

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03471

研究課題名(和文)細胞骨格の構造と機能のメカノセンシング

研究課題名(英文)Mechanosensing of cytoskeletal structure and function

研究代表者

中村 史(Nakamura, Chikashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：40357661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高転移性マウス乳がん細胞の中間径フィラメントネスチンの骨格としての構造と機械的機能について解析した。本株ではネスチンはビメンチンと共重合繊維を形成しており、ネスチン欠損により細胞弾性が上昇する。ネスチン欠損株の回復試験の結果、C末のテール領域98%を欠失したネスチンでは細胞弾性が回復せず、テール領域の立体障害によりビメンチン-アクチン結合が阻害され細胞弾性が低下することが明らかとなった。AFMを用いた力学試験の結果、ネスチンが繊維の可動性を高める働きを持つことが示された。これらの結果により細胞骨格のネットワーク構造により細胞弾性が変化し、がん細胞の悪性度に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発する技術は、申請者が独自に開発してきた免疫力学測定法をさらに深化させたものであり、生きた細胞の骨格蛋白質の機械的特性を評価できるという点で極めて独創性が高く、細胞生物学にブレークスルーをもたらす基盤技術となると考えている。また本技術は、癌細胞の転移メカニズムの解明をはじめ、細胞病理学における重要な知見を与えるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the structure of intermediate filament (IF) nestin as a skeleton in highly metastatic mouse breast cancer cells and the mechanical functions were analyzed. In this strain, nestin forms copolymerized fibers with vimentin, and nestin deficiency caused increment of cell stiffness. The results of the mutant rescue showed that the C-terminal tail deleted nestin cannot restore the stiffness since the steric hindrance with the tail domain might prevent vimentin-actin binding. The results of mechanical tests using AFM showed that nestin has the ability to increase the mobility of IF. These results suggested that the network structure of the cytoskeleton altered the cellular stiffness, resulting the malignancy of cancer cells.

研究分野：細胞工学

キーワード：バイオセンサー がん細胞 中間径フィラメント 抗体 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中間径フィラメント(IF)はアクチン、微小管と結合し、3次元的なネットワーク構造を形成することで細胞骨格として弾性に寄与すると考えられている(図1)。しかし、IFそのものの機能はほぼ未解明であり、繊維同士の結合がどのように弾性に寄与するのかについては、ほとんど分かっていなかった。IFの一種であるネスチンは、古くから神経系幹細胞のマーカーとして用いられているが、近年、高転移性のがん細胞で高発現であり(Cancer Sci, 101, 815, 2010, Curr Stem Cell Res Ther, 7, 415, 2012)。またネスチンの発現抑制が浸潤性、転移性の低下を引き起こすことも報告され注目を集めている(Cancer Res, 67, 9199, 2007, Int J Clin Exp Pathol, 8, 6377, 2015)。ネスチン高発現の乳がん患者の5年生存率が0%であるという調査結果もあり(Ginekologia Polska, 39, 135-141, 2018)。ネスチンとがんの悪性度の関係の解明が強く求められているが、ネスチンのみならず、IFは薬剤処理による繊維形成阻害が出来ない上に、生化学的解析も困難であるため、有効な解析手法が存在しなかったことが研究の進展を阻んでいた。

中村らはマウス乳がん細胞FP10SC2株(SC2株)から作出したネスチンノックアウト株(NKO株)の細胞弾性率が元株より有意に高く、転移性が低いことを見出していた。通常、がん細胞は正常細胞と比較すると弾性率が低く柔らかいため、転移過程において細胞や組織間の間隙を通過しやすくなると考えられる。そのため、NKO株の細胞弾性率が上昇したことで転移性が低下したと考えられ、ネスチンが細胞を柔軟化する機能を持つと推察した。IFはN末端側からヘッド、ロッド、テールの3領域で構成されており、ロッド領域がコイルドコイル構造をとり、束化することで繊維を形成する。ネスチンのテール領域は171 kDaと非常に大きく、単独では繊維形成できないことから当該細胞株ではビメンチンと共重合繊維を形成している(図2)。NKO株ではCas9を用いた遺伝子破壊によりロッド領域に両アレルとも欠失が生じていることを確認している。

