

学位論文

表題： 機械的刺激は骨芽細胞の移動と分裂方向を制御する
所属： 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
 歯科矯正学分野
投稿者： 竹本 史子
原稿総紙数： 15 枚（本文，文献，図の説明，図，表）
図： 5 枚（図 1， 3~5）
写真： 5 枚（図 1~5）
表： 0 枚
電子媒体： CD（1 枚）
印刷数： 50 部

機械的刺激は骨芽細胞の移動と分裂方向を制御する

竹本 史子

緒言

骨組織は機械的刺激に応答し、刺激に対して適切な強度を保つために、骨形成やリモデリングを生じることが知られている¹⁾。例えば、海綿骨を構成する骨梁の配列は骨強度を決める重要な因子であり^{2,3)}、大腿骨骨頭部では、機械的刺激の主応力に応じた方向に骨梁が形成され、重力に耐えうるような強度をもった構造を呈している⁴⁾。さらに、骨のコラーゲン線維は層板状に形成され、ベニヤ板状の構造をなすことにより強さとしなやかさを生じていることが知られ、骨基質中のコラーゲン線維の走行性とそれに基づくアパタイト結晶の配向性も骨強度に重要な因子であると考えられている^{5,6)}。従って、機械的刺激の影響下でこのような方向性を有する基質が形成されるメカニズムを解明することは、機械的刺激環境に適応した健全な骨形成を導くために重要である。

骨基質形成の方向性やコラーゲン線維の走行は、骨芽細胞の形態や配列に制御されると考えられるが、骨芽細胞の配向性は、機械的刺激によって調節されることが知られている。機械的刺激による骨芽細胞の配列方向の制御については、基質の形状やひずみ、流体せん断応力など、様々な種類の機械的刺激を培養細胞に加えることにより検討されてきた^{8,9)}。シリコン製の細胞培養ディッシュの底面を引き伸ばすことにより細胞に伸展刺激を加える実験において、持続的あるいは間欠的に伸展すると、細胞は伸展方向に対して平行¹¹⁾あるいは垂直に近い角度でそれぞれ配列することが知られている⁷⁾。また、培養液に流れを作り細胞に流体せん断応力を加える実験において、液流刺激の方向性を一方向性、あるいは双方向性に与えることによって細胞の配列方向が変化することが報告されている¹⁰⁾。このように骨芽細胞の配列方向は、機械的刺激の与え方により異なる方向へと調節されることが明らかにされている。

また、基質形成方向の調節には、細胞の移動や増殖の方向性も重要であると考えられる。例えば、骨芽細胞の移動は、極性のあるコラーゲンの架橋形成に影響を与え、方向性をもった細胞の集団運動は骨基質形成に重要であることが示唆されている¹²⁾。細胞の分裂方向も、基質形成の方向や組織の発達パターンに重要な役割を担うと考えられている^{13,14)}。さらに、細胞の移動方向や分裂方向は、細胞の配列方向の影響を受けることが知られている^{15,16)}。したがって、機械的刺激により調節される細胞の配列方向が、移動や分裂方向にどのような影響を及ぼしているかを明らかにすることは、機械的刺激に応じた方向性をもつ骨形成を可能にするメカニズムの解明に重要である。

機械的刺激により誘導された細胞の配列が、細胞の移動方向に影響を与えることは、液流刺激を細胞に加える実験系において、主に血管内皮細胞を対象に検討がすすめられてい

る¹⁷⁾。骨芽細胞については、骨延長術、矯正治療などの機械的負荷を受けるため¹⁸⁾、基質の変形から加わる伸展や圧縮といった刺激が基質形成の方向性の調節に重要と考えられる。これまでに、伸展刺激によって誘導された細胞の配列方向に向かって細胞が移動するということが、線維芽細胞について報告されている¹⁹⁾。しかしながら、骨芽細胞について、機械的伸展刺激によって制御された配列方向と、細胞移動や分裂方向の関連性について詳細な検討を行った報告は見あたらない。

そこで本研究では、機械的刺激が骨基質形成の方向を制御するメカニズムを解明するために、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 に持続的あるいは間欠的伸展刺激を加えて、それぞれ異なる方向に配列させ、刺激を除去した直後から 24 時間後までの細胞の形態と、移動および分裂方向について検討した。

材料ならびに方法

1. 細胞培養

細胞はマウス前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (理化学研究所, 埼玉, 日本) を用い、加温加湿中 (37° , 5% CO₂) の環境下で培養した。培地は 10% ウシ胎児血清およびペニシリン-スプレプトマイシン溶液 (ナカライテスク, 京都, 日本) を添加した alpha-Minimum Essential Medium を使用した。分化培地には、さらに 1% アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) および 1% β-グリセロリン酸 (東京化成, 東京) を添加した。

