

学 位 論 文 題 名

Imaging Mechanical Properties of Living Cell
by Scanning Probe Microscopy:
Tensional Coordination in Cellular Migration

(走査型プローブ顕微鏡による生きた細胞の力学性質のイメージング：
細胞運動における張力による協調性)

学位論文内容の要旨

細胞は生命体の最小単位である。細胞における現象は、あらゆる生命現象の基本となるものといえる。細胞の果たす機能の中でも、細胞運動は生体における器官の修復や癌の転移といった現象に深く関わっているため、特に医学分野で研究が進められてきた。運動の基本となる過程は分子レベルで起こる生化学反応が支配している。物理学にとっても、このミクロな過程をどのように協調して細胞運動に特徴的なマクロな時空間スケール(10 min, 10 μ m のオーダー)を生み出すのかを解明することは、大変興味深いテーマである。

シャーレ内で培養されている細胞は、シャーレの底に張りついて 0.1 mm 程度に広がる。細胞は前部の伸長と後部の収縮を交互に繰り返すことによって一方向に運動する。このような細胞の運動は、細胞質中に張り巡らされた細胞骨格(とくにアクチンフィラメント)と呼ばれる繊維状タンパクに関係する。現在までに、細胞骨格の動的性質を制御するタンパクや生化学的な反応経路が見出されている。しかし、関与するタンパク・酵素の種類が多くその経路が複雑すぎるため、細胞運動のような巨視的スケールの変化を扱うのは困難である。そのため、細胞をひとつの力学系と捉え、巨視的な力学性質に注目したアプローチが有効と考えられている。この立場から、様々な手法によって細胞の力学性質が調べられてきた。しかし、生きた細胞の力学性質を詳細に調べる研究はまだ始まったばかりで、測定系の時空間分解能の制限等により力学性質と細胞運動との関係はいまだに明らかとなっていない。

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) は、探針の先端で試料をなぞりながら 2 次的に試料表面を走査し、表面構造を測定する装置である。探針はカンチレバーと呼ばれる板バネの先端に取り付けられており、試料表面の凹凸はカンチレバーのたわみとして検出される。SPM の特徴として以下の 2 点が挙げられる。①溶液中での測定が可能であるため、生体試料を生きたままの状態を観察できる。②探針と試料が常に接触した状態にあるため、試料の形状以外にも、さまざまな物性に関する情報を得ることができる。例えば、探針を試料に一定量押し込んだときの試料の変形量から、試料のかたさに関する情報が得られる。本研究では、カンチレバーに振動を与えながら走査することで、細胞のかたさ分布を測定するフォースモジュレーション法に着目した。この手法は、従来の手法に比べ時空間分解能の高い測定が可能である。しかし、この手法ではその結果の信頼性に疑問が残されていた。その原因は、やわらかいカンチレバー ($k=10$ mN/m) を液中で振動させるため、溶液の粘性抵抗が無視できないことにある。定量的な測定のためには、溶液の粘性抵抗を考慮した測定法や解析方法の改

良が必要であった。

本研究の目的は、細胞運動における力学的な協調機構を明らかにすることである。そのために、まずフォースモジュレーション法を定量的なかたさ測定的手法として確立する。次に、細胞のかたさの時空間分布と i)細胞骨格の構造、ii)細胞運動、iii)細胞内に働く力、との関係を明らかにする。

本研究では、定量的なかたさ分布を得ることのできる手法として確立するために、フォースモジュレーション法を以下のように改良した。①液中環境下におけるカンチレバー振動の周波数依存性から、加振周波数を系の共振点から離れた低い周波数 (~500 Hz) に設定した。②この低周波数帯域で動作可能な装置系を構築した。③溶液の粘性を考慮したカンチレバーの振動解析に基づく、定量的な解析手法を確立し、導入した。これらの改良により、かたさ分布を従来の手法に比べて時空間分解能が 10 倍高く定量的に測定することが可能となった。

