

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23651099
研究課題名（和文） 蛍光ライブイメージングを用いた細胞間に発生する力学量測定法の確立
研究課題名（英文） A method for observation of multi-cellular mechanics by fluorescent microscopy
研究代表者 川端 和重 (KAWABATA KAZUSHIGE) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授 研究者番号：20261274

研究成果の概要（和文）：蛍光ライブイメージングと画像解析法により、細胞骨格ならびに細胞間に発生する変形を評価する手法の確立を目指した。この手法は、細胞骨格間の力学相互作用や細胞集団の運動を議論するための足掛かりとなるはずである。

研究成果の概要（英文）：We tried to establish methods to measure strain within cytoskeletons or strain between cells. These methods will help us to study mechanical interaction between cytoskeletons or multi-cellular movement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目： ナノ・マイクロ科学/ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード： イメージング・力学測定・細胞集団

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物における胚の発生には、細胞集団が協調して運動することが重要である。協調的に運動するためには、ケモアトラクトのような生化学的な要因と、細胞が出す「力」やそれに伴う「歪」などの物理学的な要因が重要だと考えられている。生化学的な要因については遺伝子解析などにより少しずつ明らかになってきているが、物理学的な要因については、測定の困難さからか立ち遅れているのが現状である。新たな測定・解析手法を用いて、細胞集団内における物理学的な要因を調べてゆくことが重要だと考える。

従来の方法でライブイメージングから「歪」を算出する場合、手作業による解析が主であった(例えば $\alpha$ -actinin のドット間の距離をマニュアルで計測する)。しかしながらこの方法では、画像内の特徴的な点を人が判断するために、対象とするタンパク質の局在に対する制約が存在する。一方、本研究では、画像の蛍光強度分布を元に「歪」解析を行う

ため、アクチン繊維のように一見すると一つながりの繊維に見えても、解析アルゴリズムにより、その繊維中に発生する「歪」を解析することが可能になる。また、FRAPを用いた「流れ」解析では、局所的な情報は得られても、細胞全体や細胞集団全体に対する空間分布を測定することはできない。これらの問題点を解決するような手法開発が必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

多細胞生物の器官形成において細胞間の張力等の力学効果が注目されている。本研究では、この効果を明らかにするために、細胞集団の形態形成や集団運動における細胞内や細胞間に生じる「歪」の空間分布およびその時間発展を可視化する手法を開発する。本手法では、デジタル画像相関法を発展させて、細胞集団の長時間動画から「歪」の空間分布およびその時間発展を可視化することができる画像解析方法を開発する。次に、この解

析を高精度でおこなうための、細胞や細胞集団の細胞骨格、細胞接着や細胞内張力等に関する情報分子の分布やその時間変化の観測法の最適化をおこなう。これらによって、細胞が形態形成時や集団運動時における協調性に対する力学的効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

細胞集団が運動する際の細胞-細胞間における力学バランスを明らかにするために、蛍光タンパク質を融合させた細胞間接着タンパク質のライブセルイメージングを行い、得られた画像をデジタル画像相関法によって数値解析することで、細胞集団全体に対する「歪」の空間分布を測定する。さらに、細胞集団における個々の細胞の運動方向と「歪」の空間分布と対応させることで、細胞集団による協調的運動の力学モデルを提案する。本研究では以下のことに取り組んだ。

- (1) 細胞骨格に発生する物理量測定法の確立
- (2) 細胞集団運動時における細胞間接着領域の物理量の時空間変化測定

### 4. 研究成果

(1) 細胞骨格に生じた物理量を評価する手法の開発を行った。蛍光標識した対象物が動く様子を一連の画像として撮影し、画像間での同一点の探索から対象物の変位の空間分布を求めるプログラムを作成した(画像相関法)。開発したプログラムを用いて、蛍光タグ付き中間径フィラメント(vimentin)を細胞に発現させ、他の細胞骨格フィラメントであるアクチン繊維を崩壊させる試薬(Cytochalasin D)を投与した際における中間径フィラメント繊維に発生した変位を評価した(図1)。さらに平行移動成分と歪成分の平均値を解析し、時間変化を評価した。

