていることは現在までに報告されていない。

一方で、液性因子の不均一な空間分布は細胞分裂の異方性を制御していることが報告されている。例えば生体内における特定の領域から分泌された液性因子によって、非対称分裂の異方性が制御されている(第1.2.1小節)。また、HabibらはWnt3aタンパク質を塗布したマイクロビーズを胚性幹細胞(ES細胞)に接触させることで、非対称分裂の異方性を制御することに成功した(図2.1, [41])。しかし、分裂中細胞の両端でどれほどの濃度差が生じていれば、分裂の異方性が制御可能であるかといった定量的な議論は行われていない。このような定量的な理解は、発生メカニズムを理解する上で重要である。本研究ではマイクロ流体デバイスを用いて液性因子の濃度勾配を作成することで、(1)液性因子の濃度勾配環境下で分裂の異方性を制御することは可能であるか、また、(2)細胞両端でどれほどの濃度差が生じていれば細胞分裂の異方性を制御することが可能であるか明らかにすることを目的とした。

本研究では液性因子としてWntタンパク質に着目した。Wntタンパク質は昆虫から脊椎動物までの多細胞真核生物で保存されているタンパク質である。またWntタンパク質は、組織形成[42]に関与するだけでなく、細胞周期[43]や分化の制御[44]も行うことから生体にとって重要なタンパク質として位置付けられている。Wntシグナルの活性化は、Wntタンパク質が細胞膜上のFrizzled受容体とlow-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6(LRP5/6)共役受容体に結合することで生じる。活性化されたWntシグナルは、 $\beta$ -cateninを介して遺伝子発現制御を行う古典的なシグナル(canonical Wnt signaling)(図2.2A)と $\beta$ -cateninを介さない非古典的なシグナル(non-canonical Wnt signaling)に大別される[45]。2000年以降、非古典的なWntシグナルが細胞分裂時における紡錘体の回転や星状体微

小管と細胞膜との接触を制御していることが報告されている (図 2.2B, [46,47])。したがって、細胞分裂方向は局所的な Wnt シグナルの活性化によって制御されていると考えられる。また、Wnt タンパク質は生体内において様々な空間スケールで濃度勾配が形成されていると考えられる (第 1.2.1 小節)。以上の背景より、細胞分裂の異方性は Wnt タンパク質濃度勾配によって制御されていると仮説立てた。そして、Wnt タンパク質濃度勾配を人為的に制御することで、細胞分裂の異方性決定に影響を与えるために必要な濃度差の探索を行なった。

本研究では Wnt タンパク質として Wnt3a を用いた。この理由として (1)Wnt3a と Wnt5a は精製法が確立されていて購入可能であり [48]、(2)Wnt3a は ES 細胞において分裂時の異方性を制御しているにも関わらず Wnt5a は異方性の制御を行っていないこと [41] が報告されているためである。また、実験に用いる細胞として神経芽腫細胞 SH-SY5Y を用いた。SH-SY5Y を用いた理由として、(1)SH-SY5Y は非対称分裂を行うことが報告されており [49]、(2) ほぼ無限に増殖可能なため効率的な実験を行うことが可能であることから、発生過程における幹細胞の分裂方向制御の理解に繋がることを期待されるためである。

本研究では SH-SY5Y 細胞の細胞分裂時における異方性を判別するために、outer dense fiber2(ODF2) タンパク質を観測した。ODF2 は中心子 (centriole) に局在するタンパク質であり、古い母中心子 (grandmother centriole) に多く局在することが知られている [50]。このような特徴により、古い母中心子を持つ細胞と新しい母中心子を持つ細胞を識別することが可能となる。また、幹細胞の非対称分裂時における古い母中心子は幹細胞側に分配される傾向を示すことが報告されている (図 2.3, [41,51])。したがって、ODF2 は細胞分裂時の異方性を測定するために適していると考えられる。以上の先行研究に基づき、SH-SY5Y の細胞分裂時における ODF2 の局在を測定することで分裂の異方性を判別した。

本章では Wnt3a タンパク質の濃度勾配を形成するためのマイクロ流体デバイスを作製し、分裂時における異方性決定に必要な濃度差を求めた。その結果、 $10^{-1}$  nM 程度の僅かな濃度差でも分裂時の異方性が決定されていることを明らかにした。

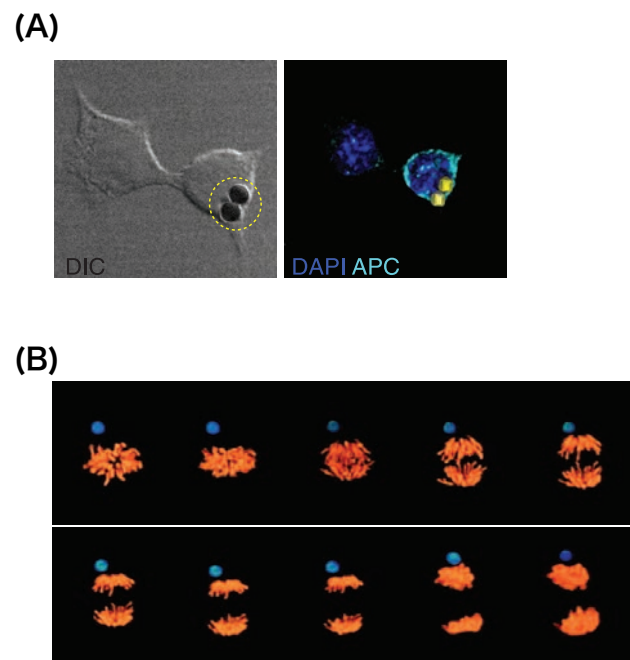


図 2.1: Wnt3a タンパク質による細胞分裂方向の制御

(A)Wnt3a タンパク質を塗布したマイクロビーズを ES 細胞に付着させることで、細胞表層に存在する APC タンパク質がマイクロビーズ側に非対称に分配される。(B) 75%の確率でマイクロビーズ (青) は ES 細胞の分裂軸上に存在する。[41]

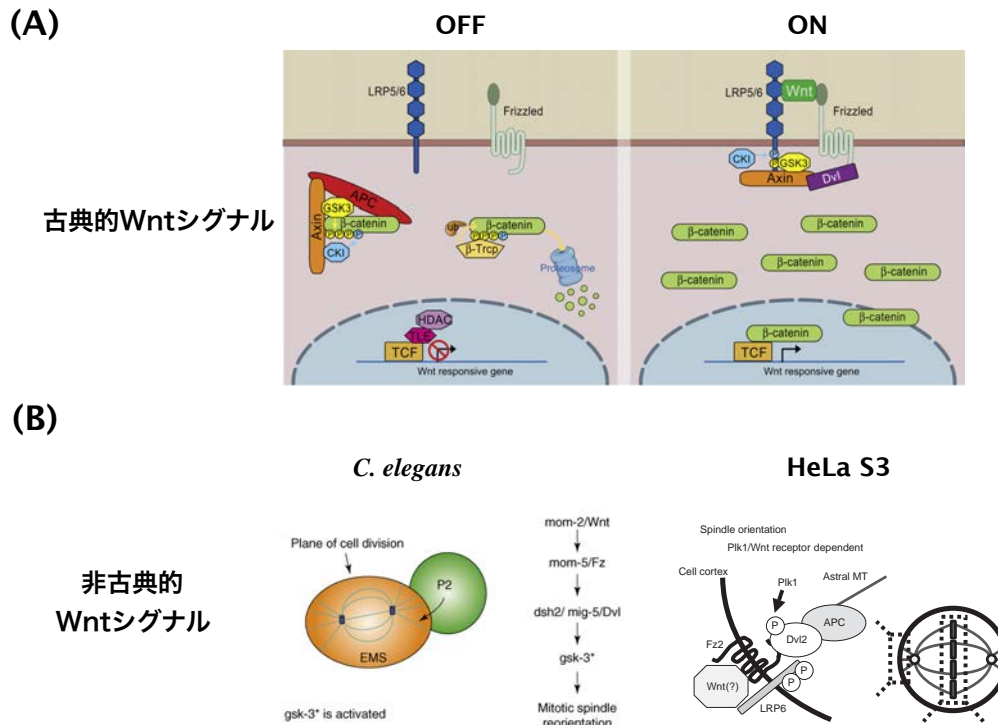


図 2.2: 古典的/非古典的 Wnt シグナル

(A) 古典的 Wnt シグナルの概略。Wnt タンパク質が受容体に結合していないときは、 $\beta$ -catenin、Axin、GSK3、CK1 と複合体を形成している。そして、CK1 によって  $\beta$ -catenin がリン酸化され (青色)、続いて GSK3 によってリン酸化を受ける (黄色)。リン酸化された  $\beta$ -catenin は  $\beta$ -Trop (E3 ユビキチンリガーゼ) に認識され、プロテアソーム分解を受ける。一方で、Wnt タンパク質が受容体に結合しているときは、Dvl が Frizzled 受容体に動員され、結果として Axin 等の  $\beta$ -catenin の分解に関与するタンパク質が複合体を形成しない。そして、分解を受けなかった  $\beta$ -catenin は核内に蓄積され、活性化補助因子である TCF と共に応答遺伝子の発現を活性化する [45]。(B) 非古典的 Wnt シグナルの概略。*C. elegans* では 4 細胞期に P2 から mom-2/Wnt が分泌され、EMS 細胞上の mom-5/Frizzled (Fz) に結合する。そして、EMS 細胞内の dsh2/mig-5/Dvl を活性化し、gsk3 の活性化が生じる。gsk3 の活性化は紡錘体の回転制御を行い、EMS 細胞における分裂面方向の決定に寄与する (左図) [46]。HeLa S3 細胞では、分裂の際に Wnt タンパク質が受容体に結合することで Dvl2 が受容体に動員される。そして、Dvl2 が Plk1 によってリン酸化を受けることで、APC を介して星状体微小管と結合し細胞分裂の方向を決定していると考えられている (右図) [47]。

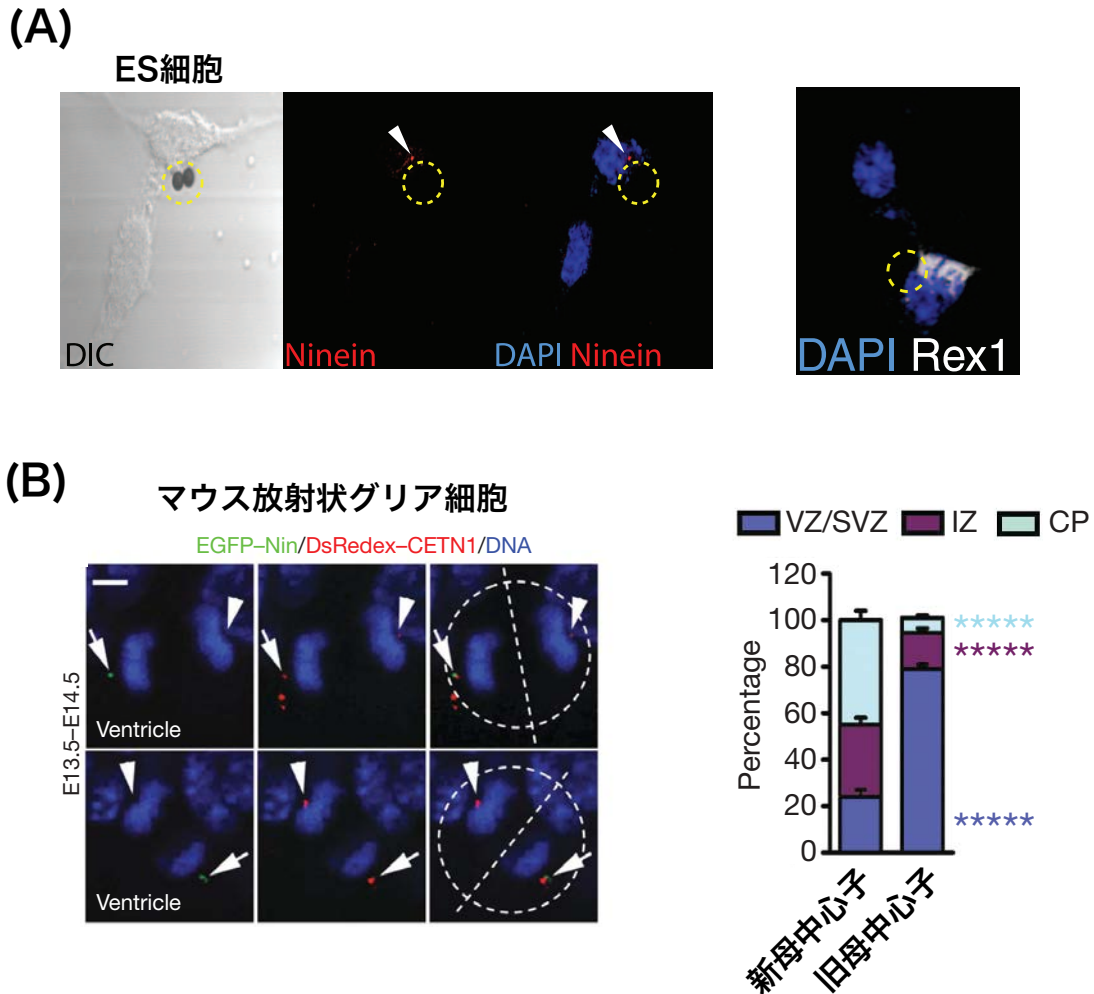


図 2.3: 非対称分裂と母中心子の分配の関係性

(A)ES 細胞分裂時の母中心子の分配と Wnt3a ビーズの位置に関する関係性。黄色の丸は Wnt3a が塗布されたマイクロビーズの位置を示している。Ninein は、古い母中心子に局在する。Wnt3a ビーズが存在している細胞に Ninein が局在している。Rex は ES 細胞における多能性マーカーである。以上の実験結果により、Wnt3a ビーズによって古い母中心子や多能性マーカーの分配が制御されていること示した。また、非対称分裂において古い母中心子と多能性マーカーの分配は一致していることを示した [41]。(B) 放射状グリア細胞の分裂と Ninein(緑)の分配について。CETN(Centrin1, 赤色) は中心子を構成するタンパク質である (左図)。胎生 16.5 日目のマウス新皮質内における新旧母中心子の分布。新しい母中心子は、様々な領域に分布している。一方で、古い母中心子は脳室帯や脳室下帯に多く分布していることがわかる。VZ/SVZ:脳室帯/脳室下帯、IZ:中間帯、CP:皮質板。脳室帯/脳室下帯は、神経幹細胞である放射状グリア細胞が存在している領域である。[51] より改変。

## 2.2 方法

### 2.2.1 マイクロ流体デバイスの作製

本研究では、濃度勾配形成流路と脱気機構から構成される細胞培養デバイスを作製した。濃度勾配形成流路と脱気機構は先行研究 [33,52] を参考にして設計を行なった。脱気機構は気泡トラッピング層と脱気層の二層から構成されている。本デバイスを作製するにあたり、5つのマスクデザイン(微細溝、細胞培養流路、気泡トラッピング流路(下層)、気泡トラッピング流路(上層)、脱気流路)を設計した。各流路の寸法は図 2.4 に示した。これらの流路デザインは全て Inkscape(version 0.48, <http://www.inkscape.org>) で作成した。各流路デザインは帆風株式会社によってフィルムに印刷し、フィルムマスク(帆風株式会社)として利用した。

濃度勾配形成流路のモールド作製は、図 2.5 の手順で行なった。まず、ネガ型フォトレジスト SU-8 3010 (MicroChem) をガラスウェハ (S9111, 松浪ガラス) 上に加えてスピコートによって薄く塗布した。その後、ウェハをホットプレートにのせて 100°C でソフトベークした。フィルムマスク(微細溝)をマスクアライナ(EMA-400, ユニオン光学)に設置した後にウェハに対して UV 照射した。UV 照射を行なったウェハを 60°C で加熱してから 100°C でフォトレジストの架橋反応を行なった。架橋反応後、SU-8 3050 をウェハ上に加えてスピコートによって薄く塗布し、100°C でソフトベークした。フィルムマスク(細胞培養流路)をマスクアライナに設置してウェハに対して UV 照射した。UV 照射後にウェハを 60°C で加熱し、100°C で架橋反応を行なった。最後にウェハを SU-8 現像液に浸して現像を行なった。各工程における詳細なパラメータは表 2.1 に記した。

モールド作製後、poly-dimethylsiloxane (PDMS)(Silpot 184 W/C, 東レ)の母剤と重合開始剤を 10:1 で混合して各モールドに流し込んだ。その後、60°C で PDMS の硬化を行うことで各層を作製した。各 PDMS 層を作製後、プラズマエッチング装置(SEDE-P, メイワフォーシス)によって各 PDMS 層の表面を活性化し、お互いを貼り合わせて接着を行なった。

最後に、流路表面へのタンパク質の非特異的吸着を防ぐために流路表面にブロッキング処理を施した。ブロッキング剤として poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorocholine - co-n-butyl methacrylate) ポリマー (MPC ポリマー)(Lipidure-CM5206, NOF) を用いた。MPC ポリマーは無水エタノール/クロロホルム溶液 ( $v/v = 1/9$ ) に溶解し、0.5 wt% に調整した [53]。調整した MPC ポリマー溶液を作製したデバイスに流し込み、流路内の MPC ポリマー溶液が蒸発するまでデバイスを放置した。

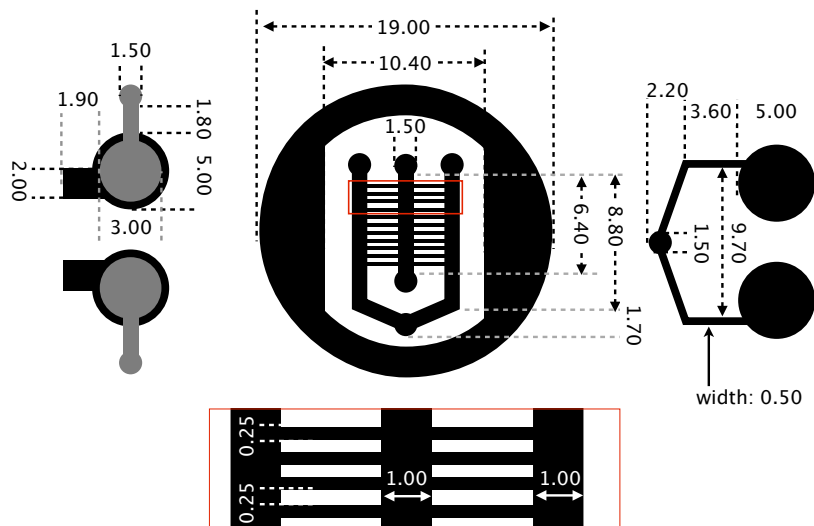


図 2.4: マイクロ流体デバイスの寸法

左図:トラッピング層、中央図:細胞培養層、右図:脱気層。トラッピング層における色の違いはモールドの高さの違いを表している (灰色 > 黒)。寸法単位は mm。

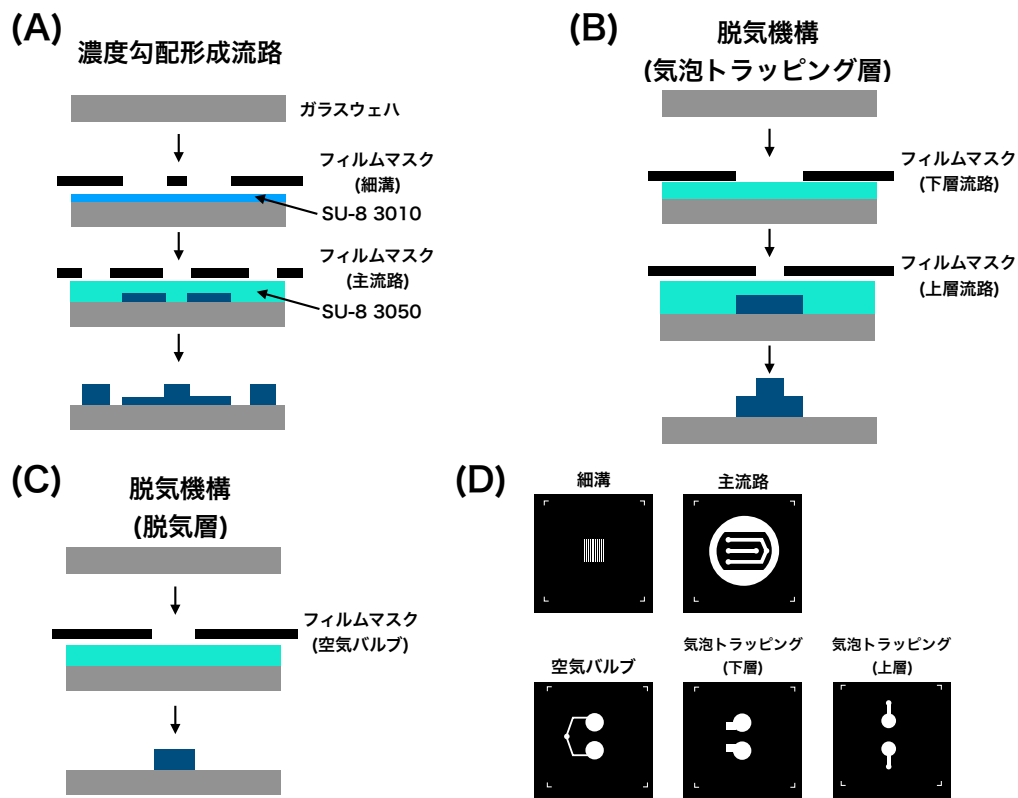


図 2.5: モールド作製手法

(A) 濃度勾配形成流路モールドの作製手法。SU-8 3010 に細溝パターンを照射後、SU-8 3050 を塗布して主流路パターンの照射を行なった。照射後、現像を行なった。(B) 脱気機構 (気泡トラッピング層) モールドの作製手法。SU-8 3050 に下層流路パターンを照射した後に、再度 SU-8 3050 を塗布し、上層流路パターンを照射し、照射後、現像した。(C) 脱気機構 (脱気層) モールドの作製手法。流路高さを確保するために、SU-8 3050 の塗布を二回行なった。そして、SU-8 3050 に空気バルブパターンを照射し、現像をした。(D) 各流路のマスクパターン。白領域は光透過領域である。



表 2.1: モールド作製におけるパラメータ

マスク	フォトレジスト	回転速度	ソフトベーク	露光量	ポストベーク (60°C/100°C)
細溝	SU8 3010	500 rpm	15 min	420 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 8 min
主流路	SU8 3050	1000 rpm	15 min	480 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 5 min
気泡トラッピング 下層	SU8 3050	1300 rpm	20 min	420 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 8 min
気泡トラッピング 上層	SU8 3050	1300 rpm	20 min	480 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 10 min
空気バルブ <sup>a)</sup>	SU8 3050	1300 rpm	20 min	480 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 10 min

<sup>a)</sup> 高さ 200  $\mu\text{m}$  のモールドを作製するために、スピコーティングとソフトベーク工程を二回繰り返した。

## 2.2.2 濃度勾配の定量的評価手法

### 2.2.2.1 濃度勾配形状の定式化

本研究では細胞培養流路内で形成された濃度勾配形状を評価した(図 2.6A)。細胞培養流路内(図 2.4)で形成された濃度勾配を定量的に評価するために、40 kDa の FITC-dextran(FD40S, Sigma) を用いて濃度勾配の可視化を行なった。FITC-dextran の分子量は Wnt3a の分子量 (38 kDa) と同等のものを選択した。FITC-dextran は Opti-MEM(1158021, Life Technologies) に溶解させた。マイクロシリンジポンプ(Nexus 3000, Chemyx)を用いて 0.1 mg/mL の FITC-dextran をデバイス片側から流し込み、共焦点顕微鏡によって濃度勾配を観察した。濃度勾配を作成する際には 1.0、2.0、3.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流量で送液を行なった。取得した濃度勾配画像の測定を行うために画像解析ソフトウェア Fiji [54] を用いた。細胞培養流路内の各位置に region of interest(ROI; 長さ: 900  $\mu\text{m}$ , 幅: 15  $\mu\text{m}$ ) を設定して ROI 内の輝度値を測定した。

濃度勾配の形状を定式化するために、実験結果に対して次元拡散方程式のフィッティングを行なった。次元拡散方程式は以下の式を用いた [55]。

$$I(x) = \frac{1}{2}(I_{max} - I_{min})\text{erfc}\left(\frac{x - \alpha}{\sqrt{\beta}}\right) + I_{min} \quad (2.1)$$

$I(x)$  は流路壁から距離  $x$   $\mu\text{m}$  離れた位置における輝度値、 $I_{max}$  は ROI 内における最大輝度値、 $I_{min}$  は ROI 内における最小輝度値を表している。 $\alpha$  は、輝度値が  $1/2(I_{max} - I_{min}) + I_{min}$  となる位置を表している。 $\beta$  は分子の平均二乗変位である。erfc は相補誤差関数である。パラメータ ( $\alpha, \beta$ ) の推定には R に実装されている非線形最小二乗法によるフィッティングを用いた。

細胞培養流路内で濃度勾配を撮影する際には、励起光強度の空間的な偏りを補正するための画像を取得した。具体的には細胞培養流路内を FITC-dextran 溶液で満たし、共焦点顕微鏡によって撮影することで補正画像を取得した。

### 2.2.2.2 細胞両端間における濃度差の導出

本研究では細胞両端間で生じる分子の濃度差を導出するために、フィッティングによって求めた次元拡散方程式(式(2.1))を利用した。本解析では細溝方向に沿った濃度差である  $\Delta I_x$  と上流から下流への軸方向に沿った濃度差である  $\Delta I_y$  を求めた。各濃度差は以下の式のように定義した。

$$\Delta I_x = \sqrt{(I_B(x - d/2) - I_B(x + d/2))^2} \quad (2.2)$$

$$\Delta I_y = \sqrt{(I_A(x) - I_C(x))^2} \times \frac{d}{w} \quad (2.3)$$

$I_{A,B,C}$  は流路の各位置における一次元拡散方程式 (式 (2.1)) を示している (図 2.6B)。また、 $d$  は分裂中の細胞の直径を示している (11 pixels  $\approx$  30  $\mu\text{m}$ )。さらに、 $w$  は細溝の幅 (250  $\mu\text{m}$ ) を示している。

### 2.2.2.3 濃度差の経時的安定性の評価

濃度差の経時的安定性の評価を行うために各位置における濃度差の経時的なゆらぎを算出した。ゆらぎ ( $\sigma$ ) は以下の式によって定義した。

$$\sigma = \frac{\sum_{i=0}^N |\Delta I_{1i} - \text{Median}(\Delta I_1)|}{N} \quad (2.4)$$

$N$  は撮影した画像枚数、 $\text{Median}(\Delta I_1)$  は流路番号 1 内の各位置 ( $x = 200 \mu\text{m}$ ,  $400 \mu\text{m}$ ,  $600 \mu\text{m}$ ) における濃度差の中央値、 $\Delta I_{1i}$  は  $i$  枚目の画像における濃度差を表している。また、濃度差は以下のように定義した。撮影条件として 1、10、100、1000 秒間隔で計 50 枚の撮影を行ない、異なる時間スケールにおける経時的な安定性を評価した。

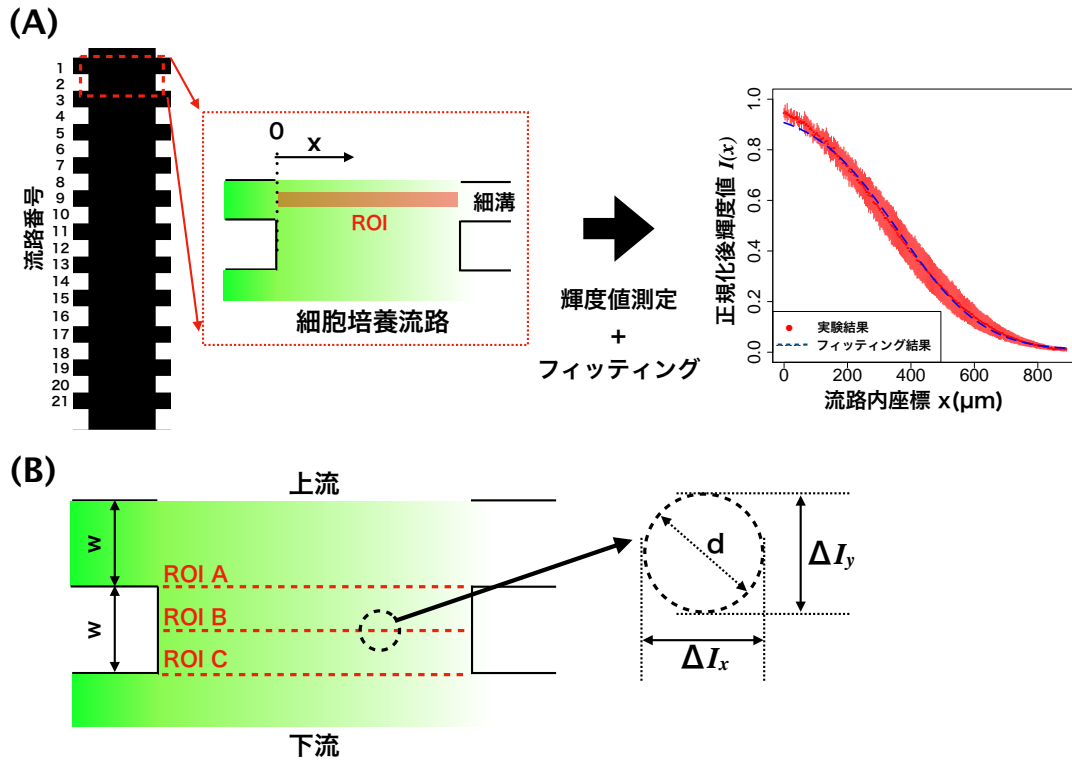


図 2.6: 濃度勾配の定量的評価手法

(A) 各流路番号における濃度勾配の定量的評価。細胞培養流路内の各位置に ROI (幅:  $15 \mu\text{m}$ , 長さ:  $900 \mu\text{m}$ ) を設定した。そして、ROI 内の FITC-dextran の輝度値に対して、式 (2.1) を用いてフィッティングを行なった。赤線のエラーバーは標準偏差を表している。上記の解析を全流路番号に対して行なった。

(B) 細胞両端間における濃度差の定量化手法。各流路番号において、ROI を 3 箇所 (ROI A, ROI B, ROI C) 設置して輝度値の測定を行なった。細溝方向に沿った濃度差である  $\Delta I_x$  は、ROI B の測定結果に対して式 (2.2) を用いてフィッティングを行うことで求めた。上流から下流への軸方向に沿った濃度差である  $\Delta I_y$  は、ROI A および ROI C の測定結果に対して式 (2.2) を用いてフィッティングを行うことで求めた。d は分裂中細胞の直径を表している。