この手法を用いて生きた繊維芽細胞のかたさ分布を測定し、細胞の局所的なかたさが細胞内で均一ではなく、場所に依存して大きく異なることを明らかにした。かたさ分布にみられるかたい筋状の構造は、細胞膜直下のアクチンフィラメントの構造と対応していた。また、アクチンフィラメントを薬剤 (Cytochalasin B) によって破壊すると細胞のかたさが 1/10 以下になった。以上の結果から、細胞のかたさはアクチンフィラメントによって生み出されているといえる。

次に細胞運動にともなうかたさの時間変化を測定した。フォースモジュレーション法による測定を連続的に行うことで、細胞のかたさ分布を 10 分間隔で 120 分にわたって得た。運動中の細胞は約 40 分間で後部を収縮し、これにともなって細胞の重心を 15 μm 移動させた。この時、細胞体部分が劇的にやわらかくなった。一方、停止状態の細胞では、細胞のかたさは 90 分にわたって変化しなかった。これらの結果から、細胞のかたさは運動に対応した変化を示すことが明らかとなった。

このような運動にともなうかたさ変化の起源を調べるため、アクチンフィラメントに働く収縮力を薬剤によって制御した場合のかたさ変化を測定した。薬剤 (LPA) で刺激された細胞は、収縮力の増大にともなうかたさが増えた。この際、局所的にかたさが増えるのではなく、全体がかたさが増えることが明らかとなった。逆に薬剤 (Y-27632) の処理によって収縮力の低下した細胞は、やわらかくなった。つまり、細胞のかたさは表層に分布するアクチンフィラメントの構造に加え、そこに働く収縮力にも依存することが明らかとなった。この結果は、細胞運動時のかたさ変化が細胞内に働く収縮力の変化を反映したものであることを示唆する。

収縮力制御によって、細胞は局所的にではなく全体的にかたさを変える。この結果は、収縮力が局所的に働くものではなく細胞全体にわたる張力として働いていると考えることで理解できる。この張力は基盤との接着が外れた細胞後部を細胞の中心方向に引きずることで細胞運動を引き起こすだろう。つまり、細胞運動の駆動力として働くといえる。この点に注目して、運動に依存するかたさ変化を以下のように考える。運動直前では張力が大きく、SPM 探針の感じるかたさもかたくなる。しかし、細胞運動開始後は、後部の収縮にともなう張力は徐々に緩和していき、SPM 探針の感じるかたさも柔らかくなっていく。この時、細胞内部の核や細胞内小器官も受動的に移動する。このように考えると、細胞運動に対応したかたさの変化が説明できる。このモデルから細胞前部の伸長と後部の収縮は、細胞全体に張り巡らされたアクチンフィラメントによる力学的なネットワークを通して働く張力によって協調されていると考える。

学位論文審査の要旨

主査	教授	川端和重
副査	教授	伊土政幸
副査	助教授	根本幸児
副査	助教授	芳賀永

学位論文題名

Imaging Mechanical Properties of Living Cell by Scanning Probe Microscopy: Tensional Coordination in Cellular Migration

(走査型プローブ顕微鏡による生きた細胞の力学性質のイメージング：
細胞運動における張力による協調性)

細胞は生命体の最小単位であるため、細胞における現象は、あらゆる生命現象の基本となるものである。細胞の機能の中で、細胞運動は、器官の修復、組織再生や癌の転移等の現象に深く関わる。このため、医学分野で特に注目され生化学的観点から研究が進められている。しかし、分子レベルの研究だけでは、細胞の各部分の形態を協調的に変化させることによって生じる細胞運動の機構を解明することは困難とされている。本論文は、このような現況にある細胞運動の研究において、走査型プローブ顕微鏡を用いて、生きた細胞の力学的性質の空間分布およびその時間発展を測定することにより、一細胞内の力学的協調機構を実験的に明らかにした。

