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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13730
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75950
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Fujii.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

令和元年度（平成 31 年度）　博士論文

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

北海道大学　大学院情報科学研究科

生命人間情報科学専攻

藤井　裕紀

目次

第 1 章　序論 1

1.1　本研究の背景 3
1.1.1　細胞の構造 3
1.1.2　単一細胞のメカニクス 4
1.1.3　多細胞系のメカニクス 7
1.1.4　単一細胞・単層細胞の力学物性計測 9
1.1.5　生体組織の力学物性計測 14
1.1.6　細胞弾性率の計測方法 17
1.1.7　AFM による細胞弾性率計測 19
1.2　本研究の目的 23
1.3　本論文の構成 24

第 2 章　実験原理 26

2.1　原子間力顕微鏡 26
2.1.1　原子間力顕微鏡（AFM） 26
2.1.2　AFM の基本原理 26
2.1.3　フォースカーブ測定 29
2.2　弾性接触モデル 31
2.3　カンチレバーのバネ定数校正 35

第 3 章　AFM による単層上皮細胞の弾性率空間分布計測 39

3.1　研究背景および目的 39
3.1.1　細胞接着と細胞物性 39
3.1.2　上皮細胞のジャミング 39
3.1.3　上皮細胞のジャミングと張力の空間特性 40
3.1.4　目的 42
3.2　実験方法 43
3.2.1　細胞培養およびサンプル作製 43
3.2.2　実験装置と測定 46
3.2.3　弾性率の自己空間相関関数の導出 49
3.3　結果と考察 50
3.3.1　MDCK 細胞の弾性率空間分布 50
3.3.2　MDCK 細胞の弾性率の長距離相関 51
3.3.3　細胞形状と細胞弾性率の関係 54
3.3.4　考察 55

3.3.5 結論 56
第 4 章 単層上皮細胞の弾性率分布形成における細胞骨格構造の影響 57
4.1 研究背景および目的 57
4.1.1 単層上皮細胞のメカニクスと細胞骨格構造 57
4.1.2 目的 58
4.2 実験方法 59
4.2.1 細胞培養およびサンプル作製 59
4.2.2 細胞の薬剤処理 60
4.2.3 細胞の免疫染色 62
4.3 結果と考察 64
4.3.1 F-アクチン阻害時の弾性率分布 64
4.3.2 カルシウムイオンキレート時の弾性率分布 66
4.3.3 E-カドヘリンノックダウン時の弾性率分布 68
4.3.4 考察 69
4.3.5 結論 71
第 5 章 表面傾斜のあるサンプルの AFM 弾性率計測手法の確立 73
5.1 研究背景および目的 73
5.1.1 ソフトマテリアルの AFM 計測 73
5.1.2 AFM による表面傾斜のあるサンプル計測での問題点 73
5.1.3 目的 74
5.2 実験方法 75
5.2.1 傾斜角度を持つサンプル作製 75
5.2.2 実験装置と計測 79
5.2.3 表面傾斜角度の決定 80
5.3 結果と考察 81
5.3.1 ヘルツモデル解析による弾性率の傾斜角度依存性 81
5.3.2 傾斜表面での弾性率の補正方法 83
5.3.3 考察 85
5.3.4 結論 87
第 6 章 AFM による傾斜角度を持つ生体組織計測 88
6.1 研究背景および目的 88
6.1.1 生体組織の力学物性計測 88
6.1.2 目的 89
6.2 実験方法 90

6.2.1 生体サンプル作製 90
6.2.2 実験装置と計測 92
6.3 結果と考察 93
6.3.1 生体サンプル弾性率分布の傾斜補正前後の比較 93
6.3.2 AFM による生体組織の時空間分布計測 94
6.3.3 考察 96
6.3.4 結論 97
第 7 章 結論 98
7.1 本研究の結語 98
7.2 今後の展望 100

参考文献 101
謝辞 108
研究業績 109

第1章　　序論

生き物の身体を形作る細胞や組織は、どのようなメカニズムで結びつき、形態形成や恒常性などの生体機能に関わる振る舞いを実現しているのか。これまで、多細胞系の形成や組織の機能について、シグナル伝達やタンパク質の発現などに着目した、生化学的手法を用いた研究によって、そのメカニズムの多くの解明が進んできた。そして、近年の研究によって、細胞の構造や機能は、細胞の力学的特性とも密接に関係していることが明らかになってきた。こうした背景から、組織形成のメカニズムや組織機能の解明には、生化学的な特性の理解とともに、力学特性の理解も重要であることが認識されてきている。

細胞の力学特性は、外力に対する応答を示す全ての物体の持つ物理量である硬さ（弾性率）と、細胞特有の自発的に生じる基質との間の牽引力や細胞間の張力に大別される。これらの細胞の弾性率と牽引力（張力）について、2000 年代から単一細胞を対象にした研究が精力的に行われ、その詳細が明らかになりつつある。しかし、生体内ではほとんどの細胞が多細胞系として存在する。そのため、多細胞系を形成するそれぞれの細胞が、接着し、相互作用するときに、互いにどのような力学特性を示し、それが多細胞系としてどのような力学特性を示すのかを理解することが重要である。したがって、多細胞系の空間的な力学特性の分布を明らかにすることが望まれる。近年、多細胞系のもっとも基本的な形態である単層細胞について、空間的な牽引力の計測によって、組織の状態や機能と多細胞スケールの細胞の牽引力分布が関係することが分かりつつある。一方で、単層細胞の弾性率については、多細胞スケールの計測が行われておらず、その空間特性はわかっていない。そこで、多細胞系における細胞弾性率の空間特性を明らかにするために、本論文では、はじめ（3 章-4 章）に、多細胞系（単層細胞）を広範囲に計測できる原子間力顕微鏡（AFM）を開発し、単層上皮細胞の弾性

率分布の計測を行なった。そして、その弾性率分布像から、多細胞系における細胞の弾性率の空間特性を調べ、またその弾性率の空間特性と多細胞系の構造との関係を調べた。

多くの種類の生体組織は、単層構造のような平面構造ではなく立体構造を持つ。このような複雑な多細胞系の低侵襲かつ高分解能な力学計測手法の確立が、多細胞系の力学挙動の解明に求められる。近年、発生胚や組織の張力や弾性率の計測が報告されてきているが、張力計測は組織への侵襲度が高く、また弾性率計測は 1 細胞分解能の計測が達成されていない。そこで、本論文では、次（5 章-6 章）に、立体的で表面傾斜をもつ多細胞系の弾性率を定量計測できる AFM 法を開発し、表面傾斜を持つ多細胞系を低侵襲に 1 細胞分解能の定量的な弾性率分布計測を可能にした。

1.1　本研究の背景

1.1.1 細胞の構造

真核生物の細胞内には、細胞核などの細胞小器官の他に、細胞骨格と呼ばれる繊維状のタンパク質が張り巡らされている（Fig. 1.1）[1]。細胞骨格は、アクチンフィラメント（F-アクチン)、微小管、中間径フィラメントの３種類に分類されている。F-アクチンは、細胞膜直下に多く存在し、細胞突起などの細胞表面形状の裏打ち構造を形成している。微小管は細胞小器官である中心体から放射状に伸びた構造を形成している。中間径フィラメントは細胞核の周囲で網目構造を形成している。このように、細胞内では複数種類の細胞骨格のネットワーク構造が形成され、この構造が細胞の形状を維持する役割を果たしていることが知られている。

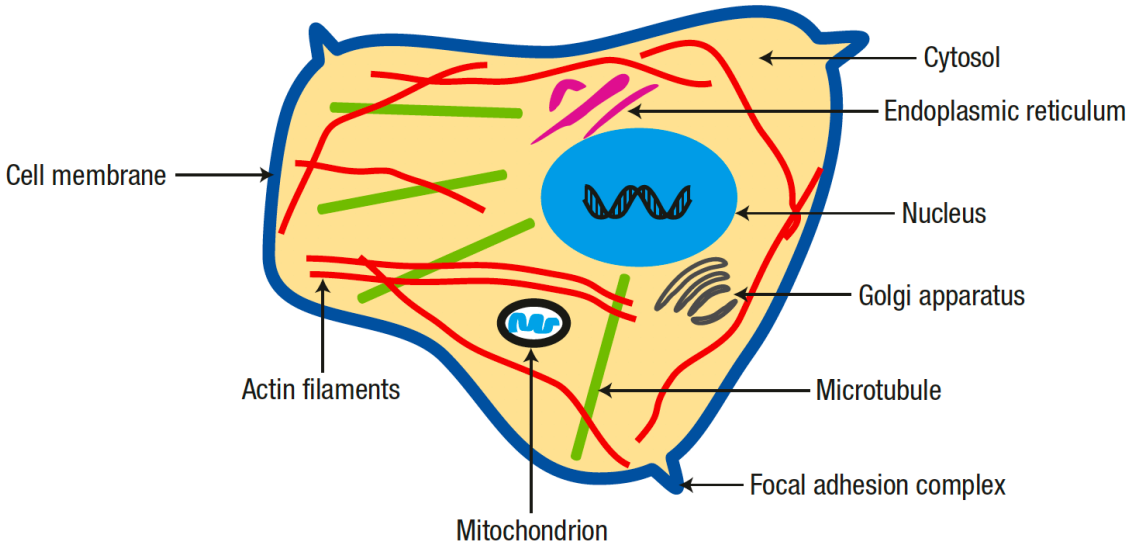


Fig. 1.1 動物細胞の細胞骨格構造[1]。アクチンフィラメント（赤）は細胞膜近傍に多く分布し、細胞の裏打ち構造を形成している。微小管（緑）は細胞核（青）の周辺に多く局在し、そこから細胞全体に放射状に伸びている。
(Bao, G. et al, *Nat. Mater*, **2003**, *2*, 716. より引用)

1.1.2 単一細胞のメカニクス

また、細胞骨格は、静的な構造体ではなく、重合や脱重合によって伸縮し、モータータンパク質などの細胞骨格同士を結合するタンパク質によって互いに結びつき、細胞骨格同士が引き付け合うことで動的に変化する構造体である。例えば、F-アクチンは細胞膜表面の接着分子であるインテグリンを介して細胞外基質（Extra Cellular Matrix, ECM）と接着し、この接着点（Focal Adhesion, FA）に細胞中心に向かって細胞自身を引っ張る牽引力を発生させている。F-アクチンのこうした収縮力は、F-アクチンに結合するモータータンパク質のミオシンの構造が、アデノシン三リン酸（ATP）の加水分解によるエネルギー供給により変化することで、F-アクチン同士が引き付け合うことで生じている。このように細胞骨格構造は、細胞膜と物理的に結合して動的に変形することで細胞の力学的な挙動の主要な役割を持っている。さらに、細胞骨格は、細胞内小器官や細胞内の様々なタンパク質と結合しており、細胞内外で生じる物理的な力を細胞核に伝達している（Fig. 1.2）。このような細胞核に伝達される力が、遺伝子発現の調整に関与していることが報告されている[2]。

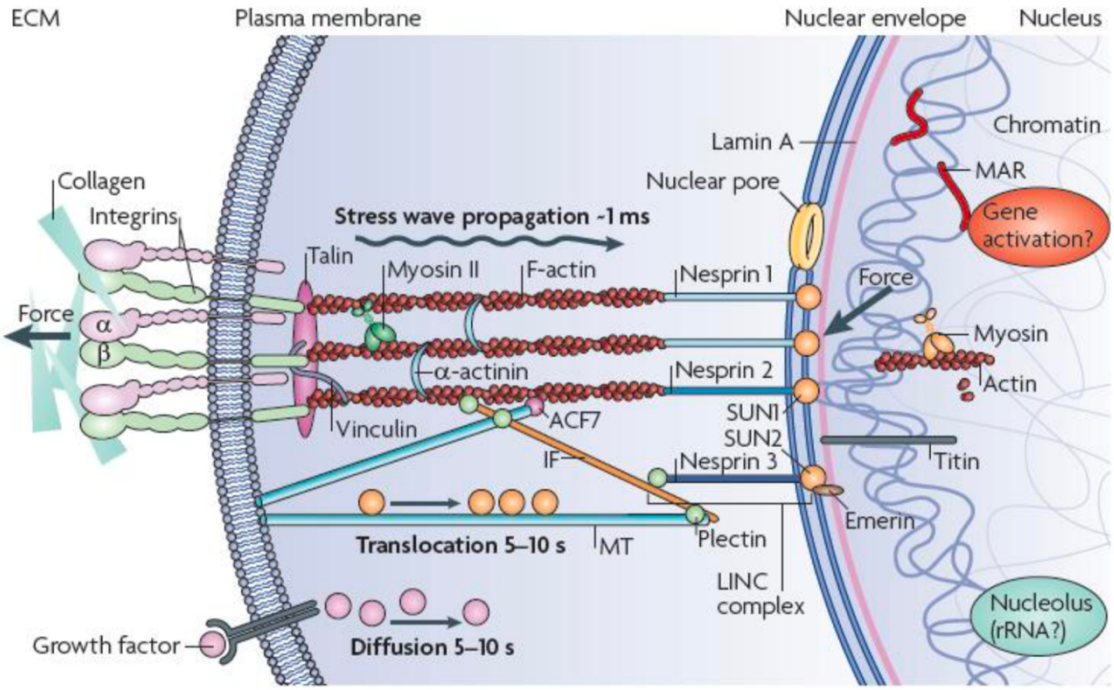


Fig. 1.2 細胞膜と細胞核が細胞骨格を介して物理的な結合を形成している模式図[2]。細胞骨格と種々のタンパク質が複合体を形成して、ECM との相互作用で生じる力を細胞核に伝搬している。
(Wang, N. et al, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, *10*, 79. より引用)

また、細胞は接着する ECM の硬さに応じて形態を変化させる機能があることが報告されている。例えば、ECM が硬くなるほど、接着する細胞は ECM との接着斑を増やし、細胞面積を増加するとともに、細胞内の F-アクチンの束や網目構造を発達させる（Fig. 1.3）[3]。さらに、空間的に硬さが変化する ECM 上では、接着細胞は硬い方を選択して運動する（Fig. 1.4）[4]。このように、細胞は接着する周囲の ECM の力学物性によって細胞内の F-アクチン構造を変化させ、細胞形状や運動性などのメカニクスを調節していることが明らかにされてきた。

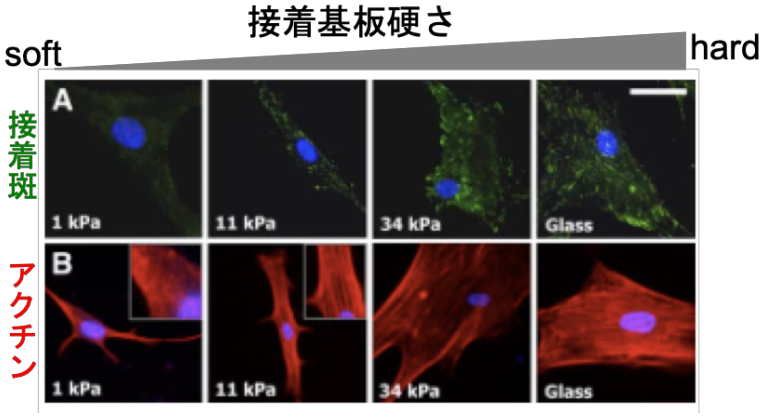


Fig. 1.3 基板の硬さに応じて変化する接着細胞形態[3]。硬い基板ほど接着細胞は接着斑を増やし、細胞内の F-アクチンの束化と網目化を促進する。
(Engler, A. J. et al, *Cell*., **2006**, *126*, 685. より引用, 改変)

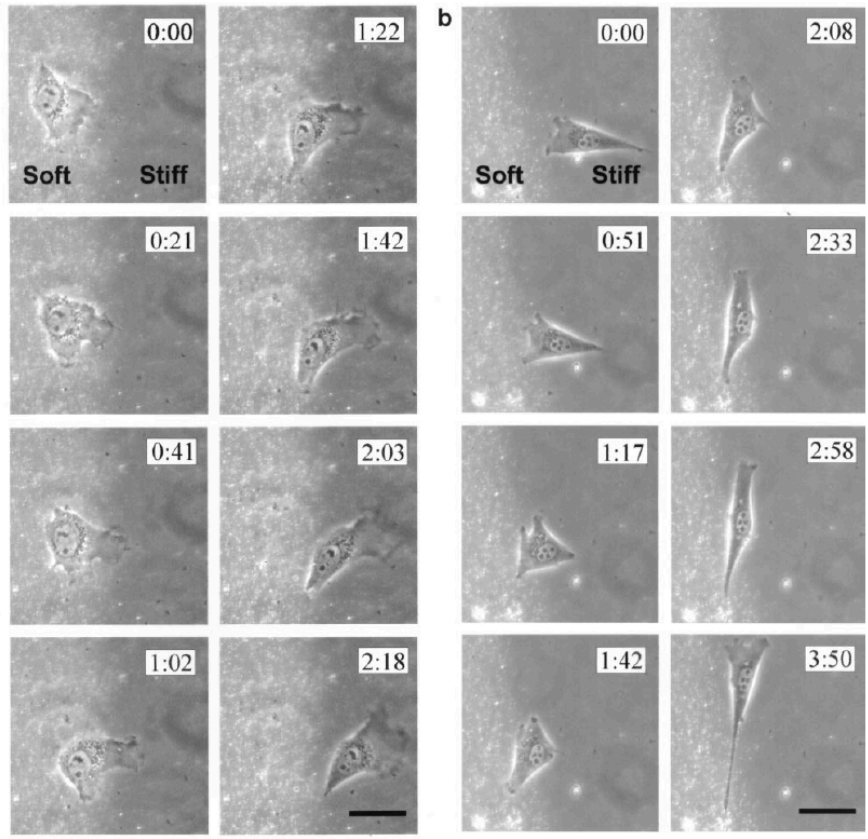


Fig. 1.4 空間的に硬さが変化する基板上の細胞運動[4]。柔らかい領域の細胞は硬い領域へ運動し、硬い領域の細胞は柔らかい領域へ移動せずに運動方向を変えて硬い領域に留まろうとする。
(Lo, C.-M. et al, *Biophys. J*., **2000**, *79*, 147. より引用)

1.1.3 多細胞系のメカニクス

生物を構成する細胞は、研究室培養環境（in vitro）における単一細胞や単層細胞シートの形態だけではなく、立体的で複雑な多細胞形態をとり、臓器や組織として働いている。このような多細胞組織内で細胞は隣接する細胞同士で接着構造を形成する。この細胞間の接着は、細胞膜タンパク質であるカドヘリンなどが細胞間で結合することで形成される。多細胞組織としての形状は、ECM との接着により形成される細胞骨格構造と同様に、細胞間接着タンパク質を介した細胞骨格の細胞をまたいだネットワーク構造の形成により維持されている（Fig. 1.5）[5]。さらに、生体内（in vivo）での創傷治癒や組織形態形成などの細胞機能の多くは、多細胞スケールの運動や形状の変化によって発現する。多細胞組織のこのような動的な生体機能についても、細胞内骨格構造の蛍光観察や細胞間張力計測によって、F-アクチンとミオシンの複合体（アクトミオシン）のネットワーク構造の変化による収縮力が大きく関与していることが知られている（Fig. 1.6）[6]。このように、単一細胞レベルだけでなく多細胞組織においても、細胞骨格のネットワーク構造が形成する力学物性が様々な生体機能に関与していると考えられる。