### 2.2.3 細胞培養

神経芽腫細胞 SH-SY5Y (Cat. No. 94030304, European Collection of Cell Authenticated Cell Cultures) は、15%の fetal bovine serum (FBS)(16170-078, Life Technologies) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 Nutrient Mixture (10565018, Thermo Fisher Scientific) を用いてインキュベータ内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) で培養を行なった。デバイス内で細胞の培養を行う際には、分裂期の細胞を効率的に観察するためにダブルチミジンプロックにより細胞周期の同調を行なった。IV 型コラーゲン (新田ゼラチン) は 150 µg/mL となるように 1 M の塩酸によって調製した。調製後のコラーゲン溶液をガラスベースディッシュに加えた後に余分なコラーゲン溶液を除去し風乾することでコラーゲンの塗布を行なった。

Wnt3a タンパク質 (5036-WN, R&D Systems) は、200 µg/mL となるように 0.1% BSA(017-22231, 富士フイルム和光純薬) を含む滅菌蒸留水に溶解して -20°C で保管した。Dickkopf-1 (Dkk1)(5439-DK, R&D Systems) タンパク質は、100 µg/mL となるように phosphate buffered saline (PBS)(16-23555, 富士フイルム和光純薬) によって溶解して -20°C に保管した。実験に用いる際には、これらの保管溶液を培養液によって希釈した。

### 2.2.4 免疫蛍光染色

#### 2.2.4.1 一次抗体および二次抗体

Wnt3a タンパク質によって共役受容体である LRP6 が活性化されているか確認するために rabbit polyclonal anti-LRP6 Tp1479 (PAB12632, Abnova) を用いた。また、細胞分裂中の異方性を確認するために mouse monoclonal anti-ODF2/cenexin (H00004957, Novus) を用いた。さらに、コラーゲンへの Wnt3a タンパク質の非特異的吸着を定量的に評価するために rabbit polyclonal anti-Wnt3a (ab28472, Abcam) を用いた。一次抗体である anti-LRP6 Tp1479 は 1/200、anti-ODF2/cenexin および anti-Wnt3a は 1/500 に希釈した。これらの一次抗体に対して、二次抗体として anti-mouse-IgG (H+L) conjugated with Alexa Fluor 488 (A-21202, Thermo Fisher Scientific)、anti-rabbit-IgG (H+L) Alexa Fluor 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific) を用いた。二次抗体は 1/1000 に希釈した。抗体の希釈には PBS を用いた。

#### 2.2.4.2 Tp1479 LRP6 の免疫蛍光染色

Tp1479 LRP6 の免疫蛍光染色は、先行研究 [41] を参考に行なった。まず、培養した SH-SY5Y 細胞を Dulbecco's PBS(14040-133, Thermo Fisher Scientific) によって洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA)(163-20145, 富士フイルム和光純薬) によって 4°C で 30 分間固定を行なった。次に 0.1% bovine serum albumin (BSA) (012-23881, 富士フイルム和光純薬) と 0.001% Tween-20(9005-64-5, ICN Biomedicals)

を含む PBS 溶液を細胞染色液として調製し、細胞染色液によって細胞の洗浄を行なった。その後、10% normal donkey serum (D9663, Sigma-Aldrich) を含む細胞染色液によって 30 分間ブロッキングを行なった。そして、上述した希釈率で一次抗体を加えてオーバーナイト (4°C) で抗原抗体反応を行なった。その後、細胞染色液を用いて細胞を洗浄してから二次抗体を加えた。二次抗体による抗原抗体反応は室温で 1 時間行なった。染色液は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Hoechst 33342 (Lonza) を含む PBS 溶液によって染色した。

#### 2.2.4.3 ODF2 の免疫蛍光染色

ODF2 の免疫蛍光染色では、最初に PBS で細胞を洗浄してから -20°C のメタノールによって固定した [56]。冷却メタノールによる固定時間は 5 分間とした。その後、3% BSA (012-23881, 富士フイルム和光純薬) を含む PBS で 30 分間ブロッキングを行なった。そして、上述した希釈率で 1 次抗体を加えて 1 時間室温で抗原抗体反応を行なった。その後、PBS で細胞の洗浄を行なってから二次抗体を加えた。染色液は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Hoechst 33342 を含む PBS 溶液によって染色した。

#### 2.2.4.4 Wnt3a の免疫蛍光染色

Wnt3a の免疫蛍光染色では、まずガラスベースディッシュを PBS で軽く洗浄した。そして、上述の希釈率で一次抗体を加えてから抗原抗体反応を室温で 1 時間行なった。その後、PBS で再度細胞を洗浄してから二次抗体を加えた。そして、二次抗体による抗原抗体反応を室温で 1 時間行なった。

#### 2.2.4.5 免疫蛍光染色画像の取得

本研究では共焦点ユニット (CSU-22, 横河電機) を組み込んだ倒立型顕微鏡 (IX81, オリパス) と CCD カメラ (ORCA R2, 浜松ホトニクス) によって免疫蛍光染色画像の取得した。

#### 2.2.4.6 高さによる輝度値の補正

分裂期の細胞内における Tp1479 LRP6 や ODF2 を観察する際には、高さによる輝度値の減少を補正した。まず、直径 500 nm の蛍光ビーズ (F8813, Life Technologies) を PBS 中に 0.02% (w/w) となるように希釈した。作製した希釈液をカバーガラス上に滴下し、もう一枚のカバーガラスを上に乗せて指で軽く押して余分な液体を除去することで封入を行なった (図 2.7)。その後、共焦点顕微鏡を用いてカバーガラスに吸着した蛍光ビーズの輝度値と底面からの高さ ( $z$ ) を測定した。測定時における対物レンズの刻み幅を 0.1  $\mu\text{m}$  に設定し、Micro-Manager によって対物レンズ

の高さを制御した [57, 58]。蛍光ビーズの高さ ( $\Delta z$ ) は最も輝度値の高い座標とした。また、蛍光ビーズの高さは ImageJ のプラグインである MetroloJ [59] を用いて、点像分布関数へのフィッティングを行うことによって求めた。撮影後、各蛍光ビーズの輝度値は底面 ( $z = 0 \mu\text{m}$ ) で撮影した蛍光ビーズの平均輝度値によって正規化を行なった。正規化した輝度値を従属変数、底面からの高さを説明変数として指数関数へのフィッティングを行うことで補正式を求めた。

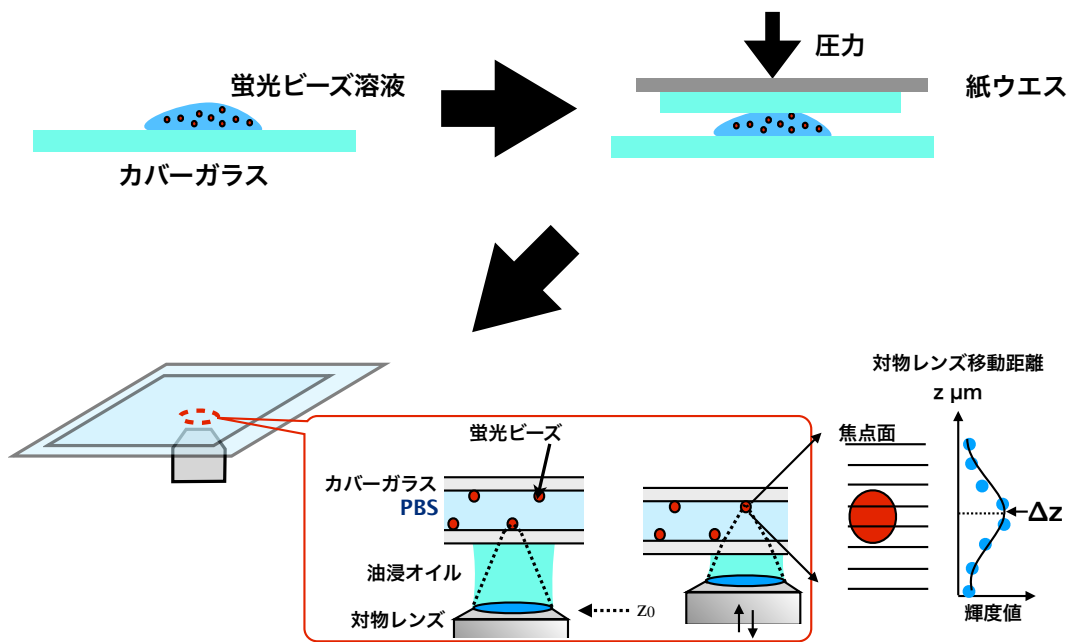


図 2.7: 高さによる輝度値補正曲線の作成手法

蛍光ビーズを含む PBS をカバーガラス上に滴下し、もう一枚のカバーガラスを上から乗せた後に紙ウエスの上から指で押すことでサンプルを準備した。そして、カバーガラス上に吸着した蛍光ビーズの輝度値を共焦点レーザー顕微鏡によって測定した。得られた輝度値を利用し、点像分布関数にフィッティングを行うことで蛍光ビーズの高さ ( $\Delta z$ ) を算出した。そして、対物レンズ側に吸着した蛍光ビーズの高さを  $z = 0$  として定義し、各ビーズの  $\Delta z$  と輝度値の関係性について解析した。対物レンズは  $0.1 \mu\text{m}$  刻みで制御した。



## 2.2.5 Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂の異方性決定

### 2.2.5.1 デバイス内細胞培養

本研究では作製したマイクロ流体デバイスを顕微鏡システム内に設置し、デバイス内に細胞を導入することで Wnt3a 濃度勾配存在下で細胞培養した。以下にデバイス内細胞培養までの手順を示す (図 2.8)。

まず、ガラスベースディッシュにコラーゲン溶液を加えてから余分なコラーゲン溶液を取り除き、ガラスベースディッシュを風乾した。また、デバイス内で細胞培養を行う前に細胞培養デバイス (第 2.2.1 小節) を熱滅菌した。滅菌処理を行なった細胞培養デバイスと真空ポンプ (DAP-15, アルバック機工) を接続した。そして、細胞培養デバイスとコラーゲンを塗布したガラスベースディッシュを吸引によって接着した。細胞培養デバイス内で気泡を形成させないために PBS を加えた後に流路内を細胞培養液で満たした。細胞培養デバイスを準備後、チミジンによって細胞同調した SH-SY5Y 細胞をトリプシンによって回収し、 $2 \times 10^6$  cells/mL となるように細胞懸濁液を調製した。調製を行なった細胞懸濁液は、細胞導入口よりデバイス内に導入した。デバイス内に細胞導入後、細胞導入口と細胞排出口をプラグによって塞いだ。細胞を導入した細胞培養デバイスは、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  に設定したステージトップインキュベータ (INUG2-ONICS, 東海ヒット) に設置した。片側の流入口には Wnt3a を含む細胞培養液 (Wnt3a-CM) を流し込み、もう一方の流入口には通常の細胞培養液を流し込んだ。培養液内の Wnt3a 濃度は 100 ng/mL もしくは 30 ng/mL に調製した。細胞導入後に細胞培養流路内で即座に濃度勾配を形成させるために、マイクロシリンジポンプを用いて  $10.0 \mu\text{L}/\text{min}$  の流量で 5 分間送液した。その後、 $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$  の流量で灌流培養を行なった。デバイス内で細胞培養を開始してから 12 時間後に Tp1479 LRP6 (第 2.2.5.4 小々節) や ODF2 (第 2.2.5.5 小々節) の免疫蛍光染色を行なった。

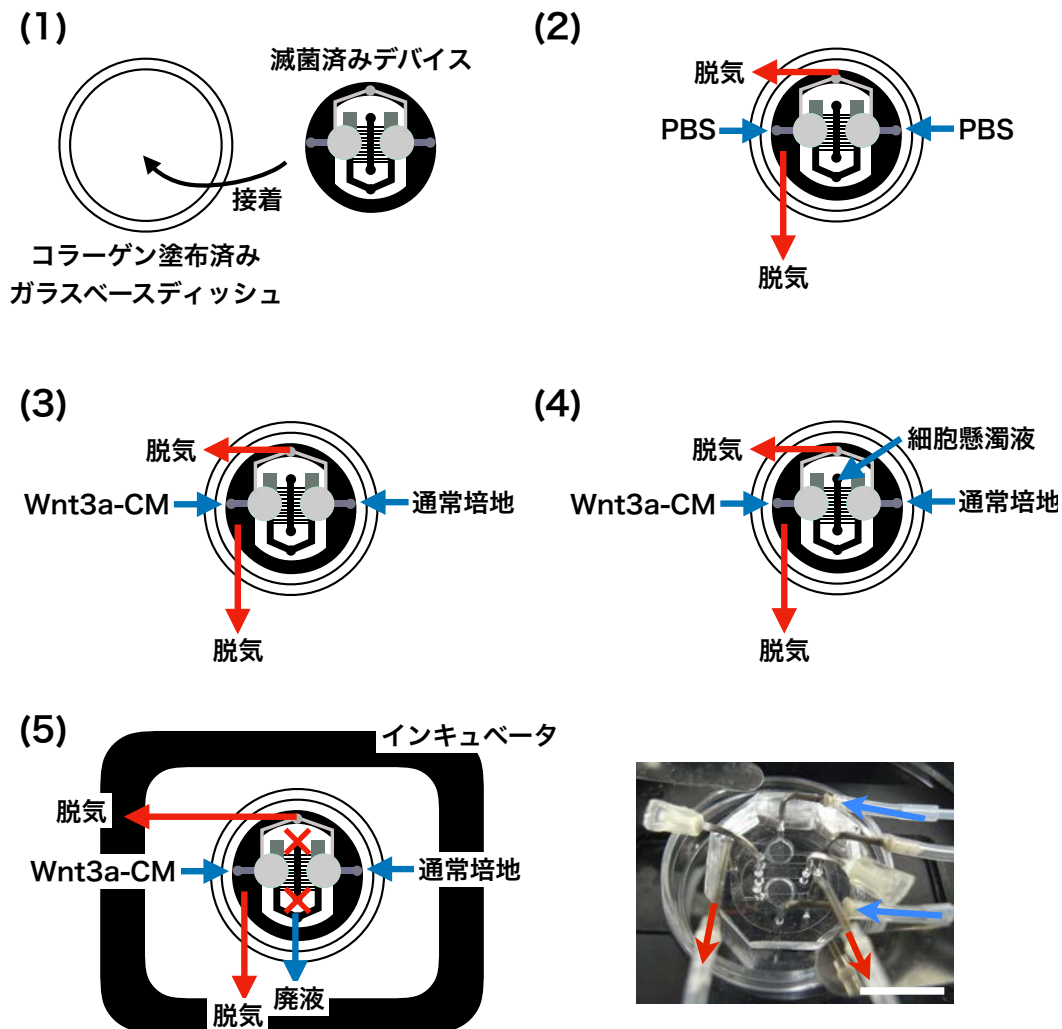


図 2.8: マイクロ流体デバイスの設置手順

以下の手順でマイクロ流体デバイスによる細胞培養の準備を行なった。(1) コラーゲンを塗布したガラスベースディッシュに滅菌済みのマイクロ流体デバイスを貼り合わせた後に脱気を行なった。(2) マイクロ流体デバイス内の空気を除去するために PBS を各流入口から加えた。(3) Wnt3a を含む培地 (Wnt3a-CM) と通常培地を各流入口からデバイス内に加えた。細胞懸濁液を加える際に Wnt3a-CM による刺激を防ぐために、デバイス内に Wnt3a-CM を加えた後に通常培地を加えることで細胞培養流路内を通常培地で満たした。(4) 流路内を通常培地で満たし、細胞導入口から細胞懸濁液を加えた。(5) マイクロ流体デバイスをステージトップインキュベータに設置し、細胞培養を行なった。

### 2.2.5.2 Dkk1 タンパク質による Wnt シグナルの阻害

Wnt3a 濃度勾配による分裂角度決定への寄与を確認するために、Wnt3a に対して競合的阻害を行うタンパク質として知られている Dkk1 を細胞培養液に添加した (Dkk1-CM, 50 ng/mL, [60])。さらに、調製した Dkk1-CM に対して Wnt3a を添加した (Dkk1-Wnt3a-CM, Wnt3a; 100 ng/mL)。これらの調製済み培養液を 2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  でデバイスの各流入口に送液した。

### 2.2.5.3 デバイス内免疫蛍光染色

デバイス内での細胞培養後、流入口から PBS を加えて流路内の培養液を洗浄した。ODF2 に対して免疫蛍光染色を行う場合は以下の操作を行なった。まず、 $-20^{\circ}\text{C}$  のメタノールを細胞流入口から加え、デバイスを即座に  $-20^{\circ}\text{C}$  のメタノールで満たされた 500 mL ガラスビーカーに沈めた。そして、細胞の固定を 5 分間行なった。細胞固定後、3% BSA を含む PBS を流入口から加えてメタノールを洗い出してブロッキングを行なった。その後、一次抗体を含む PBS を流入口から加え、抗原抗体反応を室温で 1 時間行なった。一次抗体の抗原抗体反応後、PBS を流入口から加えて一次抗体の洗浄を行なった。その後、二次抗体を含む PBS を流入口から加えて抗原抗体反応を行なった。二次抗体の抗原抗体反応後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の hoechst 33342 を含む PBS を 5 分間加えて染色体を可視化した。染色体の可視化後、PBS を流入口から加えて hoechst 33342 を洗浄した後に蛍光観察を行なった。

Tp1479 LRP6 に対して免疫蛍光染色を行う場合、PFA による固定を室温で 5 分間行なった。その後は上述の操作と同様の操作を行なった。また、試薬や抗体の濃度は第 2.2.4.2 小々節と同様の調製を行なった。

### 2.2.5.4 Tp1479 LRP6 活性化座標の同定

デバイス内での細胞培養後、Tp1479 LRP6 の免疫蛍光染色を行なった (第 2.2.4.2 小々節)。その後、対物レンズの刻み幅を 0.5  $\mu\text{m}$  に設定し、三次元蛍光画像を取得した。取得した三次元蛍光画像に対して第 2.2.4.6 小々節で求めた補正式を用いて輝度値の補正を行なった。次に、各スライス画像に対して ROI (11  $\times$  11 pixels) を走査した。そして、輝度値が最大となった ROI の中心座標を Tp1479 LRP6 の活性化座標とした。また、座標の原点として染色体の重心座標を用いた。最後に、LRP6 活性化座標が原点に対して (1)Wnt3a-CM 供給側か通常培養液供給側、(2) 上流側か下流側に偏っているか二項検定を行ない解析した (図 2.9)。

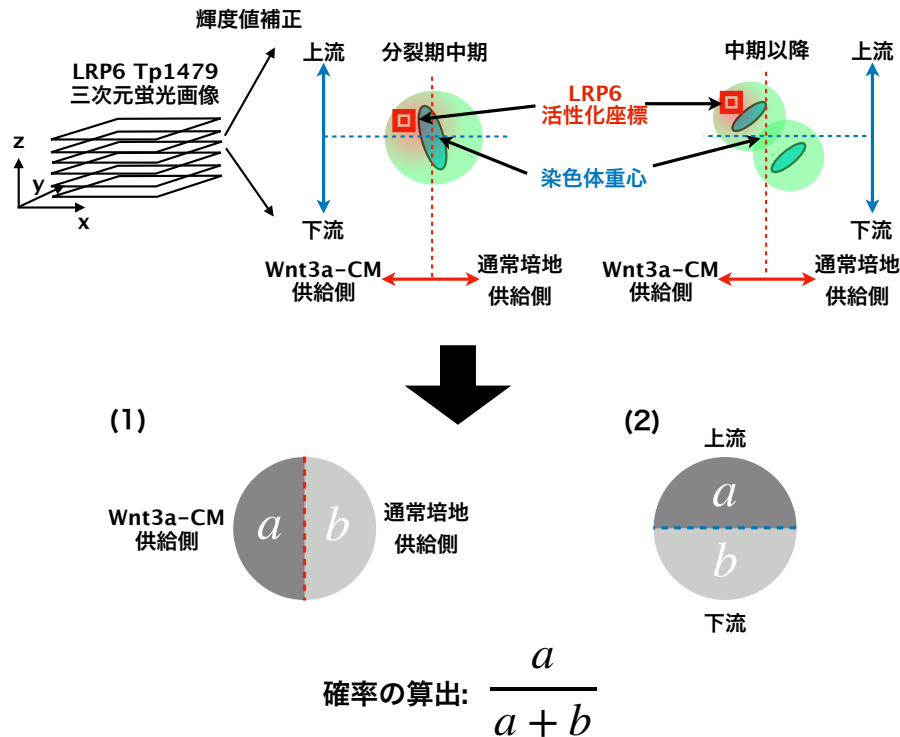


図 2.9: LRP6 活性化座標の同定方法

(上図) 三次元画像を取得し、全スライス画像に対して高さによる輝度値補正を行なった(第 2.2.4.6 参照)。輝度値補正後、ROI(11 × 11 pixels, 赤枠)を走査し、合計輝度値が最大となる ROI を求めた。そして、ROI の中心座標を LRP6 の活性化部位と定義した。また、染色体の重心座標を細胞の中心として定義した。本実験では、細溝と流れの方向を基準として細胞周辺の角度を  $0^\circ \leq \theta < 360^\circ$  として定義することが可能である。(下図) LRP6 の活性化部位が細胞中心よりも Wnt3a-CM 供給側に局在していた細胞を (a) として計数した。一方、活性化部位が細胞中心よりも通常培地供給側に局在していた細胞を (b) として計数した。また、上流側-下流側への分割では上流側を (a)、下流側を (b) として計数した。そして、活性化部位が (a) 側に偏る確率を求めた。最後に LRP6 活性化座標が原点に対して (1) Wnt3a-CM 供給側か通常培養液供給側、(2) 上流側か下流側に偏っているか二項検定を行ない解析した。

### 2.2.5.5 ODF2 局在座標の同定および異方性の決定

デバイス内での細胞培養後、ODF2 の免疫蛍光染色を行なった (第 2.2.4.3 小々節)。免疫蛍光染色後、対物レンズの刻み幅を  $0.5 \mu\text{m}$  に設定し三次元蛍光画像を取得した。ODF2 の局在座標を同定する際には、取得したスライス画像内の各中心体付近に対して ROI ( $5 \times 5$  pixels) を走査し、合計輝度値が最大となる ROI を求めた。そして、ROI の中心座標を ODF2 の局在座標とした (図 2.10)。分裂角度  $\theta_{ODF2}$  は、ROI 内における合計輝度値の低い局在座標から合計輝度値の高い局在座標への角度として求めた。最後に  $\theta_{ODF2}$  が (1)Wnt3a-CM 供給側か通常培養液供給側、(2) 上流側か下流側のどちらかに偏っているか二項検定を行ない解析した (図 2.10)。

### 2.2.5.6 Wnt3a 非特異的吸着による分裂角度への影響評価

コラーゲンに対して非特異的に吸着した Wnt3a が分裂角度の偏りに影響を及ぼしているか確認した。まず細胞培養流路底面に Wnt3a の不均一な吸着が生じているか測定した。測定手順として、はじめにコラーゲンを塗布したガラスベースディッシュと細胞培養デバイスを接着した。そして、Wnt3a-CM と通常培地を各流入口から流し込み、12 時間灌流した。その後、anti-Wnt3a による免疫蛍光染色 (第 2.2.4.4 小々節) を行ない、細胞培養流路内の各領域における Wnt3a 吸着量を定量的に評価した (図 2.11A)。

次に、培養基板上に非特異的に吸着した Wnt3a が分裂角度の決定に影響を与えているか確認した。まず、上述と同様の操作により Wnt3a-CM と通常培地を 12 時間灌流した。灌流後、細胞培養流路内を通常培地で満たした。そして、細胞培養デバイス内に細胞を導入し、通常培地を用いて灌流培養を行なった。灌流培養開始から 12 時間後に ODF2 の免疫蛍光染色を行い、分裂角度  $\theta_{ODF2}$  を測定した (図 2.11B)。最後に、 $\theta_{ODF2}$  が (1)Wnt3a-CM 供給側か通常培養液供給側、(2) 上流側か下流側のどちらかに偏っているか二項検定を行い確認した。

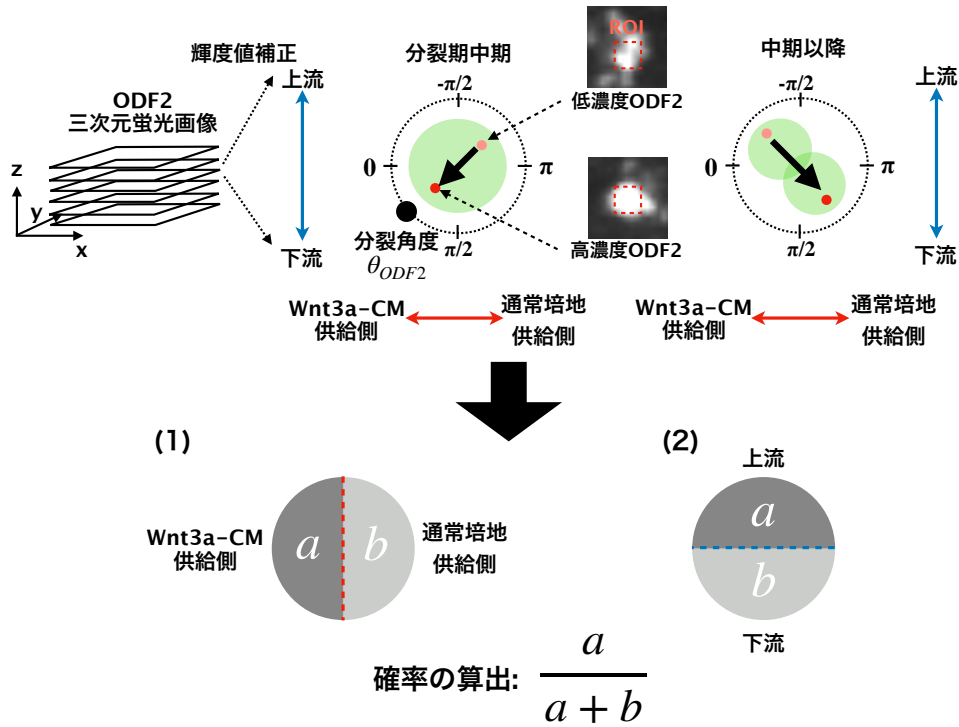


図 2.10: ODF2 の同定方法および分裂角度の定義

(上図) 三次元画像を取得し、全スライス画像に対して高さによる輝度値補正した(第 2.2.4.6 参照)。輝度値補正後、各中心体付近に対して ROI(5 × 5 pixels, 赤枠)を走査し、ROI 内の合計輝度値を取得した。そして、合計輝度値が最大となる ROI の中心座標を ODF2 の局在座標と定義した。局在座標を同定した後に、合計輝度値の低い局在座標から合計輝度値の高い局在座標への角度を分裂角度  $\theta_{ODF2}$  と定義した。(下図)  $\theta_{ODF2}$  が、Wnt3a-CM 供給側を向いていた細胞を (a) として計数した。一方、 $\theta_{ODF2}$  が、細胞中心よりも通常培地供給側を向いていた細胞を (b) として計数した。また、上流側-下流側への分割では上流側を (a)、下流側を (b) として計数した。最後に  $\theta_{ODF2}$  が (1) Wnt3a-CM 供給側か通常培養液供給側、(2) 上流側か下流側に偏っているか二項検定を行ない確認した。

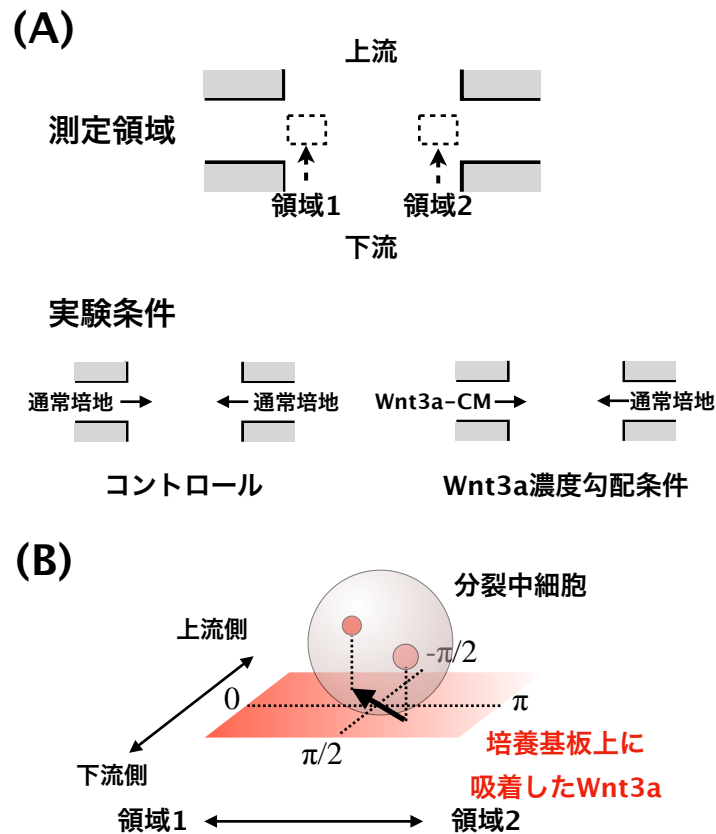


図 2.11: 非特異的な Wnt3a 吸着による分裂角度への影響評価

(A) Wnt3a 非特異的吸着の測定。細胞培養流路内の Wnt3a-CM が供給される細溝近傍の領域と通常培地が供給される細溝近傍の領域を測定領域 (領域 1、領域 2) とした。両側から通常培地を供給するコントロール条件と、Wnt3a-CM と通常培地を供給する Wnt3a 濃度勾配作成条件で、それぞれ 12 時間灌流した。灌流後、anti-Wnt3a によって免疫蛍光染色を行い、領域 1 と領域 2 における培養基板上の蛍光輝度値を測定した。(B) 分裂角度  $\theta_{ODF2}$  の測定手法。灌流を行なったマイクロ流体デバイス内に細胞を導入し、12 時間ほど通常培地で灌流培養した。そして、非特異的に吸着した Wnt3a 上で分裂している細胞に対して免疫蛍光染色を行い  $\theta_{ODF2}$  を測定した。測定後、 $\theta_{ODF2}$  に偏りが生じているか二項検定を行い確認した。

