

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19912

研究課題名(和文)顕微鏡下複屈折測定の高分解能化と3次元化による組織内細胞の収縮力計測法の開発

研究課題名(英文)Development of a method for measuring the contractile force of cells in tissues by increasing the resolution and measuring birefringence in three dimensions

研究代表者

杉田 修啓(Sugita, Shukei)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20532104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は自ら収縮力を生じ、細胞遊走や筋力の発生等、様々な細胞機能を実現している。細胞の収縮力を計測することは生命科学現象の理解には必要不可欠な技術であるが、組織内細胞の収縮力を計測するような技術は存在していない。そこで、この組織内細胞の収縮力計測確立に挑んだ。ディッシュ上に培養した細胞の収縮力評価ができることを確かめた後、この収縮力の発生源である細胞骨格で光弾性特性が変化することを確かめ、手法としての有用性を確認した。そして、透過型の偏光共焦点顕微鏡の作製により、3次元化撮影を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が発生する収縮力は、病変で見られるタイプだとその収縮力の大きさが異なるなど、生命活動にも影響するため、この測定は重要な基本技術である。また、この収縮力の大きさは周囲環境で変わることが知られているため、柔らかい基板上で計測する既存法では、生体内環境での収縮力計測ができない。そのため、組織内にいる細胞でも収縮力を測定する方法開発に取り組んだ。収縮力の発生源である細胞骨格にも光弾性法が適用できたことから、光弾性を利用した方法の有用性を確認することができた。しかし、3次元化は達成できておらず、今後の課題克服が必要である。

研究成果の概要(英文)：Cells produce contraction force. These contraction forces play an important role in cell functions such as cell migration and generation of muscle force. Although the measurement of the contraction force of cells in tissues is necessary to understand the biological phenomena, such techniques have not been well developed. In this study, we have tried to establish the method of the contraction force of cells in tissues using photo-elasticity. After the confirmation that photo-elasticity can evaluate the contraction force of the incubated cells on a dish, we confirmed this method can evaluate the changes in the force in the cytoskeleton. This indicates the usefulness of the proposed method. Then, we tried to evaluate the force in 3D under the confocal and polarized microscope.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：複屈折 リタデーション 光弾性 細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は自ら収縮力を生じる。この収縮力により、細胞遊走や筋力の発生等、様々な細胞機能が実現されている。また、近年では、組織の形態形成や遺伝子発現等の生命現象にも影響することが判明しており、細胞の収縮力計測は生命科学現象の理解には必要不可欠な技術である。そこで、様々な細胞収縮力の測定方法が提案されてきた。

1つの計測手法として、柔らかい基質上に細胞を培養し、細胞収縮力による基質変形量から力を求める方法がある。Harith, A. K.らは (Science, 208(4440), 177-179, 1980)、薄いシリコンゴム基板上に細胞を播種し、細胞収縮力で発生したしわから細胞の収縮力変化を推定した。さらに、Lee, J.ら (J. Cell Biol., 127(6), 1957-1964, 1994) は、柔らかい基板内に微小なパーティクルを埋め込み、細胞が収縮力を生じた際のこのパーティクルの変位と基板弾性率から収縮力の応力分布を求めた (Traction force microscopy)。また、この方法を利用して、細胞の発生する収縮力自体を計測する方法も提案されている (Butler, J. P. et al., Am. J. Physiol., 282(3), C595-605, 2002)。同様な方法として、Tan, J. L.ら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100(4), 2006) は、剣山状の形状をしたシリコンゴム基板上に細胞を播種し、細胞につかまれた剣山が細胞収縮力でたわむ量から細胞収縮力を計測した。しかし、これらの手法は細胞外の変形を計測しており細胞内の力は分からない上、かたい基板上では変形が小さく計測できない。さらに、多くの細胞は細胞同士が接着してひしめき合った状態にあるが、このような状態では隣り合う細胞が逆方向に引張合うと基板の変形が生じず計測できない、等の問題もある。

もう1つの収縮力測定法には、細胞内に導入した蛍光共鳴エネルギー移動プローブの蛍光状態変化から力を求める手法 (Meng et al, FEBS J, 275(12), 3072-3087, 2008) がある。このカプローブは、遺伝子組み換え技術を利用して人工的に作製したセンサタンパク質であり、これを細胞に導入し、力が加わった場合にセンサタンパク質が変形することで蛍光状態が変化し、これを検知して力を測定する。しかし、細胞収縮力の発生源であるストレスファイバ (細胞を力学的に支持する細胞骨格) 内タンパク質の張力計測プローブがなく、プローブを細胞内に導入して発現させる必要があり、非分裂細胞や組織内細胞には適用困難であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、光弾性を用いた収縮力計測を提案する。光弾性では物質の引張方向の屈折率が変わるため、振動方向が異なる2偏光を物質に同位相で入射させても出射2偏光間に位相差 (リタデーション) が生じる。即ち、力変化をリタデーション変化として測る手法である。これまでに、収縮力を生じるストレスファイバ領域からリタデーションが生じており、収縮薬や弛緩薬を投与すると、それぞれリタデーションが増加・減少することを確認し、収縮力計測ができる可能性を得てきた。しかし、まだ細胞単位でリタデーション変化を確認したのみであり、ストレスファイバ自体で力が増減するか、検証が完了していない。また、ディッシュ上に播種された培養細胞、すなわち2次元的な情報しか得られてない。そのため、まずストレスファイバ単体での力計測が可能なのかを検証するとともに、リタデーションによる張力計測を2次元から3次元に拡張することを目指した。これにより、組織内細胞のように本来の細胞環境で張力計測する手法を確立することに取り組んだ。