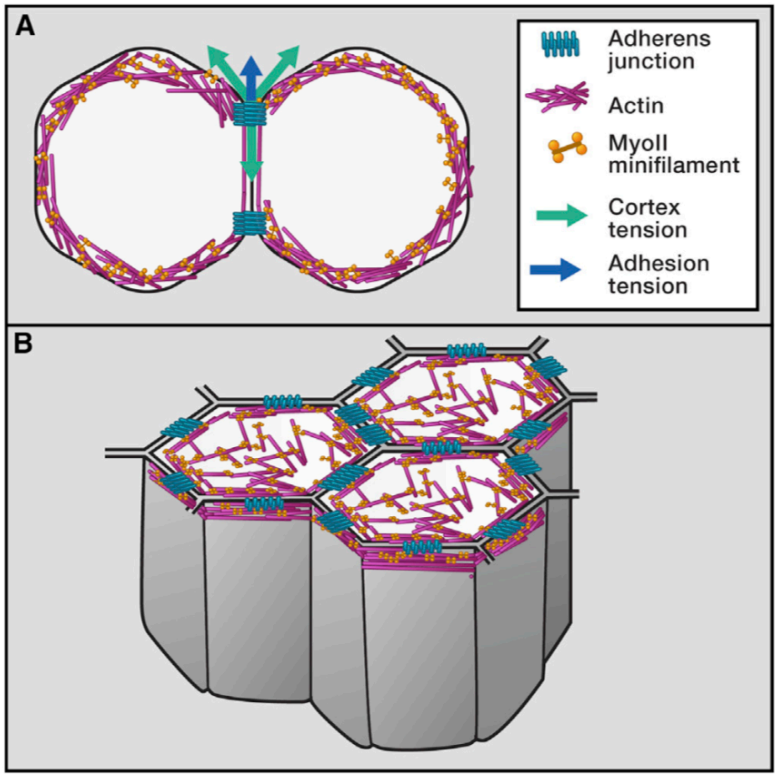


Fig. 1.5 細胞間接着タンパク質を介してアクトミオシンのネットワーク構造が形成されている模式図[5]。A：細胞膜近傍に局在するアクトミオシンによって、細胞皮層に張力が形成され、細胞間のアクトミオシンのネットワーク構造が同様に細胞間の接着点に張力を形成する。B：細胞間の接着タンパク質を介したアクトミオシンのネットワーク構造が多細胞組織内の個々の細胞形状を均一化し、安定化している。
(Heisenberg, C. P. et al, *Cell*., **2013**, *153*, 949. より引用)

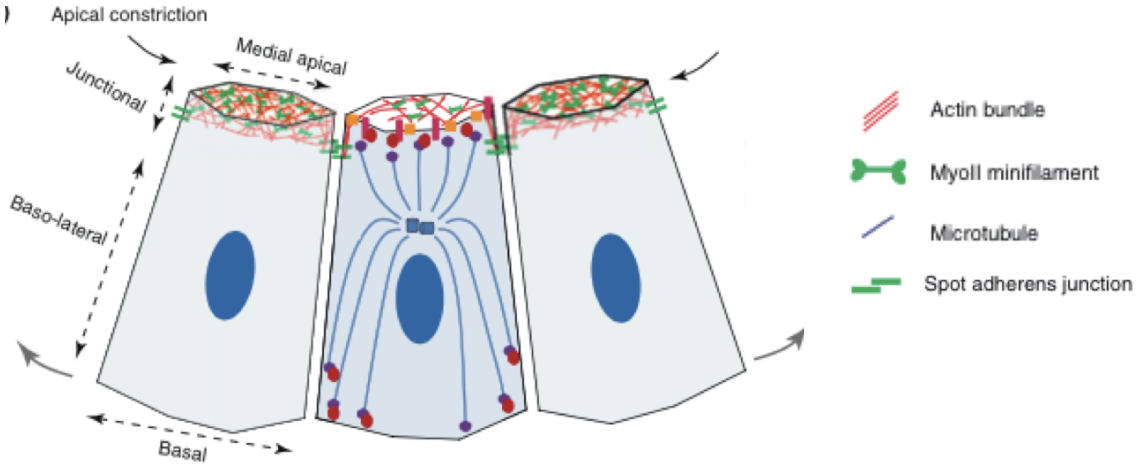


Fig. 1.6 細胞皮層のアクトミオシンのネットワーク構造が細胞間接着を介して多細胞組織の皮層領域の収縮力を形成する模式図[6]。
(Levayer, R. et al, *Trends Cell Biol*., **2012**, *22*, 64. より引用)

1.1.4 単一細胞・単層細胞の力学物性計測

近年の研究により、細胞—ECM 間の接着や細胞—細胞間の接着を介して、外部の物理的な環境の影響を受けて、細胞は構造や機能を変化するとともに、牽引力や弾性率などの細胞の力学物性も変化することが明らかになりつつある。以下に、単一細胞と多細胞系（単層細胞）の力学物性に関する代表的な研究例を示す。

(1) ECM の弾性率に応じた単一細胞の力学物性の変化

単一細胞は接着する ECM の弾性率に応じて、細胞接着面積や細胞内 F-アクチン構造、細胞の運動が変化する[3,4,7]。さらに、Fig. 1.7 に示すように、単一細胞が接着する ECM の弾性率が増加すると、細胞の弾性率も増加し[3,7]、Fig. 1.8 に示すように、細胞の牽引力も増加する[8]。これらの結果から、細胞は接着する ECM などの外部の力学物性の変化に応じて、細胞の構造や機能を変化させると共に、細胞自身の力学物性を変化する機能があるこ

とが単一細胞においてわかってきた。

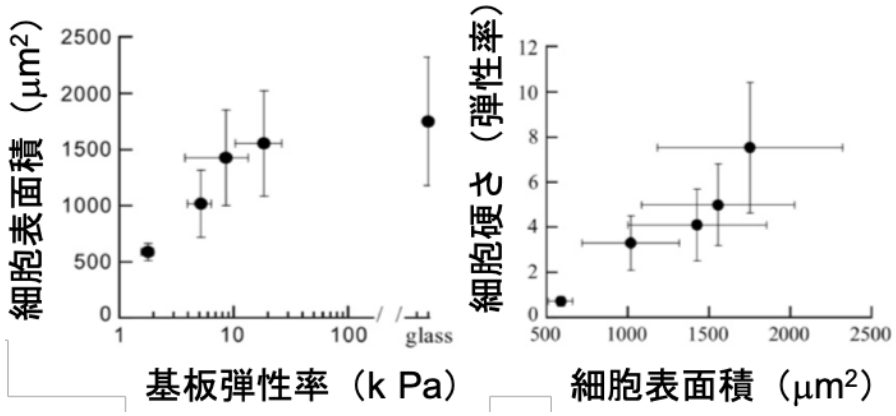


Fig. 1.7 接着基板弾性率に対する細胞硬さ（弾性率）の変化[7]。基板の弾性率の増加に応じて細胞表面積、細胞硬さが増加する。
(Solon, J. et al, *Biophys. J.*, **2007**, *93*, 4457. より引用，改変)

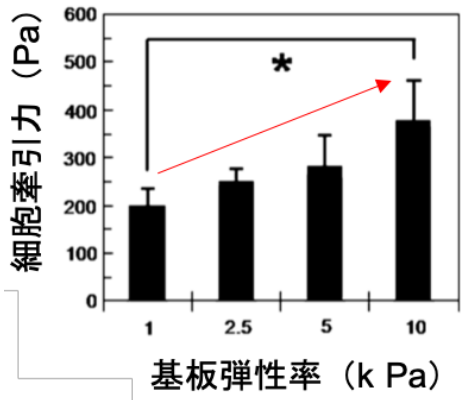


Fig. 1.8 接着基板弾性率に対する細胞牽引力の変化[8]。基板の弾性率の増加に応じて細胞牽引力が増加する。
(Califano, J. P. et al, *Cell Mol. Bioeng.*, **2010**, *3*, 68. より引用，改変)

(2) 単一細胞の状態と細胞の力学物性の関係

細胞の力学物性は、細胞の状態によっても変化することが、近年明らかになりつつある。Fig. 1.9 に示すように、乳腺の正常細胞とがん細胞の牽引力の比較により、がん細胞の方が牽引力が大きく[9]、また、Fig. 1.10 に示すように、弾性率の比較により、乳腺の正常細胞よりもがん細胞の弾性率が小

さい[10]ことがわかってきた。これらの結果から、細胞の状態と細胞の力学物性の関係についての詳細が分かりつつある。そこで、近年は細胞の状態を判別する指標として、細胞の力学物性計測の利用可能性が期待されている。

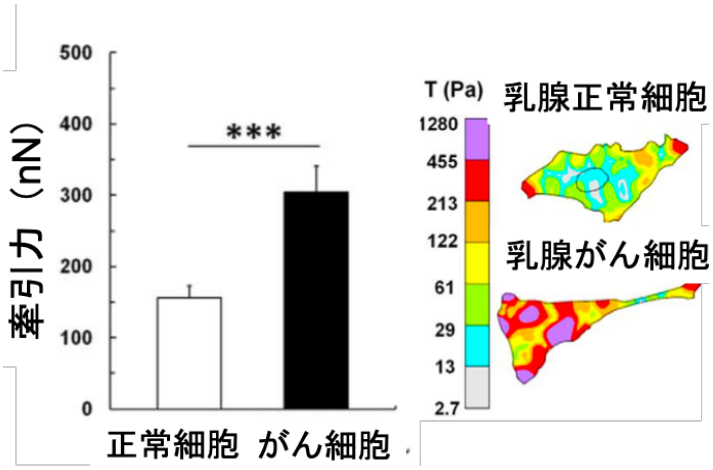


Fig.1.9 乳腺の正常細胞（MCF10A）とがん細胞（MDAMB231）の牽引力比較[9]。正常細胞に比べてがん細胞の牽引力が大きい。

(Kraning-Rush, C. M. et al, *PLoS One. Bioeng.*, **2012**, *7*, e32572. より引用，改変)

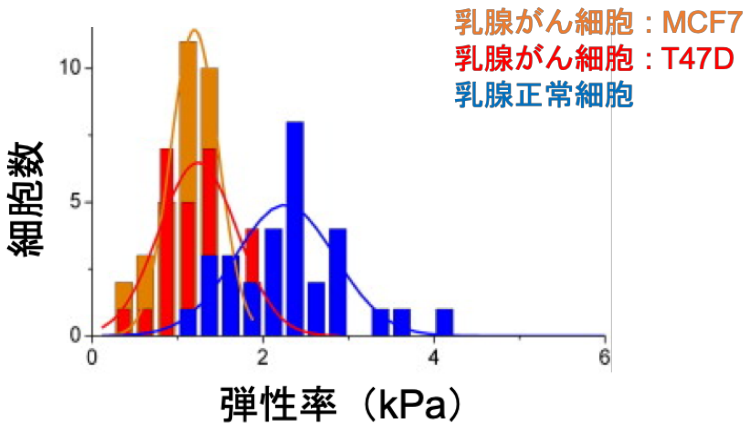


Fig. 1.10 乳腺の正常細胞（A184）とがん細胞（MCF7, T47D）の弾性率比較[10]。正常細胞に比べてがん細胞の弾性率が小さい。

(Lekka. M. et al, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2012**, *518*, 151. より引用，改変)

(3) 単層上皮細胞の牽引力分布

Fig. 1.11 に示すように、生体内の単層上皮細胞を模倣したサンプルに、実験的に創傷を与え、その後のサンプルを観察すると、細胞は集団運動により創傷部位を埋めていく、生体内における創傷治癒のような現象が観察される[11,12]。

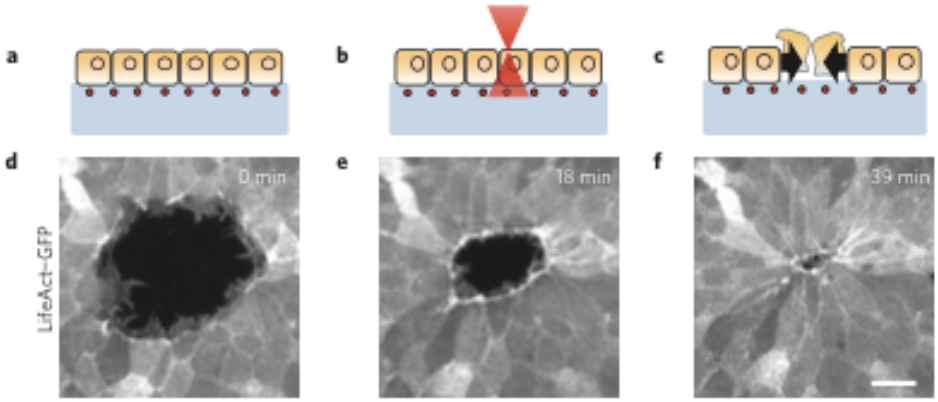


Fig.1.11 単層上皮細胞における破壊された領域の創傷治癒の様子[11]。(Brugues, A. et al, *Nat. Phys*., **2014**, *10*, 684. より引用)

このような単層上皮細胞の機能が、細胞の牽引力や細胞間応力とどのように関係しているのかについて、Fig. 1.12 に示すように、蛍光ビーズを埋め込んだゲル上に播種した単層細胞の牽引応力の分布を、蛍光ビーズの空間変異による牽引力計測から計算する方法(TFM)を用いて研究が行われるようになってきた[13]。これにより、単層細胞の牽引応力が、多細胞スケールの大きさを持って空間不均一に分布していることが明らかになった。

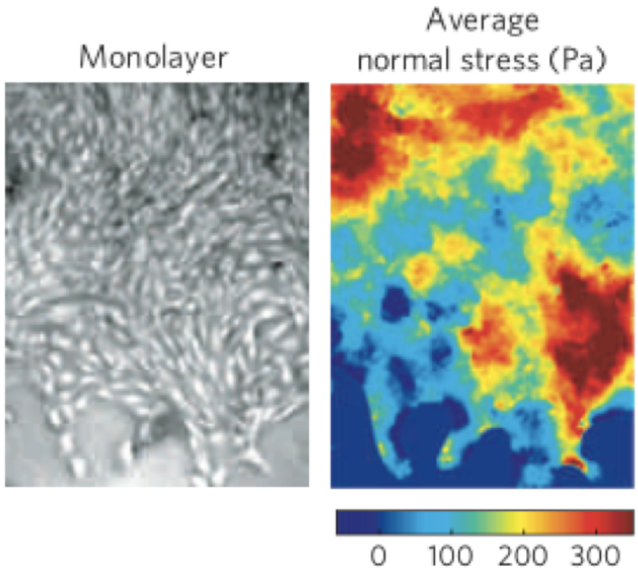


Fig. 1.12 細胞シートの牽引力計測[13]。細胞牽引力の大きい領域（赤）と小さい領域（青）が細胞集団スケールで存在。
(Tambe, D. T. et al, *Nat. Mater.*, **2011**, *10*, 471. より引用)

これらの単一細胞の弾性率や牽引力（張力）計測、また単層細胞の牽引応力計測方法の発達によって、細胞機能や細胞構造と細胞の力学物性の関係についての研究が広く行われるようになってきた。単一細胞について、原子間力顕微鏡（AFM）法を用いた弾性率計測と、牽引力顕微鏡（TFM）法を用いた牽引力計測によって、細胞―ECM 間の接着を介して細胞の弾性率と牽引力が ECM の力学物性に影響されて変化することが明らかにされた。このように、細胞の力学的機能の理解のためには、細胞の硬さや牽引力（張力）の物性計測が重要である。また、細胞―細胞接着を有する多細胞系として最も単純な形状をとる単層上皮細胞について、TFM によって細胞集団スケールの牽引応力分布と細胞集団運動機能との関係について明らかにされつつある[14-17]。このことから、多細胞系のメカニクスの理解のためには、牽引応力などの細胞の自発的な力学物性に加えて、弾性率などの材料としての空間的な力学物性の理解が重要である。しかしながら、単層細胞における弾性率の空間特性に関しては、これまでに多細胞系の

弾性率の空間分布計測が行われてこなかったために、明らかにされていない。そのため、多細胞スケールの広範囲の弾性率計測手法の確立と、それによる単層細胞の弾性率の空間特性の解明が求められる。

1.1.5 生体組織の力学物性計測

(1) 生体胚の細胞間接着張力測定

組織形態形成において、細胞は集団的に収縮したり、細胞分裂によって結合が再構成されたりしながら発生が進行する。このような組織の形態変化のメカニクスを理解するには、細胞間での力学的相互作用の理解が不可欠である。これまでに、Fig.1.13 に示す光ピンセットを用いた細胞境界部分のトラップ[18]や、 Fig.1.14 に示すレーザーアブレーションを用いた組織の局所領域の破壊[19,20]などにより、生体胚組織内の張力の計測が行われている。このような生体胚の張力計測から、発生時の表皮の伸長や組織陥入機能と張力が関係することなどが明らかにされつつある。

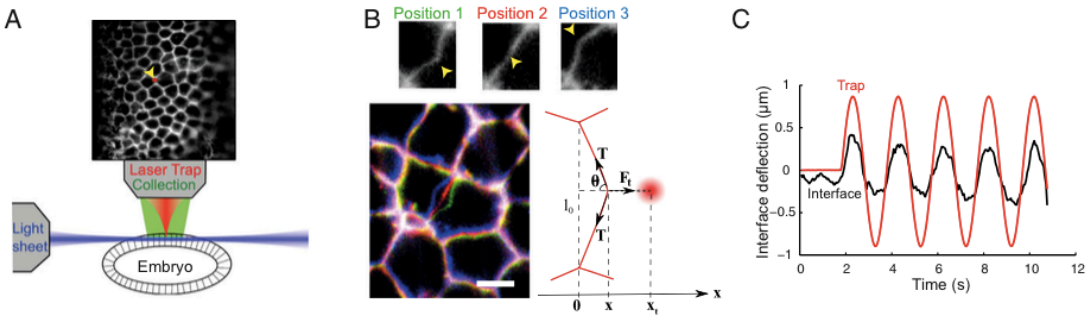


Fig. 1.13 初期胚の光ピンセットによるショウジョウバエ初期胚の細胞間張力の計測[18]。
(Bambardekar, K. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2015**, *112*, 1417. より引用)