### 2.2.6 Wnt3a 濃度差と分裂角度の関係性に関する評価手法

分裂角度  $\theta_{ODF2}$  の決定に影響を与えるために必要な Wnt3a の濃度差を解析した。まず、ODF2 の測定を行なった細胞の座標 (流路内の位置  $x$   $\mu\text{m}$ , 流路番号) を取得した。測定した細胞座標を濃度勾配式 (第 2.2.2.1 小々節) に代入し、濃度差  $\Delta C$  (nM) を算出した。そして、細胞両端間に生じている濃度差と分裂角度の関係性を可視化した (図 2.12A)。また、分裂角度の制御に必要な濃度差を定量的に評価するために、サンプルサイズが等しくなるように取得したデータセットを分割した。データセット分割の際には、濃度差によってデータを昇順に並び替えた。そして、分割後の各グループ内の分裂角度に偏りが生じているか検定した (図 2.12B)。



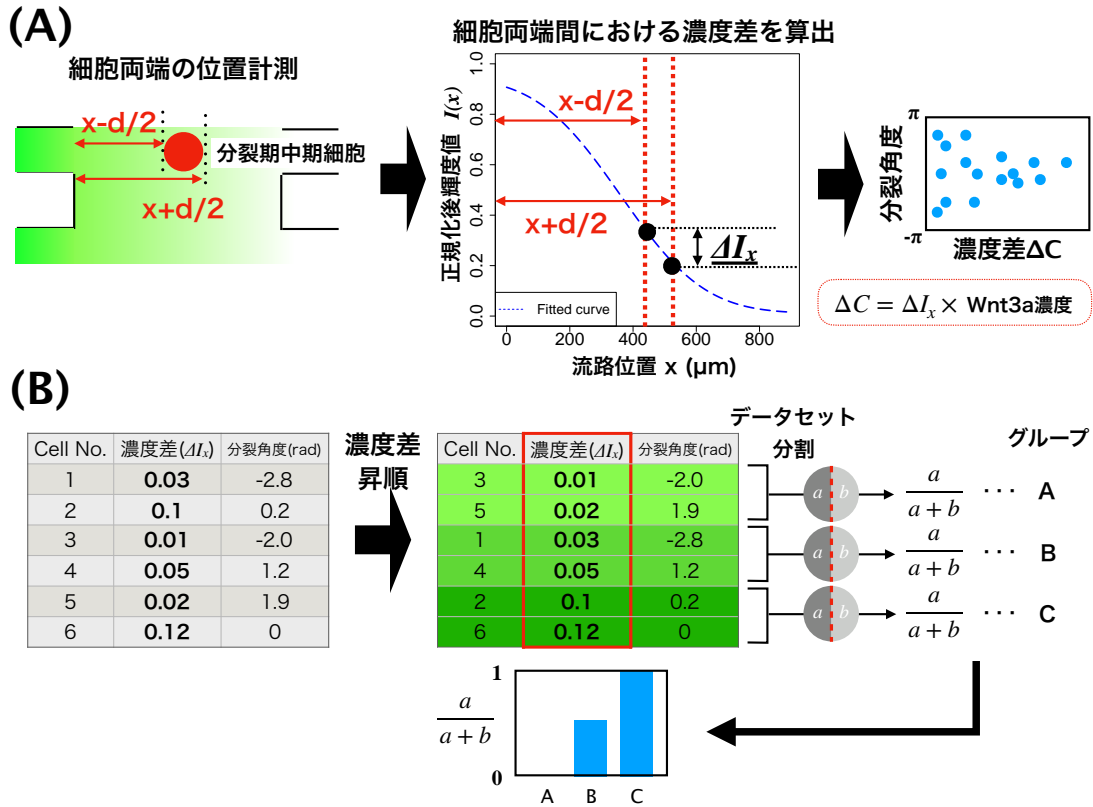


図 2.12: Wnt3a 濃度差と分裂角度の関係性に関する評価

(A) 濃度差の導出方法。まず、第 2.2.5.5 で ODF2 による分裂角度の測定を行なった細胞の流路内座標 ( $x$   $\mu\text{m}$ , 流路番号) を取得した。次に、細胞両端における座標 ( $x \pm d/2$ ) を第 2.2.2.1 小々節で求めた濃度勾配式に代入することで  $\Delta I_x$  を求めた。そして、 $\Delta I_x$  に Wnt3a-CM 内の Wnt3a 濃度 (nM) を乗算することで濃度差  $\Delta C$  (nM) を算出した。最後に濃度差と分裂角度  $\theta_{ODF2}$  についてプロットした。(B) 得られたデータセットを濃度差によって昇順に並び替えた。その後、サンプルサイズが等しくなるようにデータセットを分割した。最後に、分割後の各グループ内の分裂角度に偏りが生じているか二項検定を行ない確認した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 濃度勾配の定量的評価

片側の流入口から FITC-dextran を流し込み、細胞培養流路内における濃度勾配を可視化した。その結果、各流量 ( $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $3.0 \mu\text{L}/\text{min}$ ) において、細胞培養流路の上流側では急な濃度勾配が形成され、下流側では緩やかな濃度勾配が形成されていることを定性的に確認した (図 2.13A)。次に、取得画像を用いて濃度勾配に対して拡散方程式のフィッティングを行なった (第 2.2.2 小節)。その結果、実験から得られた濃度勾配は次元拡散方程式によくフィッティングすることが定性的に明らかとなった (図 2.13B)。次に、フィッティングの精度について定量的な議論を行うために輝度値の平均とフィッティング式の残差平方和 (residual sum of squares, RSS) を求めた。フィッティングを行う際の流量は、実際に細胞培養に用いた流量である  $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$  とした。各流路に対して残差平方和を求めると、各流路における残差平方和は非常に小さい値となった (図 2.13C)。また、下流側の流路における残差平方和は流路番号 1 よりも小さい値となった。以上の解析から各流路番号における濃度勾配の形状は、次元拡散方程式で表すことが可能であることを示唆した。次に、実験ごとに濃度勾配へのフィッティングを行い、フィッティング結果から実験間の平均濃度と標準偏差を算出することで変動係数 (coefficient of variation, CV) を求めた (図 2.14)。その結果、流路の上流 (流路番号: 1 ~ 16) では、最も勾配が大きくなる  $x = 400 \text{ nm}$  付近で変動係数は小さくなった。一方で、流路の下流 (流路番号: 17 ~) では、 $x = 400 \text{ nm}$  付近でも変動係数が大きくなった。この結果は、下流側の細胞に与えられる濃度差が実験ごとに変動することを示している。また、全ての流路において  $x = 800 \text{ nm}$  付近で変動係数が大きい値となった。この原因は、 $x = 800 \text{ nm}$  付近における FITC-dextran の濃度が低いため、わずかな濃度の変動によって変動係数が大きくなってしまうためである。以上の結果より (1) 細胞培養流路内の濃度勾配は次元拡散方程式にフィッティングでき、(2) 下流側の濃度勾配は実験ごとのばらつきが大きいことを示した (流路番号: 17 ~)。

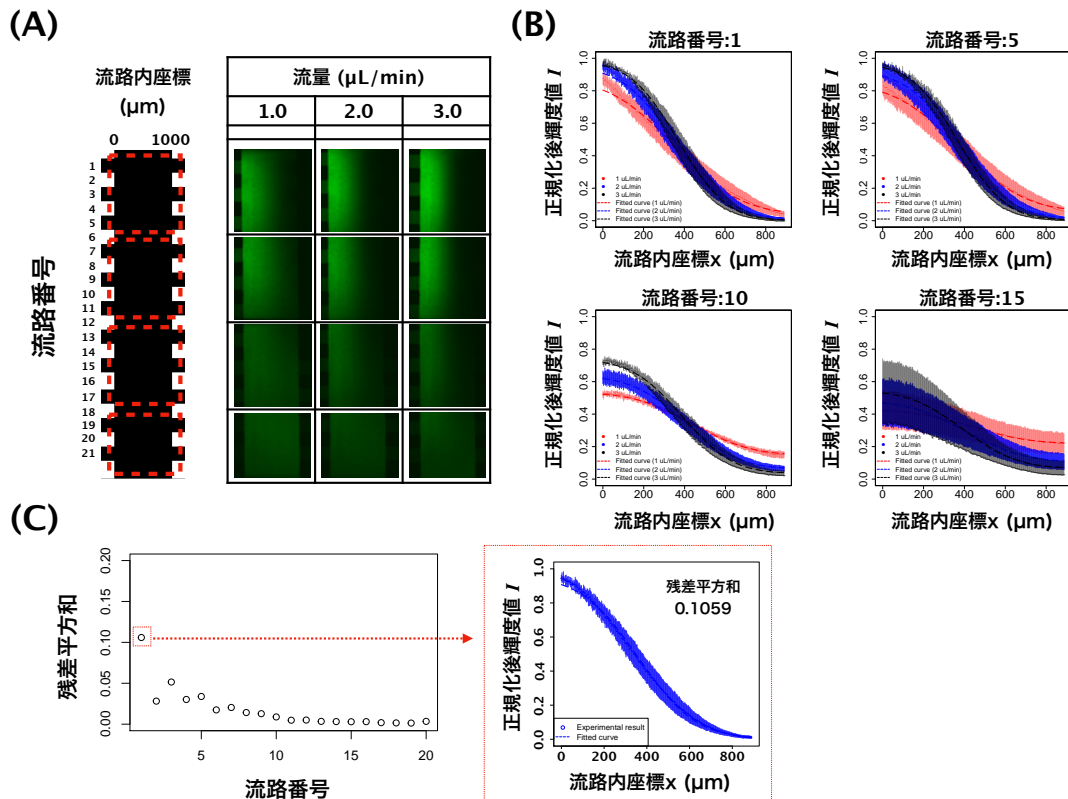


図 2.13: 濃度勾配の評価結果

(A) 各流量における FITC-dextran の蛍光画像。流路番号の小さい側が上流となっている。  
 (B) 各流路番号における濃度勾配へのフィッティング結果。エラーバーは標準偏差を示している。  
 (C) 左図: 各流路番号における残差平方和。右図: 流路番号 1 における濃度勾配とフィッティング結果。フィッティングの残差平方和は 0.1059 となった。

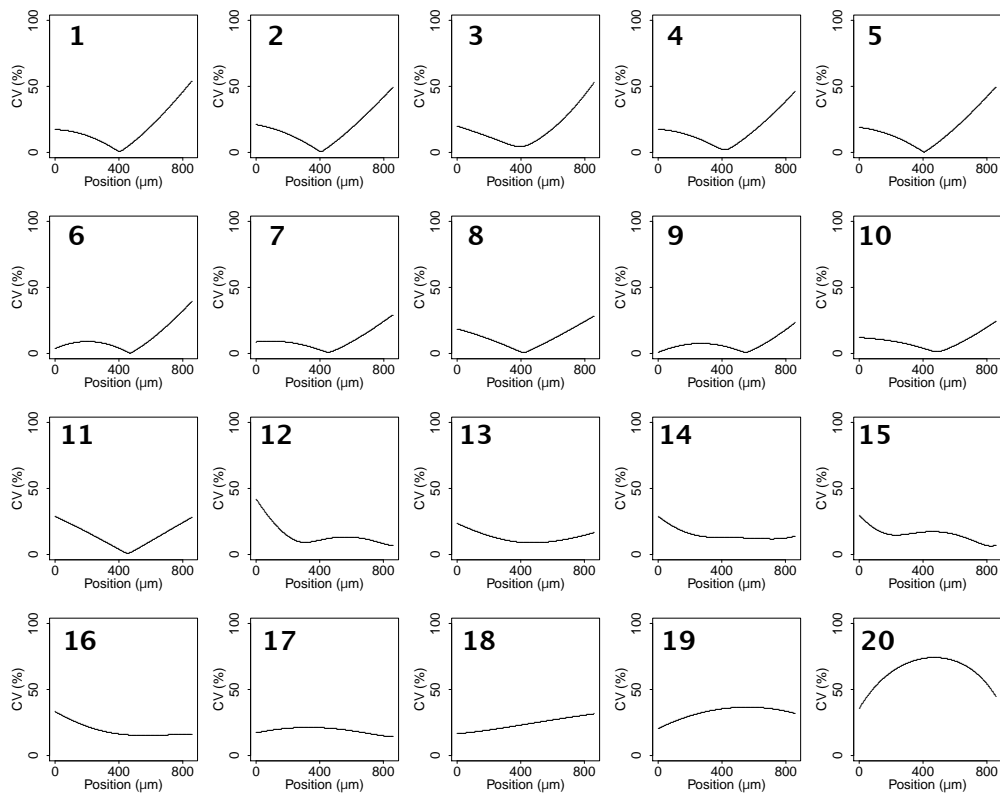


図 2.14: 濃度勾配の変動係数

各流路番号における変動係数のプロット。横軸は流路位置、縦軸は CV 値を表している。CV 値は (各位置における標準偏差/各位置における平均濃度) から算出した。

次に、流路内の各位置における濃度差  $\Delta I_x$  と  $\Delta I_y$  (式 (2.2)) を算出した (図 2.15A)。細溝方向への濃度差  $\Delta I_x$  は、流路中央付近 ( $x \approx 400 \mu\text{m}$ ) で大きな値になった。また、上流から下流方向への濃度差である  $\Delta I_y$  を求めると、細胞の上流側から下流側の間で僅かな濃度差が生じていることが明らかとなった。さらに大部分の流路番号において、 $\Delta I_x$  は  $\Delta I_y$  に比べて大きな値となった。しかし、細胞培養流路の下流側では、 $\Delta I_y$  は  $\Delta I_x$  の値に近づいた。このような結果から、下流側では  $\Delta I_x$  と  $\Delta I_y$  のどちらの濃度差が細胞に対して影響を及ぼしているか判別が困難になると判断した。したがって、本実験では流路番号 15 までの細胞を対象として分裂異方性の測定を行なった。

最後に、細胞培養流路内における濃度差の経時的安定性に関して解析 (式 (2.4)) した。解析の結果、濃度勾配の各時間スケールにおける経時的なゆらぎは、図 2.15A の濃度差 ( $\Delta I_x$ ) に比べて約 10 倍ほど小さかった (図 2.15B)。さらに、実験を開始してから安定した濃度勾配が形成されるまでの時間を測定した。その結果、灌流を開始してから 10 分程度で細胞培養流路内の濃度差が安定することを確認した (図 2.15C)。したがって、デバイス内細胞培養を開始してから細胞分裂が生じるまでの時間 (約 12 時間) よりも十分短い時間内で安定した濃度勾配を形成することが可能であると判断した。以上の結果より、細胞培養流路内の濃度勾配は経時的に安定であり濃度勾配のゆらぎによる細胞への影響は非常に小さいと結論づけた。

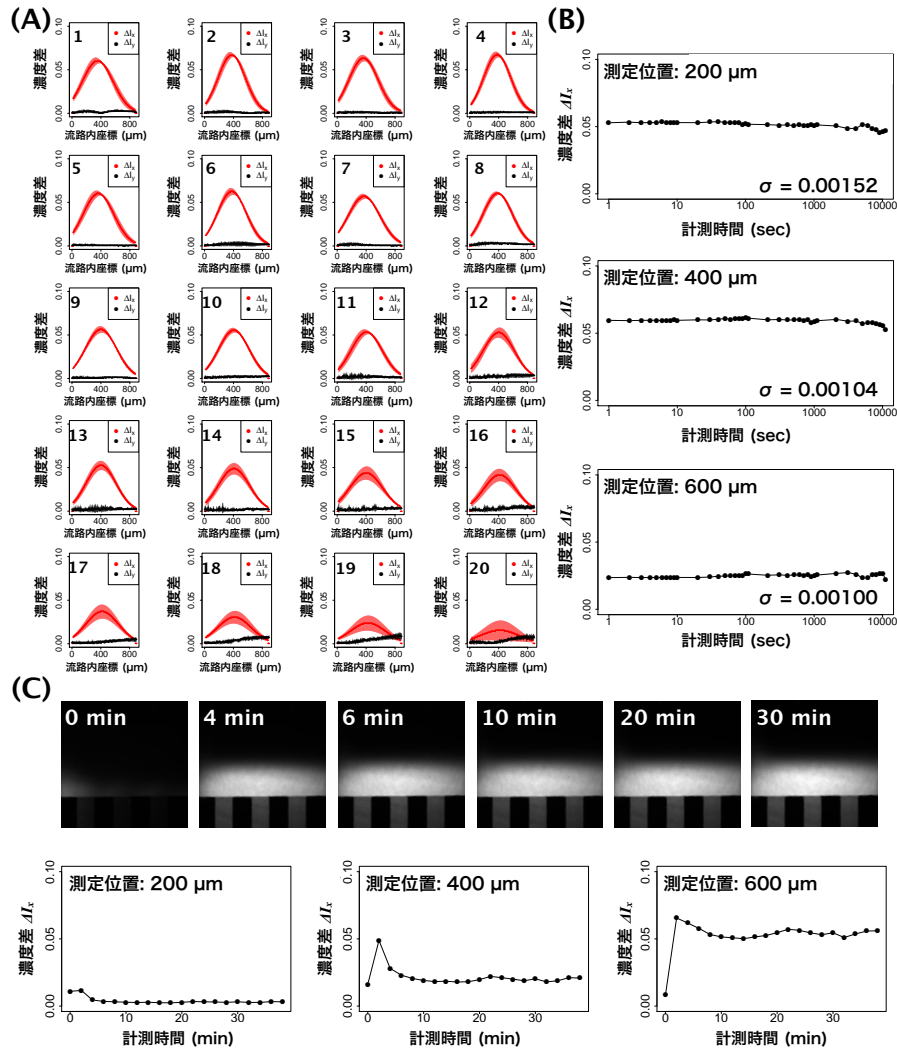


図 2.15: 濃度差および濃度勾配時間安定性の評価結果

(A) 各流路番号における濃度差。赤色プロットは  $\Delta I_x$ , 黒色プロットは  $\Delta I_y$  を表している。  
 (B) 各時間スケールにおける濃度差の経時的な変化。上段、中段、下段のプロットはそれぞれ流路位置  $x = 200 \mu\text{m}$ ,  $x = 400 \mu\text{m}$ ,  $x = 600 \mu\text{m}$  における濃度差の経時的な変化を示している。プロット内の数値は各位置における濃度差の経時的ゆらぎ ( $\sigma$ ) を表している。  
 (C) 細胞培養時と同様の条件で灌流を行なった際の濃度勾配形成過程。上段は灌流開始後の細胞培養流路内における FITC-dextran の蛍光画像。0 min は灌流を開始した時刻を表している。下段は細胞培養流路内の各位置における濃度差の経時的変化を表している。灌流を開始してから 10 分程度で濃度差は安定した。

### 2.3.2 Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂の異方性決定

次に、Wnt3a 濃度勾配が細胞分裂の異方性決定に影響を与えているか実験的に確認した。三次元蛍光顕微鏡画像を解析する際には、焦点高さによる輝度値の減少を補正するために図 2.16A の補正式を用いた。以降、三次元蛍光顕微鏡画像を用いる際には同様の補正を行なった。

まず、Wnt3a によって分裂期 SH-SY5Y 細胞の Wnt シグナルが活性化されるかを確認するため、Tp1479 LRP6 の免疫蛍光染色した。その結果、Wnt3a を加えると有意に LRP6 T1479 のリン酸化が生じていることがわかった (図 2.16B)。次に、Wnt3a 濃度勾配環境下で Wnt シグナルの活性化に空間的な偏りが生じているか解析した (第 2.2.5.4 小節参照)。解析の結果、分裂期中期において LRP6 の活性化座標は Wnt3a-CM 供給側に偏ることが明らかとなった (図 2.16C)。さらに、Wnt3a 濃度勾配が細胞培養流路内に存在しない場合、LRP6 活性化座標の偏りは生じなかった (図 2.16C, D)。以上の結果より、分裂期中期の細胞は Wnt3a 濃度勾配によって Wnt3a-CM 供給側で Wnt シグナルの活性化が惹起されやすいことを示した。

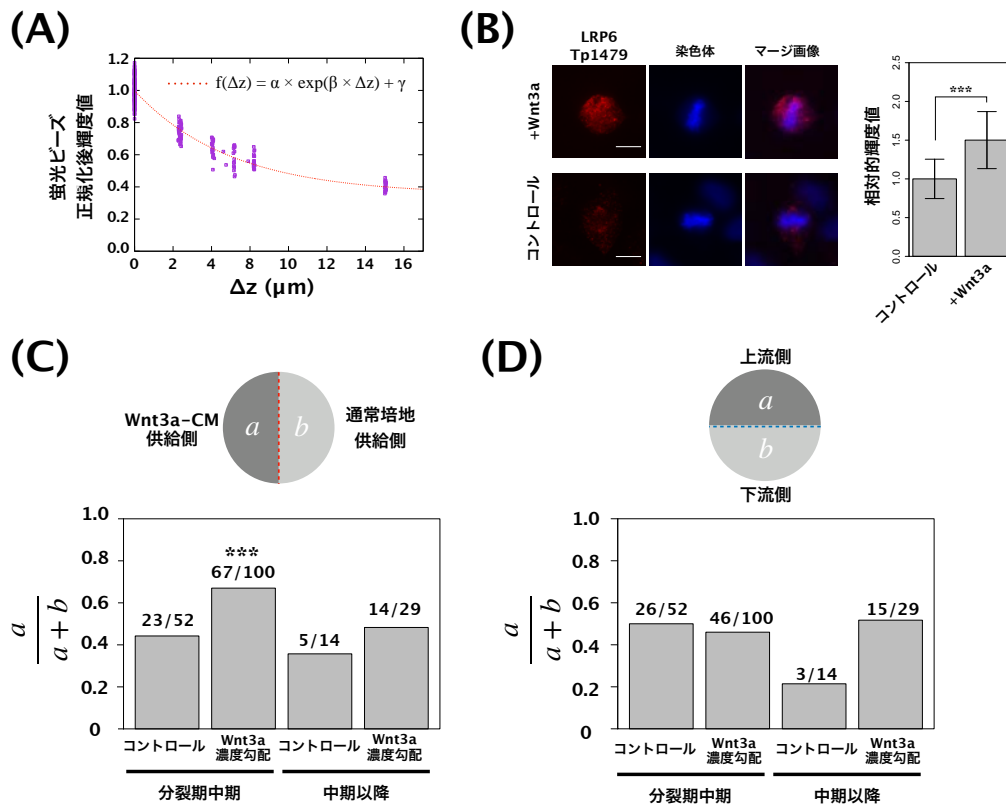


図 2.16: Wnt3a 濃度勾配による LRP6 活性化座標の同定結果

(A) 高さによる輝度値の補正曲線。  $\alpha = 0.645$ ,  $\beta = -0.200$ ,  $\gamma = 0.352$ 。帰無仮説として各パラメータの値を 0 とした。各パラメータの P 値は  $2.0 \times 10^{-16}$  を下回った。(B) 分裂期中期における Tp1479 LRP6 の免疫蛍光染色画像。三次元画像を二次元画像に投影した。棒グラフは各条件における Tp1479 LRP6 の輝度値を定量的に比較した結果。Wnt3a は 100 ng/mL の濃度で加えた。\*\*\*;  $P < 0.001$ 。(C, D) 各条件における LRP6 活性化部位の偏りについて。‘コントロール’は、両側から通常培地を流し入れた実験条件、‘Wnt3a 濃度勾配’は Wnt3a-CM と通常培地を流し込んだ実験条件である。グラフ内の分数は、分子に (a) 側に偏った細胞数を表し、分母に測定を行なった全細胞数を表している。偏りが生じているか検定するために二項検定を行なった。\*\*\*  $< 0.001$ 。



次に、Wnt3a 濃度勾配存在下で細胞を培養後、anti-ODF2 により免疫蛍光染色した (図 2.17A)。そして、細胞分裂の異方性を定量的に評価するために、各条件下における分裂角度  $\theta_{ODF2}$  を測定した (図 2.17B)。その結果、Wnt3a 濃度勾配が存在すると分裂期中期における  $\theta_{ODF2}$  は、Wnt3a-CM 供給側に有意に偏ることが明らかとなった (図 2.17C)。一方で、濃度勾配存在下の分裂期中期以降では有意な偏りは観測されなかった (図 2.17C)。また、濃度勾配が存在していない場合、全ての分裂期において分裂角度の偏りは観測されなかった (図 2.17C)。さらに、 $\theta_{ODF2}$  は上流側や下流側には偏りを示さなかった (図 2.17D)。

続いて、Wnt シグナルによって分裂角度が制御されているか確認するために Wnt3a に対して競合的阻害を行う Dkk1 を含んだ培養液 (Dkk1-CM)、Dkk1 と Wnt3a を含んだ培養液 (Dkk1-Wnt3a-CM) を各流入口から流し入れた (第 2.2.5.1 小節参照)。その結果、Wnt3a 濃度勾配刺激の結果と異なり、分裂角度の偏りは観測されなくなった (図 2.17E, F)。

最後に、コラーゲンに非特異的に吸着した Wnt3a が分裂角度の偏りに影響を及ぼしているか確認を行なった。まず、Wnt3a 濃度勾配を細胞培養流路内で 12 時間形成させた後に、培養基板上に吸着した Wnt3a を免疫蛍光染色で確認した。その結果、Wnt3a-CM 供給側と通常培地の供給側で吸着量に差が生じていた (図 2.18A)。しかし、Wnt3a 吸着量に差が生じている培養基板上で細胞を培養したところ分裂角度に偏りは生じなかった (図 2.18B)。

以上の結果より、Wnt3a 濃度勾配存在下では細胞分裂の異方性に偏りが生じることを示した。

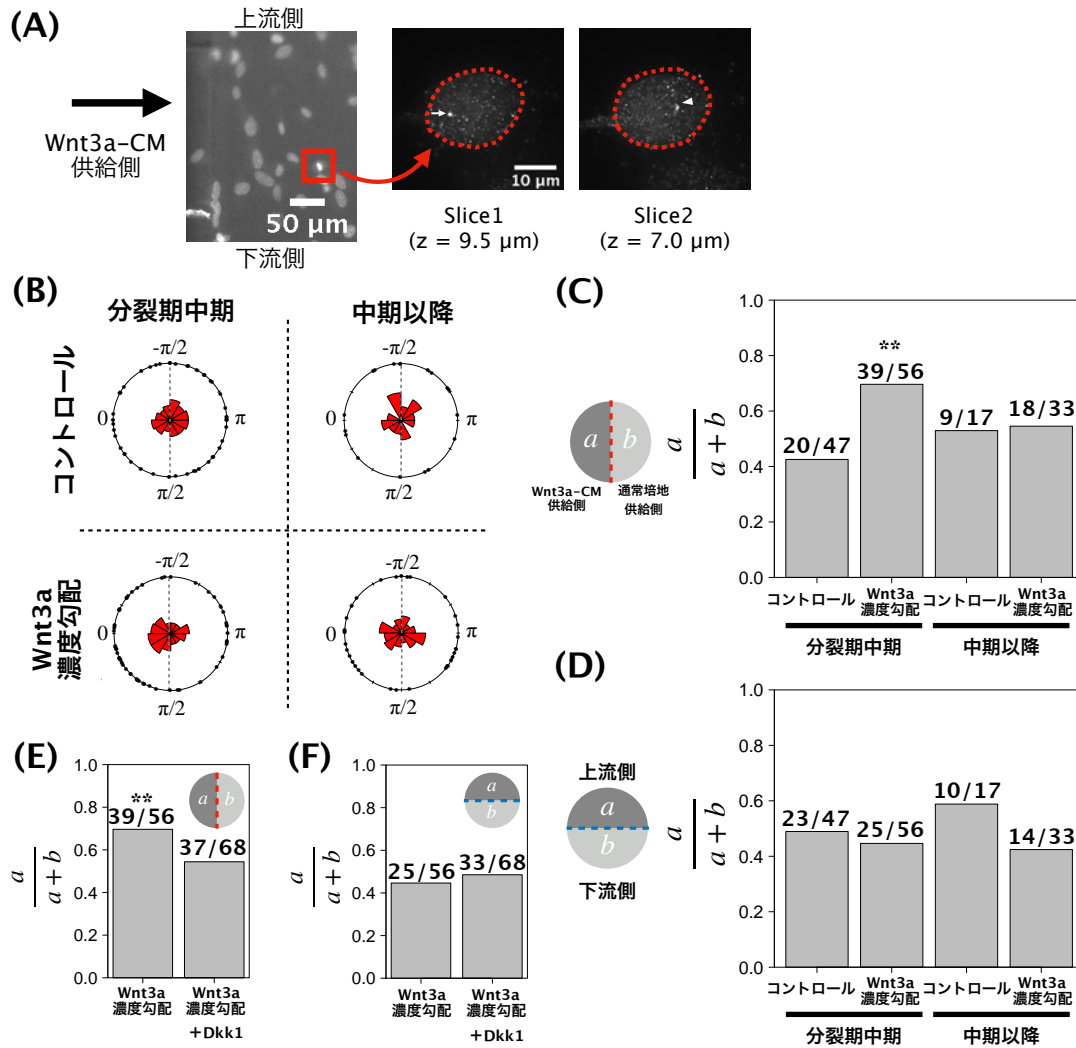


図 2.17: Wnt3a 濃度勾配による分裂角度への影響

(A) 細胞培養流路内における ODF2 の免疫蛍光染色画像。左画像: ヘキストによって染色した染色体を示している。中央および右画像: 三次元画像内の ODF2 免疫蛍光染色画像。免疫蛍光染色画像下の  $z$  は対物レンズの移動距離を示している。白矢印は輝度値の高い ODF2 を指し示し、白三角は輝度値の低い ODF2 を指し示している。(B) 各条件における分裂角度  $\theta_{ODF2}$  の角度分布。角度  $0^\circ$  が Wnt3a-CM を供給する細溝が存在する方向を示し、 $-\pi/2$  が流路の上流方向を示している。‘コントロール’ は両側から通常培地を流し入れた実験条件を表し、‘Wnt3a 濃度勾配’ は Wnt3a-CM と通常培地を流し入れた実験条件を表している。(C, D) 各条件における分裂角度  $\theta_{ODF2}$  の偏りについて。グラフ内の分数は、分子に (a) 側に偏った細胞数を、分母に測定を行なった全細胞数を表している。偏りが生じているか検定するために二項検定を行なった。\*;  $P < 0.01$ 。(E, F) 分裂期中期における Dkk1 による Wnt シグナル阻害実験。Dkk1 を加えると、Wnt3a 濃度勾配が存在していたとしても分裂角度の偏りが失われた (E)。