2. 伸展刺激の装置と条件

伸展刺激装置には、培養細胞伸展システム ShellPa (メニコン, 愛知) を用いた。まず、I 型コラーゲン (Cellmatrix Type I-C; 新田ゼラチン株式会社, 大阪) でコーティングしたシリコン製のチャンバー (ストレッチチャンバー, SC4Ha, メニコン; 図 1 A) に、細胞を 1.25×10^4 cells/cm² の密度で播種し 24 時間静置培養した。その後分化培地に交換し、チャンバーを 2 種類の伸展方法により細胞に刺激を加えた。機械的伸展刺激条件は、過去に細胞の生死、増殖率など、さまざまな観点から検討されている^{7,11)}。本研究では、持続的、間欠的伸展刺激ともに細胞の配列方向を規定し、細胞の生死に影響を与えない刺激強度で行った。持続的伸展刺激群 (持続群) では、伸展率 10% でチャンバーを伸展した状態を維持し、間欠的伸展刺激群 (間欠群) では、同じ伸展率での伸展を、毎分 12 サイクルの頻度 (1 サイクル: 伸展 2.5 秒 + 弛緩 2.5 秒) で繰り返した (図 1B)。なお、分化培地に交換後、チャンバーを伸展せず静置した状態で培養した細胞を対照群とした。

3. 蛍光染色

細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液で15分間固定した後、再びPBSで洗浄した。次いで、0.1%Triton X-100で1分間透過処理し、PBSで洗浄した後、Actin-Tracker Green solution (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA) を使用し、製造元のプロトコルに従ってF-アクチンを染色した。核染色には4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。

4. 細胞の形態と配列の解析

細胞の経時的形態変化を調べるために、伸展刺激開始後、0, 0.5, 1, 3, 6時間でチャンバーをホルダーから外して位相差顕微鏡で観察した。持続群、間欠群ともに特徴的な細胞の配列が観察された6時間で伸展刺激を除去し、その時点を実験除去後0時間として、細胞の形態変化を継続して位相差顕微鏡で観察した。

伸展刺激除去後0時間および、細胞の形態を観察できる限界の24時間で、細胞を固定しF-アクチンを蛍光染色して、蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS, 東京) で観察した。細胞および核の形態を評価するために、20倍の対物レンズで撮影した蛍光顕微鏡像を用いて、NIH Image J Fiji (US National Institute of Health, Bethesda, MD) を使用し、細胞の外形に近似させた楕円の長軸と短軸の長さを計測し、両者の比率を細胞の縦横比 (長軸/短軸) として算出した²⁰⁾。さらに、細胞の配向性を定量化するために、伸展方向に対する細胞の長軸がなす角度をCellProfilerソフトウェア (Broad Institute, Cambridge, MA) を使って計測した。

5. 細胞の移動方向

細胞の移動方向を解析するために、伸展刺激除去後、培養液にHoechst33258 solution (同仁化学研究所, 熊本) を30分間添加して細胞の核を染色した。その後培養液を交換し、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE, 大阪) を用いて、30分ごとに24時間タイムラプス撮影を対物レンズ20倍で行った。BZ-X Analyzer (KEYENCE) でタイムラプス像の細胞の核を認識させ、その位置の変化を追跡した。細胞の移動方向は、伸展方向をY軸と定義し、6時間ごとのX軸方向への移動距離に対するY軸方向への移動距離の比 (Y/X比) を算出し、評価した。

6. 細胞の分裂方向

細胞が分裂する方向については、伸展方向に対する細胞分裂軸の角度として評価した。観察時間を6, 12, 18, 24時間とし、それぞれの観察時間の3時間前からのタイムラプス像中に見られた分裂終期の細胞について、ImageJ Fiji を使用して分裂方向を計測した。タイムラプス像中で細胞の赤道面付近にくびれを認めた細胞を分裂終期と判断した。

7. 統計解析

実験から得られたデータは、平均値±標準誤差 (SE) として表した。一元配置分散分析法を使用して、細胞及び核の縦横比、移動方向、分裂方向について、対照群、持続群、間欠群の3群間で比較した。その後の検定として、Bonferroniの多重比較検定を用いた。すべての測定は、統計ソフトウェアパッケージ SPSS 28.0 for Windows (SPSS Japan, 東京) を用いて行った。統計的有意性は P 値 < 0.05 とした²¹⁾。

結果

持続的伸展刺激と間欠的伸展刺激による細胞の配列の違い

シリコン製ストレッチチャンバー上で培養した MC3T3-E1 細胞に、持続的伸展刺激と間欠的伸展刺激 (12 サイクル/分) の2種類の機械的伸展刺激を6時間与え (図1), 細胞の形態と配列を、位相差顕微鏡で観察した (図2)。伸展刺激を開始して30分後には、伸長した形態の細胞が認められるようになり、刺激後6時間までには、持続群は伸展方向に対して平行に (図2A, 中段), 間欠群では垂直に配列する傾向を示した (図2A, 下段)。伸展刺激除去後、持続群では、6時間まで伸展方向に対して平行に近い方向に配列する細胞が多くみられたが、その後は特定の方向に配列する傾向は見られなかった (図2B, 中段)。間欠群では、24時間まで垂直に近い方向に配列する傾向が維持されていた (図2B, 下段)。対照群では、全ての観察時間において、細胞は特定の方向への配列傾向を示さなかった (図2A, B, 上段)。