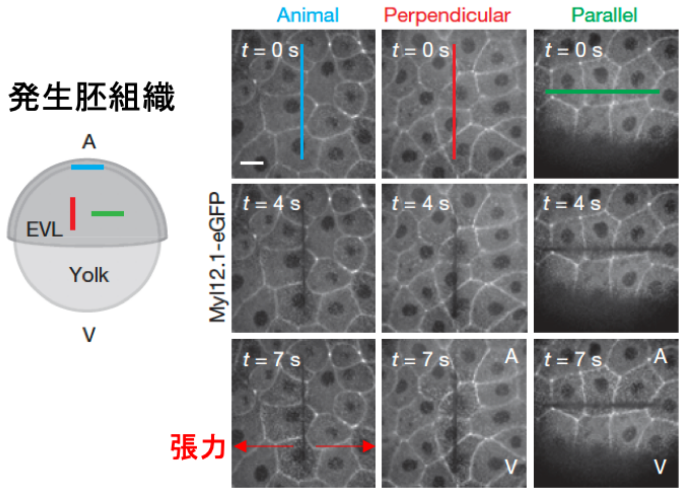


Fig. 1.14 レーザーアブレーションによるアフリカツメガエル初期胚の上皮組織の張力計測[20]。
(Campinho, P. et al, *Proc. Nat. Cell Biol.*, **2013**, *15*, 1405. より引用，改変)

(2) 生体胚組織の弾性率測定

発生胚は、分化した細胞により形成された各組織が集まり、相互に力学的に作用し合うことで、形態変化を誘導し、生き物の体を形成する。このような組織の力学的相互作用の理解に、弾性率計測が用いられている。Fig. 1.15 に示すように、発生胚の一部の組織（脊索とその周囲組織の複合体）全体を変形させることによる弾性率計測から、正常発生胚と異常発生胚の弾性率の違いについて、研究が進められている[21]。

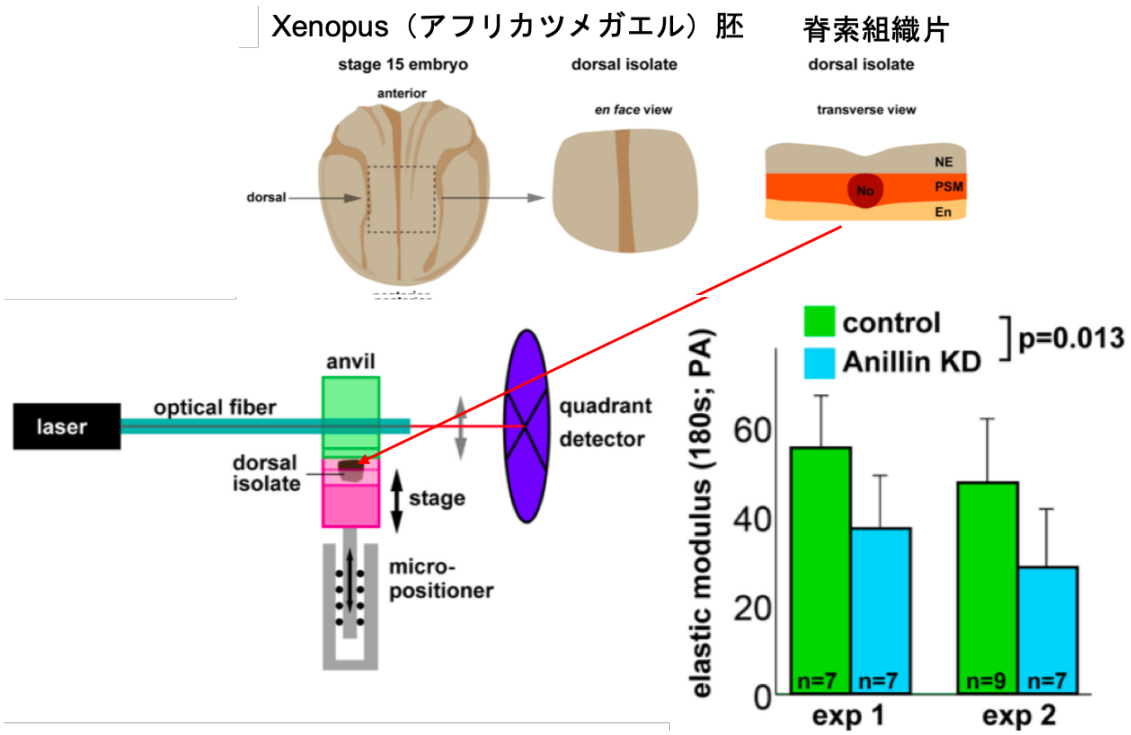


Fig. 1.15 発生胚組織片の弾性率計測[21]。アニリン（細胞骨格構造調節タンパク質）阻害による異常発生胚で、組織片の弾性率が減少する。
(Arnold, T. R. et al, *Elife*., **2019**, *8*, E39065, 20. より引用，改変)

これらの発生胚組織の張力計測や弾性率計測方法の発達により、組織形態形成のメカニクスの理解が進んできた。生体組織のこのような形態変化は、細胞間の力学的相互作用の時間的・空間的な変化によって制御されることから、細胞スケールの分解能での時空間的な力学物性分布を低侵襲に計測することが重要である。しかしながら、レーザーアブレーションによる張力計測では組織の一部を破壊するため、高侵襲であること、また光ピンセットによる張力計測はプローブ位置に限定され、また組織の変形による弾性率計測では空間分布計測が困難であることにより、実現できていない。そのため、生体組織のメカニクスの解明のために、低侵襲で細胞スケールの力・空間分解能を持つ力学物性の空間分布計測手法の確立が求められる。

1.1.6 細胞弾性率の計測方法

1.1.4-5 節で示したように、単層細胞、生体組織の弾性率分布計測手法の確立が望まれている。単一細胞の細胞弾性率の計測方法は、これまでに様々な方法が提案されてきた（Fig. 1.16）[22]。ここでは、細胞全体の計測手法（a, b）と細胞局所領域の計測手法（c-e）について述べる。

(a) マイクロピペット吸引法[23,24]

内径数 μm のマイクロピペットで浮遊した細胞の一部を吸引し、吸引の圧力と細胞の歪み量から細胞膜と細胞質を含む細胞の弾性率を計測する手法である（Fig. 1.16(a)）。単一の浮遊細胞の計測に向いており、接着細胞の場合はディッシュから剥離させて計測する必要がある。

(b) 光ピンセット法[25,26]

浮遊細胞の両端に接着させたマイクロビーズをレーザー光でトラップして引っ張り応力を加えることで、その応力と細胞の変形量から細胞弾性率を計測する方法である（Fig. 1.16(b)）。単一の浮遊細胞で計測するため、接着細胞の場合はディッシュから剥離させて計測する必要がある。

(c) 磁気ビーズを用いた計測法（MTC）[27-29]

細胞表面に接着させた磁気ビーズを外部から加えた磁場によって動かし、ビーズの変位を観察することで局所的な細胞弾性率を計測する方法である（Fig. 1.16(c)）。接着細胞をそのまま計測でき、ビーズ接着部位の局所的な弾性率計測が可能であるという利点がある。また、多数個のビーズを接着させて同時に計測することで、局所的な構造に左右されない集団平均測定に適している。しかし、細胞とビーズの接着面積を制御できないということから

一つ一つのビーズから得られる計測精度は低い。また、接着タンパク質を利用して細胞とビーズを接着させるため、接着タンパク質に結合する細胞骨格構造に測定結果が影響される可能性がある。

(d) 原子間力顕微鏡法（AFM）[30-32]

カンチレバー先端の探針を細胞に接触させて押し込み、押し込む力と細胞の変形量から局所的な細胞弾性率を計測する方法である（Fig. 1.16(d)）。接着細胞をそのまま計測でき、押し込み位置を制御することにより任意の局所位置の弾性率計測が可能であるという利点がある。また、他の計測に比べて空間分解能、力分解能が高く、マッピング計測により細胞表面形状や細胞弾性率の空間分布計測に用いられている。一方で、一度に一点の局所位置の計測に限られることから、高い運動性のある細胞や構造の不安定な細胞の弾性率の集団平均測定には向かない。

(e) セルポーキング法[33,34]

直径数 μm のガラスニードルの先端を細胞に押し込み、細胞の変形から弾性率を計測する方法である（Fig. 1.16(e)）。接着細胞をそのまま計測でき、局所領域の弾性率の計測が可能である。しかし、AFM と比較して力分解能が低く、細胞への負荷が大きくなってしまう。また一度に一点の局所位置の計測に限られるため、集団平均測定には向かない。

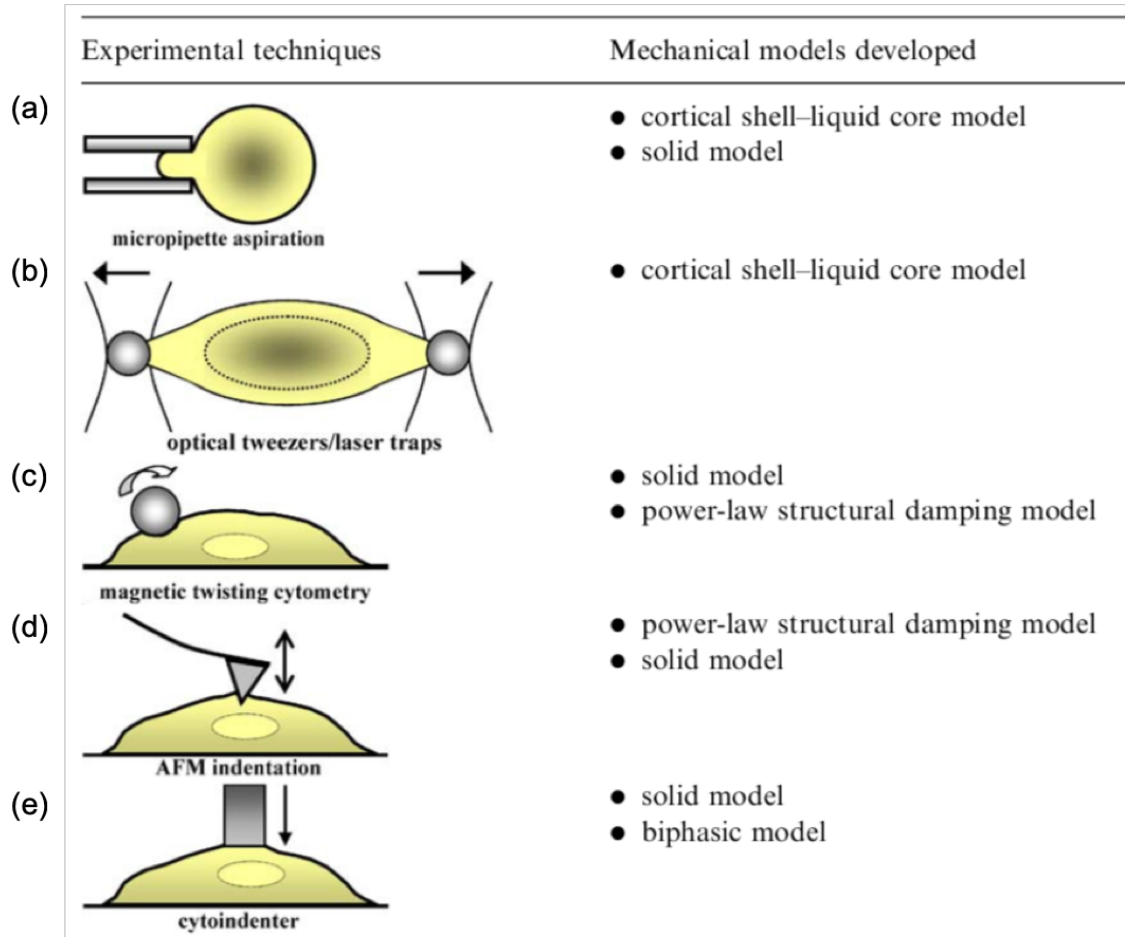


Fig. 1.16 細胞弾性率を計測する代表的な方法[22]。(a)マイクロピペット吸引法。マイクロピペットで浮遊細胞を吸引して歪み量から細胞弾性率を計測する。(b)光ピンセット法。細胞に接着させたビーズをレーザー光でトラップして細胞に応力を加えることで細胞弾性率を計測する。(c)磁気ビーズを用いた計測法（MTC)。細胞に接着させた磁気ビーズに磁場を加えて変位させて細胞弾性率を計測する。(d)原子間力顕微鏡法 (AFM)。カンチレバーで細胞を押し込み、変形量から細胞弾性率を計測する。(e)セルポーキング法。ガラスポーカーで細胞を押し込み、変形量から細胞弾性率を計測する。
(Lim, C. T. et al, *J. Biomech*., **2006**, *39*, 198. より引用)

1.1.7 AFM による細胞弾性率計測

AFM による細胞弾性率計測では、フォースカーブ測定法が一般的に用いられる。フォースカーブ測定法では、カンチレバーを細胞表面に近づけていき、接触

させて細胞を押し込む。この時のカンチレバーの位置と探針にかかる細胞からの応力の関係をフォースカーブとして取得する（Fig. 1.17）。このフォースカーブ曲線から、サンプル表面の高さや押し込み点の弾性率を評価できる。また、サンプルを水平方向に移動させながらフォースカーブ測定を連続して行うことで、サンプルの高さや弾性率のマッピング画像を取得することが可能である。例えば、マッピング測定する領域（90 μm 四方の正方形領域）を 30 × 30 ピクセル（3 μm 毎）のように分割して、各ピクセルでフォースカーブ測定を行い、高さや弾性率を計算し、それらの値で色調をつけた 1 つの画像を作製することで、測定領域のサンプルの高さや弾性率の空間分布を可視化することができる（Fig. 1.18）。このフォースカーブマッピング計測により、接着細胞の表面形状と弾性率分布を同時に取得し、細胞骨格構造と細胞物性の関係などについての研究が行われている（Fig. 1.19）[35]。しかしながら、マッピング測定では多数のフォースカーブ測定を行う必要があるため、1 つの画像の取得に時間がかかってしまう。したがって、マッピング測定中にサンプルが運動してしまう場合や短時間の薬剤反応を見る実験には適さない。

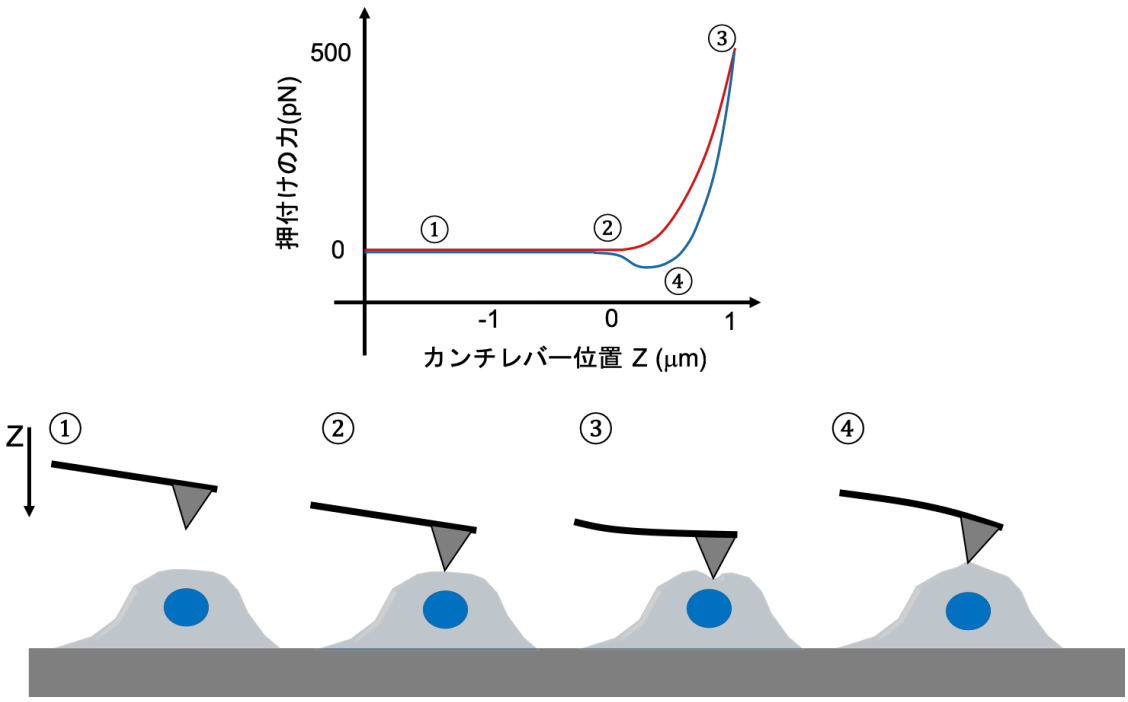


Fig. 1.17 フォースカーブ測定法の概略図とフォースカーブ概略図。サンプルから離れた位置からカンチレバーを近づけ（①)、サンプルに接触（②）し、サンプルを押し込む。カンチレバーのたわみ量からサンプルへの押し付け力を算出し、一定の力に達した（③）ところでカンチレバーをサンプルから遠ざける。サンプル表面の吸着力に応じてカンチレバーの退避時に、押し込みと逆の方向にカンチレバーのたわみが生じる（④)。このときのカンチレバーの位置とサンプルを押し付ける力の関係であるフォースカーブから、サンプル表面の高さ（②の位置）と弾性率を計算により求める。

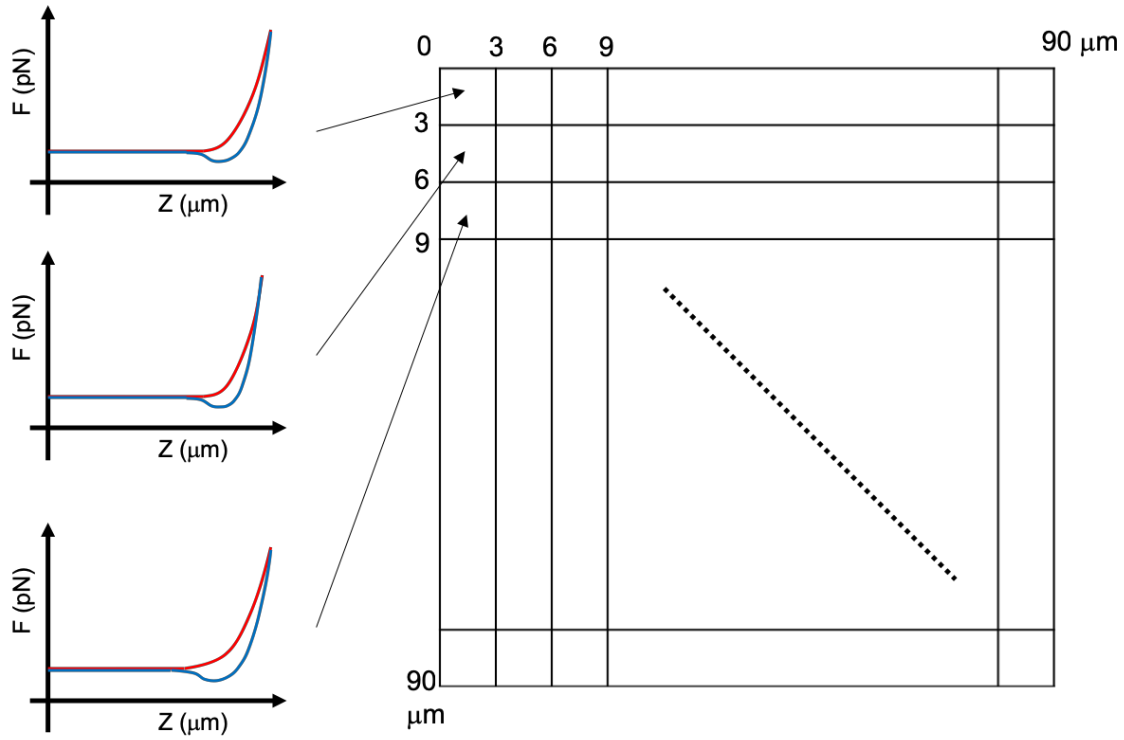


Fig. 1.18 フォースカーブマッピング測定の模式図。計測領域の各ピクセルでフォースカーブ測定を行い、高さや弾性率の計測値を色調をつけて画像化することで、空間分布を取得できる。

