

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650046

研究課題名(和文)細胞接着面のラベルフリー定量的可視化法の開発

研究課題名(英文)Development of label-free and quantitative imaging of cell adhesion

研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50551173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光干渉法をベースとした細胞接着面のイメージング法を、装置・解析の両面から更に発展させ、より高コントラスト且つ定量的な計測が行えるようにした。さらに本手法を用いて、様々な細胞種の接着と機能との定量相関の取得に挑んだ。特に、がん細胞においては、接着面積と転移能との定量相関を初めて見出し、ラベルフリーの細胞接着のスクリーニング法としての応用可能性を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this work, a high-contrast and quantitative imaging method of cell adhesion has been developed by improving instruments and analysis of optical interferometry. In addition, the new method was applied to the study of the quantitative correlation between adhesion and functions of various cells. In particular, the method provided the first quantitative insights into the correlation between adhesion and metastatic ability of cancer cells, which clearly shows the potential of this method for the applications to label-free screening of cell adhesion.

研究分野：生物物理化学

キーワード：光イメージング法 細胞接着 光干渉 原子間力顕微鏡 細胞培養基板設計 がん細胞 定量計測

## 1. 研究開始当初の背景

細胞接着は、単細胞から多細胞に至る組織形成のファーストステップであるとともに、様々な生命機能に關与する重要プロセスである。また近年、細胞が接着を介して、周辺環境の生化学的特性だけではなく、周囲の“硬さ”を認識し、その機能(分化・走行性など)を決定していることが明らかとなった。このような背景の元、細胞接着と細胞機能との相関解明に注目が集まり、様々な研究グループが細胞接着の高解像顕微鏡観察に挑んでいる。一般的には、細胞接着の観察は、蛍光をベースとした光学顕微鏡法により行われることが多い。この手法では、細胞接着を誘起する各種接着分子を蛍光ラベルしておき、その空間分布を検出する。しかし、蛍光は細胞接着分子を検出する方法としては有効であるが、接着分子の存在は必ずしも細胞と外場との物理的な接触を意味しない。さらに接着分子の蛍光観察では、クーロン力や分子間力など、リガンドレセプター結合を介さない他の物理的相互作用による接着を検出することはできない。よって、細胞接着と細胞機能との定量的な相関を得るためには、細胞と外場との間の物理的接触を定量評価する方法の開発が必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞外部環境間接着の定量的可視化が可能な光イメージング法を開発するとともに、細胞接着と細胞機能との定量相関の解明に挑むことにある。

近年研究代表者は、反射型光干渉法(Reflection Interference Contrast Microscopy, RICM)をベースに、細胞基板間の物理接触を高コントラストに可視化できる手法を開発してきた。RICMは、細胞膜からの反射光 $I_1$ と、基板からの反射光 $I_2$ からなる光干渉像を得るイメージング方法である。本手法は、光干渉に基づいているため、Z軸空間分解能は $\sim$ nmと非常に高く、細胞基板間の物理的接触を判別することが可能である。研究代表者はRICMに高輝度光学系を組み合わせ、より高コントラストに細胞接着を検出できる手法を開発してきた。特に、共焦点光学系を導入したRICMを用いることで、通常型のRICMでは不可能な細胞ゲル基板間の物理接触の検出を行うこともできる。そこで本研究では、このRICMをベースとした細胞接着面のイメージング法を、装置・解析の両面から更に発展させるとともに、様々な細胞種に応用することで細胞接着と細胞機能との定量相関を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞接着面の定量的スクリーニング法の開発

本研究では、細胞の接着面に関する定量的な情報を得るために、化学的および物理的に表面処理を施した細胞培養基板をデザイン

した。具体的には、平面脂質二重膜や有機シラン単分子膜などを修飾したガラス基板を作製した。それぞれの基板では、接着タンパク質の密度や領域などを空間制御できるため、細胞と基板との間に働く物理的相互作用を明確にした上で、細胞接着面を解析することができる。これらの基板上で、様々な細胞の接着面を系統的に計測・解析した。

