

平成30年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03004

研究課題名(和文)革新的な細胞収縮力可視化技術の開発

研究課題名(英文)Development of cell contraction assay

研究代表者

出口 真次(Deguchi, Shinji)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：30379713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の収縮力を従来よりも効率良く可視化・定量化することができる技術の開発を研究目的とする。適度な弾性率をもつシリコンの表面に化学的・力学的な性質が均質な親水性薄膜を形成する。細胞を播種し、細胞収縮力の負荷により生じる薄膜の変形を位相差顕微鏡により検出する。得られた画像について画像解析を行い、薄膜の変形量を定量化する。個々の細胞が発生する収縮力を定量化できる。とりわけ画像解析については自動処理コードを構築して測定効率、すなわちスループットを向上させた。本研究で開発したシステムは細胞収縮力の定量化アッセイとして、とりわけ分子細胞生物学分野において有効活用できるものである。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop a new technology that allows for high-throughput i.e. highly efficient visualization/quantification of cellular traction forces. Hydrophilic membrane is created in a spatially uniform manner over the surface of silicone materials. With cells plated on the flexible membrane, microscopy is performed to detect deformations of the membrane induced upon the loading of cellular contractile forces. The microscope is equipped with a stage incubator and stepping motors, with which time-lapse of the cells and membrane are imaged at multiple points of the membrane substrate. With image analyses on the acquired series of the images, the magnitude of the deformations of the membrane is quantified. Automatic image analysis code is built to compute the magnitude of the cellular contractility-driven deformations of the membrane. The system developed here is applicable to cell biology studies as a tool to quantify the contractility of individual cells.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞バイオメカニクス メカノバイオロジー 細胞収縮力 メカノミクス 非筋II型ミオシン

1. 研究開始当初の背景

個々の接着細胞の収縮力は古くから調べられてきた。しかしいずれの方法にも高度な実験スキルが求められるため、細胞生物学の分野で日常利用されるには至っていない。さらに、従来法（最も利用されている蛍光マイクロビーズ法）は、細胞コロニーなどの細胞「群」を対象とした広範囲計測には不向きである。このような細胞群を形成する上皮細胞や内皮細胞は、癌や動脈硬化の進展メカニズムの研究対象として重要であり、とりわけ昨今その中で細胞収縮力が果たす役割に関心が向けられている。その点において、本研究で開発する技術は細胞群、さらにはその中の個々の細胞における収縮力をも評価でき、大きく研究対象を広げられる点において革新的であると言える。

2. 研究の目的

近年、が重要な役割を果たしていることが分かり、注目されている。従来の収縮力測定方法は実験が難しく、関連研究の深化と裾野拡大を妨げる要因となっている。本研究では、細胞の収縮力を簡便に定量評価できる新しい方法を開発する。本研究を通して当技術の汎用性と有効性が示されれば、従来法の多くの欠点を克服していることも鑑み、当技術は革新的な細胞収縮力研究手法として広く役立てられると期待できる。

3. 研究の方法

シリコンエラストマー (SE と略記) を培養皿に一定量滴下し、固定回転数・時間でスピコートし、硬化させる。酸素プラズマ発生装置の電極上にヒーターを設置し、その上にこの培養皿を固定する。この培養皿には、あらかじめ観察面のガラスよりも熱膨張係数の高い材料 A (主にポリスチレンを使用) を周囲に取り付けておく。一定温度 B (条件によって異なるが 40 度程度) に加熱した状態で低真空状態 (20 パスカ) となるように脱気し、そのまま高電圧をかけて酸素プラズマを一定時間 SE 表面に照射する。その結果、SE の主鎖の一部を成す Si が二つの酸素原子 O によって拘束されるために、巨視的には弾性率が高くなるとともに、酸素原子の付加により親水的となる。この改質は PDMS の表層から 5nm (X 線光電子分光による測定) 以内で起こる。つまり、柔らかい SE の表面に硬い改質 SE の薄膜が形成される。この後に培養皿を大気圧および実験温度に戻し、熱膨張係数の高い材料 A が収縮して改質 SE を圧縮する。ちょうど改質 SE の座屈ひずみ (圧縮によってシワが生じるまでに必要な変形量) を解消するように初期温度 B を設定すれば、その後に接着させた細胞が収縮した場所に微小なシワを生じさせることができる。改質 SE は親水的であり、細胞外マトリクスを事前にコーティングのうえ任意の接着細胞を播種することができる。さらにこの技術を、パ