中村らはマウス乳がん細胞FP10SC2株(SC2株)から作出したネスチンノックアウト株(NKO株)の細胞弾性率が元株より有意に高く、転移性が低いことを見出していた。通常、がん細胞は正常細胞と比較すると弾性率が低く柔らかいため、転移過程において細胞や組織間の間隙を通過しやすくなると考えられる。そのため、NKO株の細胞弾性率が上昇したことで転移性が低下したと考えられ、ネスチンが細胞を柔軟化する機能を持つと推察した。IFはN末端側からヘッド、ロッド、テールの3領域で構成されており、ロッド領域がコイルドコイル構造をとり、束化することで繊維を形成する。ネスチンのテール領域は171 kDaと非常に大きく、単独では繊維形成できないことから当該細胞株ではビメンチンと共重合繊維を形成している(図2)。NKO株ではCas9を用いた遺伝子破壊によりロッド領域に両アレルとも欠失が生じていることを確認している。

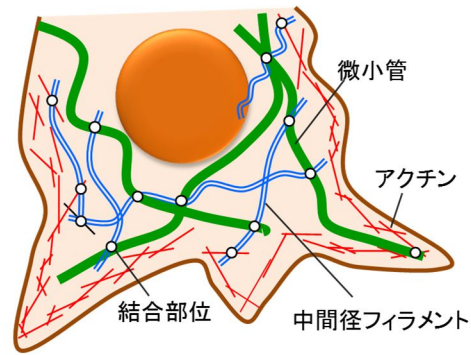


図1 細胞骨格タンパク質のネットワーク構造
細胞内のアクチン、微小管、中間径フィラメントは相互に連結し、3次元的なネットワーク構造を形成する。

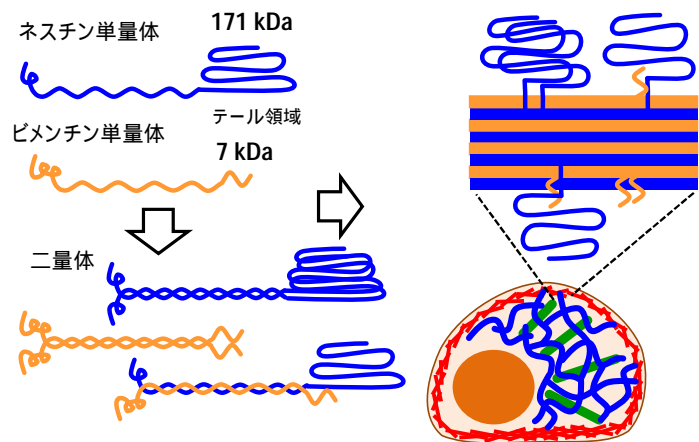


図2 ネスチン - ビメンチン共重合繊維

2. 研究の目的

本研究では、生きた細胞の骨格タンパク質が織りなすネットワーク構造を機械的に解析し、その性質を明らかにする全く新しい手法を開発する。IFは、細胞の弾性を生み出す細胞骨格タンパク質の一つであるが、生化学的解析が難しく、その機能はほとんど解明されていない。本研究では、高転移性のがん細胞で発現するネスチンを標的として、その構造と機能を解明することで本手法の有用性を実証し、細胞生物学、生物物理学に資する新規バイオセンシング技術として確立することを目的とする。また、これによりネスチンの構造と細胞の浸潤性、転移性との関係を解明し、がん細胞の転移メカニズムの一端を明らかにする。ビメンチンは7 kDaのテール領域を介してアクチンと結合することが報告されている。ネスチンとビメンチンが二量体を形成するとテール同士が向き合うため、ネスチンの巨大なテール領域がビメンチン - アクチン間の結合を阻害するのではないかと推察した。

3. 研究の方法

(1) 細胞弾性率の測定

集束イオンビームによりAFMカンチレバーを加工し、直径2.5 μm、長さ10 μmの円柱型探針を作製した。AFMを用いて探針を細胞に圧入し、Force-indentation曲線を得た。これを円柱 - 球体接触のHertzモデルを用いて、細胞接触点から0.5 μm圧入するまでの範囲の曲線に対してフィッティングを行った。

(2) 変異株相補試験

ネスチン全長発現ベクター、C末端にHisタグを付加したネスチン全長発現ベクター、及びC末端にHisタグを付加したテール領域欠失ネスチン発現ベクターを作製し、それぞれリポフェク

