

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12871

研究課題名(和文)細胞が生じる収縮力を直接的に計測する新手法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel method for measuring of cell contraction force

研究代表者

杉田 修啓(Sugita, Shukei)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20532104

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):細胞の基本的機能の1つである収縮力を計測するため、力変化による複屈折量の変化を利用した計測法開発を目指した。複屈折量の指標であるリタデーションは、細胞へ収縮・弛緩薬の投与に応じてそれぞれ増加・減少し、従来法である牽引力顕微鏡法により得た細胞収縮力と有意に相関した。また、リタデーションの発生源であるストレスファイバ1本を単離させたところ、収縮力増加時にリタデーションが増加する傾向が得られた。したがって、リタデーションが細胞収縮力の良い指標であることが示唆された。

研究成果の概要(英文):Cell contraction force is one of the important functions of cells. The aim of this study is to develop a method for measuring the contraction force using retardation of stress fibers. When contraction and relaxation reagents were applied to cells, cell retardation increased and decreased, respectively. Cell traction force which was measured using a conventional traction force microscopy correlated significantly with cell retardation. Retardation of a isolated single stress fiber tended to increase when contraction reagent was applied. These results indicate that retardation is a good indicator of the cell contraction force.

研究分野：総合領域

キーワード：バイオメカニクス 細胞・組織 細胞骨格 張力計測

### 1. 研究開始当初の背景

細胞が生じる収縮力は、分裂、遊走など細胞の基本的機能の原動力である。また、近年では、細胞収縮力がその周囲にも影響を及ぼし、組織の形態形成や遺伝子発現等様々な生命現象に影響すると言われている。したがって、細胞の収縮力計測はこれらの解明に必要不可欠である。

この収縮力の従来計測法に、剣山状のマイクロピラー上に細胞を播種し、収縮力で曲がるピラーの変形量から力を計測する方法 (Tan et al, PNAS, 2003) がある。しかし、ピラー上では細胞移動が抑制され、計測した力は細胞本来の力とは異なる可能性がある。また、ビーズなどの変形マーカーを柔らかいゲル基板に埋め込み、その上に播種した細胞がゲルを変形させる量とゲル弾性率から収縮力を測定する牽引力顕微鏡法 (Traction Force Microscopy, 以下 TFM) もある (Lee et al, J Cell Biol, 1994)。しかし、この方法はゲルの変形が必須であるため、我々の経験では基板かたさが 100 kPa 以上では計測限界以下まで変形が小さくなり計測できなかった。ところが、例えば血管平滑筋細胞は、生理下で 1 MPa 程度のかたさ環境で生息しているため、従来法では細胞本来の収縮力計測ができないことになる。また、計測可能な範囲で基板かたさを変化させて TFM で収縮力を計測すると、2 kPa と 50 kPa の基板かたさでは収縮力が約 8 倍も異なった (水谷ら, 日本生体医工学会, 2015) ことから、生体内のようにかたい約 1 MPa の基板でも収縮力が計測できるよう、基板かたさに依存しない計測手法が必要である。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、基板のかたさに依らずに細胞収縮力を計測できる新手法の開発を目指した。非常に小さい細胞内小器官の収縮力による変形を計測するため、本研究では光弾性を利用することとした。光弾性では、物質に力が加わると物質内の方向により屈折率が変わる、複屈折物質になる。屈折率が「物質中に対する真空中の光速の比」であるため、物質中では屈折率の高い方向に振動面を持つ偏光は遅く、屈折率の低い方向には速く光が進む。したがって、両者を同時に入射させると出射光では位相差 (以降、リタデーションと呼ぶ) が生じ、これが屈折率変化、即ち力による変形に依存すると考えられた。そこで、この原理を利用して細胞内の力を測定することを目指すこととした。

そのため、本研究では、「1. 細胞の収縮力変化で細胞のリタデーションが変化するか?」、「2. リタデーションで収縮力を定量計測できるのか?」を調べ、本法の定量計測性検証と計測メカニズムの解明を目指した。さらに、生体内に近いかたさの基板での収縮力計測等、「3. 本手法で実際に異なる細胞タイプで収縮力が異なるか?」を検証するこ

