

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06627

研究課題名(和文)高分子超薄膜を用いた細胞トラクションフォース評価法の開発

研究課題名(英文)Ultra-thin film wrinkle assay to visualize and evaluate the cell traction force

研究代表者

横山 奨 (Yokoyama, Sho)

東海大学・マイクロ・ナノ研究開発センター・特定研究員

研究者番号：30760425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が発生するトラクションフォース(細胞が細胞外マトリクスを引張る力)測定方法はTraction force microscopy (TFM)と呼ばれている。細胞固有の機能・性質を明らかにし細胞生物学の発展に貢献するとともに、細胞の薬品への反応を定性的に評価できることから、創薬の為の大規模なスクリーニング作業への応用が期待できる。

本研究では、従来法よりも優れたTFMを目指し、金超薄膜に発生する“シワ”を応用した細胞トラクションフォース評価法を開発した。細胞トラクションフォースの大きさ・方向のリアルタイムな可視化を実現するとともに、トラクションフォース定量化に向けての基礎的な解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：The experimental method of measuring cell traction force (the force of cells to pull extracellular matrix and another cells) is called traction force microscopy (TFM). The dynamic mechanical behavior of cell-ECM and cell-cell interactions is known to influence a vast range of cellular functions, including necrosis, differentiation, adhesion, migration, locomotion, and growth. TFM can clarify the unique functions and properties of cells, contribute to the development of cell biology, qualitatively evaluate the response of cells to chemicals, and be applied to large-scale screening work for drug discovery.

In this research, we aimed for superior TFM than the conventional method and developed a novel cell traction force evaluation method using "wrinkle" generated on gold ultra-thin film. We realized visualization of the size and direction of the cell traction force and carried out basic analysis to quantify the cell traction force.

研究分野：生体医工学

キーワード：Traction force TFM Wrinkle Contractile Drug efficacy evaluation

1. 研究開始当初の背景

細胞と細胞、あるいは細胞と細胞外マトリクス (ECM) 間の相互作用的な力は、トラクションフォースと呼ばれ、細胞の増殖、分化、アポトーシス、接着や移動などの様々な機能と密接な関係が存在する。そのため、トラクションフォースの大きさ、発生箇所、発生方向を調査することが重要である。既存の細胞トラクションフォースの可視化技術は、コストと手間がかかるため、網羅的に遺伝子をノックダウンする実験や、創薬 (薬剤の副作用評価など) の為の大規模なスクリーニング作業を行うことは非現実的である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、超薄膜を応用した細胞トラクションフォース評価法の開発を行い、従来法よりも優れたスクリーニング手法を提供することである。

3. 研究の方法

ECR スパッタリング法を用いて金超薄膜 (膜厚: 100 nm 以下) を成膜する。この金超薄膜を、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 層上に成膜する。PDMS 層よりも硬く独立した金超薄膜が PDMS 層上にあかも浮遊しているような基板となる (図 1)。この二層構造の基板を細胞培養用基板として利用する。細胞親和性を有する金超薄膜は、その表面のせん断力に対して敏感に反応し、表面に“シワ”を生じる。このシワは位相差顕微鏡で観察可能であり、シワの方向はトラクションフォースの方向に、“シワ”と“シワ”の間隔 (波長) はトラクションフォースの大きさに対応している。CCD カメラを用いて、シワと細胞の挙動のライブ観察を行うと同時に、画像処理を行い、細胞トラクションフォースをリアルタイムに評価する技術を開発する。以下の 3 段階に分けて研究開発を進めた。

(1) 細胞親和性と光透過性を両立する金超薄膜の柔軟な基板上への成膜技術の確立

(2) 細胞トラクションフォースにより発生した“シワ”のタイムラプス撮影、(3) トラクションフォース定量化に向けた基礎的解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 細胞親和性と光透過性を両立する金超薄膜の柔軟な基板上への成膜技術の確立

以下の手順により、上記の機能を有する金超薄膜を成膜することに成功した (図 2)。ガラスまたは、ポリスチレン基板上にスピコーター (MS-A100, Mikasa) を用いて PDMS 膜を成膜した。“シワ”の発生に必要な細胞トラクションフォースの大きさ、すなわち、この細胞収縮力評価法の感度は PDMS 膜の硬さと膜厚に大きく依存する。本実験では、PDMS (SILPOT 184, Dow Corning) の母材を用いた。PDMS 膜厚は油浸レンズによる観察に対応するため、一般的な油浸レンズの作動