細胞および核の形態と配向の定量化

細胞の形態および配列をより詳細に観察するために、F-アクチンと核を蛍光染色した。F-アクチン染色像において、いずれの群の細胞も紡錘形の外形を呈していたが、刺激除去後0時間の間欠群では、他群よりも細長く伸びた形状を呈する細胞が多く見られた。そこで、細胞形態を定量化するために、F-アクチン染色像から縦横比を算出した。各群の細胞及び核の縦横比は、長軸の長さを短軸で除した値として求めた。刺激除去後0時間では、間欠群の細胞の縦横比は他の群に比べ著しく大きく (図3A), 刺激除去後24時間では、0時間で見られたほどの差はなかったが、他群と比較すると有意に大きかった (図3B)。核の縦横比については、細胞外形ほど大きな差はなかったが、刺激除去後0時間では、間欠群の縦横比は他群よりも有意に大きくなった (図3A)。しかし、刺激除去後24時間では、その傾向は失われた (図3B)。

次に細胞の配列方向について定量的検討を加えるために、F-アクチン染色像の細胞外形を CellProfiler で認識し、伸展方向に対する細胞の長軸の角度を計測した。刺激除去後0時間において、細胞の配列角度分布を示すヒストグラムは、持続群では 0° 付近を中心としたなだらかな山型を、間欠群では 0° 付近を底としたすり鉢状を示した (図4A)。すな

わち、持続群では伸展方向に近い方向に、間欠群では伸展方向に対して垂直に近い方向に、配列する細胞が多いという結果が得られた。刺激除去後 24 時間において、持続群では山型の分布は見られなくなり、細胞が特定の方向に配列する傾向はなかったが、間欠群では刺激除去後 0 時間で見られたのと同様にすり鉢状分布が見られた (図 4B)。対照群では、刺激除去後 0 時間及び 24 時間において、細胞の配列方向は特異的な分布傾向を示さなかった。

細胞の移動と分裂方向の解析

伸展刺激除去後の細胞の移動についてタイムラプス撮影により解析した。移動方向は、伸展方向を Y 軸として、Y 軸方向への移動距離と X 軸方向への移動距離の比で示した。したがって、X/Y 比が 1 より小さい場合は Y 軸方向への移動量が大きく、1 より大きい場合は X 軸方向への移動が大きいことを意味する。全ての群において、細胞の移動方向は配列方向に一致する傾向が見られた。対照群では、撮影を開始して 6 時間後まで、X 軸方向と Y 軸方向への移動量は同程度であったが、12 時間以降では Y 軸方向への移動量がわずかに大きかった (図 5A, 白色バー)。持続群では、伸展刺激除去後 6 時間まで Y 軸方向への移動量が大きかったが (X/Y 比 = 0.7), 12 時間以降では、対照群と同様の移動方向を示した (図 5A, 灰色バー)。間欠群では、刺激除去後 24 時間まで、X/Y 比が 2.5 から 2.0 の範囲にあり、X 軸方向への移動量が大きいことが示された (図 5, 黒色バー)。

次に、細胞分裂方向を解析するために、伸展方向に対する細胞分裂軸の角度を測定した。全ての観察時間において、持続群と対照群の間に統計的な有意差はなく、平均値が 45° 前後であったのに対して、間欠群では、平均値は約 70° から 74° であった。つまり間欠群においては、細胞は伸展方向に対して垂直に近い方向に分裂する傾向があることが示された (図 5B)。

考察

本研究では、持続的および間欠的伸展刺激を除去した後の骨芽細胞の配列と、移動および分裂方向について検討した。その結果、機械的伸展刺激は骨芽細胞の形態や配列方向を変化させ、それに応じた移動方向および分裂方向の制御を引き起こすことが明らかとなった。

今回の結果では、細胞は与えられた伸展刺激に応じて配列し、その配列方向に移動した。これまでの研究においても、流体せん断応力を持続的に与えると、骨芽細胞は流水方向へ配列し移動することが示されており²²⁾、我々の結果と一致する。しかしながら、前述した研究では、細胞が配列と移動を制御された時間は刺激開始後 30 分間のみで、その後は刺激の影響を受けなくなったのに対して²²⁾、本研究では数時間から数十時間におよび細胞の配列と移動方向が規定されていた。さらに、持続的刺激に比べ間欠的刺激のほうが、

細胞の配列と移動方向に、より長時間影響していたことが明らかとなった。また、細胞の縦横比についても、持続的刺激に比べ、間欠的刺激のほうが変化は大きく、間欠群の細胞は著しく細長い形態を呈した。以上のように機械的刺激に細胞が応答する時間の長さや、形態変化の程度に違いを生じた要因として、細胞に加わる刺激の頻度の差が考えられる。