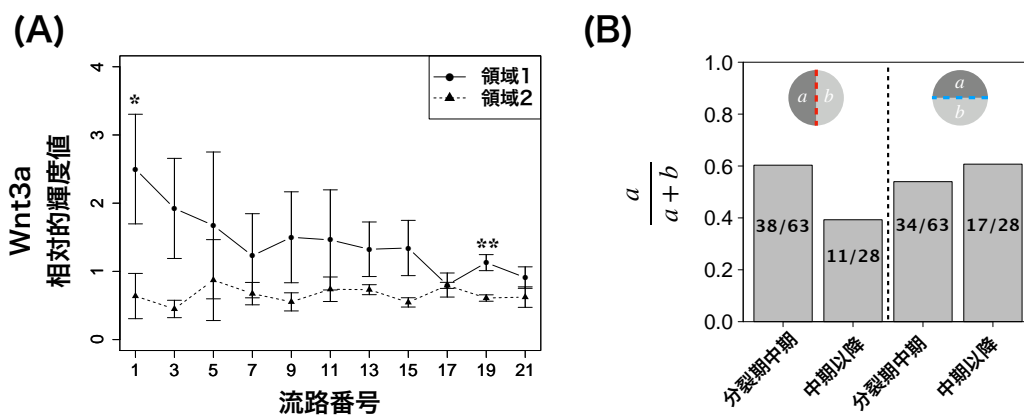


図 2.18: 非特異的な Wnt3a 吸着による分裂角度への影響

(A) Wnt3a-CM と通常培地を 12 時間灌流した後、各流路番号内の領域 1, 2 における培養基板上の相対的輝度値に関するプロット。各領域間における相対的輝度値の比較を行うために Student の t 検定を行なった。\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ 。エラーバーは標準偏差を表している。(B) Wnt3a-CM と通常培地を 12 時間灌流した後、通常培地のみで細胞を灌流培養した際の分裂角度。各方向、各分裂期において分裂角度の有意な偏りは生じなかった。偏りの検出には二項検定を用いた。

### 2.3.3 偏りのある細胞分裂異方性が観察された際の Wnt3a 濃度差の定量

最後に、細胞分裂の異方性に偏りが生じた際の Wnt3a 濃度差について定量した。まず、得られた濃度差  $\Delta C$  と分裂角度  $\theta_{ODF2}$  の関係についてプロットした (図 2.19A)。図に示すように Wnt3a の濃度差が大きくなるにつれて、分裂角度  $\theta_{ODF2}$  が Wnt3a-CM 供給側 ( $-\pi/2 < \theta_{ODF2} < \pi/2$ ) に収束することを定性的に確認した。さらに、分裂角度に偏りが生じていた際の濃度差を定量的に評価するために取得したデータセットを 4 分割したところ、濃度差  $\Delta C$  が約 0.1 nM 以上の条件で分裂角度  $\theta_{ODF2}$  が Wnt3a-CM 供給側に有意に偏ることが明らかとなった (図 2.19B)。

以上の結果より、細胞分裂の異方性を制御するためには少なくとも  $10^{-1}$  nM 程度の濃度差が必要であることを示唆した。

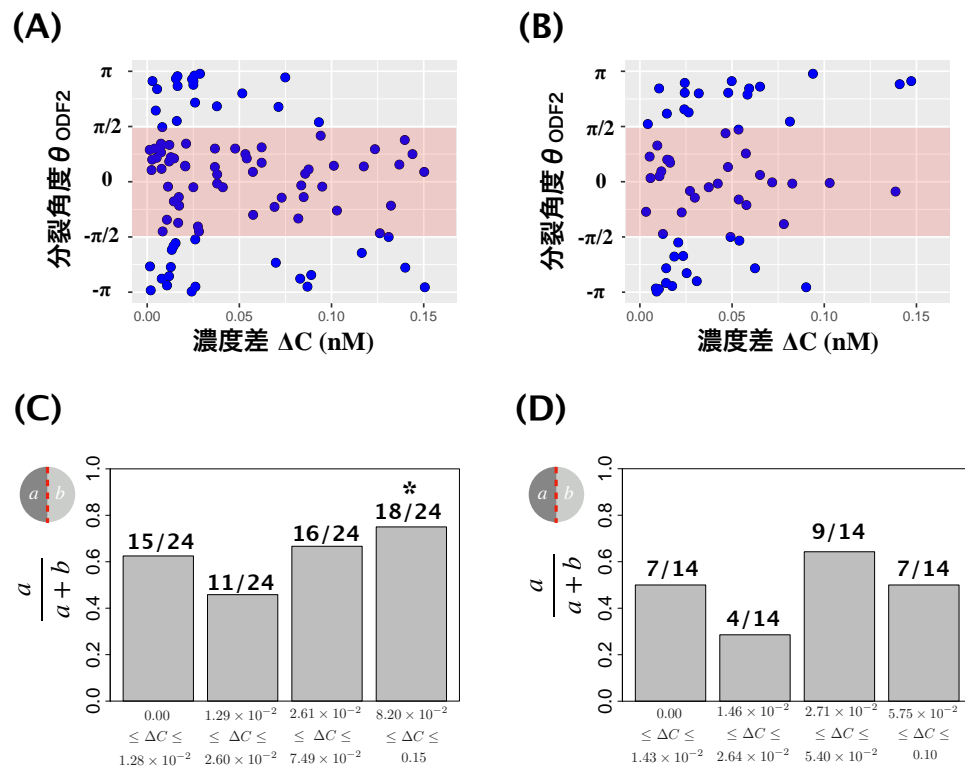


図 2.19: Wnt3a の濃度差と分裂角度の関係性

(A) 分裂期中期と (B) 中期以降における濃度差  $\Delta C$  と分裂角度  $\theta_{ODF2}$  のプロット。赤領域は Wnt3a-CM 供給側を表している。(C) 分裂期中期と (D) 中期以降において、サンプルサイズが等しくなるように濃度差によってデータセットを各グループに分割した。そして、各グループで分裂角度に偏りが生じているか検定を行なった。その結果、分裂期中期では濃度差  $8.20 \times 10^{-2} \leq \Delta C \leq 1.28 \times 10^{-2}$  の範囲で分裂角度に有意な偏りが生じていた。一方、中期以降の細胞では分裂角度に有意な偏りはみられなかった。検定には二項検定を用いた。\*;  $P < 0.05$ 。

## 2.4 考察

本研究では、Wnt3a 濃度勾配下で神経芽腫 SH-SY5Y 細胞を培養することにより、分裂の異方性決定に偏りが生じることを示した。このような分裂の異方性決定は細胞内における Wnt シグナルの空間的な偏りによって生じていることが報告されている。Sugioka らは、線虫胚の初期発生において P2 細胞から分泌される MOM-2/Wnt が EMS 細胞の分裂の異方性を制御していることを明らかにした [61]。また、Castanon らは、ゼブラフィッシュの原腸陥入時に背側胚盤葉上層細胞の紡錘体が A-V 軸に沿うことを明らかにし、このような紡錘体制御が局所的な Wnt シグナルの活性化によって生じているというモデルを提唱している [14]。さらに、Habib らは、ES 細胞に Wnt3a ビーズを付着させると Nanog や Sox2 といった多分化能を維持するために必要な転写因子がビーズ側に分配されることを明らかにした [41]。Habib らの研究では、より古い母中心子に局在する Ninein が Wnt3a ビーズ側に分配される確率は 78% であった。この確率は本研究で得られた分裂異方性の決定が Wnt3a 高濃度側に決定される確率 (70%) に近い。上述した先行研究と本研究の結果を踏まえると、Wnt3a 濃度勾配下で細胞分裂の異方性に偏りが生じた原因は細胞内に局所的な Wnt シグナルが生じたためであると考えられる。

本研究の結果より、Wnt3a 濃度勾配下における細胞分裂の異方性制御は、細胞両端間の濃度差か局所的な Wnt3a 濃度の影響を受けていると考えられる。現在までに、分裂における異方性制御は、Wnt3a 濃度差もしくは Wnt3a 濃度のどちらによって決定されるか明らかにされていない。そこで、流路内で濃度勾配を形成した際の流路方向の濃度差 ( $\Delta I_y$ ) に着目した。図 2.15 の結果では、流路方向にも僅かな濃度差が生じていた。仮に、Wnt3a の濃度によって分裂角度が決定されているのであれば、 $\theta_{ODF_2}$  は細胞の上流側に偏ることが推測される。しかし、図 2.17 の結果からわかるように、どの条件においても分裂角度  $\theta_{ODF_2}$  は上流側に偏らなかった。また、 $\theta_{ODF_2}$  だけでなく、LRP6 の活性化も同様の結果となった (図 2.16)。以上の結果より、分裂角度の決定は濃度差の影響を受けていることを示唆した。

本研究では  $10^{-1}$  nM という僅かな濃度差によって細胞の動きが制御されていることを示唆した。僅かな濃度差によって細胞動態を制御する機構として local excitation global inhibition (LEGI, [62,63]) モデルが挙げられる (図 2.20A)。LEGI モデルの特徴としては、

- (a) リガンド S が受容体に結合することで活性化因子 A と不活性化因子 I の濃度上昇を引き起こし、シグナル経路の下流に位置する反応物 R の活性化/不活性化を制御する
- (b) 活性化因子 A の濃度上昇が先に生じ、次いで不活性化因子 I の濃度上昇が生じる

が挙げられる。LEGI モデルでは上記の特徴により僅かな濃度変化に対する検出が可能である。例えば、細胞周辺にリガンドの濃度勾配が存在している場合、まず

高濃度のリガンドが存在している領域で局所的に活性化因子 A の濃度上昇が生じる。その後、細胞全体で不活性化因子 I の濃度上昇が生じることで、最終的に活性化因子 A と不活性化因子 I の濃度バランスによって濃度差を検知することが可能となる (図 2.20B)。また、LEGI モデルには勾配検出以外にも適応的応答と呼ばれる特徴が備わっている。適応的応答とは、細胞に対して空間的に一様な刺激を持続して与えると、細胞応答が一過的に生じたのちに刺激前の状態に戻る応答のことを示す (図 2.20C)。現在までに、LEGI モデルが細胞分裂に備わっているかは不明である。したがって、今後は勾配検出に関する詳細な検証と刺激に対して適応的応答を示すか検証を行うことで、LEGI モデルの存在を明らかにする必要がある。

LEGI モデルの確認には、ODF2 のライブセルイメージングや LEGI モデルにおける活性化因子と不活性化因子の同定を行う必要がある。本研究では、免疫蛍光染色による解析を行なったため、ある時刻の瞬間的な細胞の様子しか捉えることができていない。したがって、ODF2 のライブセルイメージングを行うことで、どのような過程を経て分裂異方性が決定されるか明らかにする必要がある。また、LEGI モデルにおける活性化因子と不活性化因子の同定では、分裂期における微小管動態制御因子に注目していくことが考えられる。この理由として線虫の初期発生における非対称分裂の軸決定には、星状体微小管と細胞表層間の局所的な結合安定化が深く関与していることが挙げられる [61]。この結合安定化には、Wnt3a によってリン酸化した LRP6 と星状体微小管の間に Dvl2 と APC を介さなければならないと考えられている [47]。さらに、LRP6 のリン酸化は Wnt3a を加えてから 10 min ほどで生じる非常に早い応答である [64,65]。したがって、LRP6 のリン酸化は LEGI モデルにおける活性化因子として考えられる。一方で不活性化因子の候補は、Wnt3a を加えると星状体微小管と細胞表層間の相互作用を阻害するタンパク質が考えられる。このようなタンパク質の一つとして caveolin が挙げられる。Wnt3a を培地に加えると、細胞膜上の LRP6 は caveolin 依存的に細胞質内に取り込まれることが報告されている [66]。したがって、caveolin は LRP6 やリン酸化した LRP6 を細胞質内に取り込むことで、星状体微小管と LRP6 の相互作用を阻害していると考えられる。また、caveolin による LRP6 の取り込みは Wnt3a を加えてから 30 min ほどで確認される [66] ことから、活性化因子候補である LRP6 リン酸化よりも遅い現象である。上述の先行研究から LEGI モデルにおける活性化因子と不活性化因子として、それぞれ微小管動態制御因子と LRP6 の取り込みを制御するタンパク質が考えられる。したがって、今後は Wnt3a を加えた際のこれらのタンパク質の動態を調べる必要がある。さらに、適応的応答の検証を行うために、Wnt3a を空間的に一様に加え、細胞膜上のリン酸化 LRP6 と Dvl2 や APC の共局在について経時的に観測する必要がある。

次に、本研究で形成したような空間的に微小な濃度勾配が生体内で形成されているか考察を行う。細胞から産生された Wnt3a は生体内の各組織で局所的に分布していることが報告されている。例えば腸陰窩先端 (図 1.2E、[11])、マウス脊髄神経管の最も背側に位置する蓋板 (roof plate) [67,68]、ゼブラフィッシュ初期胚にお

ける後極側 [69] などが挙げられる。このような局所的な分布は Wnt3a が脂質修飾を受けて分泌小胞に挿入されることで、周辺の細胞膜や細胞外マトリクスに局在しやすくなることによって生じると考えられている [70–72]。したがって、生体内における Wnt3a は、細胞膜に局在しつつ細胞分裂やエンドサイトーシスを経て、空間的に微小な濃度勾配を形成し、細胞周辺で濃度差が生じている可能性が高いと考えられる。

本研究では、濃度勾配存在下において細胞周辺に生じた Wnt3a 濃度差が細胞分裂の異方性決定に影響を与えることを示唆した。背景 (第 2.1 節) で述べたように、現在までに機械的刺激によって細胞分裂の異方性が制御されていることは報告されていない。しかし、細胞分裂方向は機械的刺激によって制御されていることが報告されている。したがって本研究の結果を踏まえると、生体内では機械的刺激と液性因子の濃度勾配が協同的に細胞に働きかけることで、異方性を含めた細胞分裂を制御していると考えられる。そしてこのような協同的な細胞分裂制御機構によって、生体内における複雑な組織パターンが形成されていると考えられる。



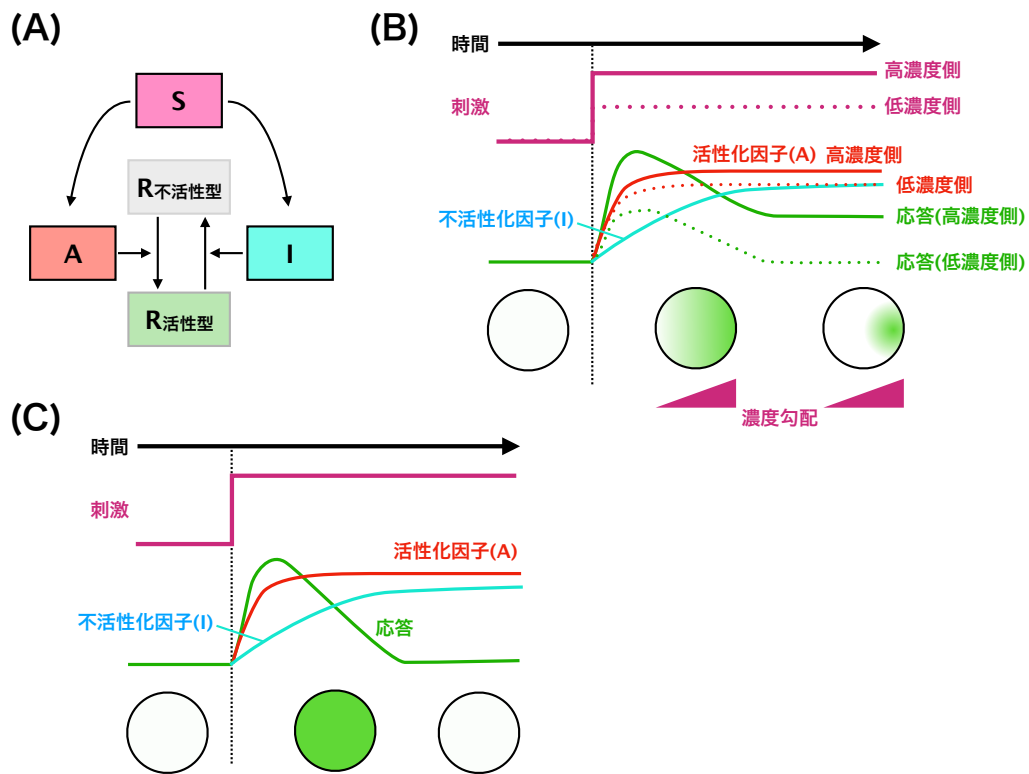


図 2.20: LEGI モデルの概略図および特徴

(A)LEGI モデルの概略図。S: リガンド、A: 活性化因子、I: 不活性化因子、R: 応答因子。  
 (B) リガンド濃度勾配に対する勾配検出の概略図。(C) 適応的応答の概略図。[73] より改変

# 第3章 せん断応力による神経芽腫細胞の遊走制御

## 3.1 背景

第1.2節で述べたように、生体内で生じるせん断応力は組織形成以外にも癌細胞の転移に影響を及ぼしている。癌細胞の転移は以下の複数のステップから成り立っていると考えられている [74]。

1. 原発腫瘍から細胞が脱離する
2. 局所に浸潤する
3. 血管内やリンパ管に侵入を行う
4. 血管内で生体防御機構を回避する
5. 血管内皮細胞に接着する
6. 血管外遊走し、コロニーを形成する

したがって癌細胞が遠位に転移する場合、癌細胞が血管やリンパ管の方向に遊走を行うことや遊走能の向上が重要となる。実際にマウス内に乳癌細胞 4T1 を同所的に移植すると、乳癌細胞がリンパ節内の血管方向に遊走し遠位に転移することが観測されている [75]。癌細胞がどの方向に遊走するかといった異方性決定は、生体内で生じる流れの影響を受けていることが報告されている。また、前立腺ガン細胞の遊走能はせん断応力によって向上することが報告されている (図 3.1)。しかし、せん断応力によって癌細胞の遊走を変化させるメカニズムについては未だに不明瞭である。

生体内の腫瘍周辺では腫瘍の増大に伴い、間質流が増大していくと考えられている。この原因は、癌細胞の異常増殖によって生じる圧縮や血管からの流体漏れの増加が生じるためであると考えられている (図 3.2, [2, 76, 77])。このようなことから生体内の癌細胞は正常組織に比べて流れの影響を強く受けられていると考えられる。しかしながら、間質流の増大が癌細胞の遊走に対してどれほどの影響を与えているかは不明である。ゆえに、流体流れの増加と癌細胞の遊走変化の関係性に

ついて定量的に明らかにすることは、癌細胞転移メカニズムの理解を行う上で重要な課題である。

本研究では癌細胞として神経芽腫細胞を用いる。悪性度の高い神経芽腫細胞は、遠位への転移を行う小児癌細胞として知られている [78]。神経芽腫の悪性度の高さ(予後不良)はMYCN 遺伝子の増幅と相関を示すことが報告されている [78]。マウスに対して神経芽腫細胞の同所性移植を行うと、MYCN 遺伝子の増幅が生じている神経芽腫細胞は増幅が生じていない神経芽腫細胞に比べて多くの組織に転移していることが確認されている [79]。しかし、MYCN 遺伝子の増幅がどのような機序で転移に影響を与えているかについてはいまだ不明である。神経芽腫細胞における MYCN 遺伝子の増幅は、遊走能を調節しているタンパク質の発現量を制御している。たとえば MYCN 遺伝子の増幅は、接着斑 (Focal adhesion) を構成する  $\beta 1$  integrin の発現を抑制する一方で、Focal adhesion kinase (FAK) の発現を促進することが知られている [80, 81]。そして、神経芽腫細胞における  $\beta 1$  integrin の発現は遊走能を抑制し、FAK の発現は遊走能を促進している [82, 83]。癌細胞における遊走能は転移能と相関を示すことが知られている [84]。このようなことから神経芽腫細胞における MYCN 遺伝子の増幅は遊走を制御することで転移能にも影響を及ぼしていると考えられる。

しかし、現在までに得られた MYCN 増幅と遊走に関する結果は、全て静置培養における実験結果である。前述したように生体内の癌細胞では、せん断応力に曝されることで遊走能や遊走方向が変化すると考えられている。また近年では、神経芽腫細胞 SK-N-SH の血管内皮細胞への接着が、せん断応力 (0.05 ~ 0.2 Pa) によって促進されることが明らかにされている [85]。このようなことから神経芽腫細胞はせん断応力を感知する何かしらの機構が備わっていることが推測される。したがって MYCN 増幅が生じた神経芽腫の転移機構について理解するためには、せん断応力が及ぼす影響について考慮する必要がある。しかしながら、現在までに様々なせん断応力値に対して癌細胞が応答することが報告されているが、神経芽腫細胞の遊走においてはどれほどのせん断応力に対して応答を示すか明らかにされていないといった問題がある (表 3.1)。

以上の研究背景より、本研究では、(1) どれほどのせん断応力によって神経芽腫細胞の遊走が変化するか、(2) 遊走変化する際には細胞内でどのような変化が生じているか、(3) MYCN 増幅がせん断応力による遊走変化に関わっているのか明らかにすることを目的とし、せん断応力が MYCN 増幅型の神経芽腫細胞の遊走に対してどのような影響を与えているか明らかにすることを目指した。

本研究で用いたマイクロ流体デバイスは対数スケールで異なるせん断応力値を一度に実現することが可能である。したがって、今回使用したマイクロ流体デバイスは神経芽腫細胞の遊走変化が生じる際のせん断応力値を探索するのに適している。また本研究では神経芽腫細胞として IMR32 細胞を用いた。IMR32 細胞は SK-N-SH 細胞に比べて N-Myc タンパク質が 33 倍ほど発現している MYCN 遺伝子増幅型の神経芽腫細胞であり、マウスに同所性移植を行うと遠位に転移するこ

とが確認されている [79, 80]。このような生物学的特徴を有する IMR32 細胞に対してマイクロ流体デバイスを用いてせん断応力を与え、遊走方向や遊走能の変化を測定した。近年、静置培養条件下における細胞の遊走能は接着斑の形態的特徴に依存していることが報告されている (表 3.2)。したがって、せん断応力を細胞に与えた時の接着斑の形態的特徴を測定することで、せん断応力による遊走変化に接着斑の形態的特徴が関わっているか調べた。さらに、神経芽腫細胞の悪性度指標である MYCN をノックダウンした際に、せん断応力下での細胞遊走や接着斑の形態的特徴に変化が生じるか調べた。以上の実験から、せん断応力が MYCN 増幅型の神経芽腫細胞の遊走に対してどのような影響を与えているのか明らかにした。

本章では  $10^{-1}$  Pa のせん断応力を与えた際に IMR32 細胞の遊走方向や遊走能が変化することを明らかにした。また、 $10^{-1}$  Pa のせん断応力を与えると、接着斑の形態的特徴に変化が生じていることを明らかにした。そして、細胞内の N-Myc 発現量を減少させると、 $10^{-1}$  Pa のせん断応力を与えた際の遊走能や形態的特徴の変化は減少した。以上の結果から、少なくとも  $10^{-1}$  Pa のせん断応力が、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞の遊走に影響を与えていることを明らかにした。また、N-Myc の発現はせん断応力による遊走能変化に関与していることを示唆した。

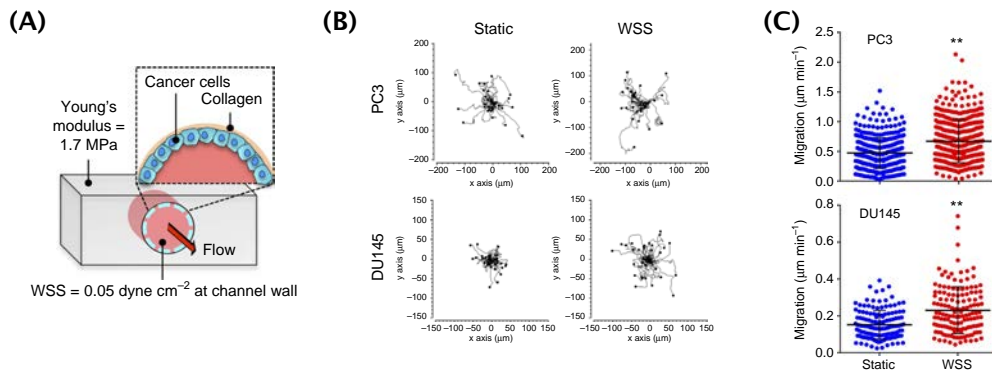


図 3.1: せん断応力による癌細胞の遊走能変化

(A) 癌細胞に対してせん断応力を与える PDMS 製マイクロ流体デバイス。流路壁面で細胞を培養している。流路に培地を流し、壁面に 0.005 Pa のせん断応力が生じている。(B) せん断応力を与えた際のヒト前立腺癌細胞 PC3、DU145 における遊走軌跡。(C) せん断応力を与えた際の各細胞株における遊走速度の変化。Static: せん断応力を与えない培養条件。WSS(wall shear stress):せん断応力を与えた培養条件。[23] より改変

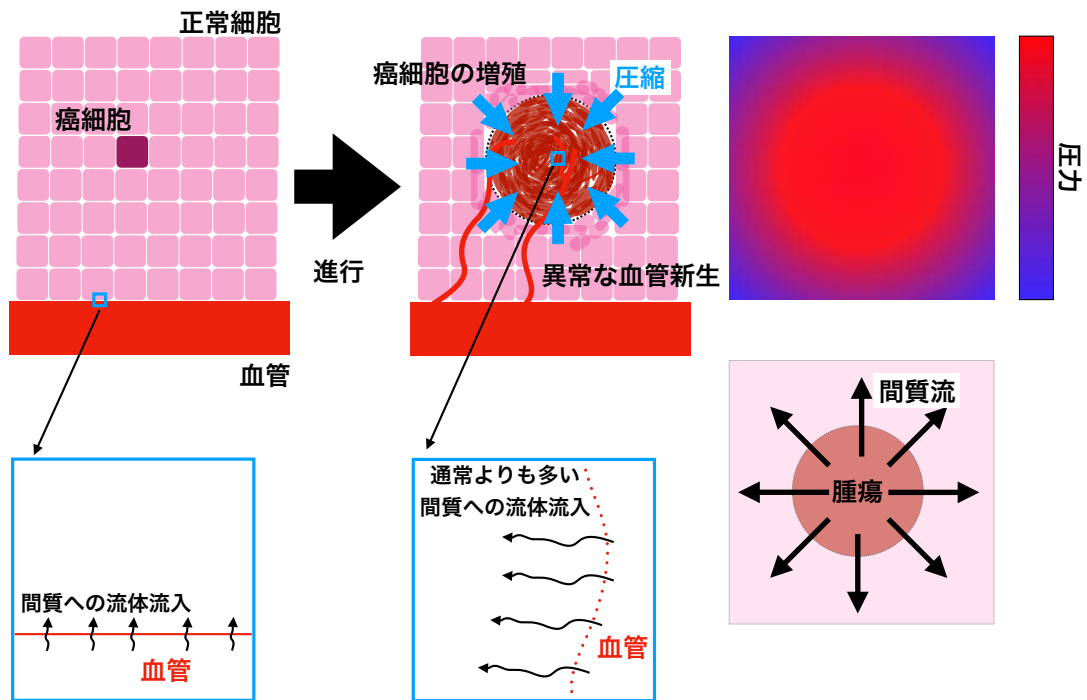


図 3.2: 腫瘍内圧力の上昇と間質流の増大

正常組織では、浸透圧によって血管から間質に向けて流体が流れ出ている。また、正常組織内の細胞は規則的に配置されている。一方で、癌細胞が腫瘍として進行すると、(1) 無秩序な癌細胞増殖による腫瘍の圧縮、(2) 異常な血管新生による間質流の増大によって、腫瘍内の圧力が正常組織よりも高くなる。これにより、腫瘍内から正常組織間に大きな圧力差が生じる。したがって、腫瘍内で血管より漏れ出た流体が間質流となって腫瘍外に向かって流れ出ると考えられている [2, 76, 77]。

表 3.1: 各せん断応力値に対する各癌細胞の応答

癌細胞	せん断応力値	応答	文献
ヒト骨肉腫細胞 MG63, Saos2; ヒト舌癌細胞 SCC25; ヒト軟骨肉腫細胞 SW1353	1.2 Pa	G <sub>2</sub> /M arrest	[86]
ヒト前立腺癌細胞 PC3, DU145	0.005 Pa	遊走能の向上	[23]
ヒト卵巣癌細胞 OVCAR-3	0.05-0.15 Pa	細胞形状の伸展およびストレスファイバーの形成	[87]
ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231	0.18 Pa	細胞面積の増大、細胞の極性化 (ゴルジ体を下流側に配向)、接着斑数の増加	[88]
ヒト結腸腺癌細胞 COLO205; ヒト前立腺癌細胞 PC3	0.04-0.2 Pa	抗癌剤 TRAIL によるアポトーシスを促進	[89]

表 3.2: 接着斑の形態的特徴と遊走能の関係性

形態的特徴	変化	遊走能変化	参考文献
角度分散	減少	有向性増加、持続距離増加、速度増加	[90, 91]
面積	増大	有向性増加、持続距離増加、速度増加	[92]
長軸長さ	増大	有向性増加、持続距離増加、速度増加	[91, 92]
短軸長さ	増大	変化無し	[92]
真円度 <sup>a</sup>	減少	有向性増加、持続距離増加、速度増加	[92]

<sup>a</sup>: 真円度の求め方は式 (3.6) 参照



## 3.2 方法

### 3.2.1 マイクロ流体デバイスの作製

まず、細胞に対数的なスケールのせん断応力を与えるためのマイクロ流体デバイスを作製した [37]。本研究では、4つの細胞培養流路 (cell culture channel) と4つの抵抗流路 (logarithmically scaled resistors) を持つマイクロ流体デバイスを設計した (図3.3A)。低アスペクト比 ( $h/w$ ) を持つ流路内を流れる流体は二次元ポアズイユ流れとして仮定できるため、流路壁にかかるせん断応力 ( $\tau$ ) は式 (1.8) から求まる。したがって、細胞培養流路は低アスペクト比になるように設計を行なった。各流路に分配される流量 ( $Q_i$ ) は、第1.3.2小節で述べたようにキルヒホッフの法則に従い、式 (1.10) から求めた。

本デバイスを作製するために6つのマスクデザイン (高抵抗値流路 (流路高さ:低)、中抵抗値流路 (流路高さ:中)、低抵抗値流路 (流路高さ:高)、気泡トラッピング流路 (下層)、気泡トラッピング流路 (上層)、脱気流路) を設計した (図3.3B)。これらの流路デザインは全てInkscape (version 0.48, <http://www.inkscape.org>) で作成した。各流路デザインは、帆風株式会社でフィルムに印刷しフィルムマスク (帆風株式会社) として利用した。また、本デバイスは並列流路の上流に第2章と同様の脱気機構を設置した。