3. 研究の方法

3.1 ストレスファイバの収縮力変化時のリタデーション変化

ブタ胸大動脈から Explant 法により血管平滑筋細胞を単離した。継代培養して継代数 2-12 のものを用いた。Matsui, T. S.ら (Biochem. Biophys. Res. Commun., 395(3), 301-306, 2010) を参考に、平滑筋細胞からストレスファイバを単離しつつディッシュ上に貼り付けた状態にした。このストレスファイバに対して収縮薬を投与し、リタデーション変化を計測した。リタデーション計測には、カメラ組み込み型の複屈折イメージングシステムを用いた。また、リタデーション計測と同時に、微分干渉顕微鏡による撮影も同時に行い、収縮薬投与前後におけるストレスファイバ形状の変化も調べた。

3.2 リタデーション計測の三次元計測の試み

当初は、画像処理により3次元化することも検討したが、実現性が低いと判断した。そこで、共焦点観察による3次元化撮影を行い、リタデーション計測と組み合わせることで、リタデーション計測3次元計測を目指した。作製に際し、初めにリタデーション観察用の円偏光計単体を作製し、次に透過型の共焦点顕微鏡単体を作製し、最後に共焦点顕微鏡とリタデーション観察用の円偏光計と両者を組み合わせる、という手順で実施した。

初めに円偏光計を顕微鏡上に製作した。光源には波長 625 nm の高輝度 LED 光源 (Thorlabs) を使い、顕微鏡筐体には IX-73 (Olympus) の下部側のみを用いた。上記光源を用い、ただし、対物レンズ通過前に直線偏光子と 1/4 波長板を透過させた。さらに試料透過後、IX-73 の筐体内にて、クロスニコル位置に配置したもう1組の 1/4 波長板と直線偏光子を透過させた。この光を顕微鏡のサイドポートから外に出し、カメラで撮影した。

次に、透過型の共焦点顕微鏡装置単体を設計した。上記の LED 光源からでた光をコリメータレンズに通し、対物レンズを通してサンプルに照射する。サンプルを透過させた後に顕微鏡筐体内部で 90° 光路を曲げ、顕微鏡のサイドポートから出射させる。この後にピンホールを透過させて焦点面以外の光を取り除く。その後、レンズにより平行光に戻し、さらにもう 1 つのレンズでカメラのイメージセンサ面に集光させて画像を得た。サンプル台として XYZ 軸ステージを用い、サンプルを 3 次元的に移動させることで、3 次元情報を得られる仕様とした。

最後に、上記 2 つを組み合わせると 3 次元共焦点偏光顕微鏡が効果を発揮するかを確認した。

4. 研究成果

4.1 ストレスファイバの収縮力変化時のリタデーション変化

収縮薬を投与すると、ストレスファイバ内のリタデーションは増加した(図 1)。このとき、ストレスファイバの長さの減少割合は 3% 程度であり、ほぼ等尺性収縮の状態であると言える。よって、リタデーションの増加割合がストレスファイバ長さ減少割合を上回るため、ストレスファイバが短縮することにより複屈折物質の量が増えてリタデーションが増加した可能性は否定された。また、収縮薬濃度が大きいほどリタデーションの増加も大きい傾向となった。これまでに、細胞単位では収縮薬投与でのリタデーション増加を確認してきたが、細胞のみならず収縮薬を発生させるストレスファイバ単体でも、収縮力の増加によりリタデーションが増加することが判った。したがって、リタデーション計測により、細胞の収縮力変化が計測できる可能性を高く示した。

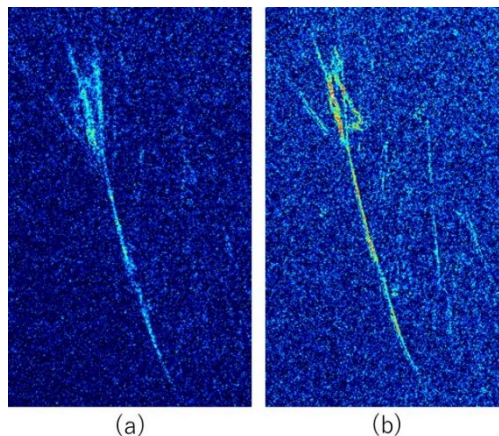


図 1 ストレスファイバの収縮薬を投与する前(a)と後(b)のリタデーション像の例。投与後には、比較的高いリタデーションである暖色系が見えるように思える。

さらに、リタデーションが増加した理由を探るため、収縮薬投与前後のストレスファイバ単体の形状を調べた。結果、微分干渉画像により、リタデーション収縮後のストレスファイバ幅が細くなる傾向にあった。今回の計測では、線維の長軸方向に沿って 1 本の解析線を引き、この部分のリタデーション値の平均を計測した。よって、収縮薬投与によって線維が細くなり、ストレスファイバ内の複屈折量が解析線内で増加することでリタデーションが増加したことが考えられた。

