

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18608

研究課題名（和文）組織弾性モダリティの構築と老化制御

研究課題名（英文）The establishment of tissue elasticity modalities and aging control

研究代表者

早野 元詞（Hayano, Motoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：30593644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において極めて多数の細胞の力学特性を測定可能な原子間力顕微鏡（AFM）を構築した。本顕微鏡は、正立型光学顕微鏡と一体化されており、光学顕微鏡観察領域の力学特性をサブマイクロメートルの分解能で計測することが可能である。広範囲変位可能なスキャナーを用いることで、最大1mmの範囲をマッピングすることが可能となった。さらに、その分子機序としたタンパク質のジスフィルド結合や、Ero1といった酵素の遺伝子発現変化を見出し、空間的に数桁弾性率が異なる組織様サンプルのレオロジー計測と、分子機序の解析が進展した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでAFMやMTCを用いた「細胞単位」の研究で、がん細胞は細胞内骨格や細胞間接着因子の発現が異なるため、癌の悪性度や転移性の違いが報告されている。細胞はメカニカルセンサーを介して外部環境のシグナルを受け取り、これによって幹細胞の機能を制御する。本研究によって、組織中の粘弾性を高速かつ精密に計測し、高い「空間分解能」を持つレオロジーマッピング測定が可能な改良型パルスフォースAFM法が開発した。数100-1000個の細胞の粘弾性を一度に測定し、加齢に伴う変化の様子を捉える要素技術が進展しており、他に類を見ない技術である。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel atomic force microscope (AFM) was constructed with the capability to measure the mechanical properties of an extensive number of cells. The microscope was integrated with an upright optical microscope and provided a sub-micrometre resolution for measuring the mechanical properties of the observed area. Additionally, the wide displacement scanner enabled mapping of an area of up to 1 mm. The rheological measurement of tissue-like samples with varying elastic moduli by several orders of magnitude and the analysis of the molecular mechanism were advanced by identifying disulfide bonds of proteins and changes in gene expression of enzymes such as Ero1 as the molecular mechanism.

研究分野：分子生物学

キーワード：レオロジーマッピング パルスフォースAFM法 ジスフィルド結合 Ero1

1. 研究開始当初の背景

加齢により臓器の「弾性」は変化することが知られている。臓器の弾性と機能の間には高い相関があり (Cheng et al., 2019, Aging)、細胞レベルの弾性変化が、遺伝子発現を制御し細胞分化・増殖・炎症等のマクロな機能に重要な役割をしていると考えられている (Sun et al., 2020, Sci Adv; Segel et al., 2019, Nature)。したがって、加齢による臓器の力学物性を制御する分子メカニズムを理解するためには、細胞レベルの臓器物性計測が求められる。しかし、現在臓器の弾性を細胞レベルで計測する方法は確立

しておらず、弾性制御の分子制御及び疾患との弾性変化の因果関係も未知である。そこで本研究では、

(1) 組織計測に特化した原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、臓器の力学構造と分子構造の空間相関を明らかにする。そして、(2) これらの構造と臓器のマクロな弾性とを比較することにより、細胞レベルで臓器の機能と力学物性との関係を明らかにし、(3) 弾性分布変化を制御する遺伝子、代謝変化を明らかにする。以上の成果は、物理的特性、遺伝子、臓器機能を結ぶ数理モデルの構築および物理的な疾患治療・予測の基礎となる (図 1)。

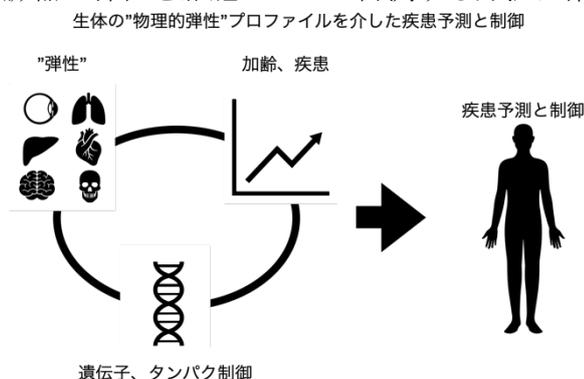


図1 弾性モダリティの確立と生体制御

細胞や組織の物理的特性である弾性は加齢によって変化する。マクロ及びマイクロレベルで弾性分布の解析、その分子機序解析、疾患や組織機能との相関を明らかにする。将来的に数学モデルを用いた疾患予測や治療薬開発を含めた弾性モダリティを構築する。