ションにより NKO 株に導入した。AFM と円柱型探針を用いて細胞圧入試験を行った後、抗ネスチン抗体または抗 His タグ抗体を用いた免疫染色により全長もしくはテール欠失ネスチン発現の有無を確認した。ネスチン全長発現ベクターを導入した細胞に関しては、適正なネスチン発現量を示す細胞のみで弾性率の評価を行うために、SC2 株で発現しているネスチンの輝度密度の平均値 + 4SD を閾値として設定した。この閾値以上の輝度密度を示したネスチン発現回復細胞は、ネスチン過剰発現細胞とみなし、データから除外した。

(3) 近接ライゲーションアッセイによるビメンチン - アクチン間の結合点の評価

近接ライゲーションアッセイ (PLA) には、Duolink In Situ PLA を用いた。近接を確認したい 2 つの標的タンパク質に抗体を反応させ、異なるプローブのついた二次抗体を反応させる。このプローブが近接していると、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドがリガーゼにより結合されて、閉じた環状分子を形成する。これを鋳型として RCA 増幅反応が起こり、蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズすることで増強したシグナルが赤い蛍光点として観察される。一次抗体にウサギ抗ビメンチン抗体とマウス抗アクチン抗体を用いることで、SC2 株と NKO 株におけるビメンチン - アクチン間の結合点を共焦点顕微鏡観察により評価した。

(4) 抗体修飾ナノニードルを用いた中間径フィラメントの引張試験

集束イオンビームを用いたエッチングにより AFM 探針を加工し、長さ 15 μm 、直径 200 nm 程度のナノニードルを作製した。これに対してフッ酸による酸化膜除去の後、抗体結合微粒子 ZZ-BNC (Biomaterials, 32, 1455, 2011) を用いて抗ビメンチン抗体をナノニードル上に固定化した。この抗体修飾ナノニードルと AFM を用いて、SC2 もしくは NKO 株における IF の引張試験を行った。AFM でナノニードルを 10 $\mu\text{m/s}$ で細胞に挿入し、60 秒間停留した後、10 $\mu\text{m/s}$ で引き上げることで Force-extension 曲線を得た。

4. 研究成果

(1) 細胞弾性の回復

まず、NKO 株に対してネスチン全長発現ベクターを導入し、細胞弾性を評価することで、ネスチンの細胞柔軟化機能の回復を検証した。SC2 株、NKO 株、ネスチン発現回復細胞の各弾性率を測定した結果、ネスチン発現回復細胞では NKO 株と比較して弾性率が低いことが示された (図 3)。これは SC2 株の弾性率とほぼ同程度であり、ネスチン発現により細胞の柔軟性が回復することが示された。次に、テール領域欠失ネスチン発現ベクターを NKO 株に導入し、テール領域が細胞柔軟化に寄与するかどうかを評価した。抗 His タグ抗体を用いた免疫染色を行ったところ、テール欠失ネスチンが細胞質に網目状に存在しており、その局在はビメンチンと一致していた。よって、テール欠失ネスチンがビメンチンと繊維構造を形成していると考え、弾性率の測定を行った。C 末端に His タグを付加したネスチン全長発現ベクターを導入した NKO 株の弾性率が 1.13 ± 0.79 kPa であったのに対し、テール欠失ネスチンを発現した NKO 株の弾性率は 1.86 ± 1.33 kPa と、有意に高いことが示された ($p = 0.008$)。以上より、ネスチンテールが細胞柔軟化に重要であることが明らかとなった。

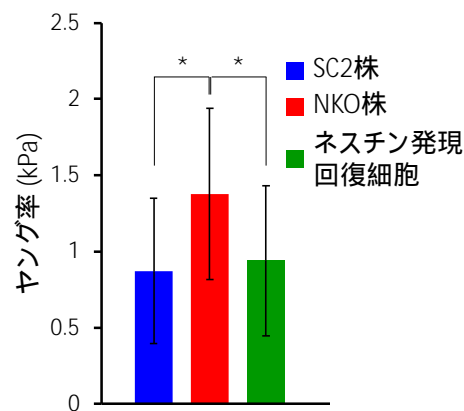


図3 高転移性マウス乳がん細胞の弾性率評価 * $p < 0.001$

(2) ネスチンによるビメンチン - アクチンの結合阻害

上記の変異株相補試験の結果からネスチンのテール領域が弾性率に深く関わることは明らかであり、またネスチン - ビメンチンヘテロ 2 量体形成時にはその構造から、ネスチンテール領域がビメンチン - アクチン間の結合に影響を与えていると推察された。そもそも、ビメンチン - アクチン結合はレオロジー測定により直接結合が示唆されているのみであり (J Biol Chem, 281, 30393, 2006)、細胞内でその結合は確認されていなかったため、PLA によりまず SC2 細胞内のビメンチン - アクチン結合点の数を評価した。その結果、接着側のみならず頭頂側を含め細胞表面全域に渡って、結合点は検出されることが分かった (図 4)。すなわち、ビメンチン繊維