とを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、全てブタ胸大動脈から血管平滑筋細胞を単離し、これを継代培養したものをを用いた。

始めに、細胞の収縮・弛緩薬投与時にリタデーションが増減するかを調べた。細胞のリタデーションの発生源であるストレスファイバに収縮力を発生させることができる Calyculin A を培養細胞に投与した。一方で、ストレスファイバを弛緩させるとされる Y-27632 も培養細胞に投与した。また、対照群として、培養液のみを細胞に投与したディッシュも用意した。いずれも投与後 10 分ごとに 50 分間にわたり、1 細胞の投影単位面積当たりのリタデーションを計測した。

次に、より直接的に収縮力とリタデーションが相関するかを調べるため、従来法である TFM で細胞の収縮力を計測しつつ、同一の細胞に対して細胞のリタデーションを計測した。弾性率約 16 kPa のアクリルアミドゲル基板に蛍光ビーズを播種し、この上に細胞を播種した。既報の TFM に従い、細胞周辺の応力分布を求めた後、細胞の長軸方向成分の応力を合計して、細胞収縮力とした。一方、細胞内のリタデーションを総和して、細胞総和リタデーションとし、細胞収縮力と比較した。

そして、リタデーション値と細胞収縮力の関係を求めるため、細胞から収縮力の発生源であるストレスファイバのみを単離し、ストレスファイバの引張によりリタデーションが定量的に変化するかの確認した。

さらに、本法の実用例として、収縮力の異なる 2 種類のフェノタイプの細胞群を用意し、両者のリタデーションを比較することに取り組んだ。

### 4. 研究成果

始めに、収縮薬・弛緩薬を投与した際の細胞のリタデーションを計測した (図 1)。収縮薬を投与すると、投与後にリタデーションが増加し始め、50 分後には対照群より有意に高

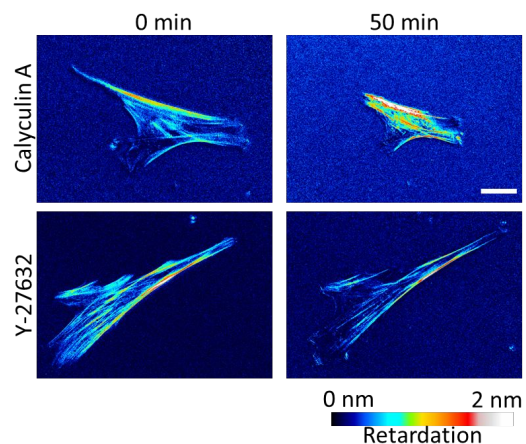


図 1 収縮薬・弛緩薬投与後のリタデーション変化。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

値となった。一方、弛緩薬を投与するとリタデーションが減少し始め、投与後 10 分後には対照群に比して有意に低値となった。なお、対照群のデータは、投与前のリタデーションと有意差がなかった。したがって、収縮薬・弛緩薬の投与に応じてリタデーションがそれぞれ増加・減少したことが確認できた。しかし、この収縮薬や弛緩薬を投与すると、同時に細胞面積も変化する結果が得られた。リタデーションは複屈折物質の量にも依存するため、投影面積が変化するとそれにより複屈折物質の密度も変化し、それによりリタデーションが変化したことも考えられる。そこで、細胞の投影面積変化を補正した 1 細胞当たりのリタデーションを計測した。その結果、細胞の面積変化を考慮しても、やはり収縮薬投与時にリタデーションが増加し、弛緩薬投与時にリタデーションが減少する結果が得られた。したがって、リタデーションの収縮力指標としての利用可能性が高まった。

しかし、試薬投与では、細胞面積変化による補正が必要であったこと、さらには時間経過中に細胞が応答して変化した可能性も否定できないこと、などを考えると、検証が不十分であると考えられた。そこで、より直接的に収縮力とリタデーションの関係を調べるため、従来の細胞収縮力計測法である TFM を行いつつ、細胞のリタデーションを同時に計測した (図 2)。その結果、TFM 像とリタデーション像の分布は異なる様子であったものの、1 細胞当たりの細胞収縮力は、1 細胞当たりの細胞総和リタデーションと有意に相関した。したがって、リタデーションが細胞収縮力に依存して変化することをより直接的に示した。