距離内に収まる 100 μm 以下とした。その後、ECR スパッタリングにより PDMS 膜上にナノメートルオーダの金超薄膜を成膜した。

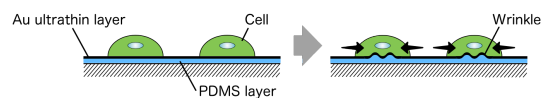


図 1 トラクションフォース評価用金超薄膜の概念図

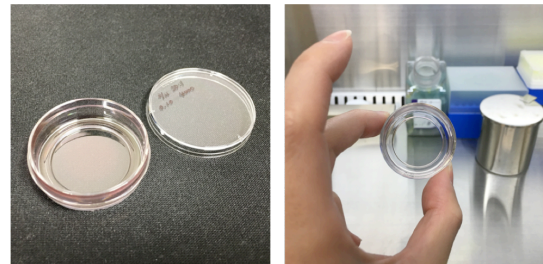


図 2 培養皿上に成膜したトラクションフォース評価用金超薄膜

(2) 細胞トラクションフォースにより発生した“シワ”のタイムラプス撮影

作製したトラクションフォース評価用金超薄膜上に細胞を播種し、倒立顕微鏡で位相差観察を行った。播種した細胞が附着すると細胞収縮力により表層の硬い金超薄膜を引き寄せ“シワ”が発生した。“シワ”は時間とともに変化する細胞収縮力に対して垂直方向に発生する。この細胞に対してトリプシン処理を行ったところ、細胞が基板から剥離するにつれて、“シワ”が消失し、細胞の細胞収縮力に追従して“シワ”が発生していることが確認された (図 3)。また、トリプシン処理 12 秒後には速やかに“シワ”が消失したため、時間応答性にも優れていると言える。従来の細胞収縮力可視化技術は、実験後に基準位置を算出するまで力の大きさを知ることができないため、この点においても本技術は利点があると考えられる。

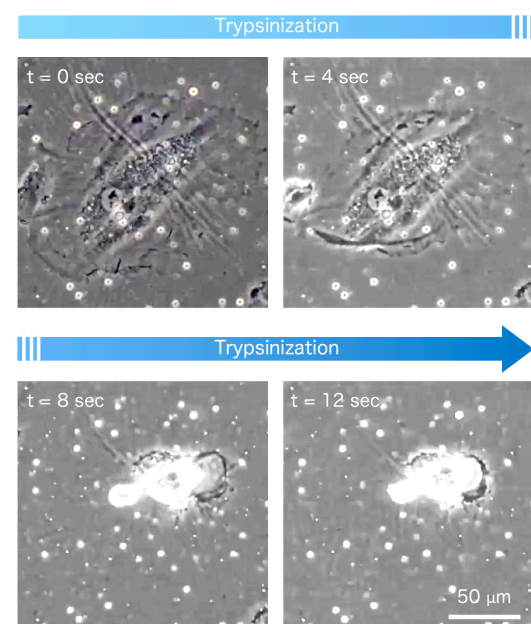


図 3 トラクションフォースにตอบสนองして金超薄膜上に生じた“シワ”のタイムラプス撮影

(3) トラクションフォース定量化に向けた基礎的解析

表面に発生する”シワ”の波長と表面座屈に寄与した応力の相関性に関する研究 (SIEBIMM) を用いたトラクションフォース定量化への検討を行った。また、数値解析ソフトを用いたシミュレーションを実施し、金超薄膜へ表面座屈を生じさせるために必要な力の大きさを評価した。

(4) 細胞パターンニングとの両立を目指した新たなトラクションフォース評価用基板への発展

研究を進める過程で、細胞群と単一細胞、また細胞形状によって、発揮されるトラクションフォースが大きく変化することが判明した。特に、細胞形状変化によるトラクションフォースの変化は数値解析ソフトを用いたシミュレーションを困難にしている。そこで、本研究の発展として、細胞の接着領域を制御し細胞の形状・形態を制御する細胞パターンニング技術をトラクションフォース評価用基板に組み込むことを考案した。トラクションフォースは細胞動態と密接な関係があるため、細胞パターンニング技術とトラクションフォース評価技術を組み合わせることで、再現性の高い高精度な薬効評価を迅速かつ簡易に実施できる技術を確立できる可能性もあるため、極めて将来有望な技術と考えている。現在、インクジェット技術を用いて PDMS 層をパターンニングする技術開発に取り組んでおり、これまでに、有機溶媒で粘度を調整した PDMS を射出することに成功している。

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 5 件)