刺激の頻度が高いほど細胞に伝達されるシグナルと細胞の反応性が大きくなることについては、頻度の高い伸展刺激を与えることによって、骨芽細胞の細胞内カルシウム濃度が増加し、増殖や、ALP 活性も向上することが報告されている²³⁾。さらに、機械的刺激により細胞内に伝達されたシグナルは、Rho GTPase を活性化して細胞骨格を構成するアクチン線維の再編成を誘導するため、そのシグナルの量に応じて細胞の配列方向や形態が変化すると考えられる²⁴⁾。したがって、本研究において持続群と間欠群の間で反応の持続時間や細胞形態に違いが生じたのは、間欠群では伸展による刺激が繰り返されることで、持続的刺激に比較して細胞内シグナルが増強された結果ではないかと考えられた。

さらに細胞の分裂方向について解析を行った結果、間欠群では、細胞は配列方向と同様の方向に分裂する傾向を示した。細胞の配列と分裂方向の関係については、「long axis rule」が知られており、細胞は長軸に一致した方向に分裂すると報告されている¹⁶⁾。この法則に従い、間欠群では配列方向、すなわち長軸方向に分裂する傾向を示したと考えられた。しかしながら、持続群では、伸展刺激除去後6時間まで、細胞はある程度伸展方向に対して平行に近い配列を維持していたにも関わらず、分裂方向には明らかな傾向が認められなかった。その理由として考えられるのは、1つには、持続群では、細胞の配列方向の制御がそれほど明瞭なものではなかったため、分裂方向に明らかな影響が現れなかったのかもしれない。もう1つ考えられるのは、持続群では、間欠群ほどの著しい細胞の形態変形が生じなかったことが影響している可能性である。これまでの研究で、細胞分裂の方向は細胞変形の程度に依存し、著しい細胞の縦横比の増加は、分裂紡錘体の向きを強く規定することが報告されている²⁵⁾。したがって、細胞の配列方向だけでなく、細胞形態の変化も細胞分裂の方向性を制御する重要な因子となる可能性がある。

以上より、機械的伸展刺激は、骨芽細胞の配列方向を調節することによって移動方向を規定し、また、細胞形態を伸長させることにより分裂方向にも影響を与えたと考えられた。これらの結果から、機械的刺激は骨芽細胞の配列方向のみならず、移動方向や分裂方向をも制御することによって、骨組織形成の方向に影響を与える可能性が示された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導、御校閲を賜りました岡山大学学術研究院医歯薬学域口腔解剖学分野の岡村裕彦教授、歯科矯正学分野の上岡寛教授に心より感謝の意を評します。また、本研究の遂行に際し、御指導、御協力いただきました岡山大学学術研究院医歯薬学域口腔解剖学分野の池亀美華准教授、福原瑤子助教に謹んで感謝の意を表しま

す。最後に、本研究を行うにあたり多くの貴重な御援助と御協力をいただきました岡山大学学術研究院医歯薬学域システム生理学分野の森松賢順助教，分子医化学分野の王紫儀先生，歯科矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J. Biomech.* **43**: 108–118, 2010.
- 2) 森田真史, 山本真, 内田貞夫. 海綿骨の機械的性質とその骨梁構造依存性について. *材料* **33**: 1323–1329, 1984.
- 3) 松下任彦, 橋本伸朗, 福元哲也, 前田智, 中馬東彦, 他 大腿骨近位部の骨梁構造. *整形外科と災害外科* **68**: 470–473, 2019.
- 4) von Meyer GH. The classic: The architecture of the trabecular bone (tenth contribution on the mechanics of the human skeletal framework). *Clin. Orthop. Relat. Res.* **469**: 3079–3084, 2011.
- 5) Sasaki N, Matsushima N, Ikawa T, Yamamura H, Fukuda A. Orientation of bone mineral and its role in the anisotropic mechanical properties of bone--transverse anisotropy. *J. Biomech.* **22**: 157–164, 1989.
- 6) Nakano T, Kaibara K, Nagata N, Enomoto S, Marukawa E, et al. Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam X-ray diffractometer system. *Bone* **31**: 479–487, 2002.
- 7) Matsugaki A, Fujiwara N, Nakano T. Continuous cyclic stretch induces osteoblast alignment and formation of anisotropic collagen fiber matrix. *Acta Biomater.* **9**: 7227–7235, 2013.
- 8) Sato K, Ogawa Y, Ito S-I, Fujisawa S, Minami K. Strain magnitude dependent intracellular calcium signaling response to uniaxial stretch in osteoblastic cells. *J. Biomech. Sci. Eng.* **10**: 15-00242-15-00242, 2015.
- 9) Manokawinchoke J, Pavasant P, Limjeerajarus CN, Limjeerajarus N, Osathanon T, et al. Mechanical loading and the control of stem cell behavior. *Arch. Oral Biol.* **125**: 105092, 2021.
- 10) Matsuzaka T, Matsugaki A, Nakano T. Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoresponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli. *Biomaterials* **279**: 121203, 2021.
- 11) Li Z, Zheng J, Wan D, Yang X. Uniaxial static strain promotes osteoblast proliferation and bone matrix formation in distraction osteogenesis in vitro. *Biomed Res. Int.* **2020**: 3906426, 2020.

