

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700381
 研究課題名（和文）力学的刺激に起因する細胞および細胞外基質の変形のマルチスケール解析
 研究課題名（英文）Multiscale analysis for deformation of cell and extracellular matrix due to mechanical stimulus
 研究代表者
 福島 修一郎（FUKUSHIMA SHUICHIRO）
 大阪大学・基礎工学研究科・助教
 研究者番号：40362644

研究成果の概要：コラーゲンを特異的に観測できる第 2 高調波発生顕微鏡を開発し、細胞と細胞外基質との力学的相互作用の定量化手法を確立した。本手法は非染色的に可視化したコラーゲン線維の変位を定量化するものであり、従来法では定量化が不可能な細胞レベルの変位場の解析が可能である。培養細胞への伸展負荷実験に適用した結果、均一とみなせる組織レベルとは異なる細胞レベルの変位場の不均一性が明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：バイオメカニクス

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：応用光学，再生医学，第 2 高調波発生光，コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

生体は力学的環境に適応して様々な生理応答を示す。個体レベルの生理応答は細胞レベルの応答が統合されて実現するため、個々の細胞がおかれている力学的な環境を把握することは重要である。しかし、細胞レベルの力学的環境を明らかにすることは容易ではなく、組織レベルとは異なる環境にあると考えられる。細胞に作用する力学的刺激に関する従来研究では、個々の細胞に対する刺激の不均一さを考慮せずに、組織レベルで想定される均一な刺激を仮定して細胞応答を解析するケースが多い。実際の細胞応答は不均一

な刺激に対する不均一な応答であり、その応答が組織から個体までの上位階層で統合されている。このような生命現象を解明するためには、組織 - 細胞レベルにわたるマルチスケールの解析が必要となる。

細胞外基質の主構成要素であるコラーゲンにピークエネルギーの高い超短パルス光を照射すると、光と物質の非線形相互作用により、入射光波長の半分の波長の第 2 高調波発生光（SHG 光）が誘起される。SHG 光は波長のオーダーで非中心対称構造を有する物質からのみ発生し、生体内では SHG 光発生源となる物質が限られているために、染色をせ

ずに特定の物質のみを検出することができる。生体組織内ではコラーゲンが量および高次構造の点から最も効率よく SHG 光を誘起する物質である。固定や染色を必要としない SHG 光観測の特長をいかせば、従来法では不可能はコラーゲンの動態を可視化でき、力学的環境を把握する強力な観測法となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では力学的環境を把握する指標として細胞外基質と細胞骨格の変形に着目し、組織レベルで均一な伸展刺激が細胞レベルでどのような不均一性をもつのかを明らかにし、マルチスケールの力学的環境を統合的に理解することを目的とする。具体的には以下の点に着目して研究を遂行する。

- (1) 細胞外基質の変形を観測する新たな手法として SHG 顕微鏡を開発する。SHG 光強度をもとにした変形の指標を選定し、高空間分解能で変形を可視化する。
- (2) 伸展負荷による実際の細胞および細胞外基質の変形を定量化する。伸展周期内の変位場を求めて、細胞の部位による変位の違いを明らかにし、組織レベルと細胞レベルとの力学的環境の関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) SHG 顕微鏡の開発

細胞外基質の変形を解析するために、コラーゲンを非侵襲・非染色的に観測可能な SHG 顕微鏡を開発した。従来法ではコラーゲンの動態を観測することはできなかったが、本顕微鏡は同一コラーゲン線維の経時的な追跡が可能のため、細胞外基質の変位をサブミクロンの空間分解能で定量化できる。

SHG 顕微鏡の光学系を図 1 に示す。これは市販の共焦点レーザー顕微鏡 (DIGITAL ECLIPSE C1, NIKON) の光源を改造してモード同期 Ti:Sapphire レーザー (Cameleon, Coherent; パルス幅 140 fs, 波長可変域 720 ~ 950 nm, 繰り返し周波数 90 MHz, パワー 1 W) を用いたものである。レーザーから射出されたパルス光は 1/2 波長板 ($\lambda/2$) と偏光子 (P) およびビームエキスパンダー (BE) によって強度とビーム径をそれぞれ調節し、1/4 波長板 ($\lambda/4$) で円偏光にして顕微鏡に入射して、対物レンズ (OL; 20x, N.A.=0.75) でサンプルに集光した。レーザーの中心波長は 780 nm, パワーはサンプルの位置で 60 mW に調整した。サンプルから発生した SHG 光はコンデンサーレンズ (CL) で集光した後フィルター (F1; Band pass filter 387 ± 5.5 nm, F2; Blue pass filter 500 nm 以上カット) によって基本光を除去し、光ファイバーで伝送して光電子増倍管 (PMT) で検出した。イメージングにはスキャンボックス内のガルバノミラー (GM)

