

学位論文題名

原子間力顕微鏡を用いた過渡的な細胞力学に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】 細胞は、胚性幹細胞から始まって分化・増殖因子により前駆細胞、心筋細胞や骨細胞、線維芽細胞などの機能性細胞へと分化し、その後老化し細胞死へと向かう。このような一連のライフサイクルには、細胞移動、分化、細胞形態変化などの極めて広い時間スケールの過渡現象が存在する。これらの細胞の過渡現象は、細胞内の生化学反応だけでなく、細胞骨格構造に起因する細胞力学特性により制御されていると考えられているが、前者に比べて、後者に関する知見は十分には得られておらず、その方法論も確立しているとは言い難い。本論文は、過渡的な細胞力学特性の精密計測法を提案し、いくつかの過渡的な細胞力学特性を解明することを目的としている。

原子間力顕微鏡 (AFM) は、細胞力学の測定法の 1 つである。AFM は、力分解能と空間分解能の両方に優れ、任意の場所の細胞力学特性を計測することができる。AFM 以外の細胞力学測定法は、細胞構造を不可逆に変化させたり、接着している細胞を剥離させたりするが、それらに比べて、AFM の細胞への侵襲度は小さい。

一方で、AFM はその操作性の煩雑さから 1 度の実験で数個の細胞しか測定することはできない欠点をもつ。そのため、AFM の本質的に有している力分解能にもかかわらず、細胞力学特性の絶対値の信頼性は高いとは言えない。なぜなら、細胞は同じ環境下で培養された場合でも、時間的なゆらぎや空間的なゆらぎだけでなく、細胞各々のばらつきをもっているからである。特に、細胞力学の過渡現象において、そのような細胞力学特性の不均一性はさらに増大する可能性がある。したがって、細胞力学特性を精密に計測し、過渡的現象の細胞物性の普遍性を解明するには、AFM を用いて多数の細胞を短時間で測定し、細胞力学のアンサンブル平均を議論することができる実験系の確立が必須である。

【目的】 本研究では AFM とマイクロアレイ技術を組み合わせた多数細胞測定法を提案し、過渡的な細胞力学特性を統計分布から解明することを目的とする。細胞の過渡現象として、(1) 細胞が増殖し他領域で伸展成育する接着過程の状態、(2) ストレスを受けることによって通常状態から逸脱し肥大する状態、(3) 外因性機構に調整を受けたことにより拍動挙動が変化する状態、(4) 形質転換過程と呼ばれる細胞が通常増殖から、老化細胞、不死化細胞へと変化する状態と 4 つの異なった過渡現象の細胞力学特性を調べることを目的とした。(3) は拍動挙動の空間依存性を調べた。

【結果・考察】 細胞配列を可能とするマイクロアレイ技術により、細胞を整列化させ、マイクロアレイ上の細胞の配列状態および細胞活性の確認を行った。1 個の井戸には 1 個の核のみが確認され、複数の細胞が重なっておらず、単層の細胞アレイが作製でき、井戸への充填率は、98% 以上にすることが可能であることが分かった。さらにマイクロアレイ上に播種した細胞の F-アクチンを観察した結果、培養時間の経過にともなってストレスファイバー状になっていたことから、マイクロアレイ上でも通常培養ディッシュ上と同じように細胞活性を失わずに培養可能であることが分かった。

線維芽細胞を用いて初期接着過程における多数細胞の力学特性の評価を行った結果、培養時間の経過にともなう弾性率は有意に大きくなることが明らかとなり、接着開始時からの細胞骨格の重合促進の経過が培養時間経過にともなう弾性率の有意な増加と一致することが分かった。また、細胞数分布はすべての培養時間において弾性率の分布は対数正規分布であることが分かった。対数正規分布は、細胞力学に限らず様々な自然現象において出現することが知られており、本実験結果も対数正規分布に従ったと考えられる。