ターニング技術と併用すれば、上記の材料 A を用いずとも高い感度を有する改質 SE を得ることができる。このシワは、細胞の収縮量に依存して基板表面に可逆的に現れ、シワの方向は (各位置における主たる) 収縮方向と垂直の角度を成す。シワの振幅は 30~300nm (原子間力顕微鏡による測定) であり通常の位相差顕微鏡によって明確に観察でき、蛍光標識を必要としない。細胞の増殖率は完全な平面基板に培養したときと有意な差はなく、シワの存在は細胞の動きに特に影響を及ぼさない。画像解析によりシワを自動抽出し、シワの長さ・本数・輝度を算出するソフトの開発も併せて行った。

4. 研究成果

細胞を用いた実証実験を幾つか行った。二例を挙げると、まず慢性腎炎との相関が高い非筋 IIA 型ミオシンの変異体を作製して腎細胞に強制発現し、野生型と比べて細胞の形態については大差がないものの、細胞収縮力に有意な減少をもたらすことを明らかにした (発表論文②に該当)。また、上皮細胞が集団移動する際に前縁に位置する間葉系細胞状の形態を獲得する細胞について、周囲の上皮細胞よりも大きな収縮力を発生することを明らかにした (発表論文③に該当)。また、個々の上皮細胞の形態と主たる収縮力の方向には特定の相関があることを見出した。

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 9 件)

① Ichikawa, T., Kita, M., Matsui, T.S., Ichikawa-Nagasato, A., Araki, T., Chiang, S.H., Sezaki, T., Kimura, Y., Ueda, K., Deguchi, S., Saltiel, A.R., Kioka, N., Vinexin family (SORBS) proteins play different roles in stiffness-sensing and contractile force generation. *Journal of Cell Science*, 130, 3517-3531, 2017. 査読有
doi: 10.1242/jcs.200691

② Fukuda, S.P., Matsui, T.S., Ichikawa, T., Furukawa, T., Kioka, N., Fukushima, S., Deguchi, S., Cellular force assay detects altered contractility caused by a nephritis-associated mutation in nonmuscle myosin IIA. *Development, Growth & Differentiation*, 59(5), 423-433, 2017. 査読有
doi: 10.1111/dgd.12379

③ Deguchi, S., Saito, A.C., Matsui, T.S., Huang, W.J., Sato, M., The opposite mechano-response of paxillin phosphorylation between subcellular and whole-cell levels is explained by a minimal model of cell-substrate adhesions. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 12(2), 16-00670, 2017. 査読有

doi: 10.1299/jbse.16-00670

④ Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., Microcontact peeling: a cell micropatterning technique for circumventing direct adsorption of proteins to hydrophobic PDMS. *Current Protocols in Cell Biology*, 75, 10.21.1-10.21.8, 2017. 査読有

doi: 10.1002/cpcb.22

⑤ Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., New wrinkling substrate assay reveals traction force fields of leader and follower cells undergoing collective migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 975-979, 2017. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.142

⑥ Ohishi, T., Noda, H., Matsui, T.S., Jile, H., Deguchi, S., Tensile strength of oxygen plasma-created surface layer of PDMS. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 27, 015015, 2017. 査読有

doi: 10.1088/0960-1317/27/1/015015

⑦ Sakane, Y., Yoshizawa, S., Nishimura, M., Tsuchiya, Y., Matsushita, N., Miyake, K., Horikawa, K., Imoto, I., Mizuguchi, C., Saito, H., Ueno, T., Matsushita, S., Haga, H., Deguchi, S., Mizuguchi, K., Yokota, H., Sasaki, T., Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides “law and order” in collective cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 27(20), 3095-3108, 2016. 査読有

doi: 10.1091/mbc.E16-05-0332

⑧ Deguchi, S., Hotta, J., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Viscoelastic and optical properties of four different PDMS polymers. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 25, 097002, 2015. 査読有

doi: 10.1088/0960-1317/25/9/097002

⑨ Deguchi, S., Kudo, S., Matsui, T.S., Huang, W., Sato, M., Piezoelectric actuator-based cell microstretch device with real-time imaging capability. *AIP Advances*, 5(6), 067110, 2015. 査読有

doi: 10.1063/1.4922220

[学会発表] (計 15 件)