および対物レンズの Z 軸フォーカスマーターによってビーム走査を行なった。検出系は 4 系統あり、透過画像、蛍光画像、SHG 画像の同時取得が可能となっている。

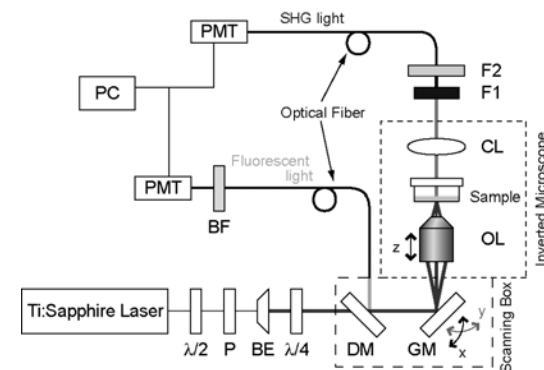


図 1 SHG 顕微鏡の光学系

(2) 細胞レベルの変位場解析

観測試料には基質となるコラーゲンゲル上に培養した血管内皮細胞を用いた。顕微鏡のステージ上に設置したインキュベータで培養環境を維持し、細胞の接着・遊走過程と伸展装置で周期的な伸展刺激を負荷したときの細胞および基質の変形を観察した。

細胞外基質の変位場は、コラーゲンゲル表面で取得した SHG 画像を用いた。SHG 画像のコラーゲン線維の特徴点を抽出し、特徴点座標の 2 時刻間差分を変位ベクトルとした。SHG 画像の特徴点抽出精度の検証は、コラーゲンゲルにマーカーとなる蛍光色素を分散させて算出した変位ベクトルと比較して行なった。

細胞の変位場は、透過画像から抽出した輪郭および内部特徴点の座標から、基質と同様に算出した。細胞の核および骨格は蛍光色素で標識して可視化した。

4. 研究成果

図 2 に SHG 顕微鏡で観測したコラーゲンゲルの例を示す。取得した画像には線維様の輝度分布が明確に現れており、染色像および電子顕微鏡像と比較して妥当なコラーゲン構造を可視化できている。また同一線維の追跡や特徴点抽出が容易な画像が得られている。

SHG 信号がコラーゲンゲルに由来していることを確認するために、コラーゲナーゼを添加してゲルの分解過程を観測した。ゲルを 37 に保持し、同一視野で 2 層 (ゲル表面, 内部) の SHG 画像を 1 分毎に取得してその平均強度をプロットしたものが図 3 である。巨視的に見るとゲルは均一な構造をしており、酵素によって時間とともにゲルが分解されていく様子がわかる。

SHG 光強度がコラーゲン線維の構造に依存していることを確認するため、線維配向が異

なるゲルを作成し、発生する SHG 光を観測した(図 4). コラーゲン線維の配向はゲル圧縮して変えたが、通常のゲル(control)と圧縮したゲル(strained)はコラーゲン濃度が観測時に同じとなるように調整した。圧縮したゲルは線維方向が揃っているので、干渉による増強効果で SHG 光強度が高くなった。

細胞の接着・遊走過程の形態変化に伴う基質の変位を定量化したのが図 5 である。浮遊させた内皮細胞をコラーゲンゲル上に播種してから 30 分後(灰色)と 40 分後(黒)の細胞の輪郭と 2 時時刻間(10 分間)の変位ベクトルを示した。細胞が足場を形成する過程で発生した牽引力が基質に作用した結果の変位が定量できている。

細胞に 10%の伸展を負荷したときの細胞内の変位は不均一な分布を示した(図 6)。試料はシリコン製チャンパー上に培養してものであり、マクロナ伸展量(10%)はチャンパーの変形量をもとに決定している。従来はマクロナ伸展量を細胞への刺激として細胞応答が検討されてきたが、細胞に実際に負荷されている刺激は細胞ごとに異なり、細胞内部でも均一ではない。このような刺激の不均一さは細胞応答の解明するうえで無視できないと考えられる。

本研究では、細胞外基質の変形を定量化するための SHG 顕微鏡を開発し、細胞と基質との力学的相互作用の定量化手法を確立した。この手法を培養細胞への伸展刺激負荷実験系に適用して、基質を均一とみなした組織レベルと細胞骨格およびコラーゲン線維構造を考慮した細胞レベルの違いが明らかになった。細胞レベルの変位場の定量化をすることが可能となったことで、細胞内の力学的環境の解明につながる計測手法が確立できた。

力学現象を解明するためには動態解析が必須なので、SHG 光を用いた変位解析は有用となる。さらに、SHG 光の強度や偏光依存性の情報を活用することで、試料の材料特性の推定などに応用できる可能性がある。