### (2) 細胞の接着面と接着力の同時計測システムの開発

細胞の接着面と接着力との定量相関を得ることを目的に、原子間力顕微鏡とRICMとを組み合わせた新規計測システムの立ち上げを行った。ここでは、細胞を原子間力顕微鏡のカンチレバーに固定し、基板に押し付ける。その後、細胞基板間の接着力をRICMをベースとした光干渉法でモニターしつつ、細胞を基板から脱離することで、接着力と接着面積・形状との定量相関を得ることを目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞接着面の定量的スクリーニング法の開発

作製した細胞培養基板上で、マウスメラノーマ細胞(B16-F10, B16-F1)、乳腺上皮細胞(MCF10A)、Tリンパ球性白血病由来細胞(CCRF-CERM)など、接着性および浮遊性の細胞の接着面を系統的に計測した。また、ラマン散乱とRICMの同時計測が可能な新たな実験システムの構築にも成功した。本報告書では、これまでの結果の中で、既に論文発表に至っている、がん細胞の接着面と転移能との相関解明に関する成果の詳細を述べる[雑誌論文成果]。ここでは、早稲田大学の谷井孝至教授らのグループと連携し、単一がん細胞の接着性を系統的に計測可能な実験系を開発した。近年谷井教授らは、ガラス表面に、細胞接着性のAPTES SAM(3-aminopropyltriethoxysilane self assembled monolayer)の円状パターン(直径約15 $\mu$ m)がアレイ状に配列した基板を作製した。円状パターンの周囲は、細胞非接着性のODS(n-octadecyltrimethoxysilane)SAMで修飾されており、各APTESの円状パターン上に単一細胞のみが接着するように最適化されている。本研究では、本パターン基板とRICMを組みあわせ、がん細胞と基板との間の接着面を系統的に定量評価することが出来る実験系を構築した。

図1にパターン基板および基板上的マウスメラノーマ細胞(B16-F1)の明視野とRICM像を示す。基板の像からは、APTESとODSの単分子膜の厚さや屈折率の違いに由来し、円状パターンの内外で明暗のコントラストがついているのが確認できる。この基板に対してB16-F1細胞を播種すると、APTES SAMスポットに対して細胞一つが接着し、その接着面が明暗の干渉パターンによって可視化でき

ることがわかった。また、光干渉の理論式を用いて、APTERS 上のポリスチレンビーズ( = 100  $\mu\text{m}$ ) の高さプロファイルを再構築し、ビーズの直径から推測した高さプロファイルとも良い一致を示すことがわかった。これらの結果から、本パターン基板を用いた場合でも、細胞 基板間の距離を反映した RICM 像が得られることが明らかとなった。

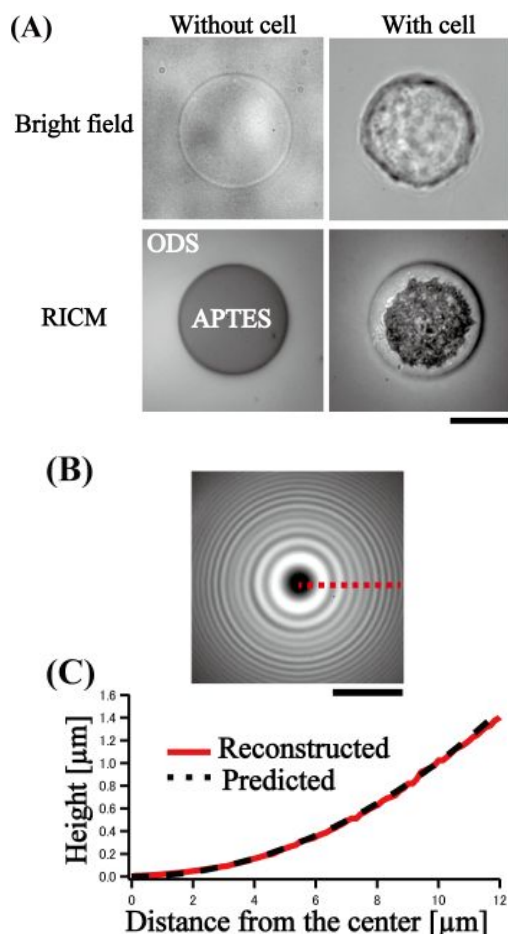


図 1 (A) パターン基板および B16-F1 細胞の明視野像と RICM 像 (B) APTES SAM 上のポリスチレンビーズ( = 100  $\mu\text{m}$ ) の RICM 像と (C) それを元に構築した高さプロファイル。発表論文 から許可を得て転載。