4.2 リタデーション計測の三次元計測の試み

初めに、顕微鏡に円偏光計を組み込み、リタデーション計測を試みた。サンプルには、複屈折性を示す透明粘着テープ 2 枚に対し、様々な角度で重ねる角度を変えて貼ったものを用いた。その結果、以前複屈折イメージングシステムで撮影したもの(Sugita S., et al., Biomech. Model. Mechanobiol., 17(2), 577-587, 2018)と同様な画像が得られた(図 2)。また、輝度値を計測したところ、既報と同様であった。角度を変えて撮影したところ、いずれも既報と同様であることを確認した。したがって、この手法でリタデーションが評価可能であることを確認した。

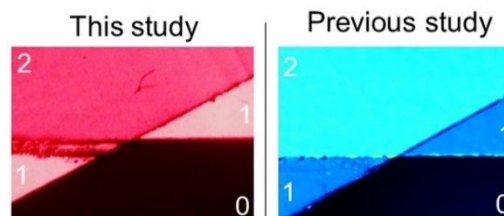


図 2 本研究と従来法 (Sugita S., et al., Biomech. Model. Mechanobiol., 17(2), 577-587, 2018) で得られた透明粘着テープを重ね合わせたときのリタデーション像。

次に、透過型の共焦点偏光顕微鏡ができたのかをピンホールの有無の 2 条件で撮影することにより確認した。サンプルとして、スライドガラスに黒色のラッカープレーを塗布した試料を用いた。サンプルを光軸方向に移動させると、黒色に塗料を塗布した面付近でのみ、カメラで計測される輝度値が増加した(図 3)。したがって、透過型の共焦点顕微鏡となったことを確かめた。

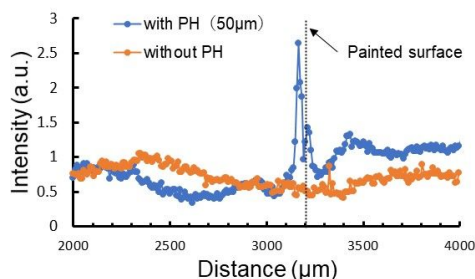


図 3 透過型共焦点顕微鏡で得られた輝度値像。サンプルを光軸方向に移動させると、ラッカープレーを塗った面でのみ輝度値が上昇した。

以上より、透過型の共焦点顕微鏡と円偏光計ができたことを確認したため、両者を組み合わせた光学系を確認した。サンプルとしては、複屈折性がある厚さ 50 μm の OPP シートで厚さ約 0.17 mm のカバーガラスをはさんだものとした。光軸方向にサンプルを移動させながら画像を記録した。もし、期待通りならサンプル通過時にのみ、リタデーションが得られるため、2 つのピークが生じると期待した。し

かしながら、サンプル透過前後に大きな輝度値変化がみられるものの、期待していたようなサンプル通過時の輝度上昇は得られなかった(図4)。3次元化は達成できておらず、課題克服が今後必要である。

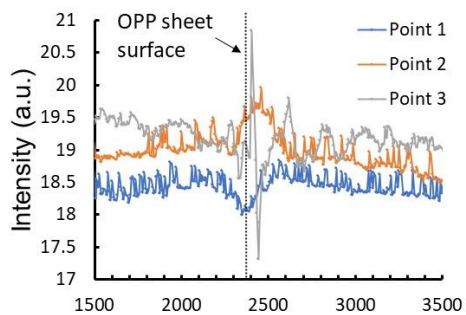


図4 透過型共焦点型の円偏光計顕微鏡で得られた輝度値像。サンプルを光軸方向に移動させるとOPPシート表面で若干の輝度値変化はみられるものの、リタレーションの光軸方向分解能特性は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Sugita Shukei, Mizutani Eri, Hozaki Masatoshi, Nakamura Masanori, Matsumoto Takeo | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Photoelasticity-based evaluation of cellular contractile force for phenotypic discrimination of vascular smooth muscle cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 3960 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40578-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shukei Sugita, Masatoshi Hozaki, Tsubasa S. Matsui, Shinji Deguchi, Yoshihiro Ujihara, and Masanori Nakamura |
| 2. 発表標題 Retardation can quantify tension in single stress fibers? |
| 3. 学会等名 2020 Biophysical Society Annual Meeting（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 保崎雅俊, 松井翼, 出口真次, 中村匡徳, 杉田修啓 |
| 2. 発表標題 複屈折量を用いた細胞張力の推定法の開発：ストレスファイバ内張力の操作によるリタデーション変化 |
| 3. 学会等名 日本機械学会2018年度年次大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋工業大学 医用生体工学研究室 研究内容
<http://biomech.web.nitech.ac.jp/research/research.html>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 中村 匡徳 (Nakamura Masanori) (20448046) | 名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13903) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|