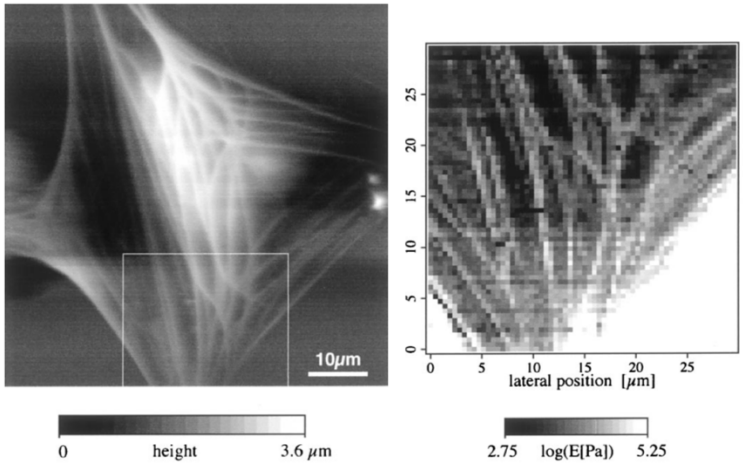


Fig. 1.19 フォースカーブマッピング測定による細胞形状(左)と弾性率分布(右)のマッピング像[35]。
(Domke, J. et al, *J. Colloids. Surf. B. Biointerfaces*., **2000**, *19*, 373-374. より引用)

以上のように、AFM は接着性の細胞弾性率を直接計測することが可能であり、

高い空間分解能で弾性率の空間分布を調べることができるため、単一の接着細胞のメカニクス研究で広く用いられる。さらに、フォースカーブマッピング計測を利用することで、AFM はスキャナの走査範囲内で弾性率の空間分布を計測できる。したがって、細胞内分解能を維持したまま多細胞系の力学特性の空間分布の計測を実現するには、AFM を用いることが最も適していると考えた。

1.2　本研究の目的

細胞や生体組織の力学物性（弾性率・牽引力（応力・張力））計測は、生物の様々な生命現象におけるメカニカルな機能の解明に用いられてきた。単一細胞レベルでは、細胞内の細胞骨格構造と細胞硬さの関係[35-38] や、細胞外基質（ECM）の硬さと接着領域や、細胞の弾性率、細胞牽引応力の関係[3,4,7,8]について、力学物性計測により詳細に明らかにされている。近年では、細胞同士が接着した多細胞系の中で最も基本的な構造を持つ単層上皮細胞の牽引応力分布計測から、細胞間で維持される牽引応力の空間特性が明らかにされた[13,14,39]。さらに、より複雑な多細胞系の発生胚組織の弾性率と張力の計測から、生物の発生における細胞骨格構造と組織の硬さの関係[40,41]や発生における形態変化に関わる張力の方向と大きさ[20]などが明らかにされつつある。

単層上皮細胞は、細胞集団的な運動が見られるなど、多細胞系としての機能を持つため、多細胞スケールの空間的な力学物性の解明が望まれる。先に述べたように、単層上皮細胞の牽引応力分布は、牽引力顕微鏡（TFM）法によって計測されている。一方で、単層上皮細胞の弾性率分布は、原子間力顕微鏡（AFM）法による計測例は報告されている[42]が、多細胞スケールの空間的な分布については、従来の研究では計測範囲が狭いため明らかになっていない。そのため、細胞間の力学的相互作用によって制御される単層上皮細胞のメカニクスを解明

するためには、広範囲の弾性率の空間分布計測が不可欠である。そこで、本研究では、(1)広範囲 AFM 計測システムの開発による単層上皮細胞の硬さ（弾性率）の空間特性を解明することを目的とした。

発生胚などの多くの多細胞系の生体組織についても、形態形成機能などでの細胞間の力学的相互作用のメカニクスの解明が望まれる。先に述べたように、発生胚の力学物性計測は近年精力的に行われているが、多くは単層上皮細胞のような平坦な単純構造ではなく、表面に傾斜のある複雑な立体構造をとるため、レーザーを用いた切断による張力計測や、組織ごと変形させた弾性率計測のような侵襲度の高い手法が用いられる。そのため、細胞レベルの詳細な空間力学物性分布や連続的な物性の変化については、計測手法が無く、未だわかっていない。したがって、生体組織の形状に左右されない、低侵襲な力学物性計測手法の確立が望まれる。そこで、弾性率の空間分布を低侵襲に計測できる AFM を用いて、生体組織の弾性率の空間分布計測を行う手法の検討を行った。従来の AFM 計測は、平坦なサンプルを仮定した数理モデルが用いられてきたため、表面傾斜を持つ生体組織に適用するには、新たなモデルが必要となる。そこで、本研究では次に、(2)サンプル表面形状に依存しない AFM による生体組織の弾性率計測手法の確立を目的とした。

1.3　本論文の構成

第 1 章では本研究の背景および目的について述べた。第 2 章では原子間力顕微鏡による弾性率計測の原理について述べる。第 3 章では、広範囲 AFM 計測による単層上皮細胞の弾性率の空間特性について述べる。第 4 章では、第 3 章で得られた結果について、細胞骨格構造、また細胞間接着と弾性率の空間特性との関係を、阻害剤実験を行うことで調べる。第 5 章では、表面傾斜のあるサンプル

に対する AFM 計測での弾性接触モデルを考案し、その方法の妥当性の評価について述べる。第 6 章では、第 5 章で考案した解析モデルを用いて立体的な多細胞系組織の弾性率マッピング計測を行った結果について紹介する。第 7 章では、本研究のまとめと今後の課題や展望について述べる。

第2章　　実験原理

2.1　原子間力顕微鏡

2.1.1 原子間力顕微鏡（AFM）

原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy : AFM）は 1986 年に Binning らによって開発された走査型プローブ顕微鏡（Scanning Probe Microscopy ; SPM）の一種である[30]。

この AFM はプローブとして先端に尖った突起（探針）を持つ板バネを使用しており、この探針とサンプルの間の力による相互作用を利用して、微小な空間での相互作用力を pN 以下という高い力分解能で測定することが可能である。この AFM を用いることで、サンプルの局所的な表面形状や粘弾性、接着力、電化密度、温度などの様々な表面状態を調べることが可能となっている。この AFM は液中での測定が可能であることを応用して、現在生体の分野において、生体分子や細胞の物理的な特性や科学的な特性などを調べるのにも用いられている。

2.1.2 AFM の基本原理

AFM 装置の概念図を Fig. 2.1 に示す。AFM はピエゾステージ、カンチレバー、レーザー、フォトディテクターによって構成されている。カンチレバーとサンプル表面の間の力学的相互作用を、カンチレバーの変位量から計測する。この変位量は、カンチレバー背面に当てたレーザーの反射光の変位量から算出する、光てこ法が一般的に用いられている[43]。計測する作用力は、カンチレバーのバネ定数を変更することで数 pN から数千 nN の範囲で観察することが可能であり、細胞などの柔らかいサンプルを測定する場合は、一般に窒化シリコン製のバネ定数の比較的低いカンチレバーが用いられる。

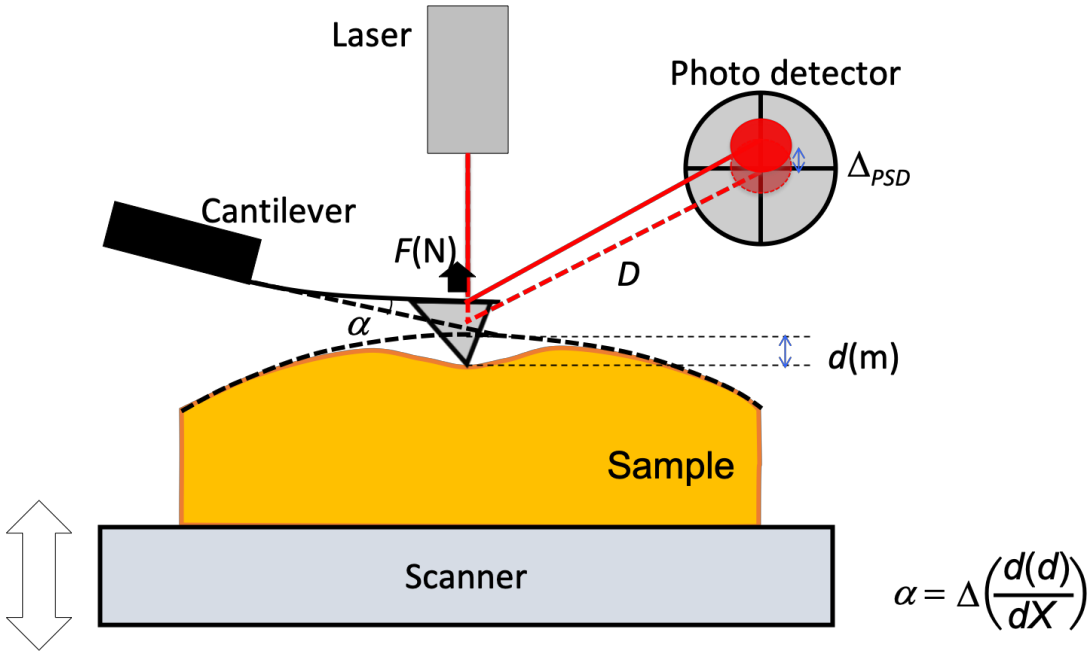


Fig. 2.1. AFM 装置概念図。

測定するカンチレバーとサンプルとの作用力 F（N）は、カンチレバーのたわみ量 d（m）とカンチレバーのバネ定数 k（N/m）から、

$$\text{フックの法則：} F = kd \qquad (2.1)$$

を用いることで算出される。フォトディテクターは 4 つのセグメントに分割されたフォトダイオードを有している(Fig. 2.2)。カンチレバーのたわみ量は式 2.2 のように、セグメント上部 2 つのフォトディテクターに生じた電圧の和(V_A+V_B)とセグメント下部 2 つの電圧の和（V_C+V_D）との差で表される。

$$Deflection = V_{top} - V_{bottom} = (V_A + V_B) - (V_C + V_D) \qquad (2.2)$$

カンチレバーがサンプル表面から十分に離れた位置にあり、作用力が働いていない場合、レーザーの反射光はセグメントの中心に位置している (Fig. 2.2 A)。また、カンチレバーはサンプル表面との作用力が働いている時、反発力が働いたときには上方にたわみ（Fig. 2.2 B)、引っ張る力が働いたときには下部にたわむ

ことになる（Fig 2.2 C）。

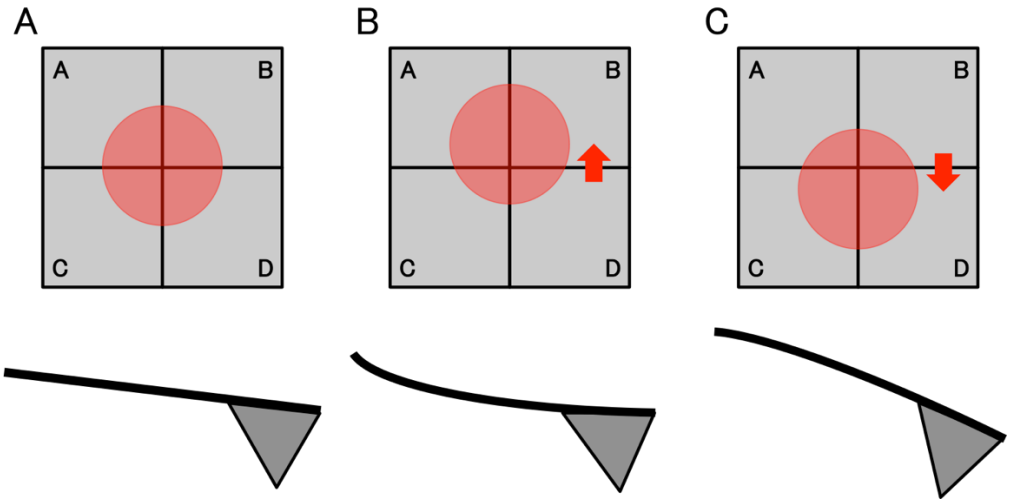


Fig. 2.2. カンチレバーの傾きによる反射光の変化の概要図。

レーザーの反射角度は、カンチレバーのたわみの角度 $\alpha = \Delta(d(d_X)/dX)$の 2 倍となる。カンチレバーとフォトディテクターの距離が D、カンチレバーとサンプルの間の作用力を F、カンチレバーの全長を L、ヤング率を E、断面二次モーメントを Iとすると、カンチレバーのたわみの角度 αは、

$$\alpha = \Delta\left(\frac{d(d_X)}{dx}\right) = \frac{FL^2}{2EI} \tag{2.3}$$

となる。Δ_{PSD}は、カンチレバーのたわみ角度αの 2 倍に比例して移動するので、たわみ角度が微小で$(FL^2/2EI) << 1$のとき、

$$\Delta_{PSD} \approx 2D \tan\alpha = \frac{FL^2D}{EI} \tag{2.4}$$

で示される。カンチレバー先端のたわみ dは、

$$d = \frac{FL^3}{3EI} = \frac{\Delta_{PSD}L}{3D} \tag{2.5}$$

で与えられる。この式（2.5）から、カンチレバーの全長 Lがフォトディテクターまでの距離Dに対して短いほど、たわみdの分解能が高くなることがわかる。

たわんだカンチレバーの模式図を Fig. 2.3 に示す。カンチレバーの幅を w、全

長を L、厚さを t としたときカンチレバー先端でのたわみ角は、

$$\frac{d(d_X)}{dX} = \frac{FL^2}{2EI} = \frac{6FL^2}{Ewt^3} \tag{2.6}$$

と表される。また $X = L$ でのカンチレバーのたわみは、

$$d_L = \frac{4FL^3}{Ewt^3} = \frac{2}{3} L \frac{d(d_X)}{dX} \tag{2.7}$$

となる。この式(2.7)から、d はたわみ角に比例することがわかる。

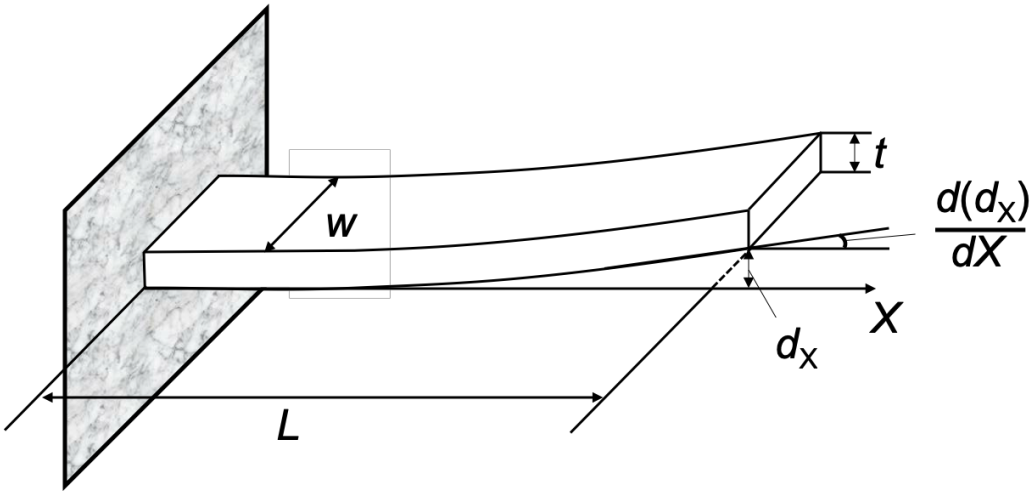


Fig. 2.3. カンチレバーたわみの模式図。 左端は固定端。

2.1.3 フォースカーブ測定

フォースカーブ測定とは、カンチレバーとサンプル間の力を、サンプル表面に垂直方向へのカンチレバーの探針の移動距離を横軸、探針に働く力を縦軸としてプロットすることにより得られる、押し込みによる力の変化（フォースカーブ）を測定する方法である。

カンチレバーによって変形しない硬い基板サンプル上でのフォースカーブの概念図を Fig.2.4 に示す。このフォースカーブの各領域での状態を以下に示す。(a)サンプル遠方にカンチレバーがあり、サンプルとの相互作用がない状態。(b)カンチレバーがサンプル表面に接触し、押し込みはない状態。(c)カンチレバー

がサンプルを押し込み、カンチレバーの移動量だけカンチレバーがたわんだ状態。(d)カンチレバーを退避させ、サンプル表面に接触している状態。(e)サンプルに吸着力がある場合の、カンチレバーがサンプルに引き寄せられる方向にたわんだ状態。(f)カンチレバーがサンプルの遠方に退避し、サンプルとの相互作用がない状態。