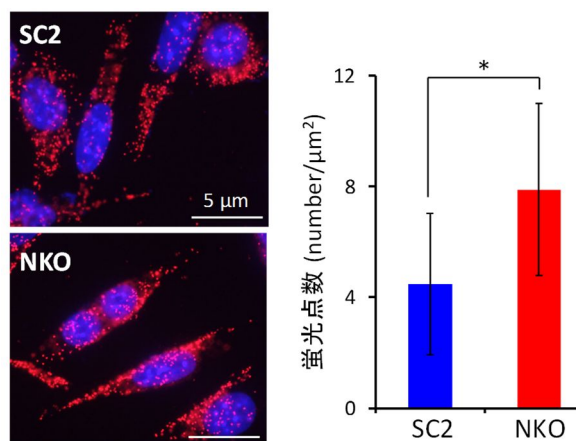


図4 近接ライゲーションアッセイによるビメンチン - アクチン相互作用の解析 * $p < 0.05$

は接着とは関係なく表層を形成する裏打ちのアクチン繊維と結合していると考えられる。これにより細胞質のIFと細胞表層の膜骨格が連結され安定した3次元ネットワーク構造が形成されるものと推察される。一方で、SC2株と比べNKO株における結合点の数が約1.5倍であることが明らかとなった。このことから、ネスチンの巨大なテール領域が、ビメンチンとアクチンの結合を立体障害により阻害することで、細胞弾性率を低下させていることが示唆された (Int J Biol Sci, 5, 1546, 2019)。

(3) ビメンチン繊維の可動性

我々は、ビメンチン-アクチン間の結合点が増加することで、細胞骨格の可動性が増大し、細胞弾性率の低下すなわち柔軟化に繋がると考えた。我々はこれまでに、生細胞にダメージ無く挿入出来る材料として、AFM探針を直径約200nmの針状に加工したナノニードルの開発を行ってきた (Nano Lett, 5, 27, 2005)。表面に骨格タンパク質を認識する抗体を修飾したナノニードルを作製する。この抗体修飾ナノニードルを、AFMを用いて細胞に挿入し、数分間維持する。その際に細胞内で抗原-抗体結合が形成される。ナノニードルを引き抜く際には、抗原-抗体結合の破断に必要な力が、ベースラインを下回る負の成分としてフォースカーブ上に出現する (Biosens Bioelectron, 31, 323, 2012)。SC2株とNKO株の両方で発現しているビメンチンを対象とし、抗ビメンチン抗体を修飾したナノニードルを用いてビメンチンの引張試験を行うことで、繊維の可動性を評価することを考案した。図5にSC2株とNKO株で得られた代表的なフォースカーブを示している。SC2株では、引力側のカーブの傾きが緩やかであるのに対し、NKO株ではより急峻なカーブが観察された。ナノニードル抜去時のforce-elongationカーブにおいて、横軸は繊維の変位、縦軸はカンチレバーにかかる力を表していることから、SC2株の方がより小さな力で繊維が大きく変位したことを意味している。この理由として、骨格構造の可動性が高い、引っ張る繊維の量が少ない、繊維そのものの剛性が異なるという3つの可能性が考えられる。PLAの結果から、ネスチンテール領域によりビメンチン-アクチン間の結合が阻害されることで、ネスチン-ビメンチン繊維の可動性が高い状態であると推察した。一方で、NKO株では引っ張り後すぐに抗原と抗体間の結合が破断していることから、ビメンチン-アクチン間の結合点が多いために可動域が狭く引っ張りにくい繊維であると考えられる。