- 12) Hosaki-Takamiya R, Hashimoto M, Imai Y, Nishida T, Yamada N, et al. Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy. *J. Bone Miner. Metab.* **34**: 491–499, 2016.
- 13) Castanon I, González-Gaitán M. Oriented cell division in vertebrate embryogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**: 697–704, 2011.
- 14) Gillies TE, Cabernard C. Cell division orientation in animals. *Curr. Biol.* **21**: R599-609, 2011.
- 15) Refaaq FM, Chen X, Pang SW. Effects of topographical guidance cues on osteoblast cell migration. *Sci. Rep.* **10** (1): 20003, 2020.
- 16) Finegan TM, Bergstralh DT. Division orientation: disentangling shape and mechanical forces. *Cell Cycle* **18**: 1187–1198, 2019.
- 17) Sato M, Ohashi T. Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli. *Biorheology* **42** (6): 421–41, 2005.
- 18) Wang, D, Cai J, Zeng Z, Gao X, Shao X, et al. The interactions between mTOR and NF- κ B: A novel mechanism mediating mechanical stretch-stimulated osteoblast differentiation. *J. Cell. Physiol.*, 2020. doi.org/10.1002/jcp.30184.
- 19) Huang C, Miyazaki K, Akaishi S, Watanabe A, Hyakusoku H, et al. Biological effects of cellular stretch on human dermal fibroblasts. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **66** (12): e351–61. 2013.
- 20) Cheng Y, Zhu S, Pang SW. Directing osteoblastic cell migration on arrays of nanopillars and nanoholes with different aspect ratios. *Lab Chip* **21**: 2206–2216, 2021.
- 21) Uchida-Fukuhara Y, Hattori T, Fu S, Kondo S, Kuwahara M, et al. Maternal gut microbiome decelerates fetal endochondral bone formation by inducing inflammatory reaction. *Microorganisms* **10**: 1000, 2022.
- 22) Riehl BD, Lee JS, Ha L, Kwon IK, Lim JY. Flowtaxis of osteoblast migration under fluid shear and the effect of RhoA kinase silencing. *PLoS One* **12**: e0171857, 2017.
- 23) Winter LC, Walboomers XF, Bumgardner JD, Jansen JA. Intermittent versus continuous stretching effects on osteoblast-like cells in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A* **67**: 1269–1275, 2003.
- 24) Kaunas R, Nguyen P, Usami S, Chien S. Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 15895–15900, 2005.
- 25) Fernandez P, Maier M, Lindauer M, Kuffer C, Storchova Z, et al. Mitotic spindle orients perpendicular to the forces imposed by dynamic shear. *PLoS One* **6**: e28965, 2011.

脚注

本論文の一部は以下の学会において発表した。

第 42 回 日本骨形態計測学会 (2022 年 7 月)

第 127 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (2022 年 3 月)

図の説明

図 1 細胞伸展装置

(A) 細胞に伸展刺激を与えるためのシリコン製ストレッチチャンバー。チャンバーの両端を伸展装置の二つのバーに固定し、片方のバーを矢印の方向に移動することによりチャンバーを変形させ、細胞に伸展刺激を加える。(B) 2種類の伸展方法を示す模式図。持続的伸展刺激(左)では、チャンバーを一定の変形率(10%)で伸展した状態を持続し、間欠的伸展刺激(右)では、同じ変形率で間欠的に(伸展 2.5 秒+弛緩 2.5 秒のサイクルを 1 分間に 12 回繰り返す)伸展する。

図 2 伸展刺激による細胞の経時的な形態変化

伸展刺激開始後(A)と伸展刺激除去後(B)の、MC3T3-E1細胞の位相差顕微鏡像。上段は対照群、中段は持続群、下段は間欠群を示す。(A)刺激開始後0, 0.5, 1, 3, 6時間の細胞形態。6時間後、伸展方向に対して、持続群では概ね平行方向、間欠群では垂直方向に配列した。(B)刺激除去後0, 6, 24, 48時間の細胞形態。刺激除去直後で見られた細胞の配列方向は、持続群では6時間後まで、間欠群では24時間後まで維持された。対照群では、どの観察時間においても特定の配列方向はみられなかった。両矢印:伸展方向、スケールバー:100 μ m

図 3 伸展刺激による細胞の形態変化

F-アクチン染色像および、細胞と核の縦横比。緑色はF-アクチン、青色はDAPI染色した核を示す。(A)伸展刺激除去後0時間。間欠群の細胞形態は他群より伸長しており、細胞の縦横比(長軸/短軸)は著しく大きかった。(B)伸展刺激除去後24時間。間欠群の縦横比は0時間後より減少していたが、他群に比べ有意に大きかった。両矢印:伸展方向、スケールバー:100 μ m。* $P < 0.05$, 一元配置分散分析法/Bonferroniの多重比較検定