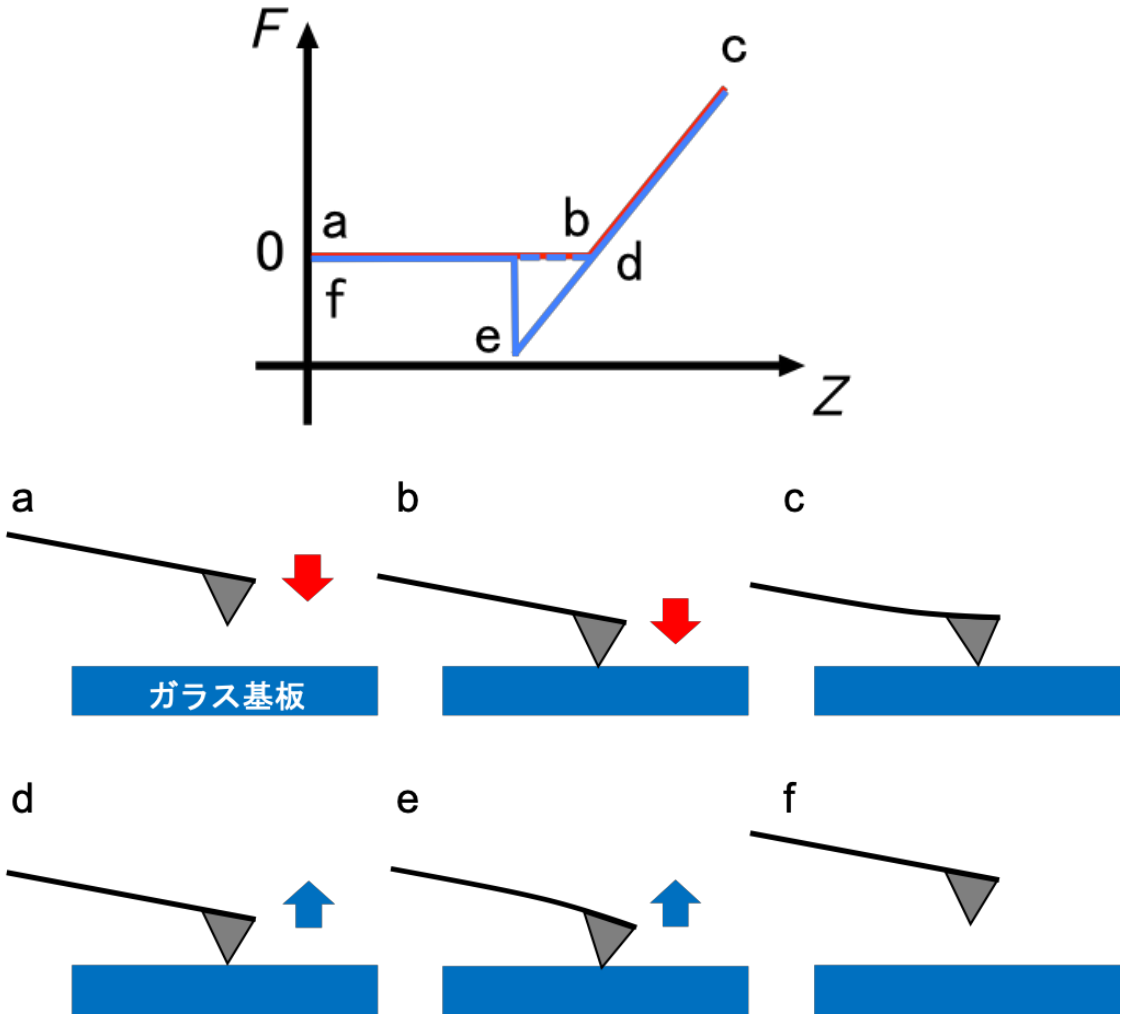


Fig.2.4. フォースモードの概念図と変形しないガラス基板上におけるフォースカーブ例。 上図赤線：アプローチカーブ、青線：リトラクトカーブ。

Fig.2.5 に、細胞のような力に対して変形する柔らかいサンプルを測定した時

のフォースカーブの例を示す。同じ力 F がカンチレバーに加わった時のカンチレバー移動量 Z は、変形しない硬い基板上の移動量 Z'と比較して、サンプルの変形量（押し込み量）δ だけ大きくなる。

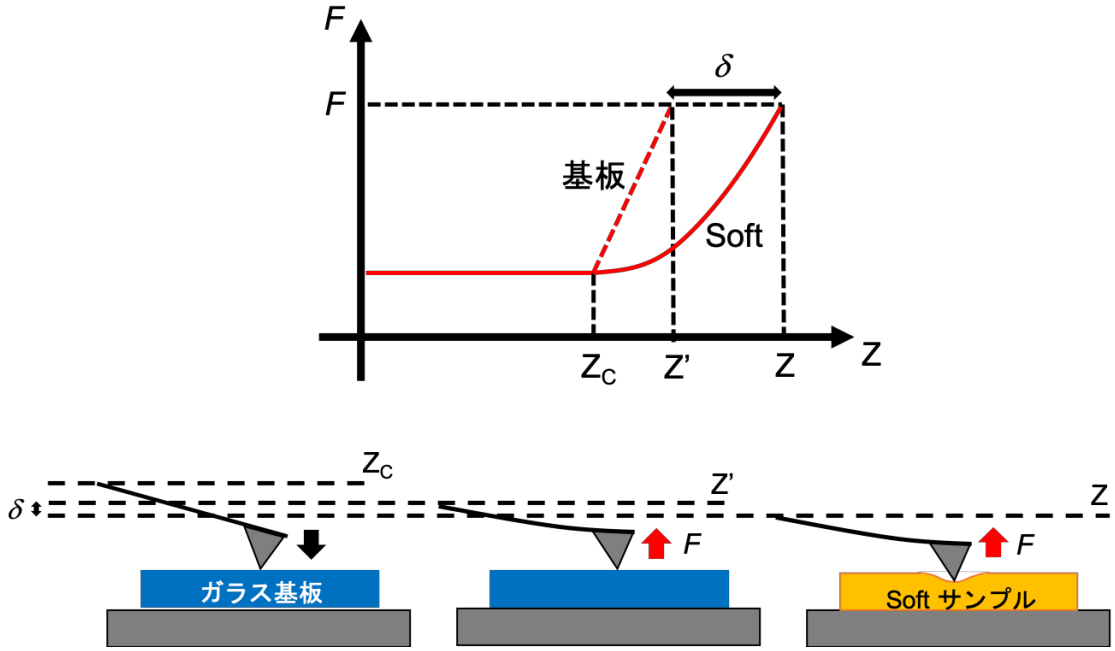


Fig. 2.5. 硬い基板上と柔らかいサンプル上でのフォースカーブ測定の概要図。

Fig.2.5 のフォースカーブの概念図からわかるように、柔らかいサンプルでは、サンプルの押し込み量を決定するのに必要な、カンチレバーとサンプル表面のコンタクトポイント Z_C を定義することが困難である。そこで、細胞のような柔らかいサンプルの押し込み開始点を決定するために、力—押し込みの曲線に対して弾性モデル式でフィッティングを行うことが一般的な方法として知られている[44]。

2.2 弾性接触モデル

弾性体同士が接触し、力が加わることで変形するときの理論的な解析は、2 つの物体が球状の場合として Hertz（1881 年）に導出された[45]。さらに、球状

ではない場合の理論も Sneddon（1965 年）らによって導出された[46]。AFM の探針に使用される形状は、円錐状、球状、円柱状などがあるが、本研究で使用した AFM の探針形状は全て球形のものを用いた。したがって、ヘルツモデルを用いた近似式を用いて解析を行った。

Hertz 弾性接触論

ヘルツの弾性接触理論では、Fig.2.6に示すような 2 つの完全弾性体の球同士が接触した場合を仮定している。以下にこのヘルツの公式である 2 つの弾性球体の弾性変形量を導出する。

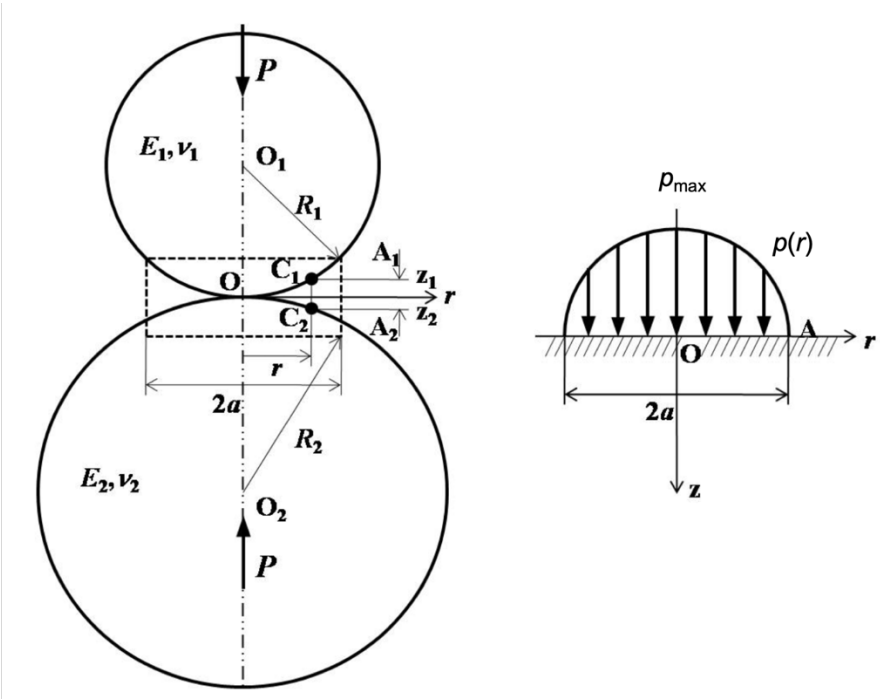


Fig. 2.6. 球と球の接触モデル。

Fig.2.6 のように、それぞれの球の半径は R_1、R_2、弾性率は E_1、E_2、ポアソン比は ν_1、ν_2、とする。2 つの球は O 点で接触し、押し付け力 P によって接触

面が半径 a の円形領域となる。接触面の圧力分布 $p(r)$が、Fig.2.6 右図のように半球状に分布すると仮定すると、

$$p(r) = p_{max}\sqrt{1-\left(\frac{r}{a}\right)^2} \tag{2.8}$$

となる。圧力 $p(r)$の合力は押し付け力 P に等しいので、

$$P = \int_0^a 2\pi r p(r) dr = \frac{2\pi a^2}{3} p_{max} \tag{2.9}$$

である。a が R_1、R_2 に対して小さいとすると、接触面では半無限の表面に $p(r)$が作用するような応力分布で近似できる。

Fig. 2.6 のような時の接触面内の表面変位$(w_z)_{z=0}$ は次式のように与えられる。

$$\begin{aligned}(w_Z)_{Z=0} &= \frac{(1-\nu)\pi}{4Ga} p_{max}\left(a^2 - \frac{1}{2}r^2\right) \\ &= \frac{3P}{4a^3}\frac{1-\nu^2}{E}\left(a^2 - \frac{1}{2}r^2\right)\end{aligned} \tag{2.10}$$

これより、Fig.2.6 における C_1、C_2 点の $p(r)$による変位δ_1、δ_2 はそれぞれ

$$\delta_1 = \frac{3P}{4a^3}\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1}\left(a^2 - \frac{1}{2}r^2\right) \tag{2.11}$$

$$\delta_2 = \frac{3P}{4a^3}\frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\left(a^2 - \frac{1}{2}r^2\right) \tag{2.12}$$

である。また、r 軸から C_1、C_2 までの距離 z_1、z_2 は幾何学的関係から、

$$z_1 = R_1 - \sqrt{{R_1}^2 - r^2} \approx \frac{r^2}{2R_1} \tag{2.13}$$

$$z_2 = R_2 - \sqrt{{R_2}^2 - r^2} \approx \frac{r^2}{2R_2} \tag{2.14}$$

と求められる。接触による C_1、C_2 点の 2 つの球の接近量 $h(r)$は、

$$h(r) = (z_1 + \delta_1) + (z_2 + \delta_2) \tag{2.15}$$

であるから、式(2.15)に式(2.11-14)を代入すると、

$$h(r) = \frac{r^2}{2}\left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right) + \frac{3P}{4a^3}\left(a^2 - \frac{1}{2}r^2\right)\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right) \tag{2.16}$$

となる。接触面は平面になると仮定して $h(r) = \delta$ とおけば、式(2.16)は任意の $r(\leq a)$ について成立しなければならないので、

$$\delta = \frac{3P}{4a}\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right) \tag{2.17}$$

$$0 = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} - \frac{3P}{4a^3}\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right) \tag{2.18}$$

となる。ここでδは両球の接近量を表す。式(2.18)から、a は

$$a = \left[\frac{3}{4}\frac{1}{(1/R_1)+(1/R_2)}\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right)P\right]^{\frac{1}{3}} \tag{2.19}$$

となる。式(2.17)に式(2.19)を代入すると

$$\delta = \left[\frac{9}{16}\left(\frac{1}{R_1}+\frac{1}{R_2}\right)\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right)^2 P^2\right]^{\frac{1}{3}} \tag{2.20}$$

となる。式(2.20)を Pについて解くと、

$$P = \frac{4\delta^{\frac{3}{2}}}{3}\left[\left(\frac{1}{R_1}+\frac{1}{R_2}\right)\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right)^2\right]^{-\frac{1}{2}} \tag{2.21}$$

となる。式(2.9)と式(2.19)より p_{max} について解くと、

$$p_{max} = \frac{3}{2\pi}P^{\frac{1}{3}}\left[\frac{3}{4}\frac{1}{(1/R_1)+(1/R_2)}\left(\frac{1-{\nu_1}^2}{E_1} + \frac{1-{\nu_2}^2}{E_2}\right)\right]^{-\frac{2}{3}} \tag{2.22}$$

となる。ここで、半径 R_1 と R_2 は凸面で正の値、凹面で負の値とする。これが球と球の接触に関するヘルツの公式となる。

また、剛球体で半無限弾性体を圧縮する場合を考えると、式(2.19-2.22)において $R_1=R_0$、$R_2\rightarrow\infty$、$E_1\rightarrow\infty$、$E_1=E$、$\nu_2=\nu$ とおけば、

$$a = \left[\frac{3}{4}R_0\frac{1-\nu^2}{E}P\right]^{\frac{1}{3}} \tag{2.23}$$

$$\delta = \left[\frac{9}{16}\frac{1}{R_0}\left(\frac{1-\nu^2}{E}\right)^2 p^2\right]^{\frac{1}{3}} \tag{2.24}$$

$$p_{max} = \frac{3}{2\pi}P^{\frac{1}{3}}\left[\frac{3}{4}R_0\frac{1-\nu^2}{E}\right]^{-\frac{2}{3}} \tag{2.25}$$

となる。

カンチレバーの先端形状が球の場合、弾性変形量は式(2.24)より

$$F = \frac{4}{3}\frac{ER^{\frac{1}{2}}}{1-\nu^2}\delta^{\frac{3}{2}} \tag{2.26}$$

となる。ここで、押し付け力 Pを Fと表した。

2.3　カンチレバーのバネ定数校正

市販のカンチレバーのバネ定数は種類ごとに公称値が示されている。しかし、実際のバネ定数はカンチレバーごとに異なり、その値のばらつきは大きい。そのため、正確な計測を行うためにはカンチレバーのバネ定数を校正する必要がある。そこで、これまでに様々なバネ定数の校正方法が考えられてきた[47]。本研究では、市販の AFM に広く使用されている、カンチレバーの熱振動のパワースペクトルを利用した熱振動法と呼ばれるバネ定数の校正方法を用いた[48,49]。以下に熱振動法の理論を示す。

Fig.2.7 のようなカンチレバーにおいて、Z 方向の熱振動は微分方程式を解くことにより、次式のように表される[50]。

$$Z = \sum_{i=0}^{\infty} C_i \sin(\omega_i t + \delta_i)\varphi_i \tag{2.27}$$

$$\varphi_i = (\sin\alpha_i + \sinh\alpha_i)\left(\cos\frac{\alpha_i}{L}x - \cosh\frac{\alpha_i}{L}x\right) - (\cos\alpha_i + \cosh\alpha_i)\left(\sin\frac{\alpha_i}{L}x - \sinh\frac{\alpha_i}{L}x\right)$$

$$\alpha_i{}^4 = \frac{12\rho\omega_i{}^2 L^4}{Eh^2} \qquad (\alpha_1 = 1.875, \alpha_2 = 4.694, \alpha_3 = 7.855, etc)$$

ここで C_i は振幅、δ_i は位相差、ω_i は角速度、E はヤング率、ρ は密度である。また、カンチレバーはいくつかの振動モードをもっており、i は i 番目の振動モードを表す。

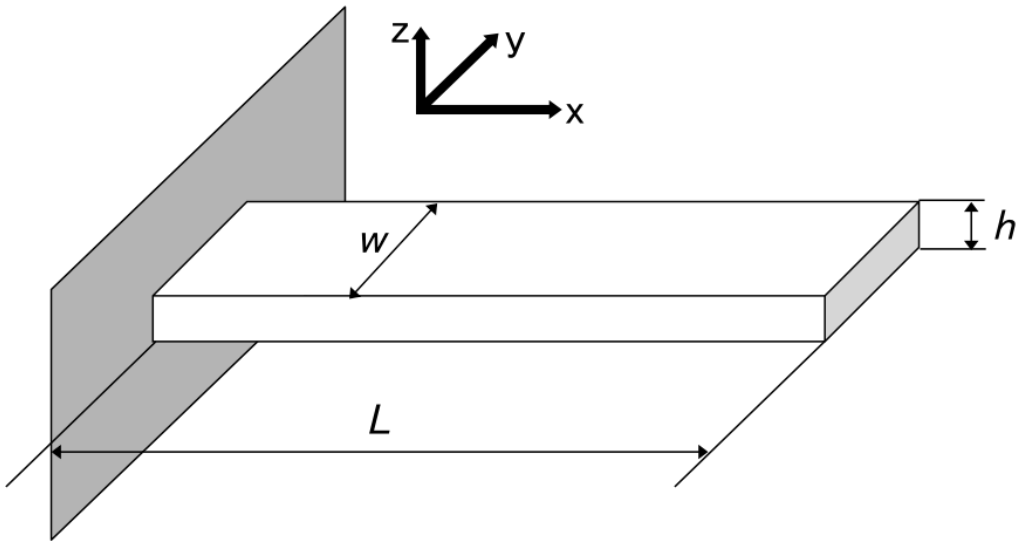


Fig. 2.7. カンチレバー概念図。

このカンチレバーが持つ振動エネルギー W は、

$$W = \frac{Ewh^3}{24}\int_0^L \left(\frac{d^2z}{dx^2}\right)^2 dx + \frac{\rho wh}{2}\int_0^L \left(\frac{dz}{dt}\right)^2 dx \tag{2.28}$$

と表すことができる。ここで右辺の第 1 項はポテンシャルエネルギーを、第 2 項は運動エネルギーを表している。ここでカンチレバーの全長 L に沿って積分し、$T_i \equiv \sin(\omega_i t + \delta_i)$、$T_i^* \equiv \cos(\omega_i t + \delta_i)$、$I_i = (\sin\alpha_i + \sinh\alpha_i)$ とおくと、

$$W = \frac{K}{2}\sum_{i=1}^{\infty} q_i{}^2 \alpha_i{}^4 \frac{I_i}{3} + \frac{1}{2M}\sum_{i=1}^{\infty} p_i{}^2 I_i \tag{2.29}$$

と表される。ここで $q_i \equiv C_i T_i$ は変数、$\mathrm{M} = \rho hwL$ はカンチレバーの全質量、$p_i \equiv M\mathrm{d}q_i/\mathrm{d}t = \mathrm{M}\omega_i C_i T_i^*$ はモーメント、K はバネ定数を表す。熱平衡時において、等分配則ではそれぞれの項は $k_B T/2$（k_B：ボルツマン定数、T：絶対温度）の

エネルギーを持つので、

$$\frac{1}{2}k_BT = \frac{K}{2}\widehat{q_i^2}{\alpha_i}^4\frac{I_i}{3} \Rightarrow \widehat{q_i^2} = \frac{3k_BT}{{\alpha_i}^4 K I_i} \tag{2.30}$$

となる。一方、カンチレバーの平均たわみは、

$$\widehat{z_i^2} = {q_i}^2\widehat{\varphi_i^2}(L) = \widehat{q_i^2}{\varphi_i}^2(L) \tag{2.31}$$

であるから、式(2.30)より、

$$\widehat{z_i^2} = \frac{k_BT}{K}\frac{3{\varphi_i}^2(L)}{{\alpha_i}^4 K I_i} \tag{2.32}$$

となる。

ここで $x=L$ の場合における式(2.27)を展開すると

$$\varphi_i(L) = 2\cos\alpha_i\sinh\alpha_i - 2\sin\alpha_i\cosh\alpha_i \tag{2.33}$$