このような繊維の可動性を定量的に表す指標として、フォースカーブとベースラインの交点における微分係数に注目した。この交点では、抗原-抗体結合がまだ破断しておらず、最大数の結合が存在していると考えてよい。逆にベースラインを下回った領域では抗体結合が破断していく複雑な過程を表しており、定量的な比較、評価を行うことは難しい。交点における微分係数は破断ゼロ、すなわち可動性の最大値を表し相互に比較しようと考えた。SC2株とNKO株におけるビメンチンの引張試験で得られたフォースカーブを解析すると、このベースラインとの交点における微分係数は、それぞれ -41.2 ± 21.1 mN/m、 -57.0 ± 32.3 mN/mとなり、SC2株の微分係数の絶対値が有意に小さい結果となった ($p=0.0412$)。上述のように、このフォースカーブが示す可動性は、引っ張られた繊維量に依存するとも考えられる。しかしSC2株とNKO株におけるビメンチンの発現量に差異は見られず、さらに、引っ張った繊維の量と相関するforce-elongationカーブの積分値(引っ張り仕事)にも有意差は見られなかったことから、量の差の可能性は否定される。また繊維そのものの剛性が異なる可能性は残るが、SC2株NKO株のビメンチン免疫染色像から持続長を評価する限り、差違は無いものと推察される。NKO株と比較して、SC2株の細胞弾性率が低く、アクチン-ビメンチン間の結合の数が少ないことは、繊維の可動性が高いという結果と一致するので、我々はこの微分係数解析により細胞骨格構造の可動性を評価できると考えている。光ピンセットを用いたマイクロレオロジーによりアクチン・ミオシン・架橋剤からなるモデル細胞骨格の力学特性を評価する手法は報告されているが (Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 89, 042711, 2014) 生きた細胞内における細胞骨格としての可動性を評価したのは本手法が世界で初めてである (Int J Biol Sci, 5, 1546, 2019)。

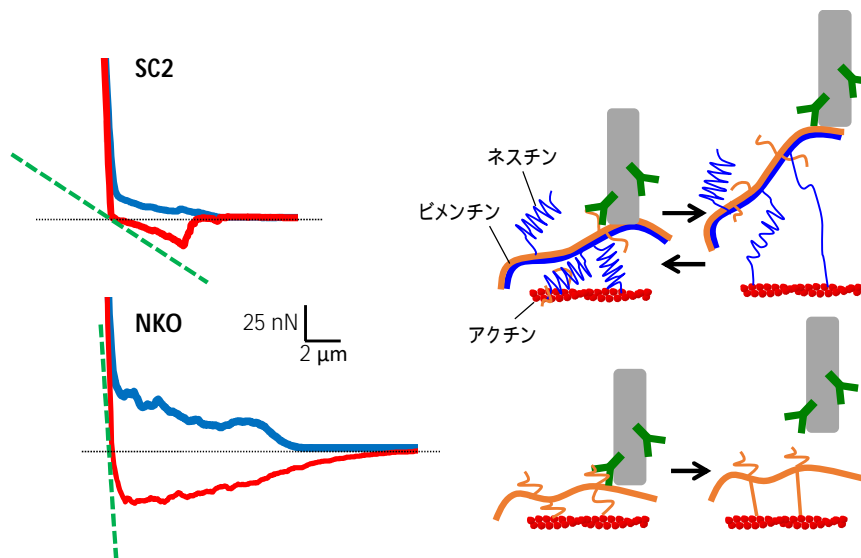


図5 SC2及びNKO株におけるビメンチン引張試験のフォースカーブ(左)と模式図(右)

青がニードル挿入時、赤が抜去時のカーブを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akira Nagasaki, Yoshio Kato, Keiichi Meguro, Ayana Yamagishi, Chikashi Nakamura, Taro Q.P. Uyeda	4. 巻 98
2. 論文標題 A genome editing vector that enables easy selection and identification of knockout cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plasmid	6. 最初と最後の頁 37 - 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plasmid.2018.08.005	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 -
1. 著者名 Ayana Yamagishi, Daisuke Matsumoto, Yoshio Kato, Yuki Honda, Mone Morikawa, Futoshi Iwata, Takeshi Kobayashi, Chikashi Nakamura	4. 巻 9
2. 論文標題 Direct delivery of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins into cells using a nanoneedle array	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Science	6. 最初と最後の頁 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9050965	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 -
1. 著者名 Nishio Maui, Yamagishi Ayana, Tsukakoshi Kaori, Kato Yoshio, Nakamura Chikashi, Ikebukuro Kazunori	4. 巻 1867
2. 論文標題 Selection and Characterization of DNA Aptamers Against FokI Nuclease Domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 165 - 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8799-3_12	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Ryu Seunghwan, Matsumoto Yuta, Matsumoto Takahiro, Ueno Takafumi, Silberberg Yaron R., Nakamura Chikashi	4. 巻 57
2. 論文標題 Improved efficiency of nanoneedle insertion by modification with a cell-puncturing protein	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 03EB02 ~ 03EB02
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.57.03EB02	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 -