筋芽細胞を用いて酸化ストレスによる肥大過程における多数細胞の力学特性の評価を行った結果、酸化ストレスと同様に活性酸素種を発生させる過酸化水素の付加濃度の増加に従って、弾性率は有意に小さくなることが分かった。F-アクチンを定量的に測定した結果、過酸化水素の付加直後は付加濃度の増加に従って F-アクチンの量が少なくなることが分かり、弾性率の結果と一致した。その後、付加した過酸化水素を取り除き培養を行うと、培養時間の経過にともなう細胞の肥大が起こり、培養 72 時間後には弾性率がコントロール群と同程度まで回復することが分かった。弾性率の細胞数分布は、全ての過酸化水素付加濃度および付加後の培養時間において、対数正規分布であった。

心筋細胞の拍動挙動の詳細は、これまでほとんど調べられておらず、空間的相関が明確でない。そこで、新生児ラット心筋細胞を用いて安定した拍動挙動の空間的測定を行った。拍動挙動を促進する薬剤を用いて過渡状態における拍動挙動の評価を行った結果、拍動挙動には空間依存性が存在し、細胞中心部では細胞が膨張するように変化し、細胞周縁部では変位は小さいが細胞が収縮するように変化する部位があることが分かった。細胞表面のヤング率は、細胞中心部は周縁部よりも小さく、周縁部に向かうに従って大きくなった。拍動挙動を促進するイソプロテレノールを用いてその影響を検討した結果、薬剤付加前後での変位量において増加した部位と変化がなかった部位とが確認され、イソプロテレノールの効果にも空間依存性が存在した。過渡状態であるイソプロテレノール付加前後で弾性率に変化が無く、付加前後の拍動振幅は直下の細胞弾性率に依存しないことが分かった。これらのことから、今後多数細胞の測定を行うことで、より精密な過渡的現象の評価が行えると考えられた。

ラット皮膚由来線維芽細胞を用いて、形質転換過程における多数細胞の力学特性の評価を行った結果、細胞の複素弾性率の周波数依存は、通常増殖、老化細胞、不死化細胞と全ての状態において確認でき、べき乗則に従うことが分かった。また、全ての状態において Structural damping model でフィットし求められた弾性率のスケールファクター G_0 の細胞数分布は対数正規分布に従い、べき指数 α 、粘性係数 μ の細胞数分布は正規分布に従うことが分かった。弾性率のスケールファクター G_0 、べき指数 α 、粘性係数 μ の各状態における平均値やバラつきに違いが存在したが、F-アクチンを脱重合させると無くなることから、これらの違いは F-アクチンに強く依存することが分かった。

【結語】 AFM を用いた測定法は統計的測定には不向きであったが、本研究で用いたマイクロアレイ技術により AFM を用いた多数細胞の統計的力学特性測定が容易になった。不安定な過渡的状态において多数細胞を測定することで、細胞の弾性率の細胞数分布は対数正規分布を示すことが分かり、細胞弾性率などの力学的パラメータの定量的評価が可能となった。さらにこの新たな測定方法を、多種多様な細胞に対して適用可能な手法に改善すれば、様々な不安定である過渡的状态の細胞物性を評価することが可能となり、粘弾性、拍動挙動、接着性などの細胞力学特性の普遍的性質を解明できることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 原 剛 一
副 査 教 授 平 田 拓
副 査 准教授 岡 嶋 孝 治

学 位 論 文 題 名

原子間力顕微鏡を用いた過渡的な細胞力学に関する研究

細胞のライフサイクルには、細胞移動、分化、形態変化などの極めて広い時間スケールの過渡現象が存在する。これらの細胞の過渡現象は、細胞骨格構造に起因する細胞力学特性により制御されていると考えられているが、その詳細は未だ明らかにされておらず、解明するための方法論も確立しているとは言い難い。そこで本論文では、細胞力学特性の精密計測法を提案し、過渡的な細胞力学特性を解明することを目的としている。