となる。これより

$$\frac{{\varphi_i}^2(L)}{4} = \cos^2\alpha_i\sinh^2\alpha_i - 2\cos\alpha_i\sin\alpha_i\cosh\alpha_i\sinh\alpha_i + \sin^2\alpha_i\cosh^2\alpha_i \tag{2.34}$$

$$= \sinh^2\alpha_i - \sin^2\alpha_i - 2\cos\alpha_i\sin\alpha_i\cosh\alpha_i\sinh\alpha_i$$

と表され、$\cos\alpha_i\cosh\alpha_i = -1$ であるから、

$$\frac{{\varphi_i}^2(L)}{4} = (\sin\alpha_i + \sinh^2\alpha_i)^2 \tag{2.35}$$

が得られる。また、$(\sin\alpha_i + \sinh\alpha_i)^2 = I_i$ より、

$$\frac{{\varphi_i}^2(L)}{I_i} = 4 \tag{2.36}$$

となる。よって式(2.36)の値を式(2.32)に代入することにより、

$$\widehat{z_i^2} = \frac{12k_BT}{K{\alpha_i}^4} \tag{2.37}$$

が得られる。1次振動モードにおいて、α_1 を式(2.37)に代入することで、1次振動モードの次式が得られる。

$$\widehat{z_1^2} = \beta\frac{k_BT}{K}(\beta = 0.971) \tag{2.38}$$

このスペクトルのピークは共振周波数を示し、1 次振動モードに対応する。この 1 次ピークをガウス曲線でフィットを行い、その積分値が z_1 の 2 乗平均となることから、式(2.38)よりバネ定数 K が求まる。

第3章　　AFM による単層上皮細胞の弾性率空間分布計測

3.1　研究背景および目的

3.1.1 細胞接着と細胞物性

接着性の培養細胞は、培養基板の弾性率が増加すると、細胞弾性率も比例して増加する[7,51]。このように、細胞は接着により基板の弾性率を感知して、細胞自身の弾性率を調節する機能を有している。一方で、細胞は周囲の細胞とも接着し、多細胞系を形成しているが、細胞間接着を介して細胞間でどのように弾性率を感知し、それぞれの細胞物性に影響しているのかは不明である。

3.1.2 上皮細胞のジャミング

上皮細胞は単層状の多細胞系を形成する。上皮細胞を研究室環境（in vitro）で培養を続けると、次第に細胞分裂速度が低下し、細胞の運動もほとんど見られなくなり、細胞が密な状態にパッキングされた構造をとる。この細胞が詰まって動かなくなる現象を細胞のジャミングと呼び、この単層上皮細胞のジャミングと細胞形状の関係が近年調べられている[14-17]。ジャミングによる、単層細胞の流動的な状態から静止した状態への遷移を固相―液相遷移（solid-fluid transition）として、細胞形状（頂端側の細胞面積：A、細胞頂端の外周長：P、細胞頂端のアスペクト比：AR）を用いて評価できることが報告された（Fig. 3.1）[17]。この細胞形状によるジャミング状態の評価によって、生体組織や発生胚（ex vivo, in vivo）の組織形態形成のメカニクスを評価できる可能性があるとして、近年単層細胞のジャミングに関する研究が精力的に行われている。

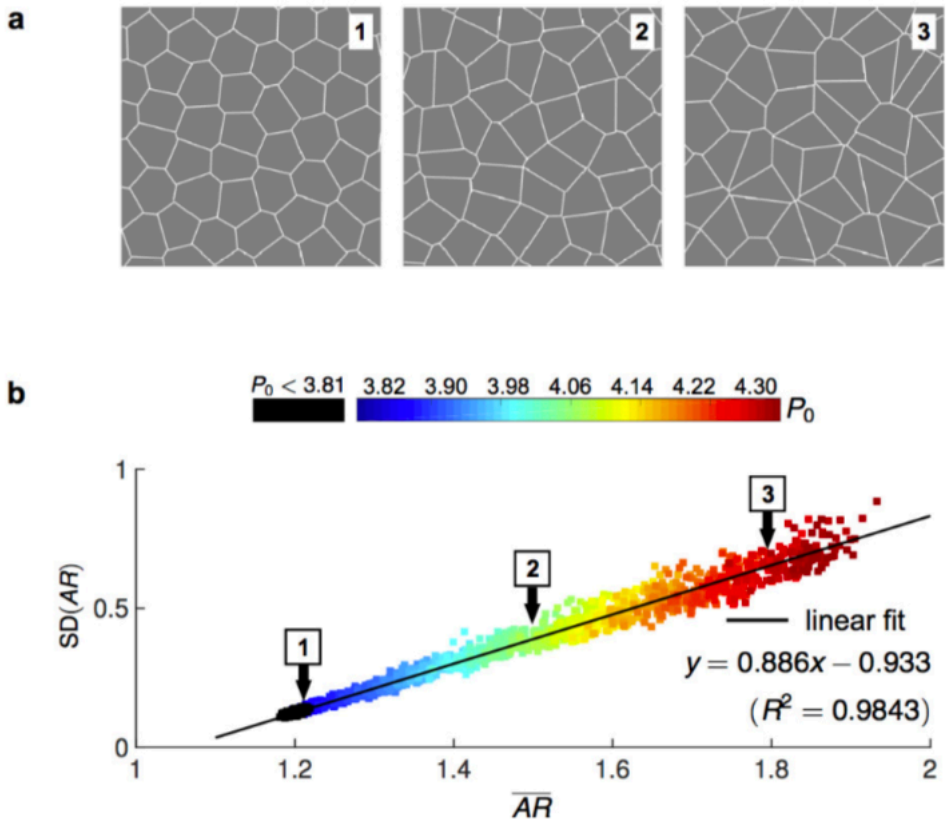


Fig. 3.1 単層上皮細胞のジャミングにおける細胞形状指数の変化[17]。(a) 固相(1)から液相(3)への状態変化における頂端側から見た単層上皮細胞の細胞形状の模式図。(b) 細胞形状指数 $P_0 = P/A^{1/2}$ と細胞のアスペクト比 AR の各値の固相(1)から液相(3)への変化。液体様から固体様へ状態が変化するにつれて形状指数とアスペクト比が一定の値に収束する。
(Atia, L. et al, *Nat. Phys*., **2018**, *14*, supplementary information, 19. より引用)

3.1.3 上皮細胞のジャミングと張力の空間特性

近年、単層上皮細胞のジャミング機能は、細胞疾患と関係することが報告されている。培養環境で、正常な気管支上皮細胞と喘息患者の気管支上皮細胞を培養すると、正常細胞ではジャミング構造をとるのに対して、喘息患者の細胞ではジャミング構造をとらず、高い流動性を維持している（Fig. 3.2）[17]。これらの単層上皮細胞について、牽引力顕微鏡法により牽引力分布と牽引応力分布が計

測され、牽引応力分布は、正常細胞で均一で全体的に低いのに対して、喘息患者の細胞では、牽引応力の大きい細胞集団と牽引応力の低い細胞集団が空間不均一に存在していることが明らかにされた（Fig. 3.3）[15]。また、牽引応力の空間自己相関関数から、それぞれのサンプルで牽引応力は 100 μm を超える範囲で相関を持ち、この牽引応力の空間相関距離は、正常細胞と比較して喘息患者の細胞は低下していることがわかる。このことから、単層上皮細胞の広範囲（100 μm ～）にわたる牽引応力の空間特性が、ジャミング機能、また喘息などの細胞疾患機能と密接に関わっている可能性が示唆されている。

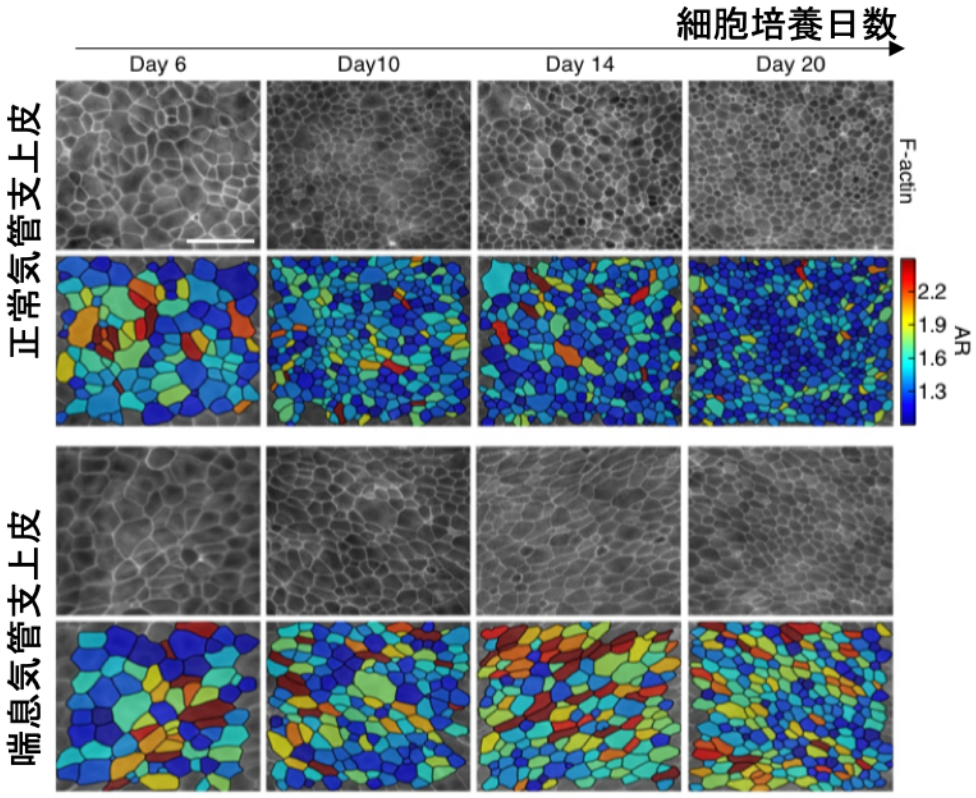


Fig. 3.2 正常気管支上皮細胞と喘息患者の気管支上皮細胞の培養日数における細胞アスペクト比解析によるジャミング評価[17]。
(Atia, L. et al, *Nat. Phys*., **2018**, *14*, 615. より引用，改変)

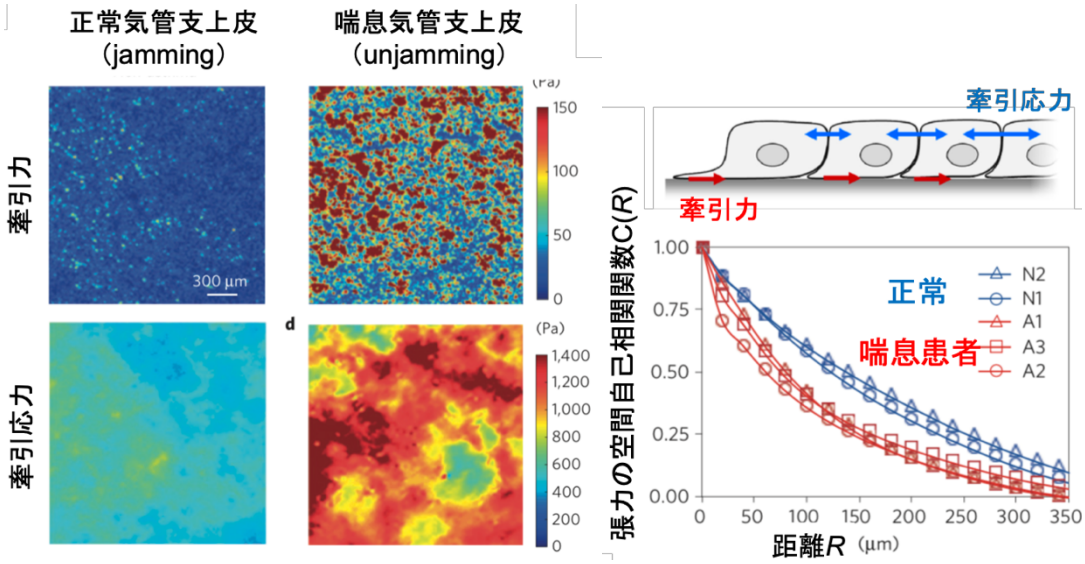


Fig. 3.3 単層状の正常気管支上皮細胞と喘息患者の単層状の気管支上皮細胞の牽引力・牽引応力分布計測[15]。喘息患者細胞の牽引応力空間相関距離が正常細胞と比較して減少する。
(Park, J. A. et al, *Nat. Mater.*, **2015**, *14*, 1045. より引用，改変)

3.1.4 目的

細胞と基板との接着と同様に、細胞同士も接着構造を形成し、接着を介して細胞骨格がネットワーク構造を形成する。上皮細胞は、細胞間接着により単層のシート様の細胞集団構造となる。この単層細胞の力学特性として、牽引応力の空間特性がジャミングによる単層構造の流動性の変化や、細胞疾患などの細胞状態の変化と関係していることが徐々に明らかにされつつある。一方で、弾性率については、広範囲での空間分布計測は行われていない。したがって、多細胞系の弾性率の空間分布と構造や機能の関係の解明に向けて、単層上皮細胞の多細胞スケールの弾性率の空間分布を計測することが望まれている。そこで、これを実現する方法として、多細胞系のスケールを走査可能な AFM システムの構築により、ジャミングした単層上皮細胞の広範囲計測を行う。ジャミング状態の単層細胞は、その流動性の低さ、細胞形状の均一性、また細胞牽引力の低さと均一性か

ら、これらの構造的・力学的な影響が限りなく少ない状態の弾性率の特性を調べるのに最適であるため、弾性率の空間特性を調べるサンプルとして最も適していると考えられる。さらに、単層上皮細胞における細胞弾性率の空間的な性質を定量評価するために、弾性率マッピング像から弾性率の空間自己相関関数を計算し、弾性率の空間相関長を調べた。これにより、単層上皮細胞の弾性率の空間分布の定量化を行うことを目的とする。

3.2　実験方法

3.2.1 細胞培養およびサンプル作製

本実験では培養上皮細胞として研究に広く用いられているイヌ腎臓尿細管上皮（MDCK）細胞を用いて実験を行なった。AFM 計測のため、細胞はコンフルエント（デッシュ底面の 100%を細胞が占める）状態（Fig. 3.4）からジャミング状態（Fig. 3.5）になるまで培養を続けたサンプルを用いた。以下に MDCK 細胞の培養手順を示す。

I.　細胞懸濁液を作製する

① CO_2 インキュベーターから MDCK 細胞の培養ディッシュを取り出し、サブコンフルエント（ディッシュ底面の 70~80% 程度を細胞が占める）状態であることを顕微鏡で確認する。

② クリーンベンチ内にディッシュを移してアスピレーターにより培地を吸い取り、Phosphate Buffer Saline (PBS) 1 ml で 3 回洗浄を行い、ディッシュ内に残存している培地と死細胞を取り除く。

③ ディッシュの底面から細胞をはがす為に Trypsin-5 mM EDTA 0.25% (Sigma)を 1 ml 加え、CO_2 インキュベーターに入れて 10 分待つ。

④ 10 分後ディッシュの底面から細胞がはがれていることを顕微鏡で確認し、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%非必須アミノ酸溶液を加えた MEM 培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を 3 ml 加えて、ピペッティングを数回行い、15 ml の遠沈管に移す。

⑤ 遠沈管を遠心分離機で 1,000 rpm で 2 分間遠心し、底面に細胞を沈殿させるために遠沈管を 180° 回してもう一度 2 分間遠心する。

⑥ 遠心後、上澄み液をアスピレーターで吸い出し、MEM 培地 1 ml を遠沈管に加えてピペッティングを行い、細胞懸濁液を作製する。

II. 細胞数をカウントする

① 死細胞の核を染色するトリパンブルーを 20 μl 入れたエッペンドルフチューブに細胞懸濁液 10 μl を加え、ピペッティングする。

② エッペンドルフチューブから 10 μl を血球計算盤に播いて、顕微鏡で細胞数を数える。

III. ディッシュに細胞を播種する

① 新しい 60 mm の培養ディッシュにあらかじめ 2 ml の培地を加えたものに、細胞数が 1.0×10^4 cells/cm^2 となるように細胞数を調整した細胞懸濁液を播種し、インキュベーターで培養する。

② 培養細胞がコンフルエント状態であることを確認し、そこからさらに毎日培地替えを行い 3 日培養することでジャミング状態とする。

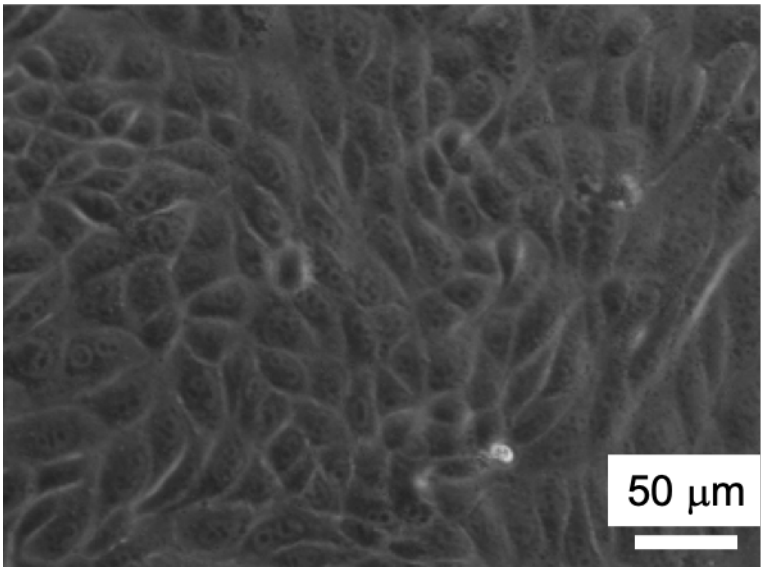


Fig. 3.4 コンフルエント直後の MDCK 細胞。細長い形状の細胞がまだ多く混在し、運動性が高く、細胞分裂も活発に起きる。

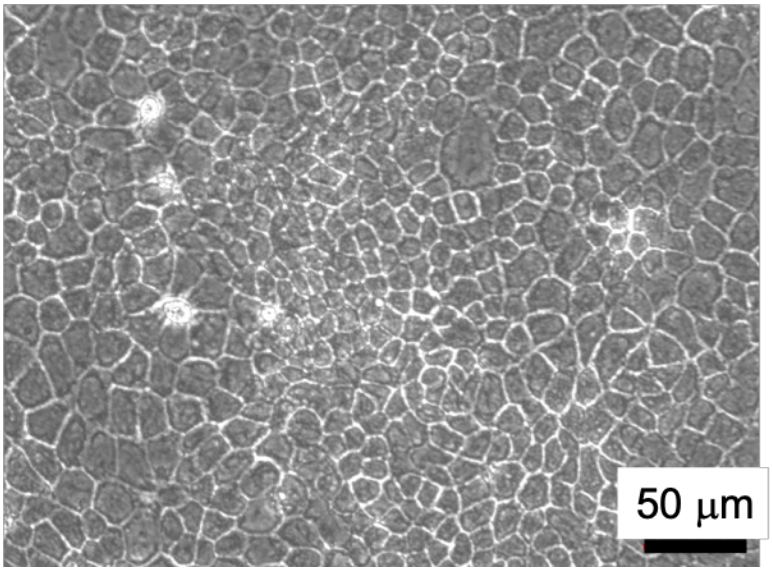


Fig. 3.5 ジャミングまで培養し続けた MDCK 細胞。細胞が密にパッキングし、敷石状を形成している。運動性が低く、細胞分裂が抑制されている。

作製した MDCK 細胞サンプルがジャミング状態であるかを調べるため、培養環境で MDCK 細胞のタイムラプス顕微鏡観察を行った。時間あたりの細胞運動距離（μm/h）は培養時間の経過とともに減少し、細胞のアスペクト比（AR）と細胞形状指数（$p=$ 外周長/細胞面積$^{1/2}$）も一定の値（AR = 1.4、$p = 3.9$）に収