1. 著者名 Kim Hyonchol, Ishibashi Kenta, Matsuo Kosuke, Kira Atsushi, Onomura Yui, Okada Tomoko, Nakamura Chikashi	4. 巻 57
2. 論文標題 Adhesion strength of a living cell to various substrates measured using a cup-attached atomic force microscopy chip	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 03EB01 ~ 03EB01
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.57.03EB01	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 -

1. 著者名 Kawamura Ryuzo, Miyazaki Minami, Shimizu Keita, Matsumoto Yuta, Silberberg Yaron R., Sathuluri Ramachandra Rao, Iijima Masumi, Kuroda Shun'ichi, Iwata Futoshi, Kobayashi Takeshi, Nakamura Chikashi	4. 巻 17
2. 論文標題 A New Cell Separation Method Based on Antibody-Immobilized Nanoneedle Arrays for the Detection of Intracellular Markers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 7117 ~ 7124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.7b03918	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 -

1. 著者名 Akira Nagasaki, Saku Kijima, Tenji Yumoto, Miku Imaizumi, Hyonchol Kim, Chikashi Nakamura and Taro Q.P. Uyeda	4. 巻 42
2. 論文標題 The Position of the GFP Tag on Actin Affects the Filament Formation in Mammalian Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 131-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.17016	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 -

1. 著者名 Kim Hyonchol, Yamagishi Ayana, Imaizumi Miku, Onomura Yui, Nagasaki Akira, Miyagi Yohei, Okada Tomoko, Nakamura Chikashi	4. 巻 155
2. 論文標題 Quantitative measurements of intercellular adhesion between a macrophage and cancer cells using a cup-attached AFM chip	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 366 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2017.04.039	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 -

1. 著者名 山岸 彩奈、中村 史	4. 巻 58
2. 論文標題 ナノニードル技術を用いた単一細胞の操作・計測	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 038 ~ 042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.58.038	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 -

1. 著者名 Yamagishi Ayana, Susaki Moe, Takano Yuta, Mizusawa Mei, Mishima Mari, Iijima Masumi, Kuroda Shun'ichi, Okada Tomoko, Nakamura Chikashi	4. 巻 15
2. 論文標題 The Structural Function of Nestin in Cell Body Softening is Correlated with Cancer Cell Metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 1546 ~ 1556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijbs.33423	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54件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 16件)