本論文では、細胞力学の測定法の1つである原子間力顕微鏡 (AFM) を用いている。AFM は、力分解能と空間分解能に優れているが、ある時間内で数個の細胞しか測定することはできない欠点をもつ。そのため、細胞が同じ環境下で培養された場合でも、時間的なゆらぎや空間的なゆらぎだけでなく、細胞各々のばらつきをもっているため、細胞力学特性の絶対値の信頼性は高いとは言えない。特に、細胞力学の過渡現象において、そのような細胞力学特性の不均一性はさらに増大する可能性がある。そこで本論文では、AFM を用いて多数の細胞を短時間で測定し、細胞力学のアンサンブル平均を議論することができる多数細胞測定法の確立が必須であると考え、マイクロアレイ技術により、AFM を用いて多数の細胞を短時間で測定できるよう細胞を整列化させ、さらに細胞活性を失わずに培養可能であることを明らかにしている。細胞の過渡現象としては、4つの異なった過渡現象を取り上げ、本方法を用いて過渡的な細胞力学特性を統計分布から検討した。これらの成果は以下のように要約される。

(1) 初期接着過程における多数細胞の力学特性

初期接着過程における多数細胞の力学特性の評価は、国内外で初めて AFM とマイクロアレイ技術を組み合わせた多数細胞測定法を用いて行われている。その結果、培養時間の経過にともなって弾性率は有意に大きくなり、接着開始時からの細胞骨格の重合促進の経過が培養時間経過にともなう弾性率の有意な増加と一致することを明らかにしている。また、細胞数分布は接着過程の不安定な状態にも関わらず、全ての培養時間で対数正規分布になることを明らかにし、本手法によって細胞接着の過渡的現象の統計的評価が可能であることを実証した。

(2) 酸化ストレスによる肥大過程における多数細胞の力学特性

酸化ストレスによる肥大過程における多数細胞の力学特性の評価は、酸化ストレスと同様に活性酸素種を発生させる過酸化水素を付加することで行われている。その結果、過酸化水素の付加濃度の増加に従って、弾性率は有意に小さくなり、ファイバー状の細胞骨格の量が、過酸化水素の付加濃度上昇にともなう弾性率の有意な減少と一致するこ

とを明らかにしている。その後、付加した過酸化水素を取り除き培養を行うと、培養時間の経過にもなって細胞の肥大化が起こり弾性率も回復し、培養 72 時間後には弾性率が非付加群と同程度まで回復することを明らかにした。

(3) 拍動挙動を促進する薬剤を用いた過渡状態における拍動挙動

心筋細胞の拍動挙動の詳細はほとんど調べられていないため、新生児ラット心筋細胞を用いて安定した拍動挙動の空間的測定を行っている。拍動挙動を促進する薬剤を用いて過渡状態における拍動挙動の評価を行った結果、拍動挙動には空間依存性が存在し、過渡状態である薬剤付加前後で弾性率に変化が無く、付加前後の拍動振幅は直下の細胞弾性率に依存しないことを明らかにした。今後多数細胞の測定を行うことで、より精密な過渡的現象の評価が可能となることが期待される。

(4) 形質転換過程における多数細胞の力学特性

形質転換過程における多数細胞の力学特性の評価を行った結果、細胞の複素弾性率の周波数依存は、通常増殖、老化細胞、不死化細胞と全ての状態において、べき乗則に従うことを明らかにしている。また、各状態の複素弾性率を Structural damping model でフィットすることで求められた弾性率のスケールファクター G_0 の細胞数分布は対数正規分布に従い、べき指数 α 、粘性係数 μ の細胞数分布は正規分布に従うことを明らかにした。また、 G_0 、 α 、 μ の各状態における平均値やバラつきに違いが存在したが、これらの違いはファイバー状の細胞骨格に強く依存することを明らかにした。

以上の検討により、本研究で提案されている AFM とマイクロアレイ技術を組み合わせた多数細胞測定法により、不安定である過渡状態の力学的パラメータの定量的評価が可能になったと結論づけている。

これを要するに、著者は、AFM を用いた多数細胞の統計的力学特性測定により、様々な過渡状態における細胞力学に関する多くの新知見を得ており、生体情報科学とくに細胞力学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（情報科学）の学位を授与される資格あるものと認める。