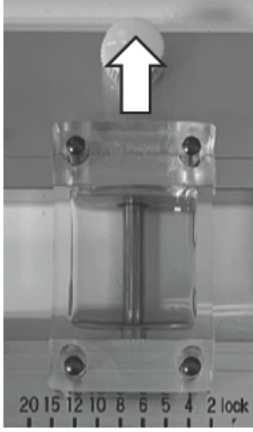
図 4 伸展刺激による細胞の配列方向の変化

F-アクチン染色した細胞の外形を、CellProfilerで認識させた画像(左)と、細胞の配列方向を示すヒストグラム(右)。配列方向は伸展方向に対する細胞の長軸の角度で示した。(A)刺激除去後0時間。(B)刺激除去後24時間。両矢印:伸展方向

図5 伸展刺激による細胞の移動および分裂方向の変化

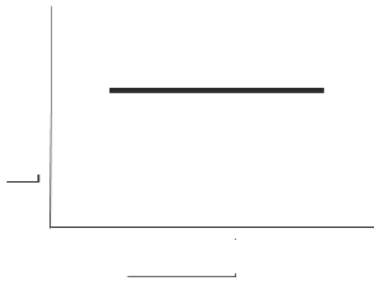
(A) 移動方向は、各計測時間内における X 軸方向への移動距離と、Y 軸方向への移動距離の比率 (X/Y 比) として示す。伸展方向を Y 軸とする。(B) 分裂方向は、伸展方向に対する細胞の分裂軸の角度で示す。角度 0° は伸展方向を、 90° はそれに対して垂直方向を示す。6, 12, 18, 24 時間で計測した細胞数：対照群, 38, 79, 50, 62；持続群, 28, 89, 71, 30；間欠群, 35, 143, 76, 75。* $P < 0.05$, 一元配置分散分析法/Bonferroni の多重比較検定