束した（Fig. 3.6）。

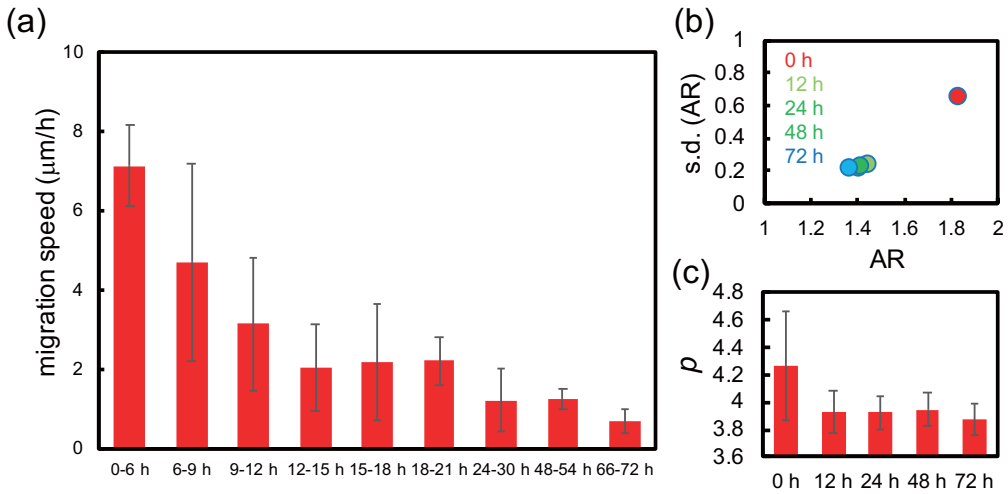


Fig. 3.6 単層 MDCK 細胞のジャミング遷移。(a) コンフルエント直後から細胞の運動性が低下する。(b) 細胞のアスペクト比 AR の時間変化。(c) 細胞の形状指数 p の時間変化。

3.2.2 実験装置と測定

自作 AFM

実験装置の概略図を Fig.3.7 に示す。本実験では、当研究室で開発した正立型顕微鏡に水浸対物レンズ、レーザー、ピエゾステージを組み合わせた AFM 装置を用いた。この AFM は、水浸対物レンズを使用することで、液中の生体サンプルを培養環境下での計測が可能である。ピエゾステージは X,Y,Z それぞれの方向に 300 μm の可動範囲がある。この AFM は PC の LabVIEW プログラムで制御を行うことで、任意に動作させることが可能である。

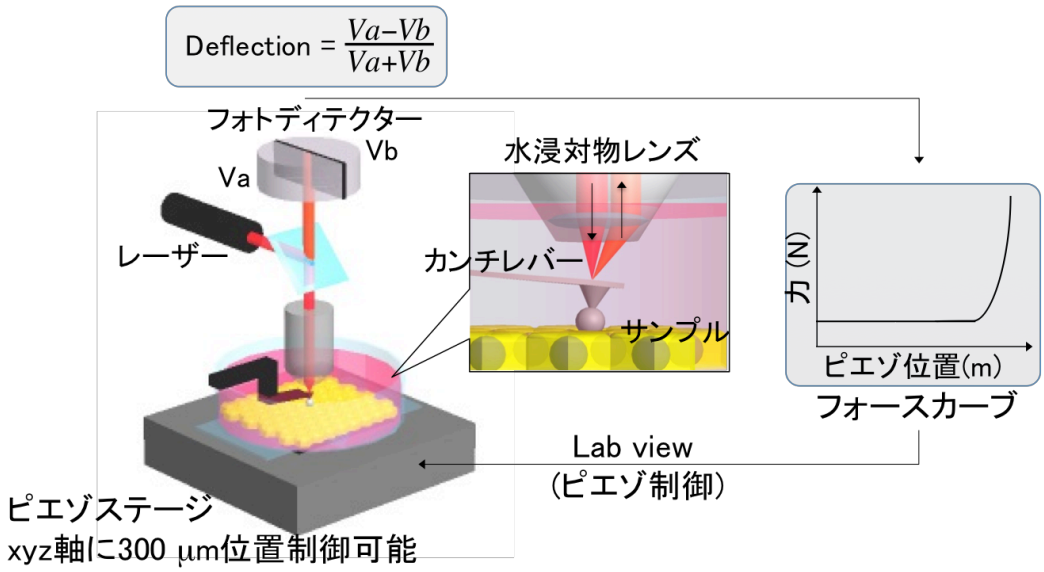


Fig. 3.7 開発した AFM 概略図。対物レンズによりカンチレバーにレーザーを集光させ、その反射光をフォトディテクターで電圧に変換する。カンチレバーへのサンプル応力によるたわみをレーザーの反射光の位置の変化（Deflection）により計算する。この力とピエゾ位置の関係を示したフォースカーブから、サンプル物性と形状の解析を行う。

コロイドプローブ

本実験ではカンチレバー（BL-AC40TS Olympus）の探針に球形のシリカビーズ（Funakoshi）を取り付けたプローブを使用した。これらのカンチレバーは、窒化シリコンでできた矩形カンチレバーである（Fig.3.8）。コロイドプローブの作製には、倒立型光学顕微鏡（Eclipse TE2000-U, 20× objective, Nicon）で観察しながら、マイクロマニピュレーターを使用してガラスニードルを操作することで、カンチレバーの先端にシリカビーズを接着した（Fig.3.9）。接着には、エポキシ系の接着剤を使用した。

・ BL-AC40TS：バネ定数<0.1N/m、長さ 37 μm、幅 16 μm、厚さ 0.2 μm

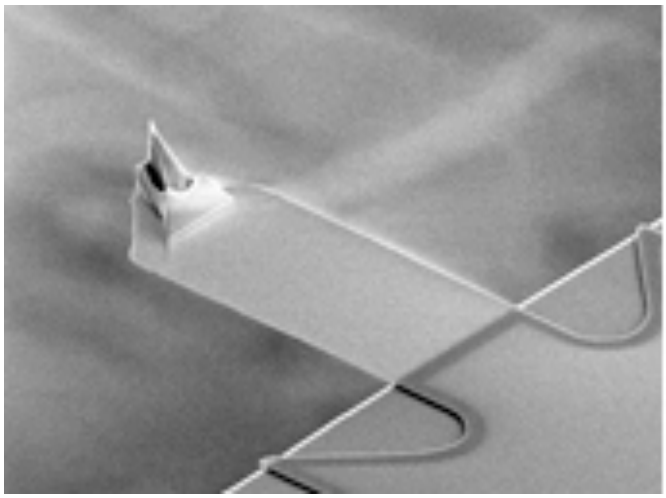


Fig. 3.8 カンチレバー(AC40) [Olympus.Co.HP]。

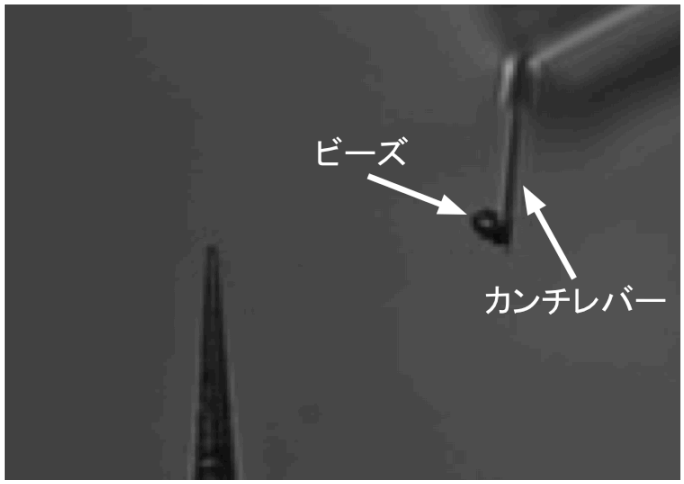


Fig. 3.9 コロイドプローブカンチレバー作製時の光学観察像。探針の先端に球形ビーズを接着させた。

本実験では、ジャミング状態の単層 MDCK 細胞の自作 AFM による弾性率のマッピング計測を行った。弾性率の算出には、前章の式(2.27)で表したヘルツモデル式を適用した。マッピング計測範囲は、水平方向に 300 μm 四方の範囲を 100 × 100 ピクセル（3 μm 毎）とした。1 つのマッピング画像の取得には、約 90 分を要する。

3.2.3 弾性率の自己空間相関関数の導出

自己相関関数は、空間的に変化する信号 v($\vec{r}$)についてある場所 $\vec{r}$ での値と、その$\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|$だけ離れた場所での値との積 A(r)とした時の空間平均をとったものである。

$$A\left(\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|\right)=v(\vec{r})\cdot v\left(\overrightarrow{r'}\right) \tag{3.1}$$

もし、v($\vec{r}$)が周期性を持っている信号の場合は v($\vec{r}$)と v($\overrightarrow{r'}$)の間には一定の関係があるため、積$v(\vec{r})\cdot v\left(\overrightarrow{r'}\right)$の空間平均は$\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|$により 0 ではないある値をとる。一方で、$v(\vec{r})$が 0 を中心とする正負の完全にランダム（無秩序）な信号の場合は、積$v(\vec{r})\cdot v\left(\overrightarrow{r'}\right)$も 0 を中心とする正負のランダムな値になるからその空間平均は 0 となる。離散的なデータの場合自己相関関数は

$$C\left(\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|\right)=\langle v(\vec{r})\cdot v\left(\overrightarrow{r'}\right)\rangle \tag{3.2}$$

となり、$\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|$=0 の時は同じデータ同士の積の平均値となり、全ての$C\left(\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|\right)$の中で最大の値である。この時、全ての$C\left(\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|\right)$を$C(0)$で割った値を改めて$C\left(\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|\right)$とすることにより、完全に相関がある場合を 1 に規格化する。

マッピング像の値 Xが正規分布となる場合、Xは空間的に$\bar{X}$を中心として揺らいでいる値であるため、式(3.2)の$v(\vec{r})$を$(X(\vec{r})-\bar{X})$として考える。また、$C(0)$で規格化することで以下の式を用いて Xの自己空間相関関数を表した。

$$C\left(\left|\vec{r}-\overrightarrow{r'}\right|\right)=\frac{\langle(X(\vec{r})-\bar{X})\cdot\left(X\left(\overrightarrow{r'}\right)-\bar{X}\right)\rangle}{\langle X^2\rangle-\bar{X}^2} \tag{3.3}$$

3.3　結果と考察

3.3.1 MDCK 細胞の弾性率空間分布

Fig. 3.10 にジャミング状態の MDCK 細胞の AFM 計測により得られた典型的な弾性率マッピング像を示す。細胞の弾性率は細胞中心領域と比較して、細胞間の境界部分で高い値を示しており、これは先行研究結果と一致している[42,52]。また、マッピング像全体の弾性率のヒストグラムから、単層細胞の弾性率は対数正規分布を示し、単一細胞の弾性率を調べた先行研究結果と一致している[37]。弾性率のマッピング像を見ると、右下部や左部で比較的弾性率の低い細胞が多く存在し、右上部では比較的弾性率の高い細胞が多く存在するように見える。そこで、この単層細胞の弾性率の空間特性を定量化するために、次節では、マッピング像の弾性率の空間自己相関関数を計算により求めた結果を示す。

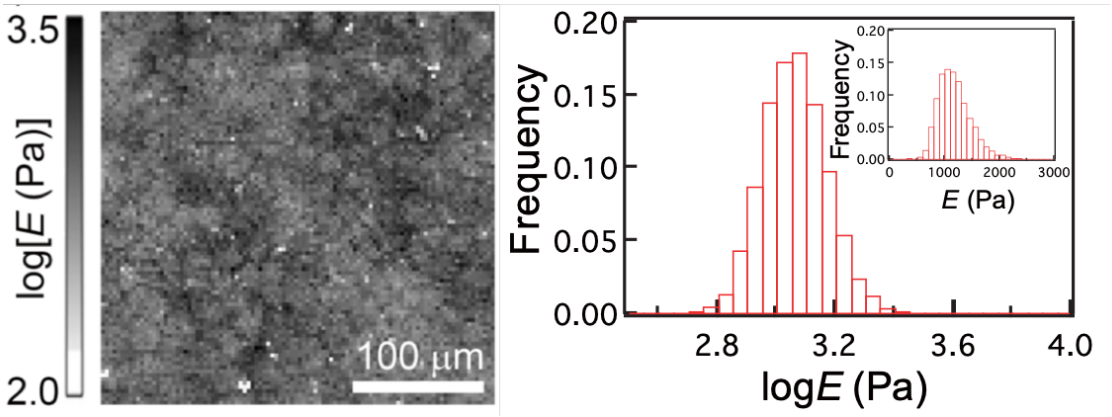


Fig. 3.10 単層 MDCK 細胞の弾性率マッピング像と弾性率のヒストグラム。

3.3.2 MDCK 細胞の弾性率の長距離相関

Fig. 3.10 の MDCK 細胞の弾性率マッピング像に対して、ある距離 r 離れた弾性率の自己相関関数を、式(3.3)で X=log$E$ とおき、$C_E(r)\left(=C\left(\left|\vec{r}-\vec{r'}\right|\right)\right)$として計算し、プロットした（Fig. 3.11)。空間相関関数を見ると、２段階の振る舞いを示していることがわかった。この相関関数を以下の２つの指数関数の加算関数でフィッティングすることにより、各段階の相関長を求めた。

$$C_E(r) = a_S e^{-r/l_S} + a_L e^{-r/l_L} \tag{3.4}$$

１段階目の r = 0 ~ 10 μm の領域は相関長 l_S が平均して約 6.1 μm であり、細胞中心間距離（15.3 μm）を下回ることから単一細胞内の短い相関長を示すことがわかった。２段階目の r = 10 ~ μm の領域は相関長 l_L が平均して約 25.4 μm であり、細胞中心間距離と細胞平均直径（15.6 μm）を超える複数細胞間にわたる空間相関を示した。この複数の細胞間にまたがる長距離相関長 l_L は、一つ一つの細胞の弾性率の関係から生じている可能性のほかに、細胞境界で弾性率が高い値を示し、それがマッピング像全体に網目状の構造を形成していることによる効果や、薄いサンプルが厚さに応じて基板の硬さの影響を受けることにより、細胞形状に依存した見かけ上の弾性率の空間特性による効果（Fig. 3.12）[53]で生じている可能性が考えられた。そこで、細胞境界部分を除いた弾性率像と、サンプルとプローブのコンタクトポイントによるサンプルの高さと細胞膜染色により求めた単層細胞の平均の厚さから算出した細胞の厚さ分布を用いて弾性率を補正した弾性率像から、それぞれの空間相関を調べた（Fig. 3.13, Fig. 3.14)。その結果、それぞれの弾性率の相関関数から、長距離相関は細胞境界部分の弾性率や、細胞の空間的な厚さの違いによる見かけの弾性率分布の影響を取り除いても存在していることがわかった。つまり、単層上皮細胞の弾性率の長距離相関

は、隣接する細胞間で細胞同士の弾性率が相関を持つことで形成されていることが示唆された。

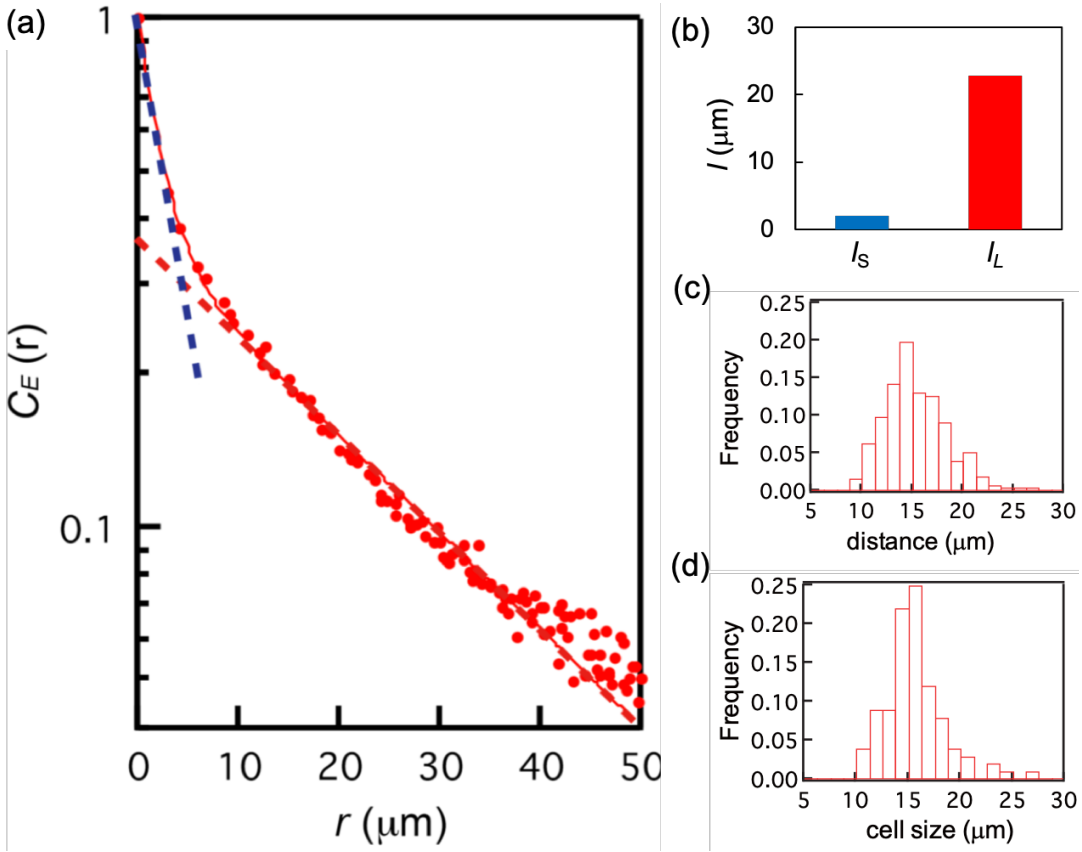


Fig. 3.11 単層 MDCK 細胞の弾性率の空間相関。(a) 弾性率の空間相関関数 $C_E(r)$。2 つの指数関数（短距離：青、長距離：赤）の和でフィッティングした。(b) 短距離と長距離の各相関長（l_S、l_L）。(c) 細胞の中心間距離。(d) 細胞の直径。