1930 年に McCay らによってカロリー制限が哺乳類の寿命を延長することが報告されてから約 90 年が経過している。これまでカロリー制限下流の分子機序解析から mTOR, SIRT6, NAD+ などの因子が寿命や老化制御を行っていることが報告されており、また加齢に伴って DNA のメチル化による修飾が寿命を予測する “Aging clock” として着目されている。研究代表者(早野元詞)は、ウェルナー症候群 (指定難病 191) のように特定の年齢から急速に老化進行が加速し、悪性腫瘍や心筋梗塞などを発症することから「老化の開始タイミングの分子機序」と「老化の予測開発」に興味を持っている。これまで DNA やヒストンなどのエピジェネティクス変化から老化が誘導される新しい早老症モデル (ICE マウス) を構築し、後天的かつ外的刺激による老化の分子機序を報告している (Yang* and Hayano et al., 2023 *Cell*)。しかしながら、老化の研究領域において大きな課題は炎症、DNA 損傷など生物学的応答に終始しており物理、数学といった分野横断的な新しい知見が少ない。先行研究において組織レベルでの弾性を測定する測定系を構築し、筋肉、肝臓、水晶体、脳などの弾性が加齢に伴って変化していることを見出している。以前より幹細胞や癌細胞は周囲の物理的弾性に応じて分化の方向性や増殖効率が変化することが知られている。本研究は、組織レベル及び細胞レベルで物性の変化を正確に捉え、物理的变化を遺伝子発現を含めた数学的モデルを構築することで、「弾性」を基軸とした新しい生物物理と老化研究が開拓できると考え、構想に至っている。

2. 研究の目的

これまで臓器の弾性を細胞レベルで計測する方法は確立しておらず、弾性制御の分子制御及び疾患との弾性変化の因果関係も未知である。そこで本研究では、(1) 組織計測に特化した原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、臓器の力学構造と分子構造の空間相関を明らかにする。そして、(2) これらの構造と臓器のマクロな弾性とを比較することにより、細胞レベルで臓器の機能と力学物性との関係を明らかにし、(3) 弾性分布変化を制御する遺伝子、代謝変化を明らかにする。以上の成果は、物理的特性、遺伝子、臓器機能を結ぶ数理モデルの構築および物理的な疾患治療・予測の基礎となる。

3. 研究の方法

(1) 加齢組織の弾性分布測定

押し込み型弾性測定装置 (YAWASA) を共同開発し、加齢に伴った水晶体、肝臓、筋肉などの硬化を組織レベルで計測することに成功している。一方で、臓器・組織は不均一な構造を有するため、加齢に伴う臓器の弾性率変化の理解には、部位特異的、細胞特異的な測定の併用が不可欠である。そこで、申請者が開発した正立型光学顕微鏡と一体化した原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、加齢による臓器の弾性率とターゲット分子の空間構造を明らかにする。

(2) 弾性変化を制御する

代謝及び遺伝子を含めた分子機序解析 先行研究において加齢に応じたマウス、ラットにおいて水晶体弾性低下が観察されており、キャピラリー電気泳動質量分析法(CE/MS; Agilent 6530 Q-TOF)によって、加齢および水晶体硬化に伴う ATP, Citrate などのミトコンドリア代謝産物の減少、オルニチンなどの減少を確認している。「組織弾性分布」、「時間的変化」、「分子変化」、「組織機能変化」の4方向データベースを構築する。これらのデータを用いて物理的変化と組織機能性を推測する「組織弾性モダリティ」の基盤構築を目指す。

4. 研究成果

申請者らは、既知の緩和弾性率の関数形を利用し粘弾性マッピングが可能な改良型パルスフォース AFM 法を開発している(図2、3)

1 細胞のみならず、極めて多数の細胞の力学特性を測定可能な原子間力顕微鏡 (AFM) を構築した。本顕微鏡は、正立型光学顕微鏡と一体化されており、光学顕微鏡観察領域の力学特性をサブマイクロメートルの分解能で計測することが可能である。広範囲変位可能なスキャナーを用いることで、最大 1mm の範囲をマッピングすることが可能である。実験の結果、単層上皮細胞を極めて高い空間分解能で測定することに成功し、組織スライスのメカノフィールドマッピングを実現した。また、AFM レオロジー計測法として、精密な応力緩和測定法を提案した。通常、応力緩和測定法では、AFM カンチレバーの変位が測定誤差に含まれる。そこで、カンチレバー変位を考慮しない解析方法を構築した。これにより、空間的に数桁弾性率が異なる組織様サンプルのレオロジー計測を精密に行うことが可能になった。本解析方法は、一部、近似解を用いているが、厳密解を用いた形式に拡張できれば真に誤差のない精密なレオロジー計測・解析が可能になると期待される。さらに、静電刺激下の細胞集団の時空間挙動を追跡する計測系を構築し、1 細胞および多数細胞へ適用できることを実証した。これにより、今後、メカノフィールドだけでなく、エレクトロフィールドにおける時空間解析が可能になると期待できる。