A



B

持續的伸展刺激



間欠的伸展刺激

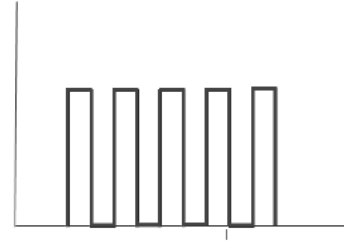


图 1

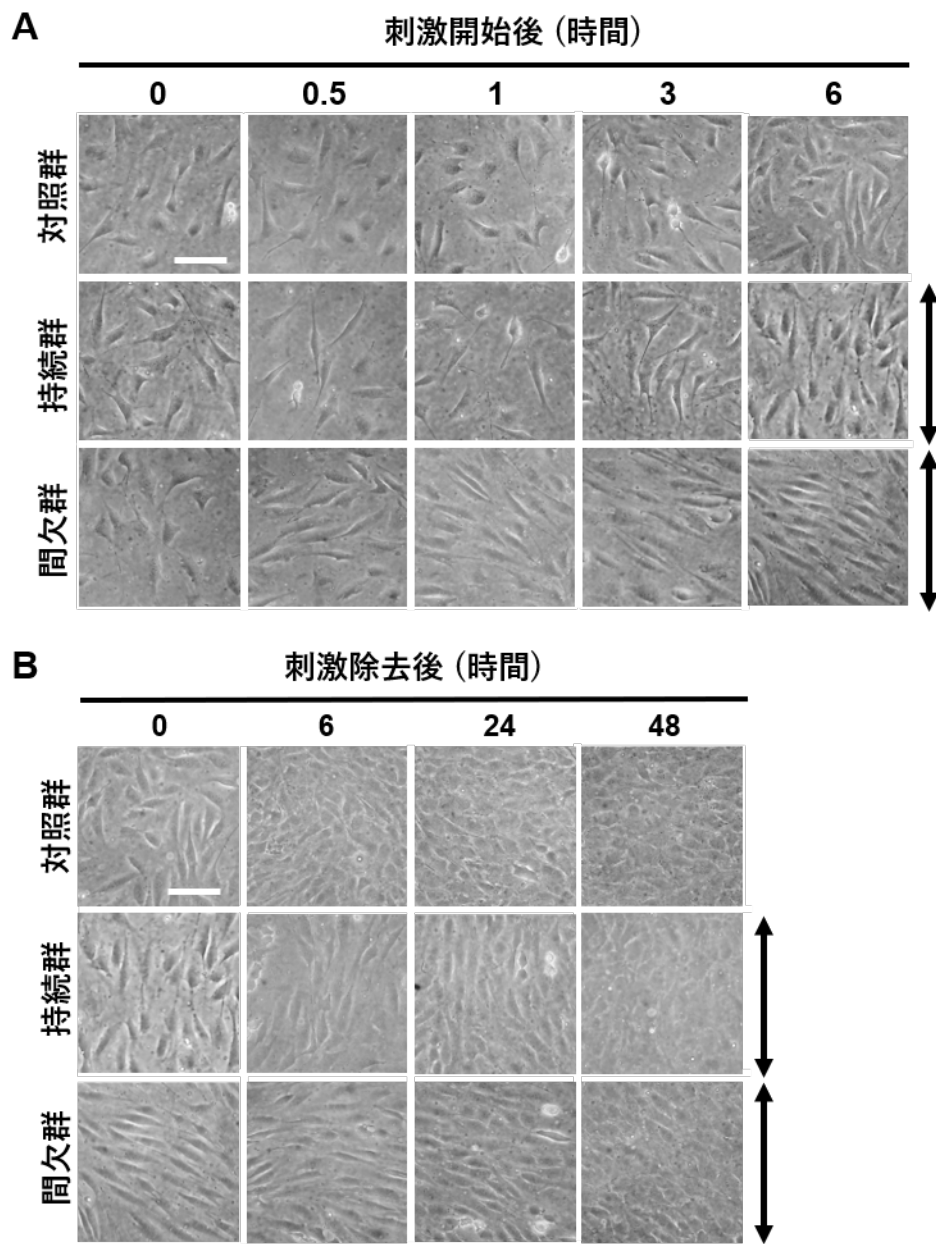


図 2

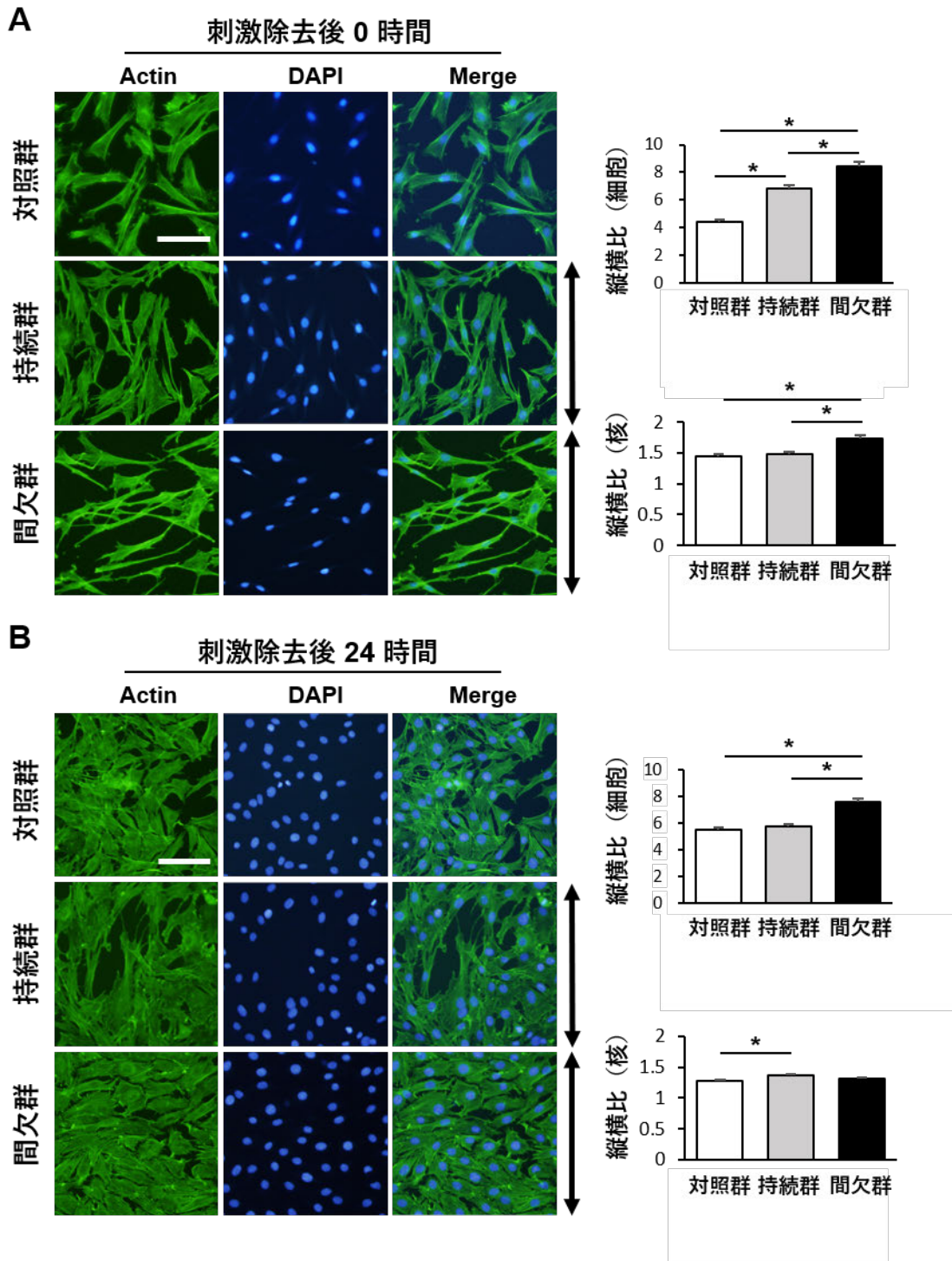


図 3

