

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25820017

研究課題名(和文)リアルタイム動的TFM法による細胞バンドパスフィルタ機能のメカニズム解析

研究課題名(英文)Analyzing cellular bandpass filtering with real-time traction force microscopy

研究代表者

塚本 哲 (Tsukamoto, Akira)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工・その他部局等・講師)

研究者番号：90511460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PDMS上に低弾性率PDMSを塗布し、さらに低弾性率PDMSには分散された蛍光ビーズを内包させることで引張刺激を与えていた培養細胞であってもTFM法を可能とした。そのような特異的なTFM法であっても画像処理を可能とするアルゴリズムが必要であったため、細胞が存在しない領域を特定した上で射影変換するようなアルゴリズムを構築した。TFM法をリアルタイムにて実施するには至っていないが、リアルタイム観察の有効性を示すため、細胞内Ca²⁺濃度上昇を引張刺激を与えている最中において初めて観察した。

研究成果の概要(英文)：PDMS chamber was coated with low-elasticity PDMS to realize traction force microscopy in cells under mechanical stretching. In the low-elasticity PDMS, fluorescence beads were dispersed sufficiently by loading mechanical shearing. Mechanical stretching induce large displacement which make traction force microscopy difficult to quantify. To adjust the displacement, fluorescence images were correlated with fluorescence beads on which cells were not present. Although real-time traction force microscopy in cells under mechanical stretching is under construction, real-time imaging of intracellular Ca²⁺ increase in cells under mechanical stretching was demonstrated.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：培養細胞 引張刺激 細胞牽引力 リアルタイム観察

1. 研究開始当初の背景

細胞は細胞バンドパスフィルタ機能を有し、異なる周波数を区別して認識し、それぞれの周波数を持つ外的刺激に対し別々に適応する。すなわち細胞は、生体内で脈拍や歩行 (~1Hz), ならびに高血圧や成長 (10^{-7} Hz) を区別して認識し、それぞれ適応することで、生体の恒常性を維持している可能性がある。細胞が細胞バンドパスフィルタ機能を実現するためには、細胞は歪み速度を感知する必要がある。従来、細胞は歪み速度に依存して細胞内 Ca^{2+} 濃度挙動や細胞骨格配向挙動が変化することが知られてきた (Hoffman ら, 2011)。しかしながら、細胞がどのように歪み速度を感知するのか、そのメカニズムは分かっていない。

細胞は、特殊なタンパク質を用いて応力を生化学シグナルに変換できる。すなわち、歪み速度に依存してそれらタンパク質に応力が伝達されるならば、細胞は歪み速度を感知できる。それを実現し得る細胞内区分の候補として、細胞を固定する接着斑と、接着斑を力学的に結合する細胞骨格が挙げられる。接着斑には、応力を生化学シグナルに変換するタンパク質が多く存在する (Albiges-Rizo ら, 2009)。一方で、細胞骨格は粘弾性の性質を示す (Colombelli ら, 2009)。つまり、細胞が歪み速度を感知するメカニズムとして、歪み速度に依存して細胞骨格で発生した張力が接着斑に伝達され、歪み速度に依存して伝達された応力により接着斑で生化学シグナルが発生する、という仮説が立てられる。

細胞で接着斑に発生する応力は測定できる (Wang ら, 2007)。更に、歪み量を与えた細胞であっても、断続的であれば測定できる。例えば、引張マイクロポスト法などが挙げられる (Nagayama ら, 2011)。しかしながら、歪み速度、具体的には脈拍や歩行に準じた 5-20%/s 程度、を与えた細胞を連続的に測定するまでには至っていない。最大のネックは、歪み速度を与えた細胞が顕微鏡の焦点外に移動してしまう技術課題にある。そこで本研究では、20%/s 程度の歪み速度を与えた細胞であっても顕微鏡の焦点内に留められる焦点不動細胞引張システムを開発しつつ細胞で接着斑に発生する応力を測定できるリアルタイム動的 TFM 法を開発することを考えた。