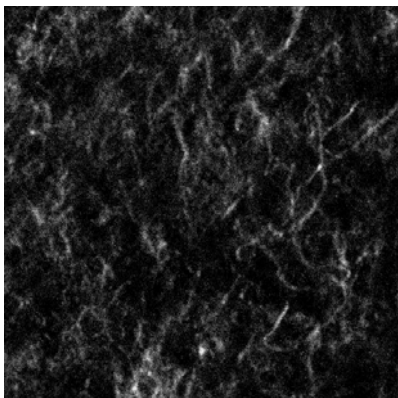


図 2 コラーゲンゲルの SHG 画像
(200 × 200 μm)

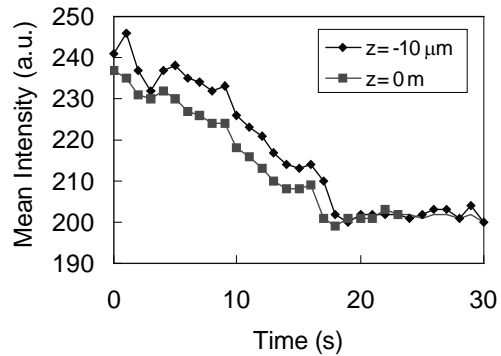


図 3 コラーゲンゲルの分解過程の SHG 光強度の変化

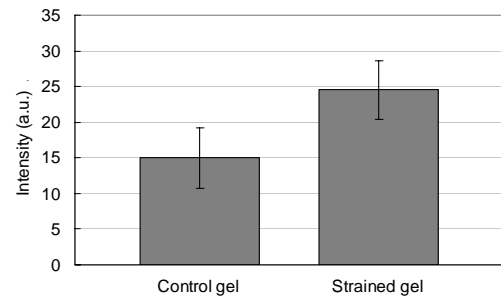


図 4 SHG 光強度のコラーゲンゲル線維配向依存性

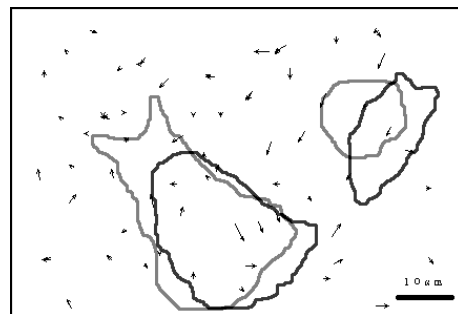


図 5 細胞接着過程におけるコラーゲンゲルの変位

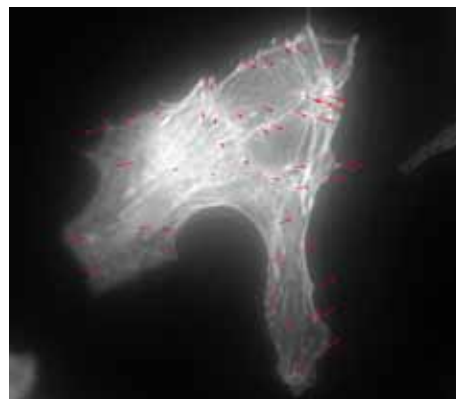


図 6 伸展負荷時の細胞の変位

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4件)

Yasui, T.; Takahashi, Y.; Ito, M.; Fukushima, S.; Araki, T: Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:forsterite and Ti:sapphire lasers, *Appl. Opt.* **48**, D88-D95, 2009. 査読有
Yasui, T.; Takahashi, Y.; Fukushima, S. 他5名: Observation of dermal collagen fiber in wrinkled skin using polarization-resolved second harmonic-generation microscopy, *Opt. Express*, **17**, 912-923, 2009. 査読有
福島修一郎, 荒木勉, 東野義之: 血管石灰化の定量的評価法について ~ 血管年齢診断への可能性 ~, *CLINICAL CALCIUM*, **18**, 953-958, 2008, 査読有
伊藤誠啓, 安井武史, 福島修一郎, 他3名: SHG (第2高調波発生光) 顕微鏡を用いた真皮コラーゲン線維分布の観察, *光学*, **36**, 35-40, 2007. 査読有

[学会発表](計9件)

福島修一郎, 第2高調波発生光による培養組織の非襲撃的ECM評価, 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月5日, 東京都
福島修一郎, 第2高調波発生光を用いたコラーゲンの分布および配向解析, 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008年10月23日, 京都市
福島修一郎, 第2高調波発生光を用いたコラーゲンの非染色的な可視化, 第36回可視化情報シンポジウム, 2008年7月22日, 東京都
福島修一郎, 第2高調波発生光を用いたコラーゲンゲルの品質評価, 第20回バイオエンジニアリング講演会, 2008年1月25日, 札幌市
Fukushima S., Analysis of Calcium Content in Human Artery, Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2007年11月5日, Tokyo.
Fukushima S., Second Harmonic Generation Imaging of Cultured Collagen Gel, 3rd Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics Biophotonics Downunder II, 2007年7月9日, Cairns, Australia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA SHUICHIRO)
大阪大学・基礎工学研究科・助教
研究者番号: 40362644