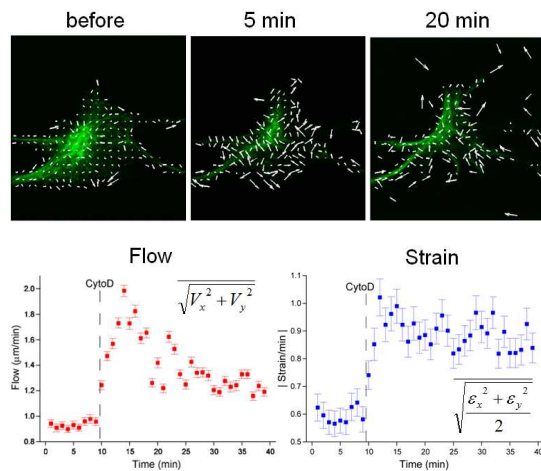


図1 中間径フィラメントに生じた変形解析

アクチン繊維の崩壊とともに平行移動成分、歪成分の両方ともに上昇すること、平行移動成分についてはその後減少してゆくことを発見した。これらの結果は、細胞内でアクチン繊維とビメンチン繊維が力学的に相互作用していることを示唆している。

さらに、他の細胞骨格である微小管とビメンチン繊維との力学的相互作用を明らかにするため、蛍光タグ付き中間径フィラメントと微小管(tubulin)を発現させた細胞に対して、微小管を崩壊させる試薬(Nocodazole)を投与し、その際の中間径フィラメントに発生した変位を画像相関法によって評価した。さらに、変位の空間分布から歪の平均値の時間変化を評価した(図2)。

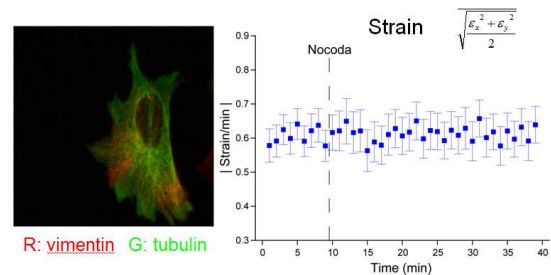


図2 微小管崩壊下での中間径フィラメントに生じた変形解析

アクチン繊維を崩壊させたときとは異なり、中間径フィラメント繊維には有意な歪は生じなかった。この結果は、微小管は中間径フィラメントとさほど大きな力での相互作用をしていないか、もしくは、微小管の物性値がアクチン繊維よりも小さいか、どちらかの可能性を示唆している。

画像相関法プログラムの開発と細胞骨格タンパク質発現用プラスミドの構築によって、細胞骨格に生じた変形を評価することが可能となり、さらには、細胞骨格間の力学バランスを議論することが可能となった。

(2) 細胞-細胞間に生じた変形を評価する方法を模索した。細胞-細胞間接着タンパク質に赤色もしくは緑色の蛍光タンパク質を結合させ、上皮細胞集団に発現させた。赤色と緑色の細胞が隣接している状況のものを細胞集団内から探し出し、光学顕微鏡を用いて細胞間接着領域を観察した。広い視野での観察では、赤と緑が重なり、黄色に見えたが、拡大すると、細胞-細胞間の赤と緑色をわずかではあるが分離することが出来た。細胞集団に移動スペースを与えないような密集した状況でタイムラプス観察したところ、この細胞間距離は一定であった。しかしながら、個々の細胞の収縮力を増加させる試薬を投与したところ、細胞間距離が一時的に短くなった。さらに、数分という時間スケールで細胞間距離は元のレンジに戻って行った。現在、

この手法の妥当性を免疫蛍光染色法や他の顕微鏡法と合わせながら、確認をすすめている。

細胞集団の運動の定量化に着手した。核に局在するタンパク質に蛍光タンパク質を融合させ、それを上皮細胞に導入することで、恒常的に発現するような株を作製した。さらに核のトラッキングから、個々の細胞の移動の数値化を試みた (図 3)。