2. 研究の目的

本研究は、20%/s 程度の歪み速度を与えた細胞であっても顕微鏡の焦点内に留められる焦点不動細胞引張システムを開発しつつ細胞で接着斑に発生する応力を測定できるリアルタイム動的 TFM 法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PDMS 上に低弾性率 PDMS を塗布

PDMS として Sylpod184 (東レ・ダウコーニング) を用いた。この PDMS は主剤と硬化剤を混合することで硬化するが、この混合比を変えることで硬化したときの弾性率が変化することが知られる。そこで、通常の混合比が 10:1 であるところを、75:1 で調整することで、低弾性率 PDMS を得た。具体的には、アクリル樹脂製の型枠に主剤と硬化剤の混合比が 10:1 である PDMS を流し込み、80°C にて 1~2 時間ほど昇温させることで PDMS を硬化させ、引張チャンバを作製した。この引張チャンバの表面に硬化する前の低弾性率 PDMS を滴下し、スピンドコートで余剰な PDMS を除去した。また、この低弾性率 PDMS には予め蛍光ビーズ (FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres, 0.2 μm , red fluorescent) を含有させておいた。低弾性率 PDMS を引張チャンバ表面に塗布した後、80°C にて 4~5 時間ほど昇温させることで PDMS を硬化させた。

(2) 引張途中に生じるずれを蛍光ビーズ画像の画像処理で排除するアルゴリズム

蛍光ビーズ画像の中でも細胞が存在しない領域に着目し、それらの領域における蛍光ビーズがどのように変位したのかを画像相関法で定量化した。それら変位から射影行列を特定した。画像の変形で多用されるアフィン行列では台形変形を表現できない欠点があるため、本研究では台形変形も表現することができる射影行列を用いた。ここで特定したアフィン行列の逆行列を用いることで引張途中にある画像を処理し、引張途中で生じたずれを補正して排除した画像を得た。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇観察

細胞としてウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) を用いた。トリプシン溶液で剥離した後、引張チャンバ上に播種した。引張チャンバは、細胞の接着性を向上させるため、予めコラーゲンにてコーティングを施した。播種してから 1~2 日培養した後、細胞を Fluo-8AM で染色した。顕微鏡に装着させた引張装置に引張チャンバを取付け、細胞に 490nm の励起光を照射し、細胞内の Fluo-8 より射出された 520nm の蛍光を CCD カメラにて捕捉して画像化した。細胞は 37°C 環境下に保持しておいた。細胞に 20% の伸展刺激を与え、このときの引張速度は 10%/s とした。

4. 研究成果

(1) 動的 TFM 法において内外の研究ではポリアクリルアミドゲルを PDMS 上に塗布したものが使用されてきたが、ポリアクリルアミドゲルが安定して硬化しなかったため、ポ

リアクリルアミドゲルの代わりに低弾性率 PDMS を用いた (図 1). 低弾性率 PDMS には蛍光ビーズを予め含有させておいたが, 含有させた後に蛍光ビーズを分散させる方法として機械的な剪断力負荷が有効であることが分かった (図 2).

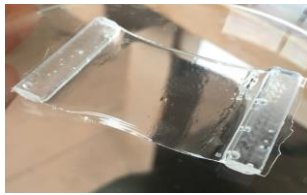


図 1 低弾性率 PDMS を塗布した引張チャンバ

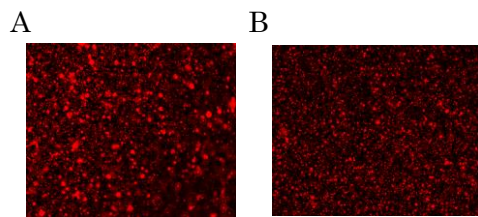


図 2 PDMS 内に分布させた蛍光ビーズに対して機械的な剪断力を負荷しないと蛍光ビーズは凝集しているが (A), 負荷すると凝集が解消された (B)

(2) 動的 TFM 法では引張前後のみでしかデータ取得ができていなかったため, 引張途中であってもデータ取得ができるようにするため, 引張途中に生じるずれを蛍光ビーズ画像の画像処理で排除するアルゴリズムを開発した. このアルゴリズムの妥当性を評価するため, 旧来の TFM 法で得られた静止画を人為的に変形した画像を用いて, 本研究のアルゴリズムによってずれを補正できるかを検証した. その結果, 数 μm 程度のずれが発生することが分かり, このずれを防ぐためにアルゴリズムの補正が必要であることが分かった (図 3).