細胞は、部分的な伸長と収縮を交互に繰り返すことによって一方向に運動する。このような細胞運動は、細胞質中に張り巡らされた細胞骨格(とくにアクチンフィラメント)と呼ばれる繊維状タンパクに関係する。現在までに、細胞骨格の動的性質を制御するタンパクや生化学的な反応経路が見出されている。しかし、関与するタンパク・酵素の種類が多くその経路が複雑すぎるため、細胞運動のような巨視的スケールの変化を扱うのは困難とされている。そのため、細胞をひとつの力学系と捉え、その巨視的な力学性質に着目するアプローチが有効と考えられている。本研究では、生きた細胞の局所的なかたさの空間分布とその時間変化を詳細に調べる方法として走査型プローブ顕微鏡をもちいたフォースモジュレーション法に着目し、この方法を生きた細胞における測定に適したものとするために以下の改良をおこなった。①培養液中環境下におけるカンチレバー振動の周波数依存性から、加振周波数を系の共振点から離れた低い周波数(～500 Hz)に設定した。②この低周波数帯域で動作可能な測定回路系を構築した。③溶液の粘性を考慮したカンチレバーの振動解析に基づく、定量的な解析方法を作成した。これらの改良により、かたさ分布

を従来の方法に比べて時空間分解能が 10 倍高く、さらに定量的評価が可能となった。

この方法を用いて生きた繊維芽細胞のかたさ分布を測定し、細胞の局所的なかたさが細胞内で均一ではなく、場所に依存して大きく異なることを見いだした。かたさ分布にみられるかたい筋状の構造は、細胞膜直下のアクチンフィラメントの密度と対応する。また、アクチンフィラメントを薬剤 (Cytochalasin B) によって破壊すると細胞のかたさは 1/10 以下になった。これらの結果から、細胞のかたさは、アクチンフィラメントに起因するといえる。次に、細胞のかたさの時間変化を測定した。細胞が運動するのに伴って、細胞のかたさは柔らかくなり、運動が停止するとかたさは再び硬くなることを見いだした。このような運動にともなうかたさの変化の起源を調べるため、アクチンフィラメントに働く収縮力を薬剤によって制御した場合のかたさの時間変化を測定した。薬剤 (LPA) で刺激された細胞は、収縮力の増大にともなってかたくなり、逆に、薬剤 (Y-27632) の処理によって収縮力を低下させた場合、細胞はやわらかくなった。この結果は、細胞運動時のかたさ変化が細胞内に働く収縮力の変化を反映したものであることを示している。

収縮力の制御によって、細胞は局所的にではなく全体的にかたさを変える。この結果は、収縮力が局所的に働くものではなく細胞全体にわたる張力として働いていることを示している。この張力の効果に注目して、運動に依存するかたさの時間変化は以下のように考えられる：運動直前では細胞内のアクチンフィラメントにはたらく張力が大きく、細胞のかたさはかたくなる。この張力によって細胞骨格の一端と基盤の接点が壊され、細胞全体の収縮が起こる。このために、細胞骨格にはたらく張力は徐々に緩和し、細胞のかたさも柔らかくなっていく。この時、細胞内部の核や細胞内小器官は受動的に運動する。言い換えると、細胞前部の伸長と後部の収縮は、細胞全体に張り巡らされたアクチンフィラメントによる力学的なネットワークを通して働く張力によって協調されていると考えられる。

以上のように、著者は、細胞のかたさの空間分布とその時間変化を定量的に評価することができる走査型プローブ顕微鏡を用いたモジュレーション法を確立し、細胞運動におけるかたさの時間変化の測定に成功した。この結果は、一細胞内の各部分において起こる形態変化や生化学的反応が力学的に協調するというを示すものである。この結果は、現在、分子生物学的アプローチが主に行われている細胞生物学研究に対して、巨視的スケールでおこる細胞の活動を力学的観点から実験的に解明する新たな方向性を示すものである。よって、審査員一同はこれらの成果を評価し、著者は北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。