並列流路のモールド作成は次の手順で行なった (図3.3C)。まず、ネガ型フォトレジスト SU-8 3010 (MicroChem) をガラスウェハ (S9111, 松浪ガラス) 上加えてスピコートによって薄く塗布した。その後、ウェハをホットプレートにのせて100°Cでソフトベークした。フィルムマスク (流路3) をマスクアライナ (EMA-400, ユニオン光学) に設置した後にウェハに対してUV照射した。UV照射を行なったウェハを60°Cで加熱してから100°Cで架橋反応を行なった。架橋反応後、SU-8 3010 をウェハ上加えてスピコートによって薄く塗布し、100°Cでソフトベークした。マスクアライナ上でフィルムマスク (流路2) とウェハをアライメントしてウェハに対してUV照射した。UV照射を行なったウェハを60°Cで加熱し、その後100°Cで架橋反応を行なった。さらに、流路1のフィルムマスクを用いて同様の工程をもう一度行なった。架橋反応終了後、ウェハをSU-8現像液に浸して現像を行なった。各工程の詳細なパラメータは表3.3に記した。モールドにおける各流路の寸法は、走査型レーザー顕微鏡 (VK-9710, KEYENCE) によって測定した。

モールド作成後、poly-dimethylsiloxane (PDMS) (Silpot 184 W/C, 東レ) の母剤と重合開始剤を10:1で混合して各モールドに流し込んだ。その後、60°CでPDMSの硬化を行なうことで各層を作製した。各PDMS層を作成後、プラズマエッチング装置 (SEDE-P, メイワフォーシス) によって各PDMS層の表面を活性化し、お互いを貼り合わせることでマイクロ流体デバイスを作製した。

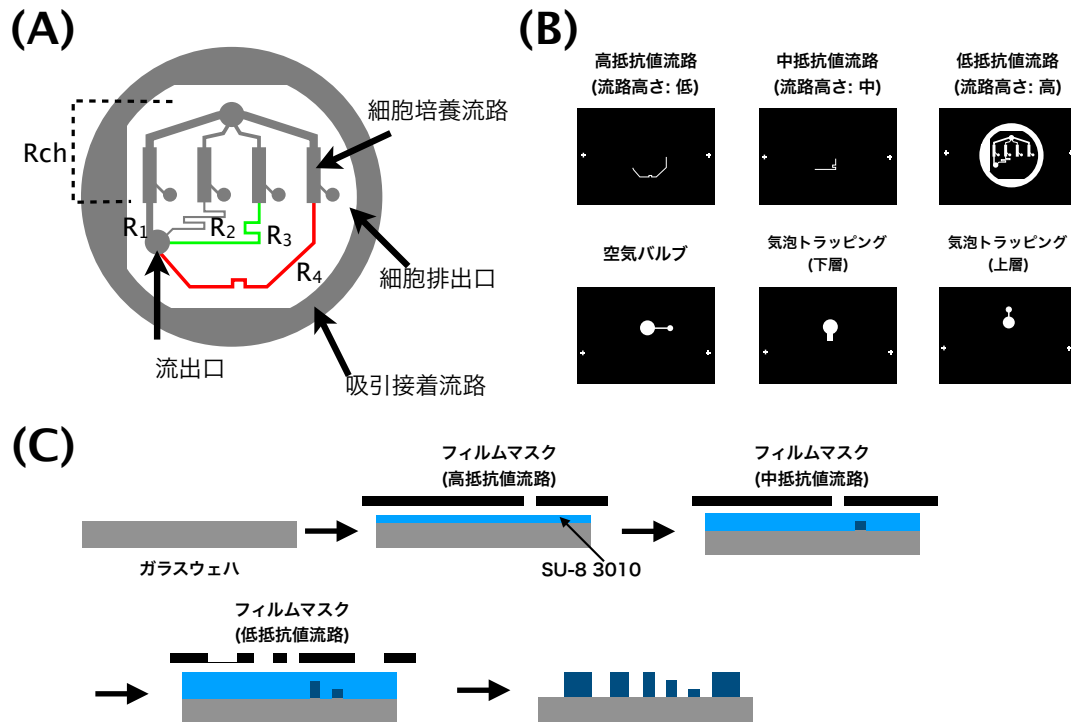


図 3.3: モールド作製手法

(A) マイクロ流体デバイスの設計。Rch: 細胞培養流路。R<sub>1</sub> ~ R<sub>4</sub>: 抵抗流路。流路の各色は流路高さを表している (高さ: グレー > 緑 > 赤)。流路抵抗値の大きさは、R<sub>1</sub> > R<sub>2</sub> > R<sub>3</sub> > R<sub>4</sub> とした。(B) 各流路のマスクパターン。(C) 細胞培養流路のモールド作成手法。ガラスウェハに対してSU8 3010を塗布し、高抵抗値流路パターンを照射。SU-8 3010を再度塗布し、中抵抗値流路パターンを照射。さらに、SU-8 3010を塗布し、低抵抗値流路パターンを照射した。最後に現像を行うことでモールドを作製した。

表 3.3: モールド作製におけるパラメータ

マスク	フォトレジスト	回転速度	ソフトベーク	露光量	ポストベーク (60°C / 100°C)
高抵抗値流路	SU8 3010	3000 rpm	5 min	420 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 5 min
中抵抗値流路	SU8 3010	2500 rpm	5 min	420 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 5 min
低抵抗値流路	SU8 3010	2500 rpm	5 min	420 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 5 min
気泡トラッピング (下層)	SU8 3050	1300 rpm	20 min	420 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 8 min
気泡トラッピング (上層)	SU8 3050	1300 rpm	20 min	480 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 10 min
Air valve <sup>a)</sup>	SU8 3050	1300 rpm	20 min	480 mJ/cm <sup>2</sup>	1 min / 10 min

<sup>a)</sup> 高さ 200  $\mu\text{m}$  のモールドを作製するために、スピニングとソフトベーク工程を二回繰り返した。

### 3.2.2 Particle Image Velocimetry (PIV)

本研究では、各流路内の流量を求めるために Particle image velocimetry (PIV) による流速測定を行なった [93]。PIV は、取得画像に対して探索窓を設定し、各フレームにおける探索窓間の相互相関係数を導出することで蛍光ビーズの変位を求める流速測定法である。

まず、500 nm 蛍光ビーズ (F8813, Life Technologies) を 0.05%(volume/volume) となるように滅菌蒸留水に加えた。そして、ビーズ同士の凝集を防ぐために Triton-X を 0.1% になるように加えた。作製したマイクロ流体デバイスに対して、マイクロシリンジポンプ (Nexus 3000, Chemyx) を用いて調製したビーズ懸濁液を 0.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流量で送液した。タイムラプス画像は、倒立型顕微鏡 (IX81, オリオンパス) に共焦点ユニット (CSU-22, 横河電機) を接続し、CMOS カメラ (ORCA Flash 4.0, 浜松ホトニクス) によって取得した。最大流速 ( $V_{max}$ , 第 1.3.2.1 小々節) を求めるために、画像取得を行う際の流路内位置は流路高さ  $h/2$ 、流路幅  $w/2$  付近とした。露光時間、撮影間隔、ビニング、レーザー出力、対物レンズの倍率は表 3.4 のように設定した。蛍光ビーズの速度を求める際には画像解析ソフトウェア Fiji の iterative PIV [94] を利用し、各フレーム間のビーズの速度を求めた。そして、50 枚のタイムラプス画像における蛍光ビーズの平均速度を算出することで最大流速 ( $V_{max}$ ) を求めた。最後に、最大流速 ( $V_{max}$ ) を式 (1.9) に代入しせん断応力を求めた。

表 3.4: PIV における画像取得条件

流路番号	露光時間 ms	撮影間隔 ms	ピニング	レーザー出力 mW	倍率	撮影領域 (pixel × pixel)
$R_1$	1	1	2×2	70	10	128×128
$R_2$	1	1	2×2	70	10	128×128
$R_3$	10	10	2×2	30	10	128×128
$R_4$	100	100	2×2	5	10	128×128

### 3.2.3 流路内における静圧測定

各流路内の静圧を測定するために、各細胞培養流路内の上面に対して垂直に穿孔してシリコンチューブを接続した。そして、マイクロシリンジポンプを用いて0.1% Triton-Xを含む精製水を5.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、10.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ でデバイスに送液した。その後、チューブ内の液面高さを測定することで流路内の静圧を測定した(図3.9)。

### 3.2.4 細胞培養

神経芽腫細胞IMR32(No. JCRB9050, 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所)は、10%のfetal bovine serum (FBS)(16170-078, Life Technologies)を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(043-30085, 富士フイルム和光純薬)を用いてインキュベータ内(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)で培養を行なった。顕微鏡で細胞を観察する際にはガラスベースディッシュにIV型コラーゲン(Cellmatrix Type IV, 新田ゼラチン)を塗布した。コラーゲン溶液は150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように1 Mの塩酸によって調製した。そして、調製後のコラーゲン溶液をガラスベースディッシュに加え、余分なコラーゲン溶液を除去した後に風乾することでコラーゲンをディッシュに塗布した。

### 3.2.5 デバイス内細胞培養

作製したマイクロ流体デバイスを顕微鏡システム内に設置し、デバイス内に細胞を導入することで細胞にせん断応力を与えた。以下にデバイス内細胞培養までの手順を記す(図3.4)。

まず、カバーガラスにコラーゲン溶液を加えてからカバーガラスを風乾することでコラーゲンを塗布した。また、細胞培養を行う前に作製したマイクロ流体デバイスを熱滅菌した。滅菌処理を行なったマイクロ流体デバイスと真空ポンプ(DAP-15, アルバック機工)を接続した。そして、マイクロ流体デバイスとコラーゲンを塗布したカバーガラスを吸引接着した。各細胞排出口をプラグで塞いだ後にデバイスを37°C, 5% CO<sub>2</sub>に設定したステージトップインキュベータ(INUG2-ONICS, 東海ヒット)に設置し、細胞培養液を5.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ で1時間灌流することにより流路内を細胞培養液で満たした。その後、IMR32細胞をトリプシンによって回収し、 $2 \times 10^6$  cells/mLとなるように細胞懸濁液を調製した。細胞排出口のプラグを外した後に、流入口から細胞懸濁液をデバイス内に導入した。デバイス内に細胞導入後、細胞排出口をプラグによって再び塞いだ。そして、細胞が接着するまで2.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ で灌流培養を行なった。細胞接着後、マイクロシリンジポンプを用いて0.0, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で送液を行なった。送液を開始してから5時間後、細胞遊走のライブセルイメージングを開始した。ライブセルイメージングの撮影間隔を5

分に設定し、50枚の画像を取得した。細胞遊走解析では、FijiのManual Trackingを利用することでライブセルイメージング画像に対して手動で細胞をトラッキングした。また、遊走能の指標として変位距離、有向性、持続距離、遊走速度を求めた(図3.5, [92])。各遊走能指標の算出方法は図3.5に示した。各指標の特徴として変位距離は癌細胞の最終的な移動距離、有向性は細胞遊走の大局的な直進性、持続距離は細胞遊走における局所的な直進性、遊走速度は細胞の運動性を表している。

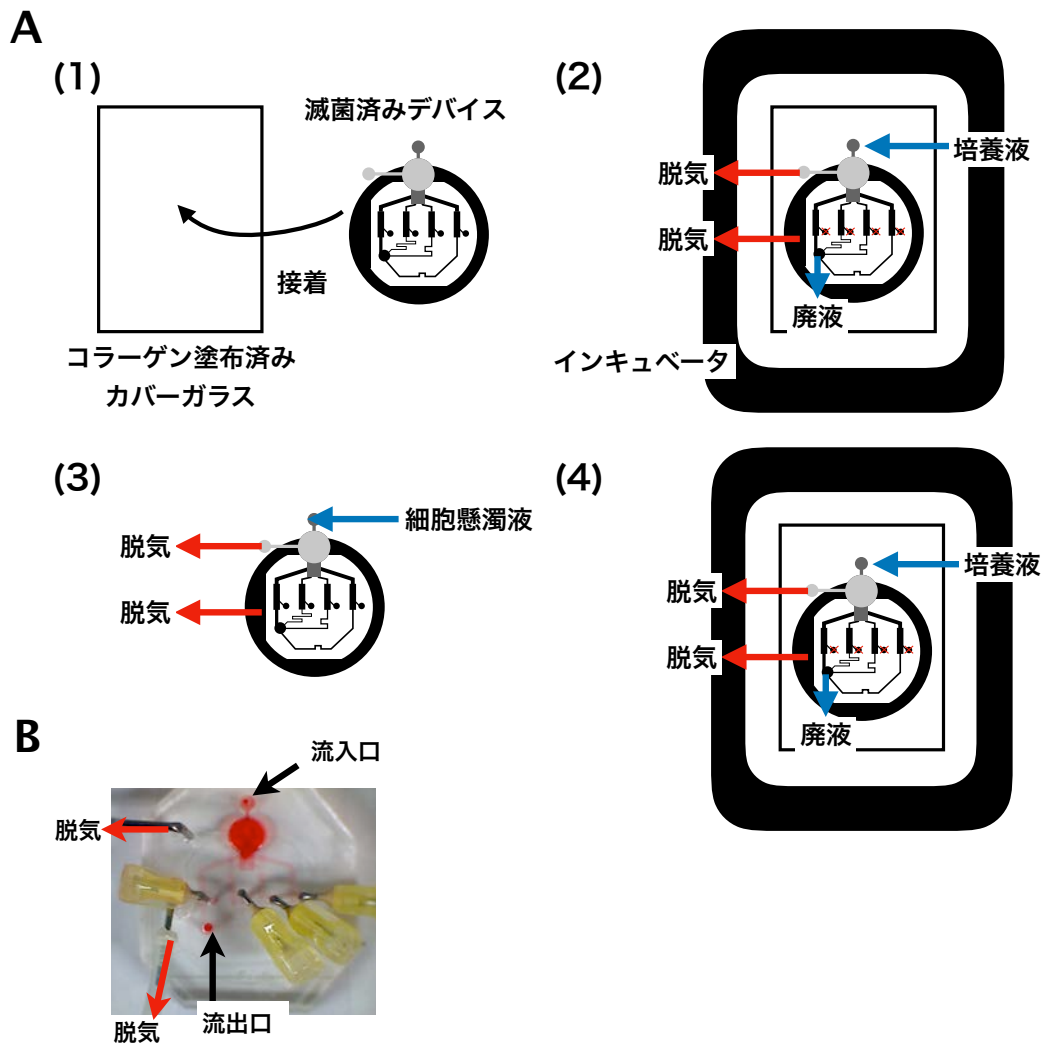


図 3.4: マイクロ流体デバイスの設置手順

以下の手順でマイクロ流体デバイスによる細胞培養の準備をおこなった。(1) コラーゲンを塗布したカバーガラスに滅菌済みのマイクロ流体デバイスを貼り合わせ吸引接着した。(2) マイクロ流体デバイスをステージトップインキュベータに設置し、培養液を送液することで流路内を培養液で満たした。培養液を満たす際には、プラグによって細胞排出口を塞いだ。(3) 流路内を培地で満たした後、マイクロ流体デバイスをインキュベータから取り外し、細胞懸濁液を流入口から導入した。このとき、細胞排出口は解放した。(4) 再度、マイクロ流体デバイスをインキュベータ内に設置し、細胞が接着するまで  $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$  程度で培養した。細胞接着後、設定した流量で灌流培養を開始した。



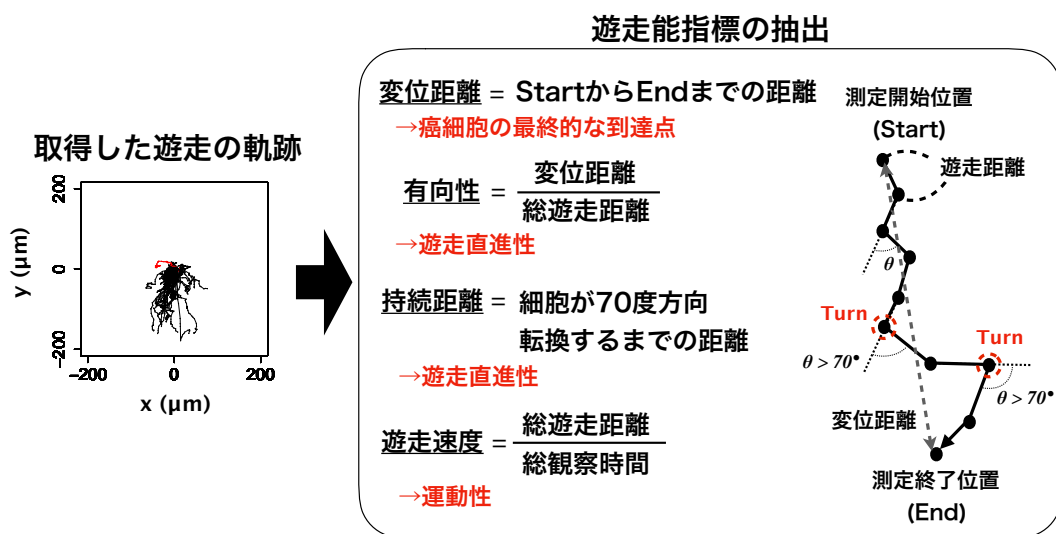


図 3.5: 遊走能指標の算出方法

細胞の遊走能指標導出方法。(左図) 得られた細胞遊走軌跡の例。得られた細胞遊走軌跡を用いて右図の解析を行なった。(右図) 指標導出の方法。右側の図は実験的に得られた細胞の遊走軌跡の概略図。軌跡の各点は画像取得を行なった際の細胞位置を表している。

### 3.2.6 粘度調整によるせん断応力刺激

IMR32 細胞の遊走能変化がせん断応力に依存していることを確認するために、細胞培養液の粘度を調整してから第 3.2.5 小節の実験を行なった (図 3.6)。粘度の調整および測定は以下の手法により行なった。

本研究では、細胞培養液の粘度調整にデキストランを用いた。デキストランは多糖類の一種であり、古くから細胞培養液の粘度調整に用いられてきた [95,96]。150 kDa のデキストラン (D4876, Sigma-Aldrich) の濃度が 0.01, 0.02, 0.05, 0.06, 0.07 g/mL となるように細胞培養液を加え、0.22  $\mu\text{m}$  のフィルター (Millex, Millipore) を用いて滅菌処理を行なった。その後、オストワルド粘度計によって相対粘度を測定した。

粘度測定は次の手順で行なった。まず、オストワルド粘度計と粘度測定を行う細胞培養液を 37°C インキュベータに 30 分間静置した。次に、オストワルド粘度計に細胞培養液を 5 mL 加え、さらに 37°C で 10 分間静置した。その後、電動ピペットを用いて粘度計内の培養液を標線 A の上方まで吸い上げた。そして、培養液が標線 A から標線 B まで流下する時間  $t$  を測定した。本研究では、デキストランを加えていない細胞培養液をコントロールとして用いて以下の式により相対的粘度 ( $\eta/\eta_0$ ) を算出した。

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (3.1)$$

$\eta$  および  $\eta_0$  は各溶液の粘度、 $t$  および  $t_0$  は各溶液における標線 A から B までの流下時間である。デキストラン濃度と相対的粘度の検量線には以下の式を用いた [97]。

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + \alpha_1 x + \alpha_2 x^2 + \alpha_3 x^3 \quad (3.2)$$

$x$  はデキストラン濃度、 $\alpha_{1,2,3}$  はフィッティングによって求まる定数である。

検量線を用いて培養液の粘度を調整した後、粘度調整済み培地を用いて灌流培養を行うことで細胞に対するせん断応力の影響を調べた。また、デキストランが細胞遊走に影響を及ぼしているか確認するために、静置培養系にデキストランを加えて細胞遊走の評価を行なった。

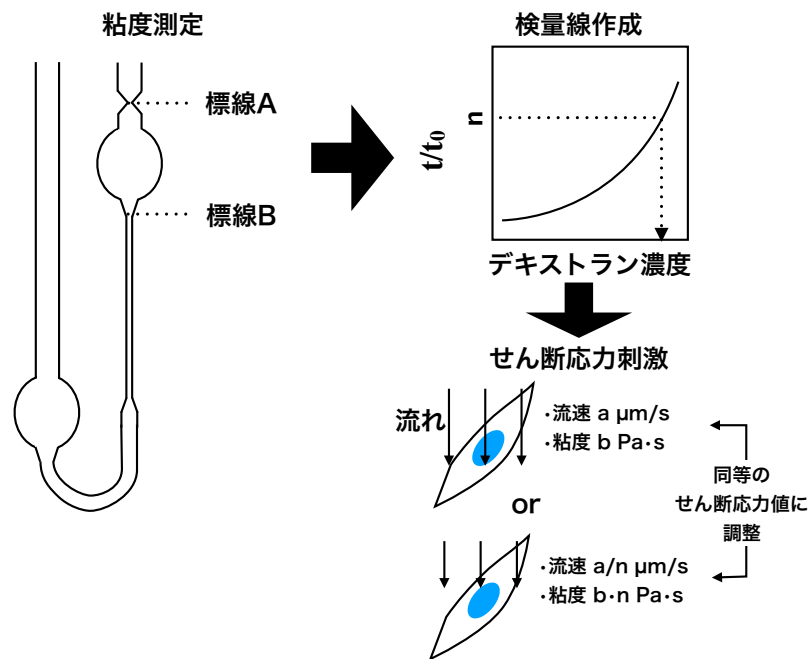


図 3.6: 粘度測定手法

左図: オストワルド粘度計の概略図。標線 A から標線 B までの流下時間を測定した。右上図: 相対的粘度とデキストラン濃度のプロット。相対的粘度はサンプルの流下時間  $t$  とコントロール (通常培地) の流下時間  $t_0$  の比率を求めることで算出した。右下図: 通常培地によるせん断応力刺激と粘度調整済み培地によるせん断応力刺激の各実験条件。各実験におけるせん断応力が同等になるように相対的粘度を調整した。

### 3.2.7 細胞への静圧刺激

先行研究の手法 [98] によって微小流路内で生じている静圧 (第 3.2.3 小節) と同等のスケールの静圧を細胞に与え、遊走能指標にどのような変化が生じるか測定した。本手法では細胞上面にカバーガラスを乗せ、さらに上部に PDMS 片を重しとしてのせることで細胞に静圧を加えた。細胞に与えた静圧は以下の式で導出した。

$$P = (\rho_1 h_1 + \rho_3 h_3 - \rho_2 h_2 - \rho_2 h_3) \frac{S_1}{S_2} g \quad (3.3)$$

$\rho_{1,2,3}$  はそれぞれ PDMS の密度 ( $965 \text{ kg/m}^3$ )、培地の密度 ( $1.01 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ )、カバーガラスの密度 ( $2.2 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ ) である。また、本実験では常に  $(\rho_1 h_1 + \rho_3 h_3) > (\rho_2 h_2 + \rho_2 h_3)$  の関係が成り立っている。g は重力加速度 ( $9.8 \text{ m/s}^2$ ) である。h<sub>1,2,3</sub> はそれぞれ PDMS、培地の高さ、カバーガラスの厚み (m) である。S<sub>1,2</sub> はそれぞれ PDMS 片の底面積 (m<sup>2</sup>) と細胞の合計面積 (m<sup>2</sup>) である。面積比 (S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) は細胞面積/撮像面積から求めた。カバーガラスの厚みは 0.4 mm とした。細胞は 35 mm のガラスベースディッシュに対して  $1 \times 10^5$  cells/dish で播種した。

### 3.2.8 細胞内カルシウムイオン濃度の経時的变化測定

デバイス内に  $2 \times 10^6$  cells/mL の密度で IMR32 細胞を導入し、 $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$  の流量で 6 時間、灌流培養した。灌流培養後、 $10.0 \mu\text{M}$  の Fluo-4 (同仁化学) を含む DMEM を流入口から加え、30 分間静置培養を行うことで Fluo-4 を細胞内に導入した。その後、 $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$  で Fluo-4 を洗い流した。そして、通常培地を  $10.0 \mu\text{L}/\text{min}$  で送液した際の Fluo-4 の輝度値を測定した。撮像条件は露光時間 50 ms、撮影間隔 1000 ms、ビニング  $2 \times 2$ 、レーザー出力 5 mW、倍率 40 倍とした。また、撮影開始時における細胞内の輝度値から背景輝度値を除去した値を 1.0 として、各撮影時間における規格化後輝度値を求めた。

### 3.2.9 siRNA 処理

本研究では神経芽腫細胞内の N-Myc の発現をノックダウンするために、3' 末端にジチミジン (dTdT) のオーバーハングを有する siRNA 配列を用いた。先行研究から、siRNA のセンス鎖の配列は 5'-CGGAGATGCTGCTTGAGAA-3' に決定した [99]。また、ネガティブコントロールとして真核生物の遺伝子配列と相同性を示さない siRNA 配列を用いた。これらの siRNA は日本ジーンより購入を行なった。一過的なトランスフェクションを行う際には、Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) を用いて、15 pmol の siRNA を  $2.0 \times 10^5$  cells に添加した。また、IMR32 細胞に対して効率的なトランスフェクションを行うために reverse transfection method

[100]を採用した。本実験では MCYN-siRNA のノックダウン効果を調べるために4つのグループを用意した。4つのグループとは実験群 (siRNA MYCN)、ネガティブコントロール (siRNA negative control: siRNA N.C.)、mock コントロール、未処理群である。mock コントロールは siRNA 処理を行う際に用いる試薬のみを細胞に加えた群である。siRNA 処理を施した細胞を用いて免疫蛍光染色やデバイス内細胞培養を行なう場合、siRNA を加えてから二日後に実験操作を行なった。この理由は siRNA 処理を行なってから二日後に MYCN mRNA の量が最小になることが報告されているためである [99]。

### 3.2.10 免疫蛍光染色

#### 3.2.10.1 一次抗体および二次抗体

接着斑を可視化するために mouse monoclonal anti- $\beta$ 1 integrin (ab30394, Life Technologies) と rabbit polyclonal anti-FAK pY925 (ab39967, Life Technologies) を用いた。また、N-Myc の発現量を定量化するために mouse monoclonal anti-N-Myc(sc-515099, Santa Cruz) を用いた。anti- $\beta$ 1 integrin と anti-FAK pY925 は 1/250 に希釈した。また anti-N-Myc は 1/100 に希釈した。これらの一次抗体に対して、二次抗体として anti-rabbit-IgG (H+L) conjugated with Alexa Fluor 488 (ab150073, Life Technologies)、anti-mouse-IgG (H+L) Alexa Fluor 568 (ab175472, Life Technologies) を用いた。二次抗体は 1/1000 に希釈した。抗体の希釈には phosphate buffered saline (PBS)(16-23555, 富士フイルム和光純薬) を用いた。

#### 3.2.10.2 $\beta$ 1 integrin および FAK pY925 の免疫蛍光染色

まず、培養した IMR32 細胞を PBS による洗浄を行なってから 4% paraformaldehyde (PFA)(163-20145, 富士フイルム和光純薬) を用いて室温で 15 分間固定した。細胞固定後、PBS で細胞を洗浄し、0.1% Tween-20(9005-64-5, ICN Biomedicals) を含む PBS 溶液によって 5 分間透過処理を行なった。その後、3% bovine serum albumin (BSA) (012-23881, 富士フイルム和光純薬) を含む PBS 溶液によって 30 分間ブロッキングを行なった。そして、上述した希釈率で一次抗体を加え、室温で 1 時間抗原抗体反応を行なった。その後、PBS で洗浄してから二次抗体を加え、室温で 1 時間抗原抗体反応を行なった。1  $\mu$ g/mL の Hoechst 33342(Lonza) を含む PBS 溶液によって細胞核を可視化した。

#### 3.2.10.3 N-Myc の免疫蛍光染色

IMR32 細胞に対して第 3.2.10.2 小々節と同様に固定を行い、1% Triton-X(A16046, Alfa Aesar) を含む PBS 溶液で 1 時間透過処理を行なった [99]。細胞透過処理後、

PBSで細胞を洗浄した後に3% BSAを含むPBS溶液によって30分間ブロッキングを行なった。そして、上述した希釈率で一次抗体を加えてから室温で1時間抗原抗体反応を行なった。その後、二次抗体を加えてから室温で1時間抗原抗体反応を行なった。

### 3.2.11 画像取得および画像解析

N-Mycの免疫蛍光染色画像の取得の際には、共焦点ユニット(CSU22, 横河電気)を組み込んだ倒立型顕微鏡(IX81, オリンパス)とCMOSカメラ(ORCA Flash 4.0, 浜松ホトニクス)を用いて撮影した。接着斑の免疫蛍光染色画像は倒立型顕微鏡(IX71, オリンパス)とCCDカメラ(ORCA R2, 浜松ホトニクス)を用いて撮影した。また、細胞遊走のライブセルイメージングの際には、IX81-CMOSカメラもしくはIX71-CCDカメラの組み合わせで撮影を行なった。遊走能の各指標はライブセルイメージングによって取得した連続画像を用いて算出した。各指標は変位距離(displacement)、有向性(directionality)、持続距離(persistence distance)、遊走速度(migration speed)を用いた[92]。

接着斑の形態的特徴を解析するために $\beta 1$  integrinの免疫蛍光染色画像を利用し、以下の手順で解析を行なった(図3.7)。まず、 $\beta 1$  integrinの免疫蛍光染色画像内のノイズを除去するために、ガウシアンフィルタ(半径:2 pixels)とrolling ball algorithm(半径: 5 pixels, [101])を適用した。ノイズ除去後、判別分析法により画像の二値化を行なった[102]。二値化後、オブジェクトのセグメンテーションを行うために分水嶺法を適用した[103]。さらに、カーネルサイズを3 pixelとして収縮処理を行なった。その後、Fijiの楕円フィッティング機能(Analyze Particles)を利用して接着斑の角度分散、面積、長軸長さ、短軸長さ、真円度(circularity)を求めた。本研究ではノイズの可能性を考慮し、1 [pixel  $\times$  pixel]のオブジェクトは解析の対象から除外した。角度分散(angle variance;  $V$ )は以下の式より定義される[104]。

$$V = 1 - M \quad (3.4)$$

$M$ は合成平均長さ(mean resultant length)であり、以下の式によって定義される。

$$(M \cos \phi, M \sin \phi) = \frac{1}{N_\theta} \left( \sum_k \cos(2\theta_k), \sum_k \sin(2\theta_k) \right) \quad (3.5)$$

$N_\theta$ は角度データのサンプルサイズである。角度データ $\theta_k$ ( $-90^\circ \leq \theta_k \leq 90^\circ$ )は、1細胞から取得した接着斑の長軸角度である。本研究では流れ方向の角度を $0^\circ$ と定義した。また、真円度(circularity)は以下の式によって定義される。

$$circularity = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (3.6)$$

$A$ は接着斑の面積、 $P$ は周囲長を示している。上式からわかるように、真円度の値が小さくなるにつれて細長い楕円を意味し、値が1のときは真円を意味する。本研究では真円度の値が1の接着斑は解析対象から除外した。この理由は、真円度の値が1の場合、接着斑の形状は真円であるため長軸角度が求められないためである。