さらに、本実験系を用いて、転移能の異なるマウスメラノーマ細胞(B16-F1 と B16-F10) の接着性の定量比較を行った(図 2)。今回は、干渉光強度のしきい値を組み込んだ画像解析法を開発し、それを元に 2 種類の接着面積を定義した。まず、 $A_{\chi=0.48}$  は、簡便な光干渉モデルによると細胞膜 基板間距離が約 50 nm 以下の領域を示し、これは主に接着斑のような鍵 鍵穴による特異的な接着相互作用の領域を示す。一方、 $A_{\chi=1.0}$  は、非特異的な相互作用を含む領域であり、細胞の投影面とほぼ一致する。明視野像からは、B16-F1 と B16-F10 の間に大きな違いはなかったが、RICM 像からは、B16-F10 の方が APTES SAM の領域の端まで進展し強く接着していること

が分かった。さらに、B16-F10 の方が、約 1.5 倍大きい接着面積を示すことがわかった。既にマウスを用いた実験により、B16-F10 は B16-F1 よりも大きな転移能を示すことが知られている。よって、本実験の結果は、接着面積が、がん細胞の転移能の指標となりうることを示唆していると考えられる。

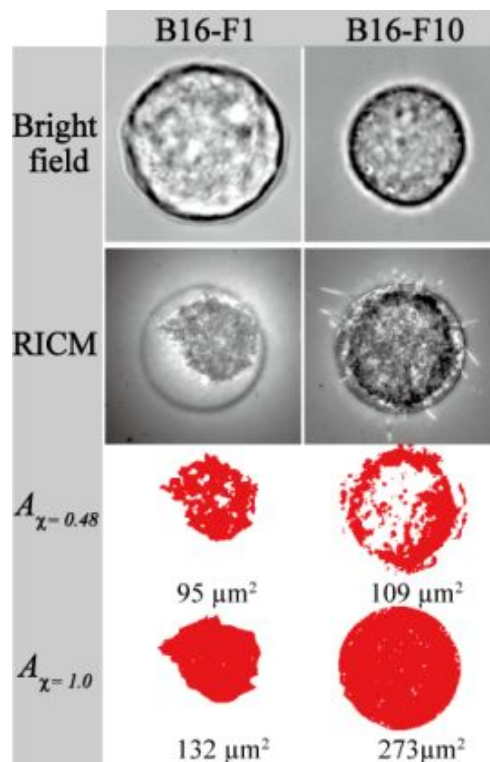


図 2 パターン基板上的 B16-F1 および B16-F10 細胞の透過像、RICM 像、およびその画像解析の結果。発表論文 から許可を得て転載。

## (2) 細胞の接着面と接着力の同時計測システムの開発

ここでは、細胞-基板間の接着面と接着力の同時測定用を行える実験システムを開発した。接着力の測定用に、細胞を固定したカンチレバーを作製した。具体的にはまず、シリコン製カンチレバー(ばね定数  $\sim 0.03$  N/m) の表面に細胞接着性タンパク質(フィブロネクチン)を物理吸着させた。次にそのカンチレバーを、牛血清アルブミンでコートしたガラス基板上的細胞に 1 nN の力で 1 分間押し付けた後、基板から引き上げた。これらの操作によりカンチレバー先端に細胞が固定され、細胞-基板間接着力を AFM により測定することができるようになった。AFM と RICM を組み合わせる際には、カンチレバー底面からの反射光を抑えるために、カーボン蒸着を施したカンチレバーを用いた。