以上より、リタデーションが力の指標になることはおおよそ確認ができたが、具体的にリタデーション値から力を予測できるためには、リタデーションを力でキャリブレーションする必要がある。そこで次に、リタデーションの発生源であるストレスファイバ 1 本

を単離して引張試験を行い、実際に線維に加わる力を計測しつつ、リタデーション値を計測する試験を実施した。その結果、これまでに引張試験時のリタデーション計測は実施したが、試料が大変形するために引張時の試料の投影面積変化の補正が必要であることが分かった。しかし、この補正法により結果が大きく異なることが判明した。この補正法の正当性を検討したが、どれも正当性を得るに至らなかった。

そこで、少し手法を変更し、等尺性収縮 (試料サイズを変化させないまま収縮力を増加させる) に手法を変更することを試みた。この実験を実施した結果、まだデータ数は少ないものの、これまでのところ、収縮力の増加によりリタデーションが増加する傾向である結果が得られた。この実験は、細胞膜を破壊してさらにバッファで試料を洗浄した後実施しているため、細胞応答による影響は排除できている。したがって、リタデーションの収縮力指標としての有効性を示すことができたと考える。今後はデータを蓄積して定量性を評価することが必要である。

さらに、この指標で本当に収縮力の変化が評価できるかを確認するため、細胞のフェノタイプが変わる 2 条件で、リタデーションの変化を調べることも試みた。その結果、収縮力が上がるフェノタイプになるとされると報告されている条件下で、細胞総和リタデーションが増加傾向にあった。したがって、本法で細胞タイプを判定できる可能性を示した。ただし、こちらもまだデータ数が少ないため、今後もデータの蓄積が必要である。

今後は、この結果を信頼性あるものにするとともに、その計測原理メカニズムの解明し、新手法として確立していくことを求めていく予定である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

保崎雅俊, 杉田修啓: 複屈折量計測による細胞骨格の発生張力の推定法に関する研究, 日本機械学会東海支部第 47 回学生員卒業研究発表講演会, 静岡大学 (浜松), 2017.3.13

Shukei Sugita, Eri Mizutani, Masatoshi Hozaki, Tsubasa S Matsui, Shinji Deguchi, Takeo Matsumoto: Estimation of cell forces in stress fibers with birefringence measurement, 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland, 2017.9.14-17

Shukei Sugita, Eri Mizutani, Masatoshi Hozaki, Tsubasa S Matsui, Shinji Deguchi, Takeo Matsumoto: Estimation of tension in a

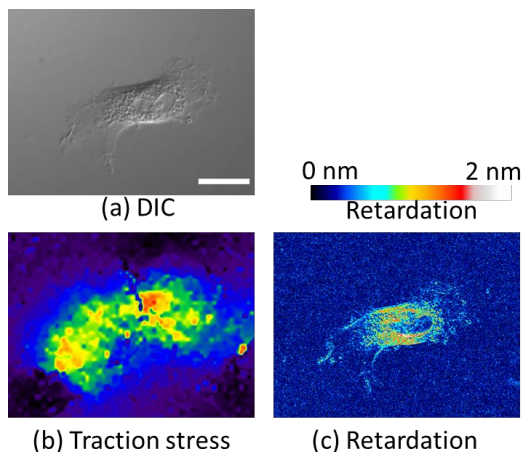


図 2 TFM とリタデーションの同時観察。(a) 微分干渉像, (b) 牽引力 (応力) 分布像, (c) リタデーション像。(a) のスケールバーは 20 μm。

stress fiber using photoelasticity, International Symposium on Biomedical and Environmental Materials, Nagoya, Japan, 2017.11.1-2

保崎雅俊, 松井翼, 出口真次, 中村匡徳,  
杉田修啓:複屈折量を用いた細胞張力の推  
定法の開発:ストレスファイバ内張力の操  
作によるリタデーション変化,日本機械学  
会 2018 年度年次大会, 関西大学

〔その他〕

ホームページ等

名古屋工業大学 医用生体工学研究室 研  
究紹介

<http://biomech.web.nitech.ac.jp/research/research.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

杉田 修啓 (SUGITA, Shukei)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 20532104