また、加齢に伴って組織弾性が 400 倍ほど増加する肝臓において、二次元ゲル泳動によってタンパク質間だけでなく、タンパク質内のジスルフィド結合が増加していることを見出し、酸化タンパク質フォールディングを制御するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の Ero1 遺伝子の発現が加齢に伴って顕著に変化することを見出している。PDI は Ero1 とともに、小胞体におけるタンパク質の酸化フォールディングに重要であることが知られている。また Ero1 の欠損マウス等での解析から神経変性疾患、心血管疾患、代謝性疾患の病態に関与していることが知られており、今後高い空間分解能にて組織レオロジー計測を行い、加齢とともに変化する細胞群と、疾患誘導を物理的特性と分子機序から進めるための基盤となった。

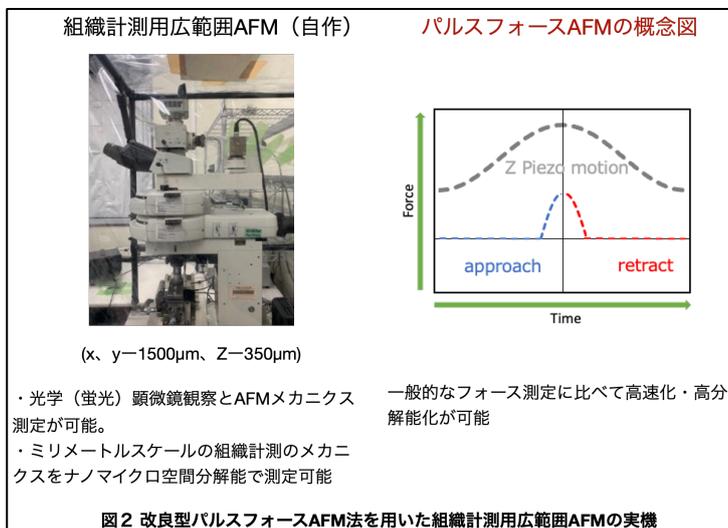


図2 改良型パルスフォースAFM法を用いた組織計測用広範囲AFMの実機

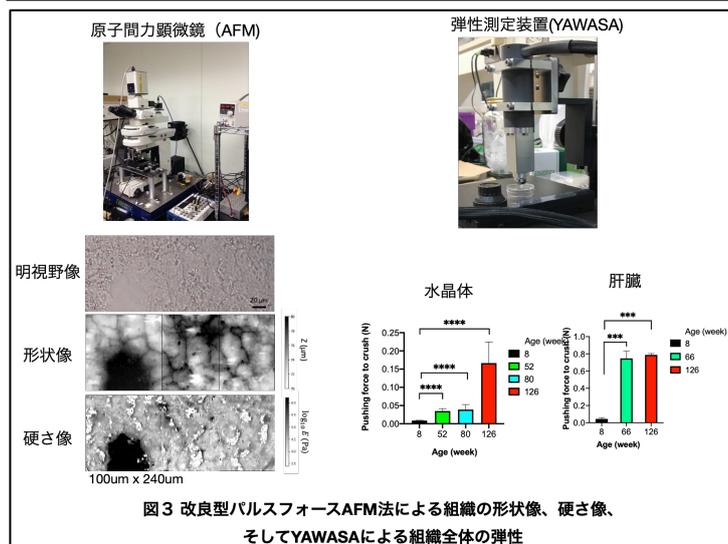


図3 改良型パルスフォースAFM法による組織の形状像、硬さ像、そしてYAWASAによる組織全体の弾性

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yang JH, Hayano M, Griffin PT, Amorim JA, Bonkowski MS, Apostolides JK, Salfati EL, and Sinclair DA.	4. 巻 186
2. 論文標題 Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 305 ~ 326.e27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2022.12.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. Nakada and T. Okajima
2. 発表標題 A numerical simulation of stress relaxation atomic force microscopy (29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy)
3. 学会等名 ICSPM29（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野実央, 小川美優, 永野真堯, 岡嶋孝治
2. 発表標題 単層構造・3D構造を有する上皮細胞の走電性の観察
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣内琢規, 土生飛翔, 岡嶋孝治
2. 発表標題 パルスフォース原子間力顕微鏡による上皮細胞シートの力学特性の測定
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Nakada, Y. Tsuboyama, and T. Okajima
2. 発表標題 Simulating stress relaxation curves of soft materials obtained in atomic force microscopy experiments
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mataka Nagano, Miyu Ogawa, Yuki Fujii, Takaharu Okajima
2. 発表標題 Observations of structural change in epithelial dome under constant electric field
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	岡嶋 孝治 (Okajima Takaharu) (70280998)	北海道大学・情報科学研究院・教授 (10101)	

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
---------	---------