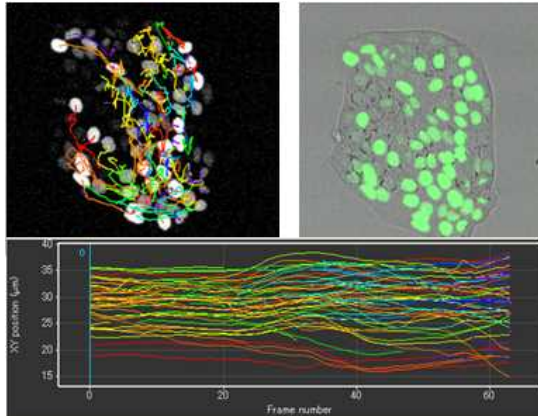


図 3 細胞集団に対する移動解析

細胞の運動解析の結果、観察のあるタイミングで移動速度が増加する細胞と減少する細胞が存在していることが明らかとなった。この時間的空間的な移動速さの違いが細胞集団全体での特徴的な移動様式にどのように貢献するのか、細胞-細胞間の変形解析に加えて、細胞下の基質の変形解析法を構築することにより、今後、明らかにしていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata:

"Tempo-Spatial Change of Cellular Stiffness and Geometry in the Process of Developing Epithelial Cell-Cell Adhesion Measured by Atomic Force Microscopy"  
Japanese Journal of Applied Physics, (2013) in press (査読有).

(2) S. Ishihara, M. Yasuda, T. Nishioka, T. Mizutani, K. Kawabata, H. Shirato, H. Haga:

"Irradiation-tolerant lung cancer cells acquire invasive ability dependent on dephosphorylation of the myosin regulatory light chain"  
FEBS Letter, Vol. 587(6), (2013) 732-6 (査

読有).

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.055

(3) K. Takemoto, T. Mizutani, K. Tamura, K. Takeda, H. Haga, K. Kawabata:

"The number of cyclic stretch regulates cellular elasticity in C2C12 myoblasts"  
CellBio, Vol. 1(1), (2012) 1-10 (査読有).  
DOI: 10.4236/cellbio.2012.11001

(4) N. Seito, T. Yamashita, Y. Tsukuda, Y. Matsui, A. Urita, T. Onodera, T. Mizutani, H. Haga, N. Fujitani, Y. Shinohara, A. Minami, N. Iwasaki:

"Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice"  
Arthritis & Rheumatism, Vol. 64(8), (2012) 2579-88 (査読有).  
DOI: 10.1002/art.34463.

(5) 水谷 武臣:

"2次元と3次元環境下での細胞と細胞骨格の力学計測"  
M&M2012 材料力学カンファレンス論文集 (2012) OS1101 (査読無).

(6) K. Tamura, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata:

"Active fluctuation in the cortical cytoskeleton observed by high-speed live-cell scanning probe microscopy"  
Acta Biomaterialia, Vol. 7(10), (2011) 3766-3772 (査読有).  
DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.013.

[学会発表] (計 7 件)

① R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata: Tempo-spatial Change of Cellular Stiffness in the Process of Developing Epithelial Cell-cell Adhesion Measured by Atomic Force Microscopy, 20th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2012年12月17日, Okinawa Kariyushi Urban Resort Naha(那覇市).

② 水谷 武臣: 2次元と3次元環境下での細胞と細胞骨格の力学計測, M&M2012 材料力学カンファレンス, 2012年9月22日, 愛媛大学(松山市).

③ R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata: Evaluation of microtubule deformation by live cell imaging and image analysis, 第50回日本生物物理学会年会,

2012年9月22日, 名古屋大学(名古屋市).

④水谷 武臣: 画像解析を用いた細胞内外の力学量計測, 第四回「光塾」, 2012年8月26日, 北海道大学(札幌市).

⑤田中 良昌、水谷 武臣、芳賀 永、川端和重: 細胞骨格に発生した不均一な歪み: ライプセルイメージングと画像解析による力学量測定法の提案, 2011年度日本生物物理学会北海道支部例会, 2012年3月6日, 旭川市民文化会館(旭川市)

⑥ T. Mizutani: Imaging for Cellular Mechanics: Dynamic Behavior of Cytoskeletal Networks and Cellular Contractile Force, The Fifth Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology, 2011年11月5日, Huashia Hotel (China).

⑦水谷 武臣: 細胞の時空間ダイナミクス計測: ライプセルイメージングから細胞骨格の力学バランスと細胞が発生する力をみる, 九州大学共同利用研究会, 2011年9月21日, 九州大学(福岡市).

[その他]

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川端 和重 (KAWABATA KAZUSHIGE)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 20261274

### (2)研究分担者

水谷 武臣 (MIZUTANI TAKEOMI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号: 40451405