1. 発表者名 中村 史
2. 発表標題 生細胞の解析と操作を実現するナノニードル技術
3. 学会等名 NanoLSI公開セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石橋健太、岡田知子、中村 史、金 賢徹
2. 発表標題 AFM細胞間接着力測定技術の開発と腫瘍内細胞間相互作用のin vitro
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Ishibashi, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura, Hyonchol Kim
2. 発表標題 Fabrication of a cup-attached AFM chip and its application for quantitative measurements of intercellular adhesion forces
3. 学会等名 Biosensors2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Matsumoto, Ryuzo Kawamura, Ayana Yamagishi, Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Discrimination and mechanical separation of neural stem cell derived from human iPS cell using antibody-functionalized nanoneedle array
3. 学会等名 Biosensors2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本多裕基、山岸彩奈、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 ヒトリンパ球への高効率遺伝子導入に向けたシリコンナノニードル表面における核酸の吸脱着制御
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水澤愛衣、須崎 萌、山岸彩奈、中村 史
2. 発表標題 マウス乳癌細胞の転移性と細胞弾性に関するネスチンのテール領域の機能解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山岸彩奈、須崎 萌、水澤愛衣、中村 史
2. 発表標題 中間径フィラメントネスチンが癌細胞の弾性率に与える影響
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Ishibashi, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura, Hyonchol Kim
2. 発表標題 Measurements of intercellular adhesions of tumor microenvironment cells in vitro by using AFM
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Moe Susaki, Mei Mizusawa, Ayana Yamagishi, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Functional analysis of nestin tail domain in elastic modulus of highly metastatic mouse breast cancer cell
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Ishibashi, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura, Hyonchol Kim
2. 発表標題 Relationship between detachment force and contact time for cells making up tumor microenvironments measured by AFM
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石橋健太、岡田知子、中村 史、金 賢徹
2. 発表標題 AFM細胞間接着力測定技術による腫瘍構成細胞間相互作用のin vitro解析
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Ishibashi, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura, Hyonchol Kim
2. 発表標題 Adhesion Force Measurements of Cells Making Up Tumor Microenvironments by Using Cup-Attached AFM Chip
3. 学会等名 ACSIN-14 & ICSPM26 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chikashi Nakamura
2. 発表標題 A new cell separation method based on antibody-immobilized nanoneedle arrays for the detection of intracellular markers
3. 学会等名 ISNM2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 史
2. 発表標題 メカニカルインターフェースとしての中間径フィラメントの機能
3. 学会等名 最新バイオインターフェース研究会・湯布院 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石橋健太、岡田知子、中村 史、金 賢徹
2. 発表標題 マクロファージとがん細胞間相互作用によるがん細胞の機械的特性変化の計測
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本拓哉、中澤謙太、中村 史、岩田 太
2. 発表標題 ナノニードルアレイを用いたメカノポレーションにおける細胞接触センサーの開発
3. 学会等名 2019年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岸彩奈、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 高転移性マウス乳癌細胞株における塩素イオン排出能の解析
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須崎 萌、山岸彩奈、長崎 晃、貴嶋紗久、上田太郎、水澤愛衣、中村 史
2. 発表標題 ネスチンテール領域のアクチン繊維との相互作用解析
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長崎晃、加藤義雄、目黒慶一、山岸彩奈、中村史、上田太郎
2. 発表標題 高効率で簡便なゲノム編集のための新規ベクターの開発
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長崎晃、加藤義雄、目黒慶一、山岸彩奈、中村史、上田太郎
2. 発表標題 簡便で高効率な遺伝子編集ベクターの開発
3. 学会等名 第13回細胞運動研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長崎晃
2. 発表標題 ファロイジンが結合しない未知核内アクチン繊維構造体の解析
3. 学会等名 第1回分子モーター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayana Yamagishi, Moe Susaki, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Measurement of cancer cell stiffness governed by intermediate filament nestin for non-adherent mimicking cells
3. 学会等名 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Moe Susaki, Ayana Yamagishi, Yuta Takano, Mari Mishima, Miku imaizumi, Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda, Yui Onomura, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Relationship between stiffness of cancer cell and mechanical property of intermediate filament
3. 学会等名 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seunghwan Ryu, Takahiro Matsumoto, Takafumi Ueno, Yaron R. Silberg, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Improvement of Nanoneedle insertion efficiency by cell-puncturing protein
3. 学会等名 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森川萌音、高野勇太、山岸彩奈、加藤義雄、中村 史
2. 発表標題 ナノニードルアレイを用いたCas9蛋白質の直接物理的輸送
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第2回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金 賢徹、石橋健太、山岸彩奈、今泉美玖、松尾幸祐、吉良敦史、小野村由衣、岡田知子、中村 史
2. 発表標題 カップ形状AFMチップによる1細胞マニピュレーションを応用したマクロファージとがん細胞間接着強度の定量的評価
3. 学会等名 日本応用物理学会第78回秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岸彩奈、高野勇太、須崎 萌、岡田知子、中村 史
2. 発表標題 高転移性マウス乳癌細胞の転移機構に関わる中間径フィラメントネスチンにおけるテール領域の機能解析
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池袋 一典、塚越かおり、西尾真初、高野勇太、松本大亮、山岸彩奈、加藤義雄、中村 史
2. 発表標題 周囲の環境に応じて機能が変化するスマートアプタマーの創製
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本雄太、清水桂太、川村隆三、山岸彩奈、飯嶋益巳、黒田俊一、中村 史