① 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, Dec. 6-9
藤原佐知子, 松井翼, 出口真次, 水野健作, “Rho-GEF Solo は細胞-基質間接着における力覚応答に関与し上皮腺房形成を制御する”

② 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, Dec. 6-9
松井翼, 三浦壮, 出口真次, “細胞発生力を評

価する画像解析手法の開発”

③ 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, Dec. 6-9

出口真次, 徳永昌也, 松井翼, 福島修一郎, “細胞-基質接着の微細構造、分子動態および力分布の間の密接な関係性”

④ 第 76 回 日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, Sept. 28-30

S. Deguchi, “Detecting endogenous forces of cells subjected to mutations and drugs”

⑤ 5th Swiss-Japan Workshop on Biomechanics SJB 2017, Zermatt, Sept. 14-17

S. Deguchi, T. S. Matsui, T. Ohishi, “Biomechanical role of α -actinin-1 in forming focal adhesions”

⑥ XXVI Congress of the International Society of Biomechanics 2017, 9th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Brisbane Convention & Exhibition Centre, July 23-27,

S. Deguchi, T. S. Matsui, “Unique contractile properties of individual stress fibers may explain tension-induced immobilization of focal adhesions”

⑦ 第 69 回日本細胞生物学会大会, 仙台国際センター, June 13-15

出口真次, 松井翼, “細胞の力くらべ: 高いスループットで収縮力を定量評価するアッセイの開発”

⑧ 第 24 回 HAB 研究機構学術年会, 昭和大学, June 1-3

福田翔太, 松井翼, 市川尚文, 古川太一, 木岡紀幸, 福島修一郎, 出口真次, “細胞の「力比べ」アッセイ”

⑨ 第 29 回バイオエンジニアリング講演会, ウィンクあいち, Jan. 19-20

石川晃大, 松井翼, 出口真次, “アクチン結合タンパク質トランスジェリン1の結合動態調節機構”

⑩ 第 29 回バイオエンジニアリング講演会, ウィンクあいち, Jan. 19-20

出口真次, 松井翼, 田中裕一郎, 呼格吉楽, “スループットの高い細胞トラクションフォースアッセイの開発”

⑪ 第 29 回バイオエンジニアリング講演会, ウィンクあいち, Jan. 19-20

松井翼, 出口真次, “高効率な細胞収縮力評価システムの開発-自動画像解析について”

⑫ 2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference, Hapuna Beach Prince Hotel, USA, Jan. 3-7

S. Deguchi, S. Yokoyama, T. S. Matsui, T. Ohishi,
“Local geometry sensing by individual focal adhesions”

⑬ 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィ
コ横浜, Nov. 30 – Dec. 2

松井翼, 出口真次, “個々の細胞が発生する力
を高効率に定量化するシステムの開発”

⑭ International Conference on Flow Dynamics
2016, Sendai International Center, Oct. 11

Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Ohishi,
T., “New traction force microscopy suggests a
mechanism of local geometry sensing by
individual cell adhesions”

⑮ 第 68 回日本細胞生物学会大会, 京都テル
サ, June, 15-17

出口真次, 松井翼, 倉賀野正弘, 高橋正行,
“ミオシン調節軽鎖のリン酸化は個々の細胞
が発生する収縮力の大きさに相関はある
か?”

[図書] (計 4 件)

① 出口真次, 高度物理刺激と生体応答. 2.2.7
節 細胞の力学応答における張力ホメオスタ
シスの役割. 養賢堂, 2017.

② 出口真次, 細胞のマルチスケールメカノ
バイオロジー. 第 4 章 細胞接着のメカノバ
イオロジー: 細胞収縮性に依存した機能調節
の仕組み. 森北出版, 2017.

③ Kaunas, R., Deguchi, S., Cyclic
stretch-induced reorganization of stress fibers in
endothelial cells. In *Vascular Engineering*. Eds:
Tanishita, K., Yamamoto, K., Springer, 99-110,
2016.

④ 出口真次, 松井翼, 佐藤正明, *Dojin*
Bioscience シリーズ・メカノバイオロジー. 細
胞が力を感じ応答する仕組み. 第 2 章 細胞
における力の発生と維持機構. 17-33, 2015.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等
<http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp>
<https://www.facebook.com/DivBioengOsakaUniv/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 真次 (DEGUCHI, Shinji)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号 : 30379713

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 研究協力者

松井 翼 (MATSUI, Tsubasa)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・講師
研究者番号 : 50638707