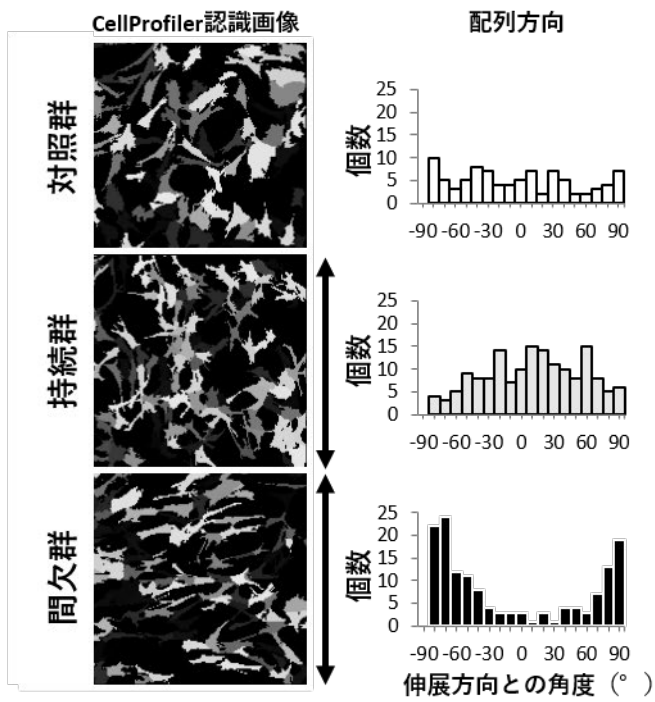
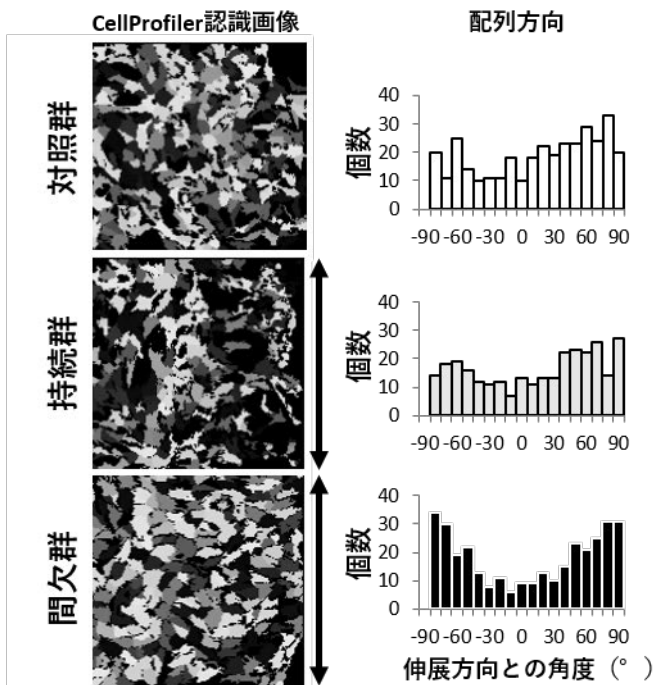
A**刺激除去後 0 時間****B****刺激除去後 24 時間**

図 4

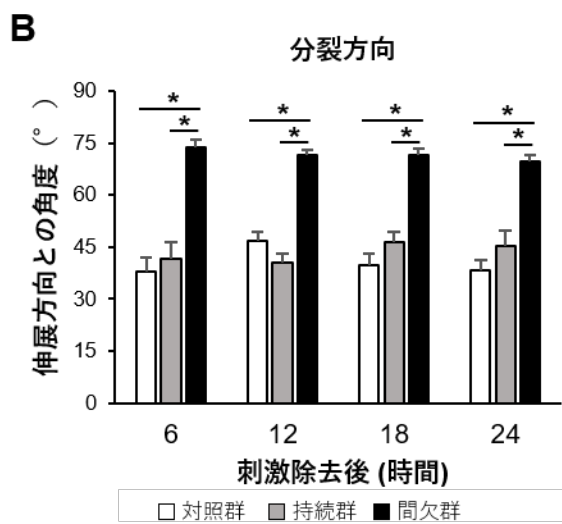
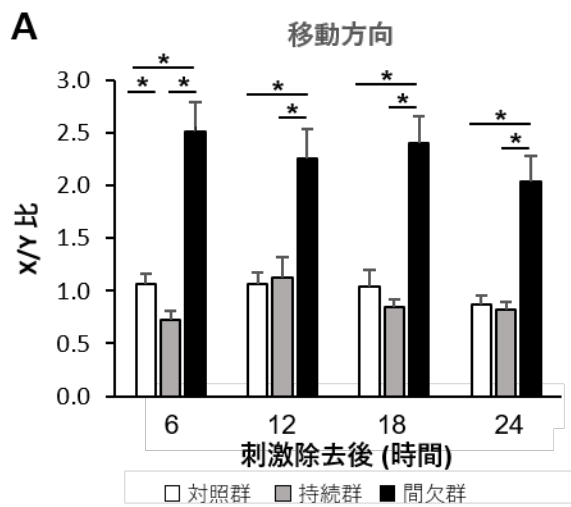


図 5