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の機械的細胞分離
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本多裕基、山岸彩奈、加藤義雄、中村 史
2. 発表標題 メカノポレーションによる人工ヌクレアーゼの細胞導入
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金 賢徹、石橋健太、松尾幸祐、吉良敦史、小野村由衣、岡田知子、中村 史
2. 発表標題 Adhesion strengths of living cells for various substrates measured by using up-shaped AFM chip
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須崎 萌、山岸彩奈、飯田圭介、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 Effect of nestin and (-)-epigallocatechin gallate on cell elasticity
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 史
2. 発表標題 癌細胞の転移性と細胞弾性の関係を解き明かす細胞骨格のメカノセンシング
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会 年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazunori Ikebukuro, Kaori Tsukakoshi, Maui Nishio, Yuta Takano, Daisuke Matsumoto, Ayana Yamagishi, Yoshio Kato, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Smart aptamers changing its structure and binding affinity to the target protein responding to cations
3. 学会等名 ISNAC2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ayana Yamagishi, Moe Susaki, Yuta Takano, Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda, Tomoko Okada, Akira Nagasaki, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Evaluation of mechanical property of intermediate filament related with stiffness of breast cancer cell by use of nanoneedle and AFM
3. 学会等名 2017 MRS Fall Meeting and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuki Honda, Ayana Yamagishi, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Transfer of plasmid DNA into human lymphocyte using nanoneedle array
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuta Matsumoto, Keita Shimizu, Ryuzo Kawamura, Ayana Yamagishi, Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Mechanical Separation of Neural Stem Cell Derived from Human iPS Cell Using Nanoneedle Array
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Functionalized nanoneedle for living cell analysis and manipulation
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長崎 晃、加藤 義雄、上田 太郎
2. 発表標題 新アクチンノックアウト細胞株樹立のための新規遺伝子編集ベクターの構築
3. 学会等名 第12回細胞運動研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長崎 晃、加藤 義雄、上田 太郎
2. 発表標題 新規遺伝子編集ベクターの構築とアクチンアイソフォームのノックアウト株の樹立
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本雄太、川村隆三、山岸彩奈、飯嶋益巳、黒田俊一、中村 史
2. 発表標題 抗体修飾ナノニードルアレイを用いた機械的細胞分離
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須崎 萌、高野勇太、金山慶大、山岸彩奈、岡田知子、中村 史
2. 発表標題 中間径フィラメントが高転移性マウス乳癌細胞株の弾性率に与える影響
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 史
2. 発表標題 ナノニードルによる生細胞内蛋白質の検出技術
3. 学会等名 日本化学会 第97春季年会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本多裕基、山岸彩奈、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 ナノニードルアレイを用いたヒトリンパ球へのプラスミド導入法の開発
3. 学会等名 日本化学会 第97春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森川萌音、山岸彩奈、齋藤史織、塚越かおり、深澤今日子、石原一彦、池袋一典、中村 史
2. 発表標題 アプタマー修飾ナノニードルによる細胞内VEGFの検出
3. 学会等名 日本化学会 第97春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本雄太、川村隆三、山岸彩奈、飯嶋益巳、黒田俊一、中村 史
2. 発表標題 ナノニードルアレイを用いたヒトiPS細胞由来神経幹細胞の機械的細胞分離
3. 学会等名 日本化学会 第97春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Moe Susaki, Ayana Yamagishi, Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Detection and analysis of intermediate filament in a living cell using antibodyfunctionalized nanoneedle and AFM
3. 学会等名 11th European Meeting on Intermediate Filament (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayana Yamagishi, Moe Susaki, Yuta Takano, Mari Mishima, Mei Mizusawa, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 The structural function of nestin in cell body softening is correlated with cancer cell metastasis
3. 学会等名 11th European Meeting on Intermediate Filament (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Nanoneedle technology for living cells
3. 学会等名 International workshop on Bioiontronics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 史
2. 発表標題 生細胞における中間径フィラメントの可動性解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会SPM研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水澤愛衣、須崎 萌、山岸彩奈、長崎 晃、貴嶋紗久、上田太郎、中村 史
2. 発表標題 マウス乳癌細胞において細胞柔軟化に寄与するネスチンのドメイン解析
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 史、須崎 萌、水澤愛衣、山岸彩奈、飯嶋益巳、黒田俊一
2. 発表標題 ナノニードルを用いた繰り返し引っ張り試験による中間径フィラメントの可動性解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水澤愛衣、須崎 萌、山岸彩奈、長崎 晃、貴嶋紗久、上田太郎、中村 史
2. 発表標題 がんの悪性度に関するネスチンのテール領域とアクチン繊維の相互作用解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岸彩奈、須崎 萌、水澤愛衣、長崎 晃、貴嶋紗久、上田太郎、中村 史
2. 発表標題 抗体修飾ナノニードルを用いた生細胞における中間径フィラメントの可動性解析
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

セルサージェリー技術の開発 https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-cme/index.html セルサージェリー技術の開発 https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-cme/ セルサージェリー技術の開発 http://staff.aist.go.jp/chikashi-nakamura/
--

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	山岸 彩奈 (Yamagishi Ayana) (00778293)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	
研究分担者	長崎 晃 (Nagasaki Akira) (30392640)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	