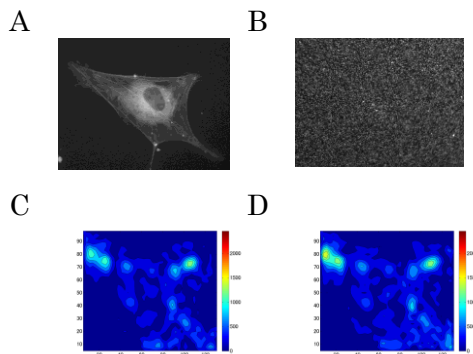


図 3 細胞 (A) に対して蛍光ビーズ (B) を指標として TFM 法によって得られた応力分布図 (C) から人為的に作成した応力分布図を本研究のアルゴリズムで補正した (D)

(3) 細胞が引張刺激に対して示す生理応答の一つである細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を観察した. その結果, 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が開始する時刻を捉えることができ, 細胞によってばらつきがあることが分かった (図 4).

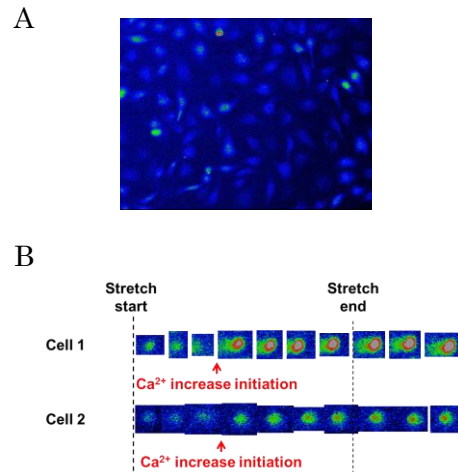


図 4 引張チャンバ上に培養した培養細胞 (A) に引張刺激を負荷したところ, 引張負荷を与えている最終に細胞内 Ca^{2+} 上昇が開始した (B).

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 1 件)

- ① Aya Shinmura, Akira Tsukamoto, Tsuyoshi Hamada, Kouki Takemura, Takashi Ushida, Shigeru Tada, "Morphological dynamics of mitochondria in bovine aortic endothelial cell under cyclic stretch", Advanced Biomedical Engineering, 査読有, Vol. 4, 2015, pp. 60-66

[学会発表] (計 6 件)

- ① Akira Tsukamoto, Takashi Ushida, Shigeru Tada, "In-Situ Real-Time Imaging of Intracellular Ca^{2+} Increase in Cells under Uniaxial Mechanical Stretch", APBiomech2015, 北海道大学
- ② 塚本哲, 中川桂一, 太刀川遼, 廖洪恩, 小林英津子, 多田茂, 牛田多加志, 佐久間一郎, 「衝撃波照射による細胞骨格牽引力変化の観察」, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 東北大学
- ③ 田中康裕, 塚本哲, 古川克子, 牛田多加志, 「低弾性率基質上で培養された血管内皮細胞の周期的引張刺激に対する形

態変化」, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 東北大学

- ④ 新村理, 塚本哲, 濱田剛, 竹村考騎, 牛田多加志, 多田茂, 「Morphological dynamics of mitochondria in BAEC under cyclic stretch」, 生体医工学シンポジウム 2014, 東京農工大学
- ⑤ 塚本哲, 満岡友祐, 多田茂, 古川克子, 牛田多加志, 「引張負荷により流動化した細胞における剛性」日本機械学会 M&M2014 材料力学カンファレンス, 福島大学
- ⑥ 塚本哲, 多田茂, 牛田多加志, 「力学受容細胞と隣接細胞での Ca^{2+} 動態比較」, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 岡山大学

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nda.ac.jp/cc/biomed/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 哲 (TSUKAMOTO, Akira)

防衛大学校・応用科学群・講師

研究者番号 : 90511460