- ① S. Yokoyama, Y. Kamei, T. S. Matsui, S. Deguchi “Low-power laser processing-based approach to plasma lithography for cell micropatterning”, *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, 7, 2015, 081–086
DOI: 10.4172/1948-593X.1000128
Open Access
- ② S. Deguchi, J. Hotta, S. Yokoyama, T. S. Matsui “Viscoelastic and optical properties of four different PDMS polymers”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 25, 2015, 097002
- ③ R. Araki, A. Otomo, J. Wada, T. Ishida, S. Yokoyama, S. Hadano, H. Kimura, “Development of a novel device with high throughput axonal transport quantification”, *Proceedings of the School of Engineering of Tokai University, Ser. E.*, Sep. 30, 2016, 67-73
- ④ S. Yokoyama, T. S. Matsui, S. Deguchi, “New wrinkling substrate assay reveals traction force fields of leader and follower

cells undergoing collective migration”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 2016, 975–979
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.142

- ⑤ S. Yokoyama, T. S. Matsui, S. Deguchi, “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.
DOI: 10.1002/cpcb.22

〔学会発表〕(計 25 件)

- ① 横山奨, 松井翼, 加藤輝, 荒木智彦, 出口真次, “単一細胞の収縮能の評価技術”, 第 54 回日本生体医工学会大会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 5 月 7 日–9 日
- ② 横山奨, 八十田穰, 松井翼, 出口真次, 木村啓志, “多層薄膜基板を用いた細胞トラクションフォースの可視化とその応用”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第 5 回学術講演会 (Tµne5), 東海大学伊勢原キャンパス (神奈川県伊勢原市), 2015 年 8 月 25 日
- ③ 荒木良介, 大友麻子, 横山奨, 和田純希, 秦野伸二, 木村啓志, “マイクロ流体デバイスを用いた ALS 疾患モデルの確立”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第 5 回学術講演会 (Tµne5), 東海大学伊勢原キャンパス (神奈川県伊勢原市), 2015 年 8 月 25 日
- ④ 横山奨, 松井翼, 加藤輝, 荒木智彦, 出口真次, “細胞収縮能評価方法の開発とその応用”, 2015 年度日本機械学会年次大会, 北海道大学工学部 (北海道札幌市), 2015 年 9 月 13 日–16 日 (発表日: 9 月 15 日, 講演番号: J0220103)
- ⑤ 荒木良介, 大友麻子, 横山奨, 和田純希, 秦野伸二, 木村啓志, “マイクロ流体デバイスを用いた ALS 疾患モデルの確立”, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2015 年 12 月 1–4 日 (発表日: 12 月 2 日, ポスター: 2P0928)
- ⑥ 荒木良介, 大友麻子, 横山奨, 和田純希, 秦野伸二, 木村啓志, “Development of a novel ALS model in vitro by using the microfluidic device-based cell culture system”, 2015 年度第 11 回総合医学研究所研修会, p.6, 東海大学伊勢原キャンパス (神奈川県伊勢原市), 2015 年 12 月 5 日 (発表日: 12 月 5 日, ポスター: 08)
- ⑦ 横山奨, 和田純希, 荒木良介, 大友麻子, 秦野伸二, 木村啓志, “神経細胞軸索輸送の定量化に向けた神経細胞極性制御デバイスの現状と将来”, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール (東京都目黒区),

