HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	原子間力顕微鏡を用いた多細胞系の力学物性に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	藤井, 裕紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第13730号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75949
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Fujii_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　内　容　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　　博士（情報科学）　　氏名　藤井　裕紀

学　位　論　文　題　名

原子間力顕微鏡を用いた多細胞系の力学物性に関する研究
（Study on cell mechanical properties in multicellular systems measured by atomic force microscopy）

本論文は、細胞スケールの力学物性計測手法の発展に伴い、単一細胞や多細胞の生体組織の力学的な挙動が細胞の牽引力や張力、弾性率などの物理量の計測によって解明されつつある昨今の状況において、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた弾性率計測による多細胞系の細胞間力学的相互作用の解明と、生体組織の定量的な弾性率計測手法の確立について論じている。

細胞は細胞外基質 (ECM) や周囲の細胞と接着タンパクを介して結合している。単一細胞では、AFM により細胞の硬さが、牽引力顕微鏡 (TFM) により細胞の牽引力が、それぞれ計測され、細胞が接着する基板の硬さの増加によって細胞の硬さと牽引力もそれぞれ増加することが明らかにされている。このことから、細胞は接着を介して外部の力学物性の影響を受け、自らのメカニクスを変化させる機能を持つことが示されている。多細胞系では、最も単純な多細胞構造である単層上皮細胞 (細胞シート) の TFM 計測により、多細胞スケールの張力分布が存在することが明らかにされている。これにより、細胞シートでは細胞間接着を介した細胞間の力学的相互作用によって、張力の長距離の空間相関が形成されることが示されている。また、細胞シートの硬さも AFM を用いた計測が行われており、細胞シート内の細胞硬さのばらつきや細胞間接着領域が硬いことが明らかにされている。一方で、上皮細胞シート内の細胞の硬さが細胞間の力学的相互作用によってどのように制御されているのかについては、これまでの硬さ計測に用いられた AFM の計測範囲では明らかにされていない。そこで、著者は、広範囲走査が可能な AFM を開発することにより、細胞シートの弾性率の広範囲マッピング計測を行い、細胞シートの弾性率の空間特性を調べた。その結果、細胞シート内に硬い細胞が集まる領域と柔らかい細胞が集まる領域が存在することを見つけた。そして、この硬さの空間相関長は、細胞間の平均距離を超える長さを持ち、細胞シートに細胞間の弾性率を調節する細胞間力学的相互作用が働いていることを明らかにした。また、F-アクチン阻害実験と細胞間接着タンパク (E-カドヘリン) のノックダウン実験から、F-アクチンが細胞弾性率の空間特性を形成する主要因子であることと、E-カドヘリン細胞間接着を介した力学的な相互作用によって隣接する細胞間でのアクチン繊維構造の調節が行われていることを明らかにした。この細胞シートの弾性率分布計測による成果は、多細胞系に内在する細胞間の力学的相互作用の解明に大きく貢献する。

多細胞系の生体組織は、細胞シートのような平坦形状をとるものだけでなく、表面に凹凸を持つ複雑な立体形状をとるものが多くある。そのため、非平坦形状を持つ多細胞組織の物性計測は、レーザーによる局所部位の張力計測や組織ごと変形させることによる弾性率計測などに限られ、低侵襲に細胞スケールの分解能で力学物性の空間分布を計測する手法はこれまでに報告されていない。そこで、著者は、力分解能・空間分解能に優れる AFM 計測手法を用いて、非平坦形状を有する多細胞系に適用可能な力学解析モデルを提案し、用いることで、多細胞系のサンプル表面傾斜に依存せずに細胞スケールの弾性率を定量評価できる手法を開発した。この手法を単一細胞、細胞

シート、発生胚組織の弾性率マッピング計測に適用すると、平坦な単一細胞と細胞シートでは従来の計測値とほぼ変化が見られなかったのに対して、発生胚組織では組織内の同一細胞において傾斜により空間不均一な弾性率分布が見られた従来の計測値から、細胞内で空間的に均一な弾性率分布に補正できた。この成果は、多細胞系生体組織の弾性率の定量計測分野の発展に大きく貢献する。

本論文は 7 章から構成されており、第 1 章では、本論文の導入として、研究背景とその目的について述べている。

第 2 章では、本研究の実験上の基礎となる、AFM 測定の原理、AFM データの解析法について述べている。

第 3 章では、細胞シートの広範囲の弾性率空間分布計測について詳述している。細胞シートの広範囲弾性率分布計測によって、細胞シート内に硬い細胞が集まる領域と柔らかい細胞が集まる領域が存在することを明らかにした。そして、弾性率の自己相関関数から硬さの空間相関長を算出し、細胞間距離を超えるスケールの硬さの相関長が細胞シート内に存在することを明らかにした。

第 4 章では、F-アクチン阻害と E-カドヘリン接着のノックダウンをそれぞれ行なった細胞シートの AFM 計測について論じている。F-アクチン阻害と E-カドヘリンのノックダウンによって、細胞シートの弾性率の空間相関長が細胞間距離を下回る長さに減少することを明らかにした。そして、細胞シートの硬さの空間相関が、F-アクチン構造によって形成されていたことと、E-カドヘリン接着を介した力学的な相互作用が隣接する細胞間での F-アクチン構造の調節に働くことで細胞間の硬さを調節していたことが考察された。

第 5 章では、AFM を用いた表面凹凸のある生体組織の弾性率空間分布計測手法の確立について詳述した。従来の平坦サンプルを仮定した解析モデルにより、傾斜勾配をつけたポリアクリルアミド (PAA) ゲルと未受精卵サンプルの AFM 計測から弾性率を算出し、傾斜角度に依存して同様に弾性率が低下することを示した。そして、傾斜角度を導入した解析モデルを考案し、弾性率を傾斜補正することで、傾斜勾配をつけたサンプルの弾性率が、ほとんどの生体組織の硬さの範囲で傾斜に依存しない値に補正できることを明らかにした。

第 6 章では、傾斜補正モデルによる生体組織の AFM 計測について論じている。単一細胞と上皮細胞シートの弾性率分布は、傾斜補正前後で大きな変化はなく、これらの平坦なサンプルでは傾斜補正が不可欠でないことを示した。さらに、発生胚の弾性率分布は、傾斜補正前後で同一細胞内の弾性率の空間不均一性が正され、均一な弾性率を示したことから、非平坦な生体組織の弾性率計測に傾斜補正モデルが有効であることを示した。そして、発生胚の連続弾性率分布計測を行い、傾斜補正モデルを用いた AFM 計測が、生体組織の機能 (細胞分裂) を抑制せずに低侵襲に弾性率の時空間分布計測が実現できることを明らかにした。

第 7 章では、3 章から 6 章まで得られた研究成果を統括し、今後の展開について論じている。

これを要するに、著者は、多細胞系に内在する力学的な相互作用を新規な広範囲計測が可能な AFM の開発により明らかにすることに成功するとともに、多細胞系の複雑な表面形状に依存せずに低侵襲な力学物性分布を計測する新たな解析モデルを確立したものであり、多細胞系のメカニクスの解明とともに情報科学に対しても大きく貢献するものと考えられる。