以上のシステムを用いて、マウスメラノーマ細胞(B16-F10)を固定したカンチレバー

を、牛血清アルブミンまたはフィブロネクチンでコートしたガラス基板に押し付ける過程(Extend)と、遠ざける過程(Retract)のフォースカーブを測定した。その結果、Extendでは正方向に力が単調増加したのに対して、Retractでは負の方向に極小値を示すカーブが得られた。ここで負の力とは、カンチレバーが基板と逆方向に力を印加していることを示している。よってRetractにおける力の極小値は、細胞をガラス基板から引き剥がすために必要な力( $F_{\text{detach}}$ )を示していると思なすことができる。 $F_{\text{detach}}$ は、フィブロネクチンをコートした基板で約 50 nN、アルブミンをコートした基板で約 0.5 nN 程度であり、コートの材料で 100 倍ほどの差が検出された。これはフィブロネクチンが、インテグリンとの特異的な接着構造を作るのに対して、アルブミンは特異的な接着相互作用がないことに由来する。また、基板からの脱離過程をRICMにより計測したところ、カンチレバーを基板から遠ざけるにしたがって、接着領域が減少していく様子を明瞭に計測することに成功した。特にフィブロネクチンの場合には、細胞中央部から、周辺部にかけて段階的に脱離するような興味深いダイナミクスが計測された。現在までに、本システムを用いてさらに詳細な計測と解析を進めており、接着に寄与する物理的相互作用の全容の定量解明に関する結果として、近いうちに成果発表を行いたいと考えている。

#### <引用文献>

A. J. Engler et al., Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, Cell, Vol 126, 2006, pp.677-689.

T. Matsuzaki, G. Sasaki, M. Suganuma, T. Watanabe, T. Yamazaki, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, High Contrast Visualization of Cell-Hydrogel Contact by Advanced Interferometric Optical Microscopy, Journal of Physical Chemistry Letters, Vol.5, 2014, pp. 253-257.

T. Tanii, K. Sasaki, K. Ichisawa, T. Demura, Y. Beppu, H. A. Vu, H. T. Chi, H. Yamamoto, Y. Sato, Application of organosilane monolayer template to quantitative evaluation of cancer cell adhesive ability, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 50, 2011, p. 06GL01.

#### 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 2件)

R. Sakamoto, E. Kakinuma, K. Masuda, Y. Takeuchi, K. Ito, K. Iketaki, T.

Matsuzaki, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, H. Yamamoto, Y. Sato, T. Tanii, Quantitative comparison of cancer and normal cell adhesion using organosilane monolayer templates: An experimental study on the anti-adhesion effect of green-tea catechins, In Vitro Cellular & Developmental Biology -Animal, 査読有, in press.

DOI:10.1007/s11626-016-0049-6

T. Matsuzaki, K. Ito, K. Masuda, E. Kakinuma, R. Sakamoto, K. Iketaki, H. Yamamoto, M. Suganuma, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, T. Tanii, H. Y. Yoshikawa, Quantitative Evaluation of Cancer Cell Adhesion to Self-Assembled Monolayer-Patterned Substrates by Reflection Interference Contrast Microscopy, Journal of Physical Chemistry B, 査読有, Vol. 120, 2016, pp. 221-1227.

DOI: 10.1021/acs.jpccb.5b11870

#### [学会発表](計 4件)

H. Yoshikawa, Physical Studies of Cell-Substrate Mechanical Interactions for the Regulation of Cell Migration and Tissue Formation, International Symposium: Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter, 2015.9.23-26, Kyoto University, Kyoto, Kyoto, Japan.

佐藤健, 松崎賢寿, 川村隆三, 中林誠一郎, 吉川洋史, 細胞接着ダイナミクスの解明に向けた新規計測システムの開発, 超高速バイオアセンブラ 第4回若手シンポジウム, 2015.7.3, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中市, 大阪府.

H. Yoshikawa, Quantitative Evaluation of Cell Adhesion by Advanced Optical Techniques, WPI iCeMS- "Bio Assembler" International Joint Symposium, 2014.5.16, iCeMS, Kyoto, Japan.

H. Yoshikawa, Quantitative evaluation of cancer cell adhesion by functional substrate and optical interferometric technique, The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2014.6.21, Saitama Cancer Research Center, Saitama, Japan.

#### [図書](計 2件)

H. Y. Yoshikawa, Quantitative

Evaluation of Cell-Hydrogel Adhesion by Advanced Optical Techniques, , Springer, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems (Ed. T. Arai, F. Arai, M. Yamato), 2015, Chapter 13 pp.223-234.

松崎賢寿,吉川洋史,細胞-ゲル間接着の定量的可視化,株式会社エヌ・ティー・エス,三次元ティッシュエンジニアリング ~細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで~, 2015年,第1編 第1章 第2節 pp.21-26.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉川 洋史(YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 50551173

### (3)連携研究者

佐崎 元(SAZAKI, Gen)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号: 60261509