- 2016年1月19日
- ⑧ 荒木良介, 大友麻子, 横山奨, 和田純希, 秦野伸二, 木村啓志, “マイクロ流体デバイスを用いた神経疾患モデルの確立”, シンポジウム:細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京都目黒区), 2016年1月19日
- ⑨ 横山奨, 和田純希, 荒木良介, 大友麻子, 木村啓志, “神経細胞軸索輸送の定量化に向けた神経細胞極性制御デバイスの最適化”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第6回学術講演会(Tune6), p.52, 東海大学海洋学部海洋科学博物館/東海大学清水校舎8号館地下ホール(静岡県静岡市), 2016年2月19-20日(ポスター:P026)
- ⑩ 横山奨, 八十田穰, 槌谷和義, 木村啓志, “金超薄膜を用いた細胞トラクションフォース可視化技術の開発”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第7回学術講演会(Tune7), p.39, 東海大学湘南校舎17号館2階ネクサスホール(神奈川県平塚市), 2016年8月9日(ポスター:P023)
- ⑪ 石田智之, 大友麻子, 横山奨, 串田隆志, 秦野伸二, 木村啓志, “マイクロ流体デバイスを用いたALS疾患モデルの解析”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第7回学術講演会(Tune7), p.99, 東海大学湘南校舎17号館2階ネクサスホール(神奈川県平塚市), 2016年8月9日(ポスター:P083)
- ⑫ 串田隆志, 横山奨, 大友麻子, 秦野伸二, 木村啓志, “神経細胞軸索内小胞動態解析の効率化に向けたアッセイデバイスの開発ー微小スリット作製条件の最適化検討ー”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第7回学術講演会(Tune7), 東海大学湘南校舎17号館2階ネクサスホール(神奈川県平塚市), 2016年8月9日(ポスター:P085)
- ⑬ 横山奨, 八十田穰, 槌谷和義, 木村啓志, “超薄膜を用いた細胞収縮力の可視化と定量化への試み”, 2016年度日本機械学会年次大会, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市), 2016年9月11日-14日(発表日:9月13日, 講演番号: J0270104)
- ⑭ 諸星和, 中山耕史朗, 江口和也, 横山奨, 槌谷和義, 喜多理王, 木村啓志, “ルートヴィッヒ・ソレー効果による重水-軽水分離のためのマイクロ流体デバイスの開発”, 2016年度日本機械学会年次大会, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市), 2016年9月11日-14日(発表日:9月13日, 講演番号: J0540101)
- ⑮ S. Yokoyama, J. Wada, T. Kushida, R. Araki, A. Otomo, S. Hadano, H. Kimura, “Development of a novel device with high-throughput axonal transport quantification”, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016 Conference), pp. 932-933, Convention Center Dublin (Dublin, Ireland) Oct. 9-13, 2016 (発表日:2016年10月10日, ポスター: M013a)
- ⑯ S. Deguchi, S. Yokoyama, T. S. Matsui, T. Ohnishi, “New traction force microscopy suggests a mechanism of local geometry sensing by individual cell adhesions”, International Conference on Flow Dynamics 2016, Sendai International Center (Sendai, Japan) Oct. 10-12, 2016 (発表日:2016年10月11日, 講演番号: 招待講演)
- ⑰ 横山奨, 串田隆志, 石田智之, 大友麻子, 秦野伸二, 木村啓志, “神経細胞軸索内小胞態の効率の定量評価アッセイデバイスの開発”, 2016年度第12回総合医学研究所研修会, p.6, 東海大学伊勢原キャンパス(神奈川県伊勢原市), 2016年10月29日(発表日:10月29日, ポスター:A02)
- ⑱ 石田智之, 荒木良介, 串田隆志, 杉山純也, 大友麻子, 横山奨, 秦野伸二, 木村啓志, “マイクロ流体デバイスを用いたALS疾患モデルの解析”, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年11月30-12月2日(発表日:11月30日, ポスター: 1P-0852)
- ⑲ 横山奨, 串田隆志, 石田智之, 大友麻子, 秦野伸二, 木村啓志, “マイクロデバイスを用いた軸索輸送現象イメージング”, 第八回「光塾」, p.27, 東京工業大学すずかけ台キャンパス(神奈川県横浜市), 2016年12月17日-18日(発表日:12月18日, ポスター: 12)
- ⑳ S. Deguchi, S. Yokoyama, T. S. Matsui, T. Ohnishi, “Local geometry sensing by individual focal adhesions”, 2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference, Hapuna Beach Prince Hotel (Big Island of Hawaii, USA) Jan. 3-7, 2017
- 21 横山奨, 串田隆志, 石田智之, 大友麻子, 秦野伸二, 木村啓志, “軸索小胞輸送の定量評価に向けた開放型マイクロデバイスの開発および評価”, シンポジウム:細胞アッセイ技術と現状と将来, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京都目黒区), 2017年1月31日
- 22 横山奨, 吉田翔太, 岡村陽介, 木村啓志, “マイクロ流体デバイスを用いた血栓クリナーの定量的機能評価”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第8回学術講演会(Tune8), 東海大学湘南校舎17号館2階ネクサスホール(神奈川県平塚市), 2017年2月25日
- 23 串田隆志, 石田智之, 横山奨, 大友麻子, 秦野伸二, 木村啓志, “神経細胞軸索内小胞動態解析の効率化に向けたマイクロデバイスの開発”, 東海大学マイクロ・ナノ啓発会第8回学術講演会(Tune8), 東海

- 大学湘南校舎 17号館 2階ネクサスホール
(神奈川県平塚市), 2017年2月25日
- 24 串田隆志, 横山奨, 大友麻子, 秦野伸二,
木村啓志, “神経細胞軸索内小胞動態解析
の効率化に向けたマイクロデバイスの開
発”, 関東学生会第 56 回学生員卒業研究
発表講演会, 東京理科大学葛飾キャンパ
ス (東京都葛飾区), 2017年3月16日
- 25 石田智之, 大友麻子, 杉山純也, 横山奨,
串田隆志, 秦野伸二, 木村啓志, “マイク
ロ流体デバイスを用いた ALS 疾患神経細
胞の軸索輸送動態の解析”, 関東学生会
第 56 回学生員卒業研究発表講演会, 東京
理科大学葛飾キャンパス (東京都葛飾区),
2017年3月16日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.mnc.u-tokai.ac.jp/?page_id=2&lang=ja

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山奨 (YOKOYAMA, Sho)

東海大学・マイクロ・ナノ研究開発センタ
ー・研究員

研究者番号：30760425