次に、高せん断応力を与えた際の接着斑の空間的分布を調べた。まず、核をHoechst 33342によって可視化し、判別分析法による二値化と楕円フィッティングを行うことで短軸を求めた。そして、核の短軸よりも上流側に位置する接着斑の合計面積( $A_{Up}$ )と下流側に位置する接着斑( $A_{Down}$ )の合計面積を測定した。最後に、接着斑が上流側か下流側のどちらに局在しやすいか確認するために以下の式を用いて定量化した。

$$Polarization = \frac{A_{Down} - A_{Up}}{A_{Down} + A_{Up}} \quad (3.7)$$

N-Myc タンパク質の発現量を定量化する際には、N-Myc タンパク質の免疫蛍光染色画像と位相差画像を用いた。まず、位相差画像内に存在するIMR32細胞をROIとした。そして、免疫蛍光染色画像におけるROI内の輝度値を測定した。さらに、細胞周辺領域における輝度値を背景輝度値として蛍光輝度値から減算した。

### 3.2.12 遊走能および形態的特徴比較における統計解析

得られたデータに対して分布の正規性を確認するためにKolmogorov-Smirnov検定を行なった。多重比較を行う際にはBonferroni補正を行なった。また、複数の実験群と一つの対照群を比較する際には、Dunnett検定を用いた[105]。本研究では有意水準を0.05と設定し、全ての実験を3回以上行なった。

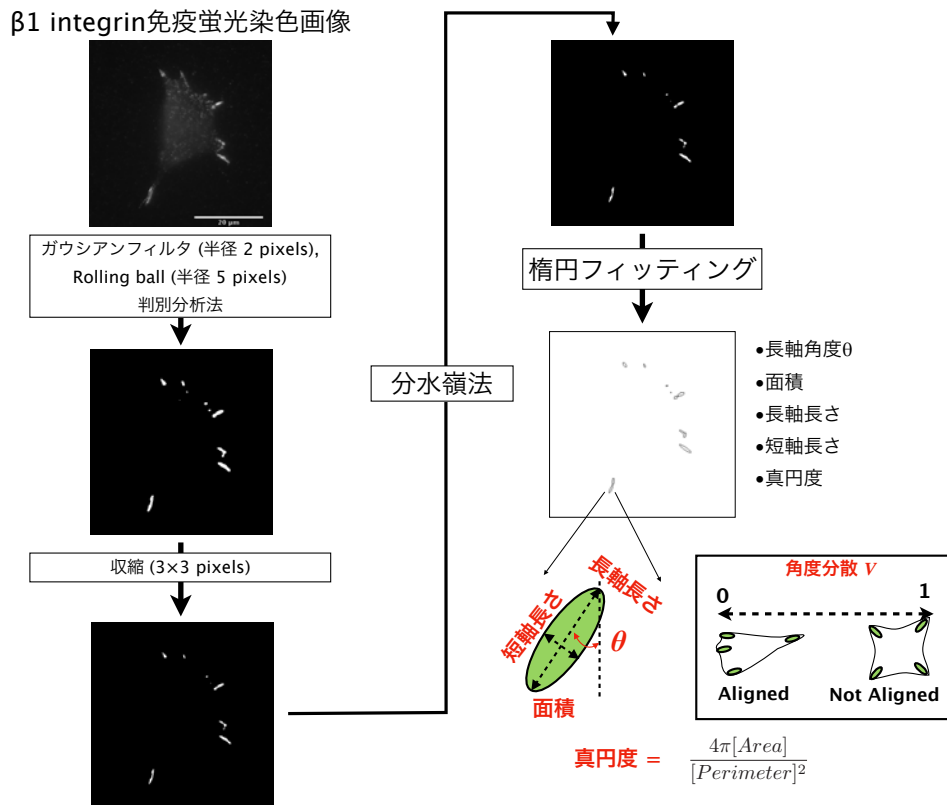


図 3.7: 接着斑の形態的特徴の取得方法

$\beta 1$  integrin 画像を用いた接着斑の形態的特徴の取得方法。画像に対して背景除去 (ガウシアンフィルタ、Rolling ball) を行なった後に、画像を二値化 (判別分析法) した。そして、二値化画像に対して収縮と分水嶺法を適用し、領域分割を行なった。最後に、得られた画像に対して楕円フィッティングを行い、各形態的特徴量を取得した。角度分散は得られた長軸角度を用いて算出した。



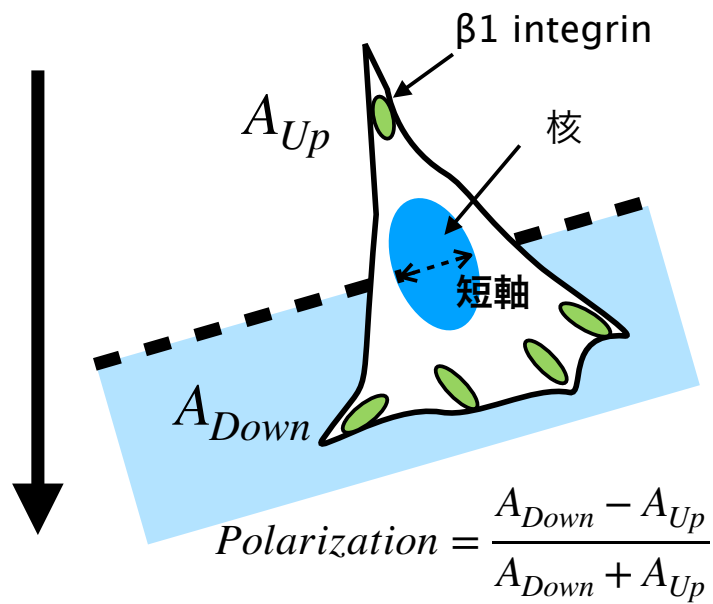


図 3.8: 接着斑の空間的分布の定量化

核を染色した画像に対して判別分析法による二値化と楕円フィッティングを行うことで核の短軸を求めた。そして、短軸よりも上流側に位置する  $\beta 1$  integrin の合計面積 ( $A_{Up}$ ) と下流側に位置する合計面積 ( $A_{Down}$ , 青色領域内) を測定した。最後に、接着斑が上流側か下流側のどちらに局在しやすいか確認するために図中の式を用いて定量化した。黒矢印は流れの方向を表している。

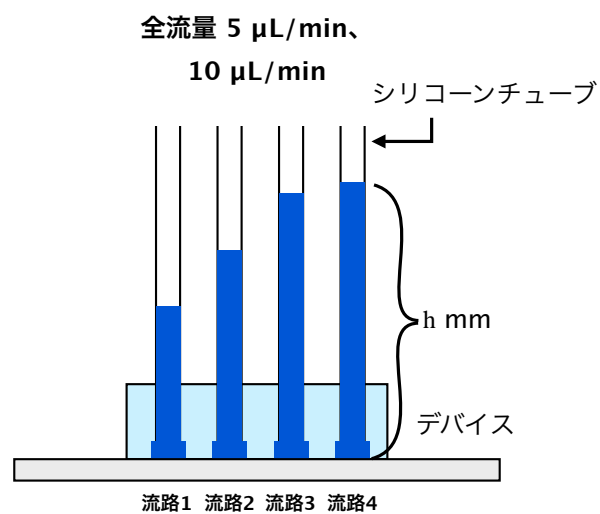


図 3.9: 流路内静圧測定手法

微小流路の上面を穿孔してシリコンチューブを接続した。そして、流路底面に対して垂直になるようにシリコンチューブを設置した。マイクロシリンジポンプを用いて 0.1% Triton-X を含んだ精製水を送液し、チューブ内の水柱高さを測定した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 マイクロ流体デバイスの評価

作成したモールドの測定結果は表 3.5 のようになった。そして、流路寸法の測定を行なったモールドを用いてマイクロ流体デバイスを作製し、細胞培養時と同様の実験条件で蛍光ビーズを流した。得られた蛍光画像から PIV を用いて各流路における流速を測定することでせん断応力を算出した (図 3.10A)。計算結果から、一つのデバイス内で対数スケールで異なるせん断応力を実現できていることを確認した。また、各流路内における静圧は図 3.10B のような結果となった。静圧の確認実験より流速の遅い流路内では他の流路に比べて静圧が高くなることを確認した。

表 3.5: モールドの測定結果

流路	幅 ( $\mu\text{m}$ )	高さ ( $\mu\text{m}$ )	流路長さ (mm)
$R_{ch}$	$991 \pm 8.7$	$38 \pm 2.0$	4.00
$R_1$	$495 \pm 8.1$	$37 \pm 1.2$	2.00
$R_2$	$138 \pm 1.7$	$37 \pm 0.6$	10.54
$R_3$	$184 \pm 1.0$	$13 \pm 1.7$	11.22
$R_4$	$233 \pm 5.3$	$8.7 \pm 1.5$	18.33

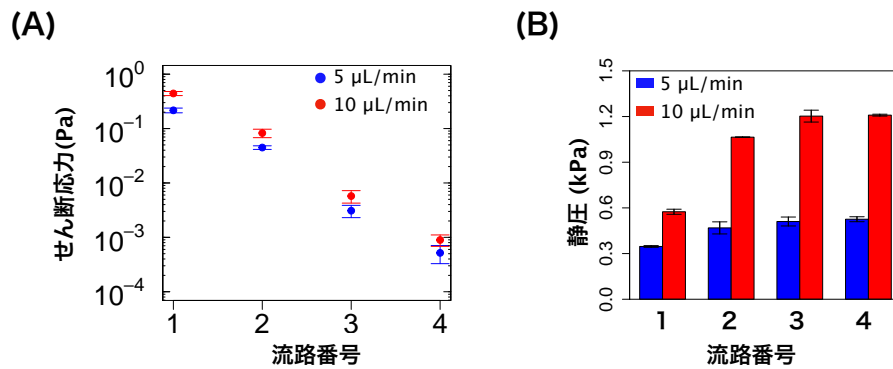


図 3.10: 各流路内におけるせん断応力および静圧

(A) 各流路で取得したマイクロビーズの連続画像に対してPIVによって流速を測定し、せん断応力値を求めた結果。せん断応力は対数スケールで異なることが明らかとなった。(B) 各流路内における静圧。エラーバーは標準偏差を示している。

### 3.3.2 せん断応力を与えた際のIMR32細胞の遊走変化

#### 3.3.2.1 流量によるせん断応力の調整と細胞遊走への影響

作製したマイクロ流体デバイスを用いてせん断応力がIMR32の遊走到に影響を及ぼすか測定した。流量は0.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  に設定した。IMR32細胞に対して高いせん断応力を与えると仮足が下流側に伸びていた(図3.11A)。一方で、送液を行っていない静置培養条件(0 Pa)では、仮足がランダムに生じていた(図3.11A)。細胞遊走の方向は仮足の伸展によって制御されていることが報告されている[106]。したがってこれらの結果は、せん断応力がIMR32細胞の下流側への仮足形成を促進していることを示唆した。次に、各流路内における60細胞の軌跡を測定し、遊走方向や遊走距離について定性的に評価した。軌跡について評価した結果、せん断応力に応じて細胞が下流側に遊走することや遠くの位置まで遊走することが確認された(図3.11B)。遊走方向について定量的な評価を行うために下流に遊走した細胞数を計数し二項検定を行なったところ、0.2 Pa以上のせん断応力を与えるとIMR32細胞はランダム方向に遊走していないことが明らかとなった( $P < 0.001$ , 図3.11C)。一方で、0.08 Pa以下のせん断応力では、細胞はランダムに遊走していた(図3.11C)。以上の結果は、高いせん断応力によってIMR32細胞の下流側に仮足が形成されることで、細胞が下流側に遊走していることを示唆した。

続いて、せん断応力を与えたときの遊走能について詳細な解析を行なった。まず、遊走能の指標として変位距離、有向性、持続距離、遊走速度を求めた。各遊走能指標の導出方法は第3.2.11小節に示した。各遊走能指標を求めた結果、せん断応力に応じて全ての指標が増大することを確認した(図3.12)。遊走指標の一つである持続距離は、0.04 Paから静置培養に比べて有意な増大を示した。また、0.4 Paのせん断応力を与えると全ての遊走能指標で有意な増大が観測され、静置培養時に比べて1.37 ~ 3.23倍増加していた(変位距離: 3.23倍、有向性: 2.15倍、持続距離: 1.89倍、遊走速度: 1.37倍、adjusted  $P < 0.05$ )。以上の結果より、 $10^{-2}$  ~  $10^{-1}$  Paのせん断応力を与えるとIMR32細胞の遊走能が変化し始めることを明らかにした。さらに流量を増やすことでせん断応力を0.8 Paまで上昇させたところ、0.08 ~ 0.8 Paでは各遊走能指標がせん断応力の大きさに応じて上昇することが明らかとなった(図3.13A - D)。また、0.08 ~ 0.8 Paのせん断応力では細胞形状に大きな変化は見られなかった(図3.13E)。しかし、1.2 Pa以上のせん断応力をIMR32細胞に与えると細胞の形状は球状となった(図3.13E)。さらに、1.2 Paのせん断応力下では多くのIMR32細胞が培養基板から剥離した。以上の結果より、0.8 Pa以下のせん断応力ではIMR32細胞の遊走能が変化することを確認した。

癌細胞では細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に伴い、遊走能が向上することが知られている[107]。せん断応力は細胞膜上の力学的センサを活性化させることで細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすことが知られている[30, 108]。そこで、0.4 Paのせん断応力を与えた時の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定した。実験の結果、0.4 Paのせん断応力刺激後に細胞内における輝度値の上

昇が確認された (図 3.14)

せん断応力の値が低い流路では、他の流路に比べて静圧が高くなることが図 3.10B から明らかとなっている。そこで、静圧のみを細胞に与えた際の遊走能を測定すると図 3.15 のような結果となった。結果から分かるように  $10^2 \sim 10^3$  Pa 程度の静圧を与えると、有向性の上昇や変位距離、持続距離、遊走速度の低下が観察された (図 3.15)。また、静圧の高さに応じて遊走能変化が生じることが定性的に観察された。

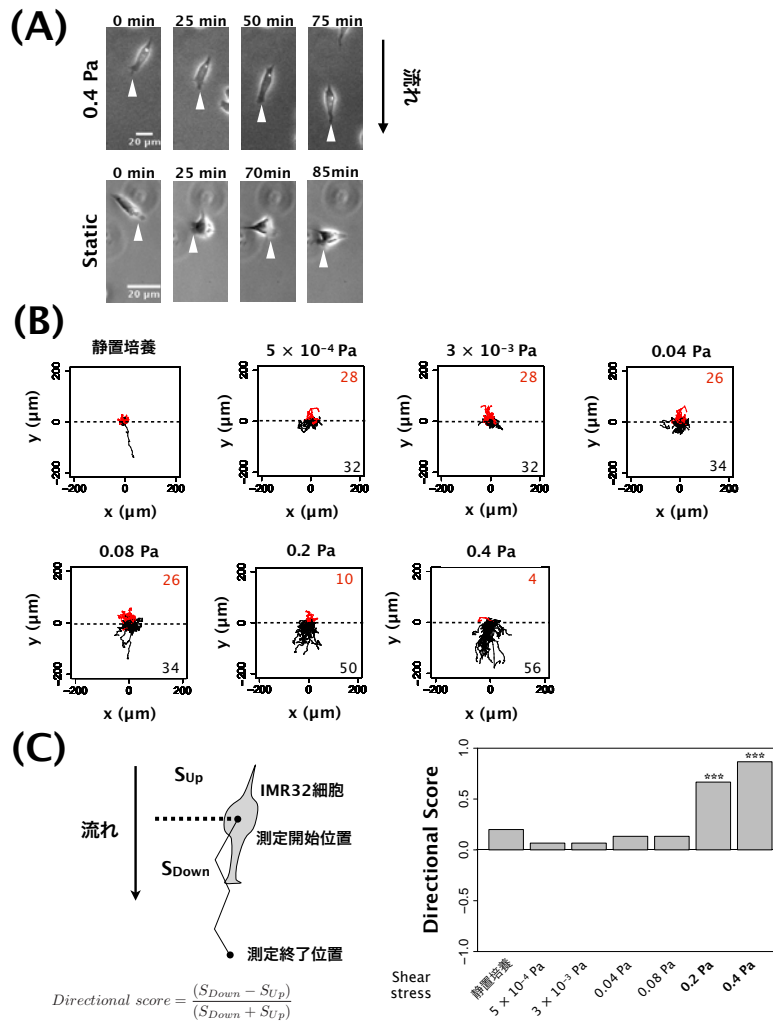


図 3.11: 各せん断応力を与えた際の細胞遊走の軌跡

(A) 細胞遊走中の位相差画像。上段はせん断応力を与えた際の IMR32 細胞の遊走を撮影している。下段は通常培地の送液を行なっていない時の IMR32 細胞の遊走を撮影している。白矢印は細胞から伸展している仮足を指し示している。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を表している。(B) 各せん断応力条件における細胞遊走の軌跡。プロット上側が上流側、プロット下側が下流側となっている。赤色の軌跡および数字は、遊走の最終到達位置が初期位置よりも上流側である細胞の軌跡および細胞数を表している。黒色の軌跡および数字は、遊走の最終到達位置が初期位置よりも下流側である細胞の軌跡および細胞数を表している。(C) 各せん断応力における遊走方向の割合について。測定開始位置よりも上流側に遊走した細胞数  $S_{Up}$  と下流側に遊走した細胞数  $S_{Down}$  を計数し、Directional score を算出した。右図は各せん断応力における Directional score を示している。遊走方向に偏りが生じているか検出するために二項検定を行なった。\*\*\*;  $P < 0.001$ 。



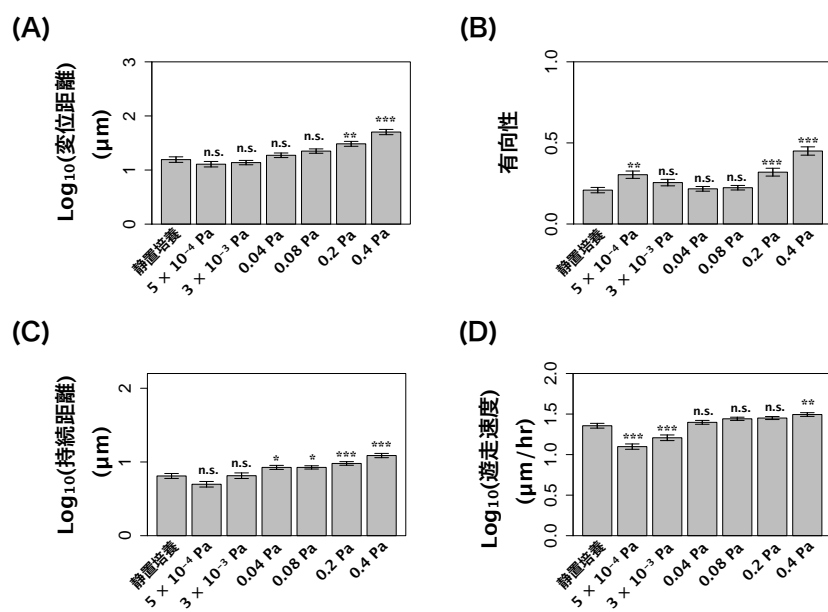


図 3.12: 各せん断応力を与えた際の遊走能指標の変化

せん断応力を与えた際の各遊走能指標の変化。横軸はせん断応力を表している。せん断応力を与えた際の遊走指標と静置培養条件下で得られた遊走指標を Dunnet's 検定によって多重比較した。\*; adjusted-P < 0.05, \*\*; adjusted-P < 0.01, \*\*\*; adjusted-P < 0.001。

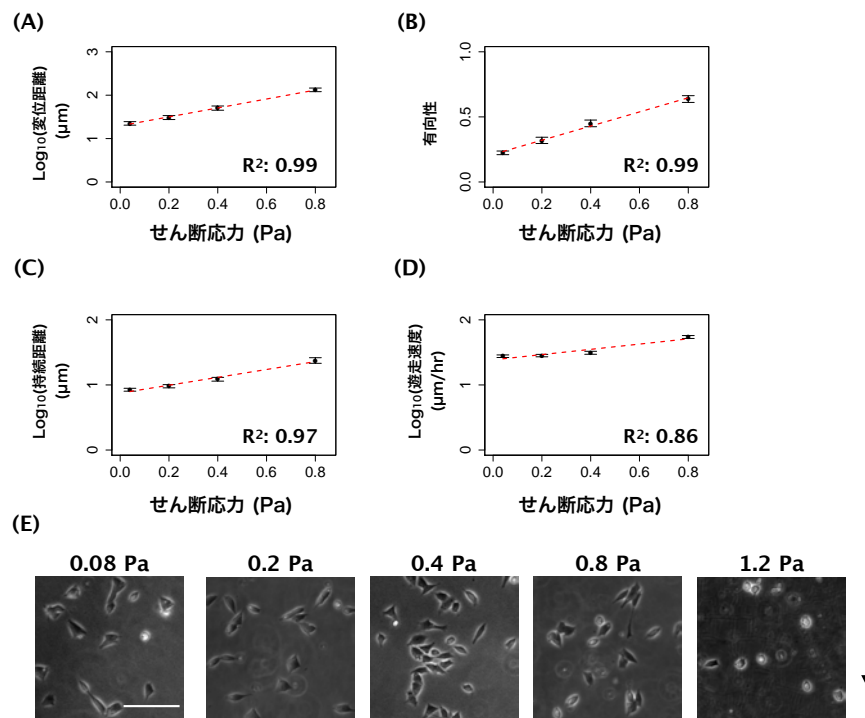


図 3.13: 高せん断応力下における遊走能指標の変化

0.08 ~ 0.8 Pa のせん断応力を与えた際の (A) 変位距離、(B) 有向性、(C) 持続距離、(D) 遊走速度。赤破線は各遊走指標の平均値に対して線形フィッティングを行なった結果。グラフ内の数字は決定係数  $R^2$ 。(E) 各せん断応力における位相差画像。画像上側が上流。Scale bar = 100 μm。

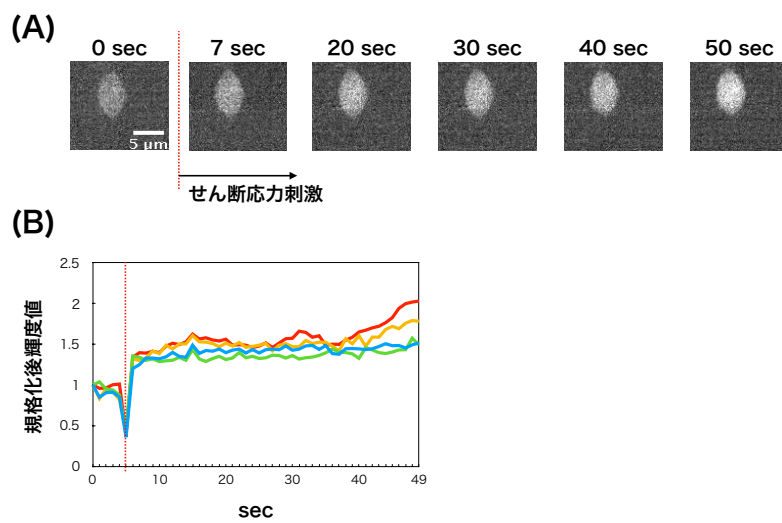


図 3.14: 高せん断応力を与えた際の細胞内カルシウムイオン濃度の変化

(A) せん断応力を与えた際の Fluo-4 の経時的輝度値変化。撮影開始時間を 0 sec として、5 sec のときに 0.4 Pa のせん断応力刺激を開始した。(B) 規格化後輝度値の経時的変化。各系列は細胞の違いを表している。5 sec では、シリンジポンプを駆動した際に焦点ズレが生じたため輝度値の急激な減少が観察された。その後、各細胞内における輝度値の上昇が観察された。

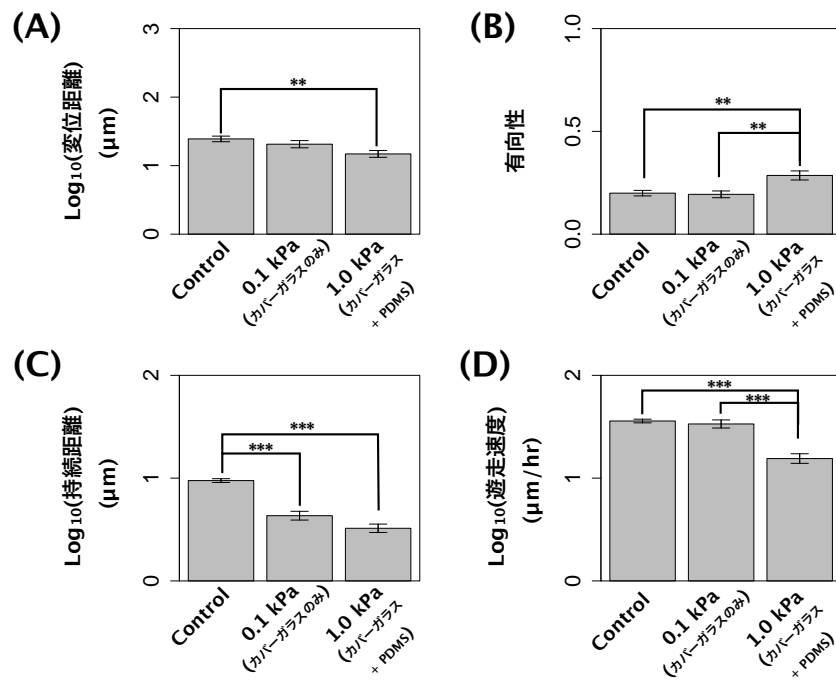


図 3.15: 静圧による遊走能指標への影響

静圧負荷時における (A) 変位距離、(B) 有向性、(C) 持続距離、(D) 遊走速度。Welch の t 検定を用いて多重比較を行い、その後 Bonferroni 補正を行なった。\*\*, adjusted-P < 0.01、\*\*\*; adjusted-P < 0.001。

### 3.3.2.2 粘度によるせん断応力の調整と遊走能への影響

本研究では、流量以外にも粘度によるせん断応力の調節を行うことでせん断応力によって遊走能に変化が生じるか測定を行なった。

培養液内のデキストラン濃度を調整したところ相対的粘度は図 3.16A のように変化した。本実験ではデキストラン含有培地 (0.0624 g/mL) を送液し、流路 2 における遊走能を測定した。流路 2 におけるせん断応力は、通常培地を灌流させた際の流路 1 と同等のせん断応力 (0.4 Pa) を実現できるように調節した。せん断応力によって遊走能が変化している場合、デキストラン含有培地を灌流した流路 2 における遊走能は、通常培地を灌流した流路 1 と同等になることが推測される。

デキストラン含有培地の灌流を行なった流路 2 における遊走能は、通常培地を灌流させた流路 1 の結果と同等となった (図 3.16B - E)。また、デキストランが IMR32 細胞の遊走能に影響を与えているか調べるために、静置培養条件下でデキストラン含有培地と通常培地を用いて細胞培養を行ない、遊走能の比較を行なった (図 3.17A)。その結果、変位距離、持続距離、遊走速度に有意な変化は観察されなかった (図 3.17B, D, E)。一方で、デキストランを加えた場合、有向性に約 0.1 の有意な差 ( $P < 0.001$ ) が検出された (図 3.17)。この影響は流路内でせん断応力を与えた際にも生じていると考えられる。図 3.16C の結果では、デキストラン含有培地を灌流した際の流路 2 における有向性は、通常培地を灌流した際の流路 1 における有向性よりも約 0.1 ほど大きな値となった。この差はデキストランによる有向性に与える影響の大きさと一致する。したがって、デキストランを加えたことによる遊走能への影響は、せん断応力を与えた際にも生じていると考えられる。

本実験では、培養液の粘度調節を行うことで細胞に対して任意のせん断応力刺激を与えた。その結果、せん断応力による遊走能の向上が観測された。粘度調整によるせん断応力の制御は、流量調整に比べて物質の運搬に影響を及ぼしにくいことを第 1.3.2.4 小々節にて説明した。したがって物質の運搬ではなく、せん断応力が IMR32 細胞の有向性、持続距離、遊走速度を促進していると結論づけた。

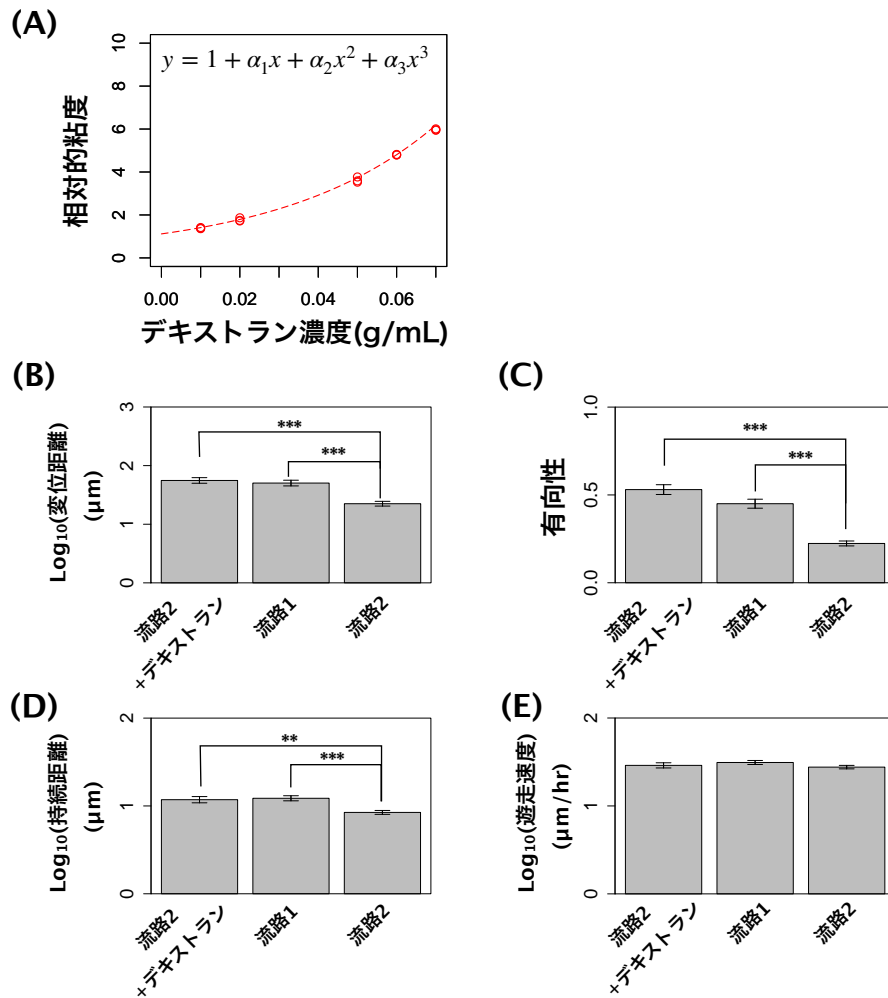


図 3.16: 粘度によるせん断応力の調整および遊走能の変化

(A) デキストランを通常培地に添加した際の相対的粘度の変化。非線形フィッティングの結果、 $\alpha_1 = 36.21$ 、 $\alpha_2 = -22.65$ 、 $\alpha_3 = 7521$  と求めた。デキストランによって粘度調整を行なった培地を用いてせん断応力刺激を与え、(B) 変位距離、(C) 有向性、(D) 持続距離、(E) 遊走速度を測定した。デキストラン含有培地と通常培地の流量は  $10.0 \mu\text{L}/\text{min}$  とした。‘流路1’および‘流路2’では、それぞれ  $0.4 \text{ Pa}$  と  $0.08 \text{ Pa}$  のせん断応力が生じている。比較のために Welch の t 検定を行なった後に Bonferroni 補正を行なった。\*\*; adjusted-P < 0.01、\*\*\*; adjusted-P < 0.005。

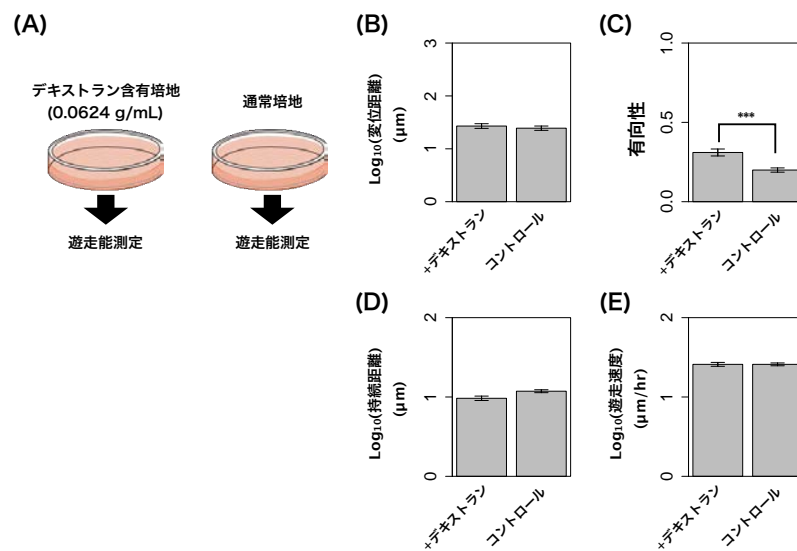


図 3.17: デキストラン添加による遊走能への影響

(A) デキストラン含有培地と通常培地を用いてガラスベースディッシュ内で遊走能の測定を行なった。(B) 変位距離、(C) 有向性、(D) 持続距離、(E) 遊走速度の比較。比較のために Welch の t 検定を行なった。\*\*\*;  $P < 0.005$ 。

### 3.3.3 せん断応力を与えた際の接着斑の形態的变化

細胞遊走における有向性、持続距離、遊走速度は接着斑の形状、面積、長軸の角度分散の影響を受けていることが報告されている [90–92]。そこで、せん断応力を与えた際における接着斑の形態的特徴 (表 3.2) を測定した。本研究では、接着斑の可視化のために  $\beta 1$  integrin に対して免疫蛍光染色を行なった。 $\beta 1$  integrin によって可視化された接着斑は、FAK pY925 と共局在していることを確認した (図 3.18A)。FAK pY925 は接着斑のターンオーバーを促すことで突起伸長を促進していることが知られている [109]。したがって、本研究では  $\beta 1$  integrin によって可視化された接着斑は、細胞遊走の制御を行う機能を有した接着斑であると結論づけた。形態的变化に関する解析の結果、角度分散および真円度はせん断応力に応じて減少しており、面積および長軸長さはせん断応力に応じて増加していることを明らかにした (図 3.18B–D, F)。しかし短軸長さに関しては、せん断応力に応じた変化が観測されなかった (図 3.18E)。本実験から得られたせん断応力による接着斑の形態的变化 (図 3.18) と遊走能変化 (図 3.12) の関係性は、先行研究によって報告された表 3.2 と一致した。

さらに、細胞に対して 0.4 Pa のせん断応力を与えると  $\beta 1$  integrin は下流側に局在しやすいことが明らかとなった (図 3.19)。したがって、下流側に細胞が遊走する原因として、接着斑の異方的な分布が原因であることが示唆された。

以上の結果より、せん断応力に応じた遊走変化は接着斑の形態や分布の変化によって生じていることを示唆した。また、せん断応力に応じて接着斑の形態的特徴を変化させる何かしらの制御機構が IMR32 細胞には備わっていることが推測された。



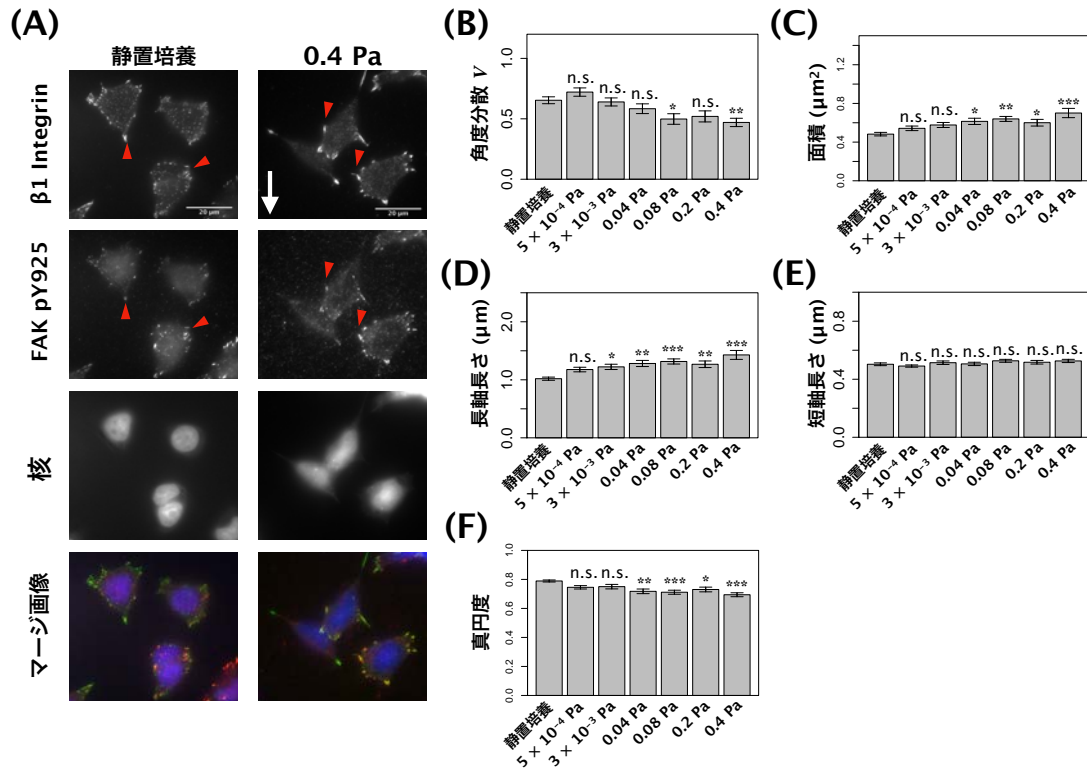


図 3.18: 各せん断応力を与えた際における接着斑の形態的特徴変化

(A)  $\beta 1$  integrin および FAK の多重免疫蛍光染色画像。白矢印は流れの向きを表している。赤三角は共局在している  $\beta 1$  integrin と FAK を指し示している。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$  を表している。(B-F) せん断応力を与えた際の接着斑の各形態的指標変化。横軸はせん断応力を表している。せん断応力を与えた際の遊走指標と静置培養条件下で得られた遊走指標を Dunnet's 検定によって多重比較した。\*; adjusted-P < 0.05, \*\*; adjusted-P < 0.01, \*\*\*; adjusted-P < 0.001。

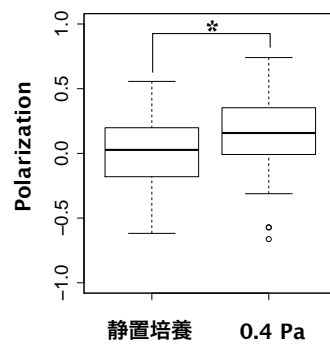


図 3.19: せん断応力を与えた際の  $\beta 1$  integrin の空間的分布の偏り

0.4 Pa のせん断応力を与えると静置培養に比べて  $\beta 1$  integrin が下流側に多く局在した。スコアの比較は Welch の t 検定によって行なった。\*;  $P < 0.05$ 。

### 3.3.4 MYCN-siRNA 処理時における接着斑の形態的特徴変化

先行研究によって MYCN 遺伝子の増幅が神経芽腫細胞の遊走能の上昇に関わっていることが報告されている (第 3.1 節参照)。このようなことから本研究では、N-Myc タンパク質の発現量を減少させた時の遊走能および接着斑の形態的变化を測定した。

まず、siRNA 処理を施した際の N-Myc タンパク質の発現量を測定したところタンパク質の有意な減少を確認した (図 3.20A, B)。次に、siRNA MYCN 処理を行なった IMR32 細胞にせん断応力を与えた結果、0.4 Pa のせん断応力を与えると細胞形状が等方的になった。一方で siRNA N.C. 処理を行なった場合、細胞形状は異方的となった (図 3.20C)。このような結果から、細胞と細胞外マトリクスをつなぎ止める役割を担う接着斑に変化が生じていることが予測された。そこで、siRNA MYCN 処理を施した際における接着斑の形態的特徴を調べた。その結果、siRNA MYCN 処理によってせん断応力に応じた角度分散の減少が阻害されていることが明らかとなった (図 3.20E)。角度分散が大きくなるという結果は接着斑の長軸方向にばらつきが生じていることを意味しており、siRNA MYCN 処理を行なった際の等方的な細胞形状への変化 (図 3.20C) と一致する結果となった。また短軸長さは僅かに有意な変化が見られた (図 3.20H)。一方で接着斑の面積、長軸長さ、真円度は siRNA MYCN 処理を行なっても有意な変化は見られなかった (図 3.20F, G, I)。続いて siRNA MYCN 処理を施した際の遊走能変化を測定した。siRNA MYCN 処理を行なった場合、0.4 Pa のせん断応力を与えた際に全ての遊走能指標で対照群 (siRNA N.C.) に比べて有意な減少を検出した (図 3.20J - M)。以上の結果より、N-Myc タンパク質の発現が  $10^{-1}$  Pa のせん断応力下における遊走能変化に影響を与えていることを明らかにした。

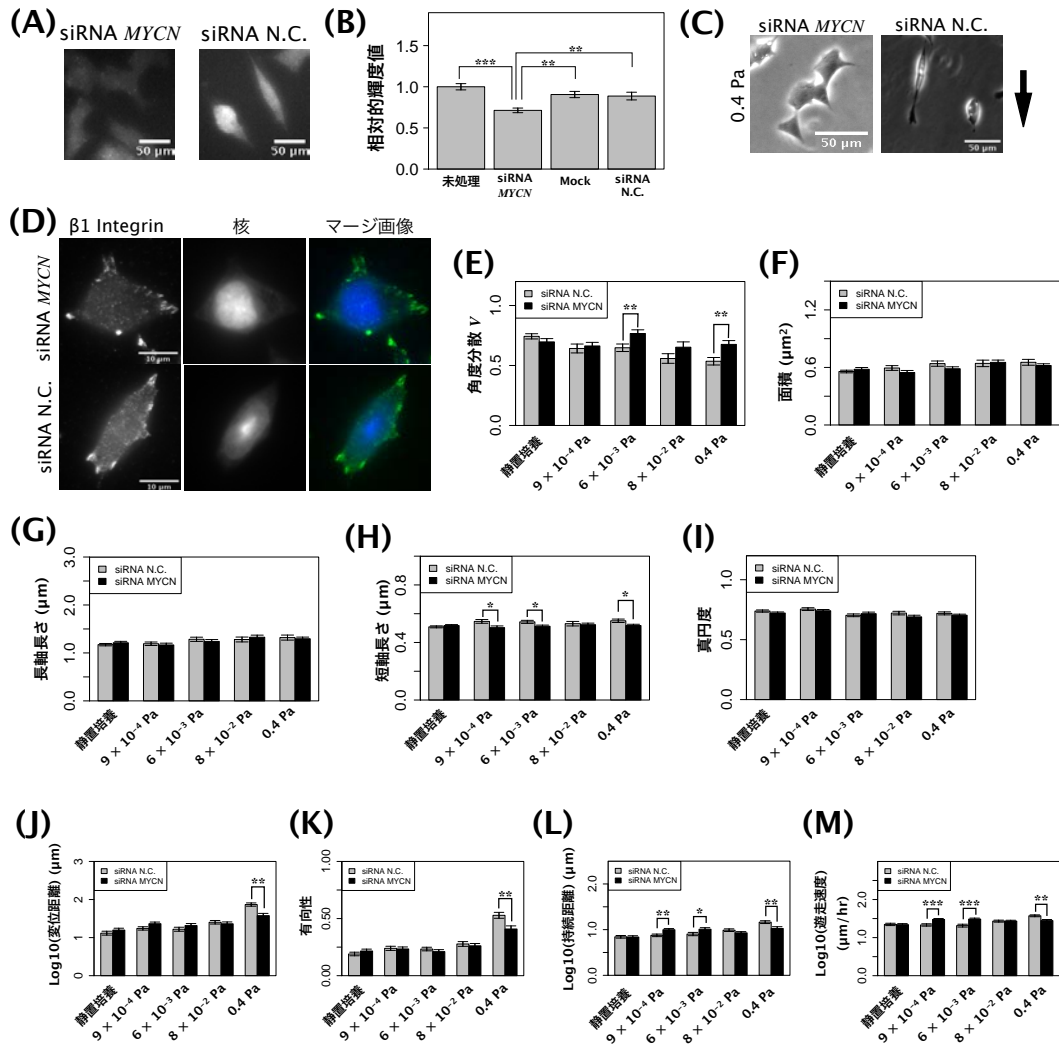


図 3.20: MYCN siRNA 処理後における各せん断応力による接着斑形態的特徴および遊走能変化

(A) siRNA 処理を行なった際の anti-N-myc を用いた免疫蛍光染色画像。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表している。(B) 免疫染色画像における輝度値の比較。Welch の t 検定を用いて多重比較を行なった後に Bonferroni 補正を行なった。\*; adjusted-P < 0.01、\*\*\*; adjusted-P < 0.001。(C) siRNA 処理を行なった細胞に対してせん断応力を与えた際の位相差画像。黒矢印は流れの方向を示している。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表している。(D) siRNA 処理を行なった細胞に対してせん断応力を与えた際の  $\beta 1$  integrin 免疫蛍光染色画像。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を表している。(E - F) せん断応力を与えた際の各形態的指標変化。横軸はせん断応力を表している。siRNA N.C. 処理条件と siRNA MYCN 処理条件における形態的指標の比較を行うために、Welch の t 検定を行なった。(J - M) せん断応力を与えた際の各遊走指標変化。横軸はせん断応力を表している。siRNA N.C. 処理条件と siRNA MYCN 処理条件における形態的指標の比較を行うために、Welch の t 検定を行なった。\*; P < 0.05、\*\*; P < 0.01、\*\*\*; P < 0.005。

### 3.4 考察

本研究では、 $10^{-1}$  Pa のせん断応力が IMR32 の遊走能に影響を及ぼすことを明らかにした。生体内の正常組織における間質流の流速は  $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m/s}$  の範囲であり、組織内の細胞には平均して  $10^{-2}$  Pa 程度のせん断応力が生じていると考えられている [110]。しかし、腫瘍の進行に伴う腫瘍内の圧力増加と異常な血管新生によって、血管から漏れ出る液体が増大する (図 3.2)。このような原因によって間質流が増大することで、生体内の癌細胞には  $10^{-1}$  Pa 程度のせん断応力が生じている可能性はある。

神経芽腫細胞 IMR32 に対してせん断応力を与えると、接着斑の長軸における角度分散は減少し、有向性や遊走速度が向上した。この原因について考察を行う。Integrins がせん断応力によって活性化されることで、アクチンフィラメントが流れの方向に沿うことが報告されている [18]。また、接着斑の長軸は結合しているアクチンフィラメントの方向に沿うことが報告されている [111]。したがって本研究では、せん断応力によって  $\beta 1$  integrin とアクチンフィラメントの間に力学的な相互作用が生じることで接着斑の長軸が揃ったと考えられる。さらに、接着斑の長軸が同一方向に揃うと、乳癌細胞 MDA-MB-231 の有向性が向上することや筋芽細胞 C2C12 の遊走速度が向上することが報告されている [90,91]。ゆえに本研究では、せん断応力が接着斑の長軸方向を同一方向に揃わせることで遊走能を向上させたと推測される。この推測は siRNA MYCN 処理後のせん断応力刺激実験からも支持される。SiRNA MYCN を IMR32 細胞に導入すると高いせん断応力を与えても接着斑の長軸は等方的に分布し、遊走能についても siRNA N.C. に比べて減少した (図 3.20D, E)。したがって、接着斑の長軸が同一方向に揃うことにより遊走能が向上したと考えられる。

本研究では、siRNA MYCN を加えると高せん断応力下においても等方的な接着斑が維持された。この原因として (1) integrins の発現量上昇、(2) メカノセンサタンパク質の減少による接着力の向上が考えられる。N-Myc タンパク質は  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\beta 1$  integrin サブユニットの発現を抑制していることが知られている [80,112]。したがって、siRNA MYCN 処理を行うことで integrins サブユニットの発現量が上昇し、接着力が向上したことによって高せん断応力下でも接着斑の等方性が維持されたと考えられる。また、細胞の接着力は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって減少すると考えられている。接着力減少の作用機序として、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することで cation/calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II (CaMKII) が integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 $\alpha$  (ICAP-1 $\alpha$ ) を活性化し、活性化した ICAP-1 $\alpha$  が  $\beta 1$  integrin を不活性化することで生じると考えられる [113]。癌細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させるメカノセンサとして transient receptor potential cation channel (TRP channel) subfamily M, member 7 (TRPM7)、TRP channel subfamily V, member 4 (TRPV4)、P2X7 が知られている [30,108]。神経芽腫細胞では N-Myc タンパク質がメカノセンサで

ある TRPM7 の発現を促進していることが報告されている [114,115]。また TRPM7 は、せん断応力依存的に細胞膜上に集積することが確認されている [116]。ゆえに、siRNA MYCN によって TRPM7 の量が減少し、高せん断応力を与えた際に十分な TRPM7 が細胞膜上に集積できなかったことによってカルシウムイオンの取り込み量が減少したと考えられる。そして、細胞の接着力が維持されたことによって接着斑の等方的な分布が維持されたと推測される。

IMR32 細胞に対してせん断応力を与えると、より多くの  $\beta 1$  integrin が細胞の下流側に局在した (図 3.19)。先行研究ではせん断応力が細胞を変形させることで、上流側の細胞-細胞外マトリクス間の接着が部分的に剥離することが確認されている [117]。したがって、IMR32 細胞に対してせん断応力を与えた際に  $\beta 1$  integrin が下流側に多く局在した原因は、上流側の接着斑が細胞外マトリクスから剥離し、崩壊したことによるためだと考えられる。

続いて、流れが細胞遊走に対して及ぼす影響について考察を行う。流れが細胞に及ぼす影響として (1) せん断応力、(2) 流れ方向の圧力、(3) 物質の供給、(4) 静圧が挙げられる。このように細胞に対して流れを与えると複数の要素が影響を及ぼす可能性が存在する。まず、本研究における流れ方向の圧力の影響について考察する。微小流路内における流れ方向の圧力が細胞に与える力は、レイノルズ数に比例することが知られている [36]。先行研究では、レイノルズ数が  $Re \approx 35$  の場合、細胞に対して与える力は流れ方向の圧力に比べてせん断応力が支配的であることが示されている [36]。本研究のレイノルズ数は 1 よりも十分小さいことを考慮すると、流れ方向の圧力による影響はほとんど無視できると考えられる。また、流れによる物質供給の影響も少ないと考えられる。この理由は、せん断応力を培養液の粘度によって調節した際の細胞遊走能が、流量によるせん断応力を調節した際の細胞遊走能と比較して有意な変化が見られなかったためである (図 3.16)。最後に、静圧の影響について考察を行う。本研究では、静圧は遊走能に影響を与えることが示された (図 3.15 参照)。しかし、少なくとも流路 1 で観察された遊走能の変化はせん断応力によるものであると考えられる。この理由として、流路 1 は他の流路に比べて静圧が低いことが挙げられる。以上の考察より、せん断応力は二次元培養を行なった IMR32 細胞の遊走能を変化させていると考えられる。

本研究では、せん断応力によって接着斑と遊走能が変化することを確認した。遊走能の変化が生じる原因として接着斑の形態的な変化が考えられる (表 3.2)。さらに、MYCN-siRNA によるノックダウン実験によって接着斑の形態および遊走能に変化が生じた。以上の結果より、せん断応力と遊走能に関わる各因子間には図 3.21 のような制御関係が成り立っていると考えられる。

以上の結果や考察から、生体内における MYCN 遺伝子増幅型の神経芽腫細胞は、流れによるせん断応力刺激を受けることで遊走能が向上しつつ細静脈やリンパ管方向へ遊走していることを示唆した。

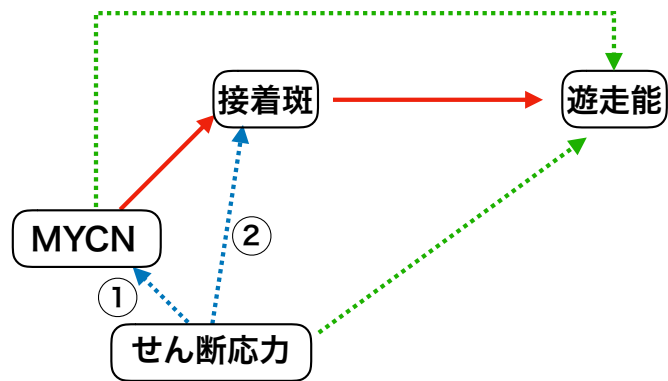


図 3.21: せん断応力によって惹起されるシグナル伝達の予測図

赤線: 本研究の実験によって明らかになった制御関係。青線: 本研究によって少なくともどちらかの一つが成り立っていることが示唆された制御関係。緑線: 本研究では、存在の有無が明らかとされなかったため今後の実験的検証を必要とする制御関係。

## 第4章 結論

### 4.1 結言

本研究では、細胞周辺の微小環境が細胞の異方性決定に与える影響について明らかにすることを目的とした。そして、マイクロ流体デバイスを用いることで液性因子濃度勾配とせん断応力が細胞分裂方向や細胞遊走に影響を与えることを定量的に明らかにした。

### 4.2 Wnt3a 濃度勾配による細胞分裂異方性の制御

第2章では、微小環境による組織形成メカニズムの理解を目的として、細胞分裂の異方性を決定するために必要な濃度差について実験的に検証した。まず、微小空間内で液性因子濃度勾配を形成するためにマイクロ流体デバイスの作製を行った。そして、マイクロ流体デバイス内で Wnt3a タンパク質と同等の分子量を有する FITC-デキストランを用いて濃度勾配を形成した。形成した濃度勾配に対して画像解析を行い1細胞レベルで濃度勾配刺激を与えることが可能であることを確認した。その後、非対称分裂が確認されている SH-SY5Y 細胞を Wnt3a 濃度勾配存在下で培養した。本研究では細胞分裂の異方性を判別するために、より古い母中心子に局在するタンパク質として知られている ODF2 を免疫蛍光染色した。実験の結果、Wnt3a 濃度勾配存在下における細胞分裂中期の異方性決定に偏りが生じていることを明らかにした。さらに、細胞分裂における異方性決定の偏りは、Wnt3a の局所的な濃度ではなく細胞両端間に生じている  $10^{-1}$  nM 程度の濃度差によって決定されていることを示唆した。この濃度差は、細胞両端間で約 20% の濃度差が生じている計算になる。

現在までに、機械的刺激が細胞分裂方向を制御していることは報告されているが、細胞分裂の異方性が機械的刺激によって制御されているといった報告例は存在しない(第2.1参照)。したがって本研究の結果を踏まえると、生体内における機械的刺激と液性因子濃度勾配によって生じる濃度差が異方性を含めた細胞分裂を協同的に制御していると考えられる。



### 4.3 せん断応力による神経芽腫細胞の遊走制御

第3章では、 $10^{-1}$  Paのせん断応力をMYCN増幅型の神経芽腫細胞であるIMR32に与えると、IMR32細胞の遊走能は向上し下流側に遊走することを明らかにした。また、 $10^{-1}$  Paのせん断応力を与えると接着斑の配向や形態(面積、長軸長さ、真円度)に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、MYCN-siRNAによってN-Mycの発現量を減少させると、 $10^{-1}$  Paのせん断応力下で接着斑の配向や遊走能の向上が阻害されていることが観察された。先行研究では、接着斑の配向や形態変化は細胞の遊走能に影響を及ぼすことが報告されている(第3.1節参照)。したがって、本研究および先行研究の結果によって $10^{-1}$  Paのせん断応力は接着斑の配向や形状の変化に影響を及ぼすことで遊走制御を行なっていることを示した。また、N-Mycの発現は、せん断応力による接着斑の配向に関与していることを示唆した。

生体内では、腫瘍の増大に伴い癌細胞に与えられるせん断応力も増大していると考えられる。したがって、本研究の結果から癌細胞は増大したせん断応力によってリンパ管や細静脈に向かって効率的に遊走していることを示唆した。

### 4.4 今後の展望

本研究の今後の展望として(1)細胞に備わる周辺環境感知メカニズムの理解、(2)実験系の改良が挙げられる。

第2章では、細胞分裂中期において細胞が僅かな濃度差を検出するためにLEGIが備わっていることを提唱した。したがって、細胞分裂の際に適応的応答が生じているか確認し、LEGIの有無について検証する必要がある。また、周辺環境に応じて細胞分裂の異方性がどのように制御されているか明らかにする必要がある。先行研究では、Wnt3aによってLRP6受容体が活性化され、F-アクチンキャップの形成[14]やDvl2タンパク質の動員[47]を介して紡錘体の制御が行われていることを報告している。したがって、細胞分裂における異方性決定メカニズムを明らかにするために、Wnt3a濃度勾配存在下におけるF-アクチンやDvl2タンパク質の局在を明らかにする必要がある。

第3章では、せん断応力によって細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することで、遊走に変化が生じるという仮説を提唱した。したがって、TRPM7などのメカノセンサをロックダウンした際の細胞内カルシウムイオン濃度の経時的変化を測定し、遊走変化との因果関係を明らかにする必要がある。また、MYCN-siRNAによってロックダウンを行なった際に、細胞膜上に局在するメカノセンサが減少するか検証する必要がある。

本研究では、マイクロ流体デバイス内で二次元細胞培養を行うことによって微小環境が細胞の異方性決定に対して与える影響について検証した。しかし、生体内の微小環境は、細胞周辺に細胞外マトリクスが存在しているため三次元培養環境に近いと考えられる。したがって、今後は本実験系の三次元への拡張が重要な

課題となる。第2章では、タンパク質の拡散現象を利用して Wnt3a の濃度勾配を作成した。しかし、生体内では脂質修飾を受けた Wnt3a が細胞外マトリクスである HSPG に結合することで Wnt3a の濃度勾配を調節していることが知られている [72]。したがって、脂質修飾を行なった Wnt3a [41] を HSPG を含む三次元培養系内に局在させることで、より生体内に近い環境を再現できることが期待される。そして、三次元培養系内で分裂異方性の制御に必要な濃度差や分裂制御機構に変化が生じるか検証する必要がある。第3章では、二次元ポアズイユ流れを利用して接着細胞に対してせん断応力を与えた。しかし、間質内に存在する細胞は細胞外マトリクスで構成された細かい網目構造内に存在している。細かい網目構造内では流れが細胞に対して与える機械的刺激として、せん断応力だけでなく抗力 (drag force) の影響が大きくなることが報告されている [118]。したがって、今後は三次元培養系内で流れによる機械的刺激を与え、遊走変化について調べる必要がある。

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変多くの方々にご指導ご協力を賜りましたこと、心より感謝いたします。

本論文は、慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に同研究科基礎理工学専攻システム生物学研究室にて行なった研究の成果をまとめたものになります。システム生物学研究室は、学生全員が幅広い知見を有し様々な観点から積極的に議論を交わすといった知的好奇心の溢れる研究室でした。また、学生同士お互いを尊重し合い、時に厳しい指摘を行うことで研究者としてだけでなく人としても成長を促す研究室であったとも思っています。このような素晴らしい環境で研究を遂行してきたおかげで本論文の執筆に至ることができました。研究室の環境を築き上げ、また様々な困難に直面した際に適切な助言をくださった舟橋啓准教授にまず深謝いたします。舟橋啓准教授には学会、微細加工講習会、画像解析勉強会、少数性生物学のトレーニングコースなど、本論文をまとめるためには欠かせない技術について学ぶ機会を多く与えてくださいました。また、新たな知識や技術を得ることに対していつも後押ししていただきました。誠に感謝いたしております。

ご多用にも関わらず学位論文審査にて副査を引き受けてくださった慶應義塾大学理工学部生命情報学科 岡浩太郎教授、同大学理工学部機械工学科 三木則尚教授、同大学理工学部生命情報学科 土居信英教授、および山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部薬学科 広井賀子教授には本研究成果をまとめるにあたり、各専門分野の観点から大変貴重なご指摘をいただきました。この場をお借りして深く感謝いたします。

広井賀子教授には実験の遂行や成果をまとめるにあたり、多くの助言をいただきました。また、学生の考えを尊重してくださり、様々な実験に挑戦することができました。実験が必ずしもうまくいかない中、反省点や改良点について助言を頂くことで諦めることなく実験を遂行することができました。広井賀子教授には厚く御礼申し上げます。

三木則尚教授には三木研究室の実験施設をお貸し頂きました。本研究は三木則尚教授のご協力なくしては成り立ちませんでした。また、三木研究室の設備を利用するにあたり三木研究室の学生の方々には多くのご協力を頂きました。三木則尚教授ならびに三木研究室 OB の横浜国立大学 太田裕貴准教授、内田和宏さん、加野智慎さん、東和彦さんには心より感謝申し上げます。

慶應義塾大学物理情報工学科の松本佳宣教授には本研究で用いたマイクロ流体

デバイスの設計に関する助言や実験設備のご提供を頂きました。松本研究室の露光装置があったからこそ、様々なデザインのマイクロ流体デバイスを作成し、検証を行うことができました。

東海大学機械工学科 木村啓志准教授には微細加工に関する大変貴重な助言を頂きました。また、マスクの作成を行う際には多くのご協力を頂きました。発表を行う機会も用意していただき、分野の垣根を越えて意見交換することの重要性を知るきっかけにもなりました。

システム生物学研究室のOBでもある仲井祐一郎君には顕微鏡システムの自動制御系を構築していただきました。現在の顕微鏡システムがなければ多くの実験を遂行することができませんでした。本当にありがとうございます。同じ後期博士課程でもある山田貴大君、徳岡雄大君とは他愛もない話で盛り上がることもあれば、研究で困難に直面した際にお互いに助言し合うなど研究生活を行う上で心強い仲間であり精神的な支えでもありました。本当に感謝しております。他にもシステム生物学研究室のOB・OG含め、皆様には多くの協力や刺激を頂きました。皆様には感謝してもしきれません。

後期博士課程では田村淳記念奨学金による支援を受けました。本奨学金による支援を受けることで、生活費に関して苦慮することなく研究に没頭することができました。田村達治様にはこの場を借りて深く感謝申し上げます。

慶應義塾先端科学技術研究センターには研究助成金 (KLL 後期博士課程研究助成金) による支援を頂きました。本助成金によって新たな実験に挑戦することができました。このような素晴らしい制度を制定していただき誠に感謝しております。

最後に、両親に感謝の意を述べたいと思います。本論文は、9年間の研究生活だけでなく幼少期からの長い年月に渡る教育があったからこそその賜物だと思っています。このような長い年月、非常に貴重な教育を受けさせ続けてくれたことにまず感謝したいと思います。また、本論文をまとめるまでに学部時代から合わせて9年間という非常に長い時間を費やし、なかなか成果が出ない中、多くの心配をかけることとなりました。それでもいつかは成果がでることを信じ、研究に没頭できるように支えてくれた両親には感謝してもしきれません。今まで本当にありがとうございました。

## 参考文献

- [1] Yoshiki Sasai, Bin Lu, Herbert Steinbeisser, Douglas Geissert, Linda K Gont, and Eddy M De Robertis. Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*, Vol. 79, No. 5, pp. 779–790, 1994.
- [2] Jennifer M Munson and Adrian C Shieh. Interstitial fluid flow in cancer: implications for disease progression and treatment. *Cancer Management and Research*, Vol. 6, No. 8, p. 317, 2014.
- [3] Patrick Müller, Katherine W Rogers, R Yu Shuizi, Michael Brand, and Alexander F Schier. Morphogen transport. *Development*, Vol. 140, No. 8, pp. 1621–1638, 2013.
- [4] Rolando Rivera-Pomar and Herbert Jackle. From gradients to stripes in drosophila embryogenesis: filling in the gaps. *Trends in Genetics*, Vol. 12, No. 11, pp. 478–483, 1996.
- [5] Stefano Piccolo, Yoshiki Sasai, Bin Lu, and Eddy M De Robertis. Dorsoventral patterning in xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to bmp-4. *Cell*, Vol. 86, No. 4, pp. 589–598, 1996.
- [6] Clemens Kiecker and Christof Niehrs. A morphogen gradient of wnt/ $\beta$ -catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in xenopus. *Development*, Vol. 128, No. 21, pp. 4189–4201, 2001.
- [7] Lorenza Ciani and Patricia C Salinas. Signalling in neural development: Wnts in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 6, No. 5, p. 351, 2005.
- [8] Elke Bayha, Mette C Jørgensen, Palle Serup, and Anne Grapin-Botton. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PloS One*, Vol. 4, No. 6, p. e5845, 2009.
- [9] Leonardo Beccari, Raquel Marco-Ferreres, and Paola Bovolenta. The logic of gene regulatory networks in early vertebrate forebrain patterning. *Mechanisms of Development*, Vol. 130, No. 2-3, pp. 95–111, 2013.

- [10] James Briscoe and Stephen Small. Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development*, Vol. 142, No. 23, pp. 3996–4009, 2015.
- [11] Henner F Farin, Ingrid Jordens, Mohammed H Mosa, Onur Basak, Jeroen Korving, Daniele VF Tauriello, Karin de Punder, Stephane Angers, Peter J Peters, Madelon M Maurice, and Hans Clevers. Visualization of a short-range wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature*, Vol. 530, No. 7590, p. 340, 2016.
- [12] Sarah E Siegrist and Chris Q Doe. Extrinsic cues orient the cell division axis in drosophila embryonic neuroblasts. *Development*, Vol. 133, No. 3, pp. 529–536, 2006.
- [13] Shigeki Yoshiura, Nao Ohta, and Fumio Matsuzaki. Tre1 gpcr signaling orients stem cell divisions in the drosophila central nervous system. *Developmental Cell*, Vol. 22, No. 1, pp. 79–91, 2012.
- [14] I Castanon, L Abrami, L Holtzer, CP Heisenberg, FG Van Der Goot, and M González-Gaitán. Anthrax toxin receptor 2a controls mitotic spindle positioning. *Nature Cell Biology*, Vol. 15, No. 1, p. 28, 2013.
- [15] Manuel Théry, Andrea Jiménez-Dalmaroni, Victor Racine, Michel Bornens, and Frank Jülicher. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature*, Vol. 447, No. 7143, p. 493, 2007.
- [16] Jenny Fink, Nicolas Carpi, Timo Betz, Angelique Bétard, Meriem Chebah, Ammar Azioune, Michel Bornens, Cecile Sykes, Luc Fetler, Damien Cuvelier, and Matthieu Piel. External forces control mitotic spindle positioning. *Nature Cell Biology*, Vol. 13, No. 7, p. 771, 2011.
- [17] Floris Bosveld, Olga Markova, Boris Guirao, Charlotte Martin, Zhimin Wang, Anaëlle Pierre, Maria Balakireva, Isabelle Gaugue, Anna Ainslie, Nicolas Christophorou, David K Lubensky, Nicolas Minc, and Yohanns Bellaïche. Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis. *Nature*, Vol. 530, No. 7591, p. 495, 2016.
- [18] Eleni Tzima, Miguel Angel Del Pozo, Sanford J Shattil, Shu Chien, and Martin Alexander Schwartz. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO Journal*, Vol. 20, No. 17, pp. 4639–4647, 2001.

- [19] Eleni Tzima, Miguel Angel Del Pozo, William B Kiosses, Samih A Mohamed, Song Li, Shu Chien, and Martin Alexander Schwartz. Activation of rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *The EMBO Journal*, Vol. 21, No. 24, pp. 6791–6800, 2002.
- [20] Aruna Poduri, Brian Raftrey, Andrew H Chang, Siyeon Rhee, Mike Van, and Kristy Red-Horse. Endothelial cells respond to the direction of mechanical stimuli through smad signaling to regulate coronary artery size. Vol. 144, No. 18, pp. 3241–3252, 2017.
- [21] Shigenori Miura, Koji Sato, Midori Kato-Negishi, Tetsuhiko Teshima, and Shoji Takeuchi. Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of trpv6. *Nature Communications*, Vol. 6, p. 8871, 2015.
- [22] Brandon D Riehl, Jeong Soon Lee, Ligeom Ha, and Jung Yul Lim. Fluid-flow-induced mesenchymal stem cell migration: role of focal adhesion kinase and rhoa kinase sensors. *Journal of the Royal Society Interface*, Vol. 12, No. 104, p. 20141351, 2015.
- [23] Hyun Jung Lee, Miguel F Diaz, Katherine M Price, Joyce A Ozuna, Songlin Zhang, Eva M Sevick-Muraca, John P Hagan, and Pamela L Wenzel. Fluid shear stress activates yap1 to promote cancer cell motility. *Nature Communications*, Vol. 8, p. 14122, 2017.
- [24] Hong Yang, Liuyuan Guan, Shun Li, Ying Jiang, Niya Xiong, Li Li, Chunhui Wu, Hongjuan Zeng, and Yiyao Liu. Mechanosensitive caveolin-1 activation-induced pi3k/akt/mtor signaling pathway promotes breast cancer motility, invadopodia formation and metastasis in vivo. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 13, p. 16227, 2016.
- [25] Pan Dan, Émilie Velot, Véronique Decot, and Patrick Menu. The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cell Science*, Vol. 128, No. 14, pp. 2415–2422, 2015.
- [26] Rob J Dekker, Simone van Soest, Ruud D Fontijn, Sonia Salamanca, Philip G de Groot, Ed VanBavel, Hans Pannekoek, and Anton JG Horrevoets. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung krüppel-like factor (klf2). *Blood*, Vol. 100, No. 5, pp. 1689–1698, 2002.

- [27] Shane P Herbert and Didier YR Stainier. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 12, No. 9, p. 551, 2011.
- [28] Tobi Nagel, Nitzan Resnick, William J Atkinson, C Forbes Dewey, and Michael A Gimbrone. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 94, No. 2, pp. 885–891, 1994.
- [29] Nicolas Baeyens, Chirosree Bandyopadhyay, Brian G Coon, Sanguk Yun, and Martin A Schwartz. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 126, No. 3, pp. 821–828, 2016.
- [30] Chaoliang Wei, Xianhua Wang, Min Chen, Kunfu Ouyang, Long-Sheng Song, and Heping Cheng. Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, Vol. 457, No. 7231, p. 901, 2009.
- [31] Akira Katsumi, A Wayne Orr, Eleni Tzima, and Martin Alexander Schwartz. Integrins in mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 13, pp. 12001–12004, 2004.
- [32] Zhong-Dong Shi, Hui Wang, and John M Tarbell. Heparan sulfate proteoglycans mediate interstitial flow mechanotransduction regulating mmp-13 expression and cell motility via fak-erk in 3d collagen. *PloS One*, Vol. 6, No. 1, p. e15956, 2011.
- [33] Elisa Cimetta, Christopher Cannizzaro, Richard James, Travis Biechele, Randall T Moon, Nicola Elvassore, and Gordana Vunjak-Novakovic. Microfluidic device generating stable concentration gradients for long term cell culture: application to wnt3a regulation of  $\beta$ -catenin signaling. *Lab on a Chip*, Vol. 10, No. 23, pp. 3277–3283, 2010.
- [34] Joong Yull Park, Suel-Kee Kim, Dong-Hun Woo, Eun-Joong Lee, Jong-Hoon Kim, and Sang-Hoon Lee. Differentiation of neural progenitor cells in a microfluidic chip-generated cytokine gradient. *Stem Cells*, Vol. 27, No. 11, pp. 2646–2654, 2009.
- [35] Christopher J Demers, Prabakaran Soundararajan, Phaneendra Chennampally, Gregory A Cox, James Briscoe, Scott D Collins, and Rosemary L Smith. Development-on-chip: in vitro neural tube patterning with a microfluidic device. *Development*, Vol. 143, No. 11, pp. 1884–1892, 2016.



- [36] Hang Lu, Lily Y Koo, Wechung M Wang, Douglas A Lauffenburger, Linda G Griffith, and Klavs F Jensen. Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion. *Analytical Chemistry*, Vol. 76, No. 18, pp. 5257–5264, 2004.
- [37] Lily Kim, Michael D Vahey, Hsu-Yi Lee, and Joel Voldman. Microfluidic arrays for logarithmically perfused embryonic stem cell culture. *Lab on a Chip*, Vol. 6, No. 3, pp. 394–406, 2006.
- [38] Henning Morawietz, Alex H Wagner, Michael Hecker, and Winfried Goettsch. Endothelin receptor b-mediated induction of c-jun and ap-1 in response to shear stress in human endothelial cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 86, No. 8, pp. 499–504, 2008.
- [39] Stefan Schnegas, Sergi Antonyuk, and Stefan Heinrich. 3d modeling and computational fluid dynamics simulations of surface-attached cho-k1 cells going to detach from a microchannel wall. *Powder Technology*, Vol. 237, pp. 529–536, 2013.
- [40] Loling Song, Sharvari M Nadkarni, Hendrik U Bödeker, Carsten Beta, Albert Bae, Carl Franck, Wouter-Jan Rappel, William F Loomis, and Eberhard Bodenschatz. Dictyostelium discoideum chemotaxis: threshold for directed motion. *European Journal of Cell Biology*, Vol. 85, No. 9-10, pp. 981–989, 2006.
- [41] Shukry J Habib, Bi-Chang Chen, Feng-Chiao Tsai, Konstantinos Anastasiadis, Tobias Meyer, Eric Betzig, and Roel Nusse. A localized wnt signal orients asymmetric stem cell division in vitro. *Science*, Vol. 339, No. 6126, pp. 1445–1448, 2013.
- [42] Andreas Wodarz and Roel Nusse. Mechanisms of wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 14, No. 1, pp. 59–88, 1998.
- [43] Gary Davidson, Jinlong Shen, Ya-Lin Huang, Yi Su, Emil Karaulanov, Kerstin Bartscherer, Christine Hassler, Peter Stanek, Michael Boutros, and Christof Niehrs. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Developmental Cell*, Vol. 17, No. 6, pp. 788–799, 2009.
- [44] Tannishtha Reya and Hans Clevers. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, Vol. 434, No. 7035, p. 843, 2005.

- [45] Bryan T MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, Vol. 17, No. 1, pp. 9–26, 2009.
- [46] Patricia C Salinas. Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical wnt pathway. *Trends in Cell Biology*, Vol. 17, No. 7, pp. 333–342, 2007.
- [47] Koji Kikuchi, Yohei Niikura, Katsumi Kitagawa, and Akira Kikuchi. Dishevelled, a wnt signalling component, is involved in mitotic progression in cooperation with plk1. *The EMBO Journal*, Vol. 29, No. 20, pp. 3470–3483, 2010.
- [48] Amanda J Mikels and Roel Nusse. Purified wnt5a protein activates or inhibits  $\beta$ -catenin–tcf signaling depending on receptor context. *PLoS Biology*, Vol. 4, No. 4, p. e115, 2006.
- [49] Hideki Izumi and Yasuhiko Kaneko. Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109, No. 44, pp. 18048–18053, 2012.
- [50] Charles T Anderson and Tim Stearns. Centriole age underlies asynchronous primary cilium growth in mammalian cells. *Current Biology*, Vol. 19, No. 17, pp. 1498–1502, 2009.
- [51] Xiaoqun Wang, Jin-Wu Tsai, Janice H Imai, Wei-Nan Lian, Richard B Vallee, and Song-Hai Shi. Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature*, Vol. 461, No. 7266, p. 947, 2009.
- [52] Alison M Skelley and Joel Voldman. An active bubble trap and debubbler for microfluidic systems. *Lab on a Chip*, Vol. 8, No. 10, pp. 1733–1737, 2008.
- [53] James Sibarani, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara. Surface modification on microfluidic devices with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers for reducing unfavorable protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 54, No. 1, pp. 88–93, 2007.
- [54] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, Vol. 9, No. 7, p. 676, 2012.

- [55] John Crank et al. *The mathematics of diffusion*. Oxford university press, 1979.
- [56] Hiroaki Ishikawa, Akiharu Kubo, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nature Cell Biology*, Vol. 7, No. 5, p. 517, 2005.
- [57] Nico Stuurman, Nenad Amodaj, and Ron Vale.  $\mu$ manager: open source software for light microscope imaging. *Microscopy Today*, Vol. 15, No. 3, pp. 42–43, 2007.
- [58] Arthur Edelstein, Nenad Amodaj, Karl Hoover, Ron Vale, and Nico Stuurman. Computer control of microscopes using  $\mu$ manager. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 92, No. 1, pp. 14–20, 2010.
- [59] Cédric Matthews and Fabrice P Cordelieres. Metroloj: an imagej plugin to help monitor microscopes health. In *ImageJ User & Developer Conference proceedings*, 2010.
- [60] Eric Bourhis, Christine Tam, Yvonne Franke, J Fernando Bazan, James Ernst, Jiyoung Hwang, Mike Costa, Andrea G Cochran, and Rami N Hannon. Reconstitution of a frizzled8· wnt3a· lrp6 signaling complex reveals multiple wnt and dkk1 binding sites on lrp6. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, No. 12, pp. 9172–9179, 2010.
- [61] Kenji Sugioka, Kota Mizumoto, and Hitoshi Sawa. Wnt regulates spindle asymmetry to generate asymmetric nuclear  $\beta$ -catenin in *c. elegans*. *Cell*, Vol. 146, No. 6, pp. 942–954, 2011.
- [62] Pablo A Iglesias and Peter N Devreotes. Navigating through models of chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 20, No. 1, pp. 35–40, 2008.
- [63] Tatsuo Shibata, Masatoshi Nishikawa, Satomi Matsuoka, and Masahiro Ueda. Intracellular encoding of spatiotemporal guidance cues in a self-organizing signaling system for chemotaxis in dictyostelium cells. *Biophysical Journal*, Vol. 105, No. 9, pp. 2199–2209, 2013.
- [64] Gary Davidson, Wei Wu, Jinlong Shen, Josipa Bilic, Ursula Fenger, Peter Stanek, Andrei Glinka, and Christof Niehrs. Casein kinase 1  $\gamma$  couples wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, Vol. 438, No. 7069, p. 867, 2005.

- [65] Josipa Bilić, Ya-Lin Huang, Gary Davidson, Timo Zimmermann, Cristina-Maria Cruciat, Mariann Bienz, and Christof Niehrs. Wnt induces lrp6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent lrp6 phosphorylation. *Science*, Vol. 316, No. 5831, pp. 1619–1622, 2007.
- [66] Hideki Yamamoto, Hiroshi Sakane, Tatsuo Michiue, and Akira Kikuchi. Wnt3a and dkk1 regulate distinct internalization pathways of lrp6 to tune the activation of  $\beta$ -catenin signaling. *Developmental cell*, Vol. 15, No. 1, pp. 37–48, 2008.
- [67] Brian A Parr, Martin J Shea, Galya Vassileva, and Andrew P McMahon. Mouse wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic cns and limb buds. *Development*, Vol. 119, No. 1, pp. 247–261, 1993.
- [68] Takuma Shinozuka, Ritsuko Takada, Shosei Yoshida, Shigenobu Yonemura, and Shinji Takada. Wnt produced by stretched roof-plate cells is required for the promotion of cell proliferation around the central canal of the spinal cord. *Development*, Vol. 146, No. 2, p. dev159343, 2019.
- [69] Benjamin L Martin and David Kimelman. Brachyury establishes the embryonic mesodermal progenitor niche. *Genes & Development*, Vol. 24, No. 24, pp. 2778–2783, 2010.
- [70] Hans Clevers, Kyle M Loh, and Roel Nusse. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, Vol. 346, No. 6205, p. 1248012, 2014.
- [71] Julia Christina Gross, Varun Chaudhary, Kerstin Bartscherer, and Michael Boutros. Active wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology*, Vol. 14, No. 10, p. 1036, 2012.
- [72] 山本英樹. Wnt シグナル伝達経路の活性制御と発がんとの関連. *生化学*, Vol. 80, No. 12, pp. 1079–1093, 2008.
- [73] 中島昭彦, 石原秀至, 澤井哲. 動く細胞が読み取る時間と空間: 走化性のパラドクスと整流作用. *生物物理*, Vol. 56, No. 2, pp. 098–101, 2016.
- [74] Konstantinos Konstantopoulos and Susan N Thomas. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 11, pp. 177–202, 2009.
- [75] Ethel R Pereira, Dmitriy Kedrin, Giorgio Seano, Olivia Gautier, Eelco FJ Meijer, Dennis Jones, Shan-Min Chin, Shuji Kitahara, Echoe M Bouta,

- Jonathan Chang, Elizabeth Beech, Han-Sin Jeong, Michael C Carroll, Alphonse G Taghian, and Timothy P Padera. Lymph node metastases can invade local blood vessels, exit the node, and colonize distant organs in mice. *Science*, Vol. 359, No. 6382, pp. 1403–1407, 2018.
- [76] Carl-Henrik Heldin, Kristofer Rubin, Kristian Pietras, and Arne Östman. High interstitial fluid pressure—an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, No. 10, p. 806, 2004.
- [77] Triantafyllos Stylianopoulos, John D Martin, Matija Snuderl, Fotios Mpekris, Saloni R Jain, and Rakesh K Jain. Co-evolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: Implications for vascular collapse. *Cancer Research*, Vol. 73, No. 13, pp. 3833–3841, 2013.
- [78] Steven G DuBois, Yan Kalika, John N Lukens, Garrett M Brodeur, Robert C Seeger, James B Atkinson, Gerald M Haase, C Thomas Black, Carlos Perez, Hiroyuki Shimada, Robert Gerbing, Daniel O Stram, and Katherine K Matthay. Metastatic sites in stage iv and ivs neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, Vol. 21, No. 3, pp. 181–189, 1999.
- [79] Chand Khanna, Jerry J Jaboin, Elias Drakos, Maria Tsokos, and Carol J Thiele. Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis. *In Vivo (Athens, Greece)*, Vol. 16, No. 2, pp. 77–85, 2002.
- [80] Raymond Judware and Lloyd A Culp. Concomitant down-regulation of expression of integrin subunits by n-myc in human neuroblastoma cells: Differential regulation of  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta 1$ . *Oncogene*, Vol. 14, No. 11, p. 1341, 1997.
- [81] Elizabeth A Beierle, Nicole A Massoll, Joseph Hartwich, Elena V Kurenova, Vita M Golubovskaya, William G Cance, Patrick McGrady, and Wendy B London. Focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma: immunohistochemical and real-time pcr analyses. *Clinical Cancer Research*, Vol. 14, No. 11, pp. 3299–3305, 2008.
- [82] Amy Meyer, Cynthia M van Golen, Bhumsoo Kim, Kenneth L van Golen, and Eva L Feldman. Integrin expression regulates neuroblastoma attachment and migration. *Neoplasia*, Vol. 6, No. 4, pp. 332–342, 2004.
- [83] Michael L Megison, Jerry E Stewart, Hugh C Nabers, Lauren A Gillory, and Elizabeth A Beierle. Fak inhibition decreases cell invasion, migration

- and metastasis in mycn amplified neuroblastoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, Vol. 30, No. 5, pp. 555–568, 2013.
- [84] Alan W Partin, Joseph S Schoeniger, James L Mohler, and Donald S Coffey. Fourier analysis of cell motility: correlation of motility with metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 86, No. 4, pp. 1254–1258, 1989.
- [85] Nina Schwankhaus, Christina Gathmann, Daniel Wicklein, Kristoffer Riecken, Udo Schumacher, and Ursula Valentiner. Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clinical & Experimental Metastasis*, Vol. 31, No. 4, pp. 483–496, 2014.
- [86] Shun-Fu Chang, Cheng Allen Chang, Ding-Yu Lee, Pei-Ling Lee, Yu-Ming Yeh, Chiuan-Ren Yeh, Cheng-Kung Cheng, Shu Chien, and Jeng-Jiann Chiu. Tumor cell cycle arrest induced by shear stress: Roles of integrins and smad. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 105, No. 10, pp. 3927–3932, 2008.
- [87] Liron Avraham-Chakim, David Elad, Uri Zaretsky, Yoel Kloog, Ariel Jaffa, and Dan Grisaru. Fluid-flow induced wall shear stress and epithelial ovarian cancer peritoneal spreading. *PloS One*, Vol. 8, No. 4, p. e60965, 2013.
- [88] Niya Xiong, Shun Li, Kai Tang, Hongxia Bai, Yueting Peng, Hong Yang, Chunhui Wu, and Yiyao Liu. Involvement of caveolin-1 in low shear stress-induced breast cancer cell motility and adhesion: Roles of fak/src and rock/p-mlc pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, Vol. 1864, No. 1, pp. 12–22, 2017.
- [89] Michael J Mitchell and Michael R King. Fluid shear stress sensitizes cancer cells to receptor-mediated apoptosis via trimeric death receptors. *New Journal of Physics*, Vol. 15, No. 1, p. 015008, 2013.
- [90] Arja Ray, Oscar Lee, Zaw Win, Rachel M Edwards, Patrick W Alford, Deok-Ho Kim, and Paolo P Provenzano. Anisotropic forces from spatially constrained focal adhesions mediate contact guidance directed cell migration. *Nature Communications*, Vol. 8, p. 14923, 2017.
- [91] Kevin Sheets, Stephen Wunsch, Colin Ng, and Amrinder S Nain. Shape-dependent cell migration and focal adhesion organization on suspended and aligned nanofiber scaffolds. *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, No. 7, pp. 7169–7177, 2013.

- [92] Dong-Hwee Kim and Denis Wirtz. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *The FASEB Journal*, Vol. 27, No. 4, pp. 1351–1361, 2013.
- [93] Carl D Meinhart, Steve T Wereley, and Juan G Santiago. Piv measurements of a microchannel flow. *Experiments in Fluids*, Vol. 27, No. 5, pp. 414–419, 1999.
- [94] Qingzong Tseng, Eve Duchemin-Pelletier, Alexandre Deshiere, Martial Baland, Hervé Guillou, Odile Filhol, and Manuel Théry. Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell–cell junction positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 109, No. 5, pp. 1506–1511, 2012.
- [95] Astrid D Bakker, Kazuhisa Soejima, Jenneke Klein-Nulend, and Elisabeth H Burger. The production of nitric oxide and prostaglandin e2 by primary bone cells is shear stress dependent. *Journal of Biomechanics*, Vol. 34, No. 5, pp. 671–677, 2001.
- [96] Henning Morawietz, Roland Talanow, Marten Szibor, Uwe Rueckschloss, Andreas Schubert, Babett Bartling, Dorothea Darmer, and Juergen Holtz. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *The Journal of Physiology*, Vol. 525, No. 3, pp. 761–770, 2000.
- [97] Christoph Gögelein, Gerhard Nägele, Johan Buitenhuis, Remco Tuinier, and Jan KG Dhont. Polymer depletion-driven cluster aggregation and initial phase separation in charged nanosized colloids. *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 130, No. 20, p. 204905, 2009.
- [98] Xiaoning Mou, Shu Wang, Xiaowang Liu, Weibo Guo, Jianhua Li, Jichuan Qiu, Xin Yu, Zhong Lin Wang, Xiaogang Liu, Zhaoxin Geng, and Hong Liu. Static pressure-induced neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Nanoscale*, Vol. 9, No. 28, pp. 10031–10037, 2017.
- [99] Keigo Nara, Takeshi Kusafuka, Akihiro Yoneda, Takaharu Oue, Surasak Sangkhathat, and Masahiro Fukuzawa. Silencing of mycn by rna interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with mycn amplification. *International Journal of Oncology*, Vol. 30, No. 5, pp. 1189–1196, 2007.
- [100] Dmitriy Ovcharenko, Richard Jarvis, Scott Hunicke-Smith, Kevin Kelnar, and David Brown. High-throughput rna screening in vitro: from cell lines to primary cells. *RNA*, Vol. 11, No. 6, pp. 985–993, 2005.

- [101] Stanley R Sternberg. Biomedical image processing. *Computer*, Vol. 16, No. 1, pp. 22–34, 1983.
- [102] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, Vol. 9, No. 1, pp. 62–66, 1979.
- [103] Pierre Soille and Luc M Vincent. Determining watersheds in digital pictures via flooding simulations. In *Visual Communications and Image Processing'90: Fifth in a Series*, Vol. 1360, pp. 240–251. International Society for Optics and Photonics, 1990.
- [104] Nicholas I Fisher. *Statistical analysis of circular data*. Cambridge University Press, 1995.
- [105] Torsten Hothorn, Frank Bretz, and Peter Westfall. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, Vol. 50, No. 3, pp. 346–363, 2008.
- [106] Anne J Ridley, Martin A Schwartz, Keith Burridge, Richard A Firtel, Mark H Ginsberg, Gary Borisy, J Thomas Parsons, and Alan Rick Horwitz. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, Vol. 302, No. 5651, pp. 1704–1709, 2003.
- [107] Teneale A Stewart, Kunsala TDS Yapa, and Gregory R Monteith. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Vol. 1848, No. 10, pp. 2502–2511, 2015.
- [108] Jacob M Hope, Joshua D Greenlee, and Michael R King. Mechanosensitive ion channels: Trpv4 and p2x7 in disseminating cancer cells. *The Cancer Journal*, Vol. 24, No. 2, pp. 84–92, 2018.
- [109] Therese B Deramaudt, Denis Dujardin, Abdelkader Hamadi, Fanny Noulet, Kaouther Kolli, Jan De Mey, Kenneth Takeda, and Philippe Rondé. Fak phosphorylation at tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 22, No. 7, pp. 964–975, 2011.
- [110] Michael J Mitchell and Michael R King. Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress. *Frontiers in Oncology*, Vol. 3, p. 44, 2013.



- [111] Jérôme RD Soiné, Christoph A Brand, Jonathan Stricker, Patrick W Oakes, Margaret L Gardel, and Ulrich S Schwarz. Model-based traction force microscopy reveals differential tension in cellular actin bundles. *PLoS Computational Biology*, Vol. 11, No. 3, p. e1004076, 2015.
- [112] Natsumi Tanaka and Masahiro Fukuzawa. Mycn downregulates integrin  $\alpha 1$  to promote invasion of human neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*, Vol. 33, No. 4, pp. 815–821, 2008.
- [113] Angélique Millon-Frémillon, Molly Brunner, Nadia Abed, Elodie Collomb, Anne-Sophie Ribba, Marc R Block, Corinne Albigès-Rizo, and Daniel Bouvard. Calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type ii (camkii)-mediated intramolecular opening of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (icap-1 $\alpha$ ) negatively regulates  $\beta 1$  integrins. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 288, No. 28, pp. 20248–20260, 2013.
- [114] Ingo Lange and Dana-Lynn T Koomoa. Mycn promotes trpm7 expression and cell migration in neuroblastoma through a process that involves polyamines. *FEBS Open Bio*, Vol. 4, pp. 966–975, 2014.
- [115] Zheng Zhang, Malika Faouzi, Junhao Huang, Dirk Geerts, Haijie Yu, Andrea Fleig, and Reinhold Penner. N-myc-induced up-regulation of trpm6/trpm7 channels promotes neuroblastoma cell proliferation. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 17, p. 7625, 2014.
- [116] Elena Oancea, Joshua T Wolfe, and David E Clapham. Functional trpm7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circulation Research*, Vol. 98, No. 2, pp. 245–253, 2006.
- [117] Tamal Das, Tapas K Maiti, and Suman Chakraborty. Traction force microscopy on-chip: shear deformation of fibroblast cells. *Lab on a Chip*, Vol. 8, No. 8, pp. 1308–1318, 2008.
- [118] William J Polacheck, Alexandra E German, Akiko Mammoto, Donald E Ingber, and Roger D Kamm. Mechanotransduction of fluid stresses governs 3d cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 111, No. 7, pp. 2447–2452, 2014.