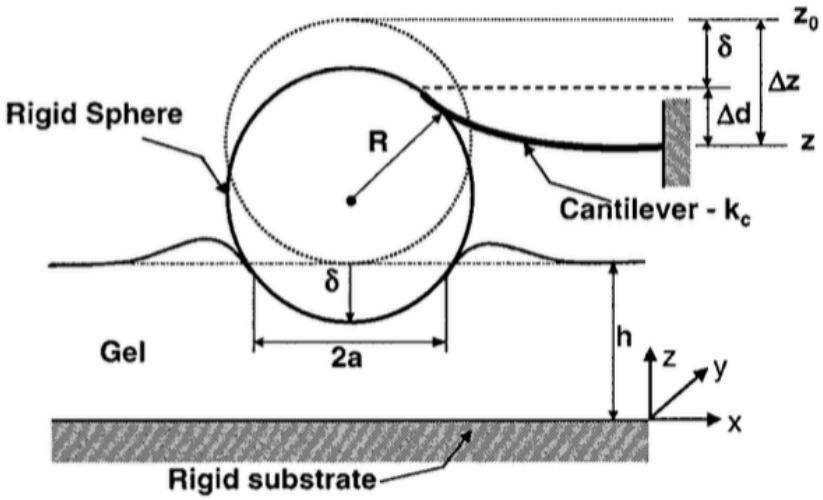


Fig. 3.12 硬い基板上の薄いサンプルの AFM 計測の模式図[53]。薄いサンプルは、厚さ h に応じて基板硬さにより見かけの弾性率が変化する
(Dimitriadis, E. K. et al, *Biophys. J.*, **2002**, *82*, 2801. より引用)

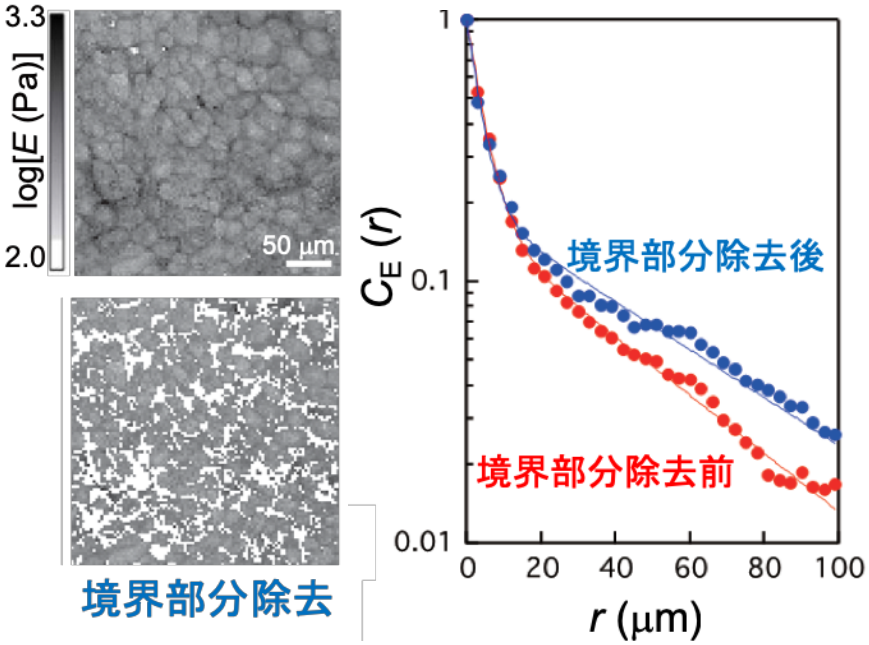


Fig. 3.13 細胞境界部分を含めた弾性率像と含めない弾性率像の空間相関。細胞境界部分を除去した弾性率像から算出した空間相関関数 C_E は、除去前と比較してほぼ変化せず、隣接細胞距離の長距離相関を維持している。

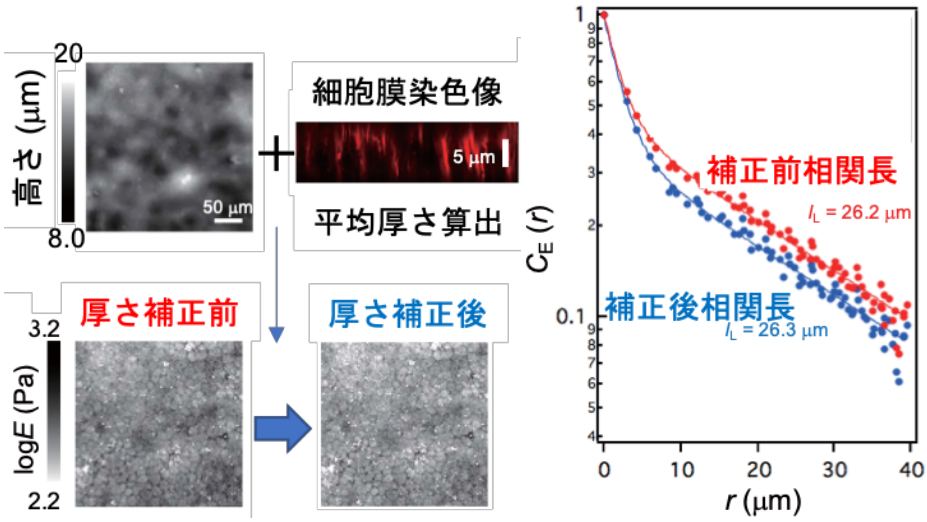


Fig. 3.14 単層上皮細胞の基板硬さによる弾性率の細胞厚さ依存性補正とその時の空間相関の変化。高さ分布と細胞膜染色画像から算出した平均の細胞厚さから、細胞の厚さの分布を求め、厚さ補正した前後の弾性率像から算出した空間相関関数 C_E は、それぞれほとんど同じ長距離相関長をもつことを示した。

3.3.3 細胞形状と細胞弾性率の関係

Fig. 3.15 にジャミングした MDCK 細胞の弾性率と細胞形状の関係を示す。この図から、MDCK 細胞の弾性率と細胞の面積、また MDCK 細胞の弾性率と細胞のアスペクト比（AR）との間には、相関が無いことがわかった。

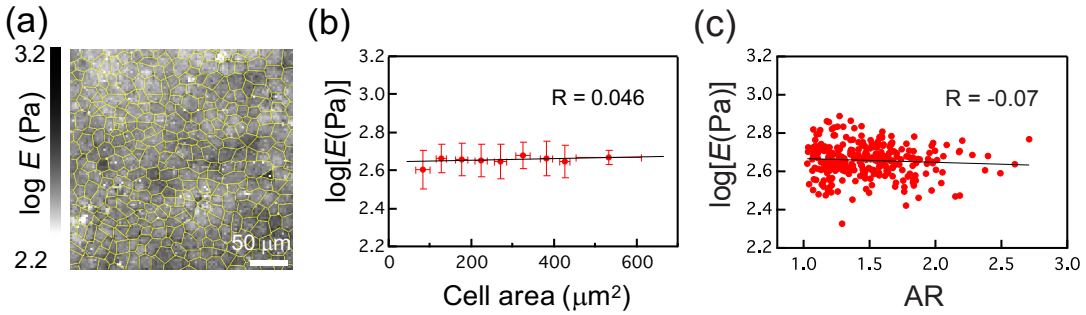


Fig. 3.15 単層 MDCK 細胞の弾性率と細胞形状との関係。(a) 細胞間境界部分を線で区切った弾性率マッピング像。(b) 細胞面積と細胞弾性率の関係。相関係数 R は 0.046。(c) 細胞アスペクト比と細胞弾性率の関係。相関係数 R は-0.07。

3.3.4 考察

単層上皮細胞では、ジャミングの起きる細胞密度で細胞増殖速度は急激に低下する[14-16,39,54-57]。このような高密度に細胞が固定化された単層細胞形態において、細胞の弾性率がどのような空間分布を形成するのかを理解することは細胞のジャミング現象を理解する上でも重要である。本研究で、ジャミングしたMDCK 細胞において、細胞弾性率と細胞面積、また細胞弾性率と細胞アスペクト比のそれぞれが、互いに無相関であることがわかった（Fig. 3.15）。この結果は、ジャミング状態の細胞弾性率の空間分布が、細胞のジャミングの過程で形成される細胞の構造に影響しないことを示唆した。

また、細胞の弾性率は、細胞培養基板の弾性率と比例するように変化することが示されている[7,51]。したがって、細胞と細胞の間でも接着を介して弾性率を相互に調節する機能が存在する可能性が考えられる。実際に、AFM 計測によって単層上皮細胞の弾性率のマッピングを行い、弾性率の自己空間相関関数を調べたところ、隣接する細胞間で細胞中心間距離を超える長さに弾性率の相関を持っていることを明らかにした（Fig. 3.10, Fig. 3.11）。このことから、細胞は細胞間接着を介して弾性率の相互調節機能を有していることが示唆された。

一方で、今回得られた単層上皮細胞における弾性率の長距離の空間相関長は約 25.4 μm であり、先行研究で示されている牽引応力の空間相関（100 μm 以上）と比較すると、明らかに短い。これは、単層上皮細胞のジャミング状態における弾性率の空間分布と牽引応力の空間分布は、それぞれ異なる起源から形成される可能性を示唆している。さらに、牽引応力は、単層細胞の弾性率は均一として計算が行われている。そのため、牽引応力の算出のために、弾性率分布の評価が重要であると考えられる。

単層上皮細胞はジャミング状態に達するまで細胞運動と細胞分裂が活発な状

態をとる。そのため、今回得られたような弾性率分布が、ジャミング時特有のものか、ジャミング前の細胞状態でも見られる単層上皮細胞で普遍的な特徴であるのかは判断できない。そこで、今後はジャミング状態となる前の単層細胞の弾性率の空間特性について明らかにすることで、生体内の創傷治癒機能などの多細胞系の運動性を伴う生体機能の理解に発展できることが期待される。

3.3.5 結論

本実験では、MDCK 細胞を用いて弾性率の空間分布を AFM により計測し、ジャミング状態における細胞弾性率の空間相関を調べた。その結果、広範囲の細胞弾性率の空間分布を得ることに成功し、細胞弾性率が細胞中心間距離を超える距離に相関を持つことを明らかにした。また、ジャミングにより形成される単層細胞内の細胞形状と細胞弾性率との間に相関関係が無いことも明らかにした。一方で、現在の AFM 計測による単層細胞の弾性率分布計測では、マッピング計測に時間がかかるためにジャミング前の流動性を持つ単層細胞の計測には適さない。そこで、今後はより高速な弾性率計測法の開発によるジャミング過程の単層細胞の弾性率分布の解明が求められる。

第4章　　単層上皮細胞の弾性率分布形成における細胞骨格構造の影響

4.1　研究背景および目的

4.1.1 単層上皮細胞のメカニクスと細胞骨格構造

細胞―基板間の接着と同様に、細胞―細胞間の接着も細胞骨格のネットワーク構造が形成されている（Fig. 1.3)。単層細胞内で形成される張力や牽引力の協同的な空間分布は、アクトミオシン構造と関係している[58,59]。また、単一の培養細胞弾性率もアクチン構造の阻害によって大きく減少することが知られている（Fig. 4.1）[36]。これらのことから、単層細胞の弾性率も細胞間接着を介したアクチン構造と関係する可能性が考えられる。そこで、本論文の第 3 章で明らかにした単層上皮細胞における弾性率の空間分布が、細胞骨格構造とどのような関係にあるのかを理解することは、多細胞系のメカニクスを理解する上で重要である。

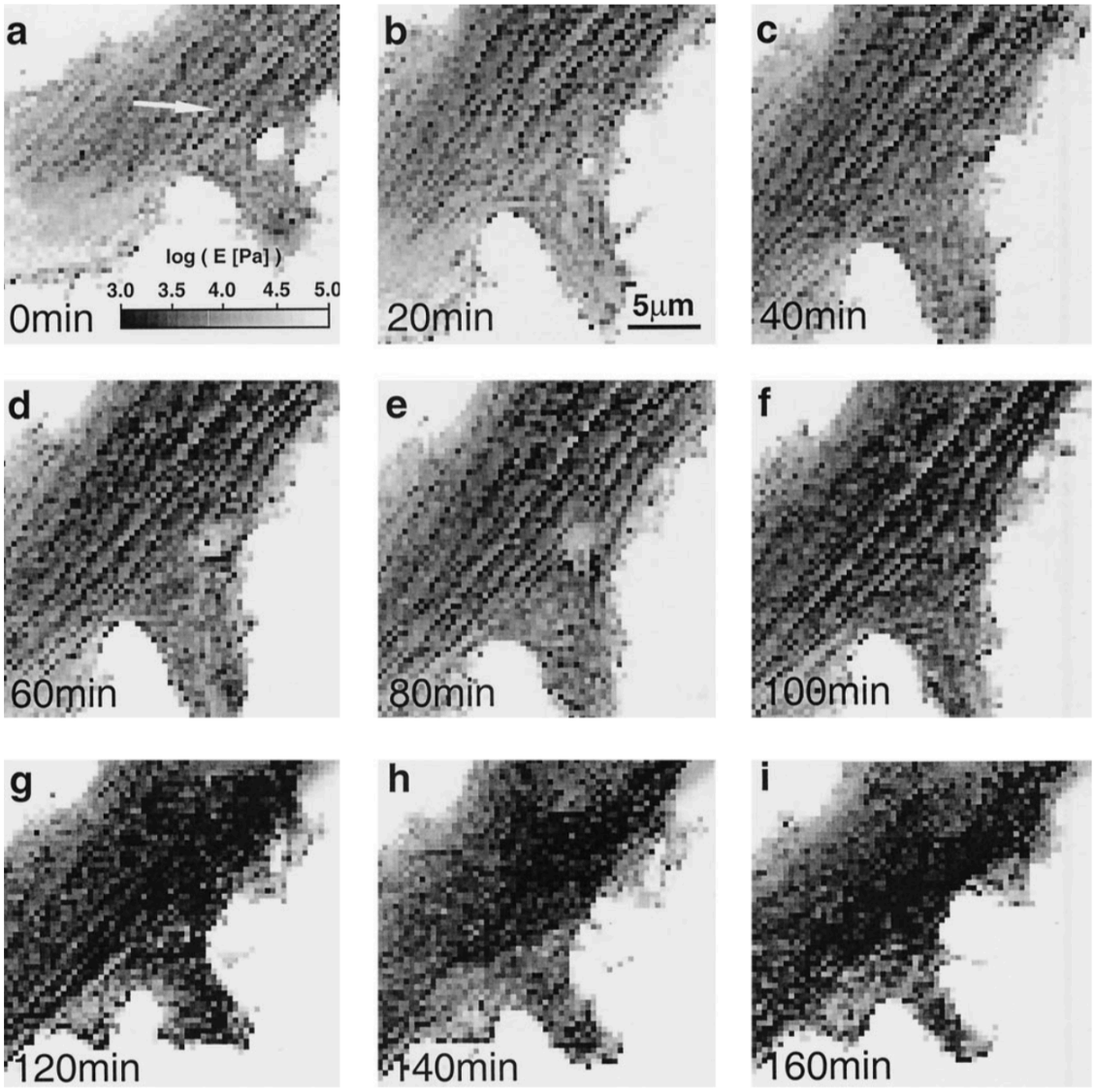


Fig. 4.1 3T3 細胞のアクチン重合阻害剤（CytochalasinB）環境下での弾性率マッピングの時間変化[36]。
(Rotsch, C. et al, *Biophys. J.*, **2000**, *78*, 525. より引用)

4.1.2 目的

細胞の弾性率とアクチンフィラメント（F-アクチン）構造については、単一の培養細胞で多く研究がなされ、関係性が示されてきた。第 3 章で我々は、単層上皮細胞における細胞弾性率の空間分布を明らかにしたが、細胞間接着を介する F-アクチンのネットワーク構造と弾性率分布との関係はいまだ不明であった。

そこで、F-アクチン阻害剤と細胞間接着阻害、またこれらの回復実験を行い、AFM 計測を行うことで、F-アクチンのネットワーク構造と細胞弾性率の空間分布との関係を調べることを目的とする。

4.2　実験方法

4.2.1 細胞培養およびサンプル作製

本実験では第 3 章で用いた MDCK 細胞と、細胞間接着タンパク質である E-カドヘリン発現をテトラサイクリン分子の存在下でノックダウンすることが可能な MDCK 細胞（E-cadherin shRNA MDCK cells）を用いた。AFM 計測のため、細胞はジャミング状態まで培養を続けたサンプル（tet(-)）を用いた。以下に E-cadherin shRNA MDCK 細胞の培養手順を示す。

I.　細胞懸濁液を作製する

① CO_2 インキュベーターから E-cadherin shRNA MDCK 細胞の培養ディッシュを取り出し、サブコンフルエント（ディッシュ底面の 70~80% 程度を細胞が占める）状態であることを顕微鏡で確認する。

② クリーンベンチ内にディッシュを移してアスピレーターにより培地を吸い取り、Phosphate Buffer Saline (PBS) 1 ml で 3 回洗浄を行い、ディッシュ内に残存している培地と死細胞を取り除く。

③ ディッシュの底面から細胞をはがす為に Trypsin-5 mM EDTA 0.25% (Sigma)を 1 ml 加え、CO_2 インキュベーターに入れて 10 分待つ。

④ 10 分後ディッシュの底面から細胞がはがれていることを顕微鏡で確認し、10% tetracycline negative FBS (Life Technologies, Boston, MA)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%非必須アミノ酸溶液（GlutaMAX,

Gibco)、抗生物質（800 μg/ml G418 and 5 μg/ml blasticidin, InvivoGen, Carlsbad, CA）を加えた DMEM 培地（Wako, Tokyo, Japan）を 3 ml 加えて、ピペッティングを数回行い、15 ml の遠沈管に移す。

⑤ 遠沈管を遠心分離機で 1,000 rpm で 2 分間遠心し、底面に細胞を沈殿させるために遠沈管を 180° 回してもう一度 2 分間遠心する。

⑥ 遠心後、上澄み液をアスピレーターで吸い出し、MEM 培地 1 ml を遠沈管に加えてピペッティングを行い、細胞懸濁液を作製する。

II. 細胞数をカウントする

① 死細胞の核を染色するトリパンブルーを 20 μl 入れたエッペンドルフチューブに細胞懸濁液 10 μl を加え、ピペッティングする。

② エッペンドルフチューブから 10 μl を血球計算盤に播いて、顕微鏡で細胞数を数える。

III. ディッシュに細胞を播種する

① 新しい 60 mm の培養ディッシュにあらかじめ 2 ml の培地を加えたものに、細胞数が 3.0×10^4 cells/cm^2 となるように細胞数を調整した細胞懸濁液を播種し、インキュベーターで培養する。

② 培養細胞がコンフルエント状態であることを確認し、そこからさらに培地替えを行い 1 日培養することでジャミング状態とする。

4.2.2 細胞の薬剤処理

F-アクチン阻害と回復

F-アクチンの重合を阻害した単層 MDCK 細胞は、ジャミング状態の MDCK 細胞に 3 μM の F-アクチン重合阻害剤：latrunculin A (LatA, Sigma-Aldrich)を加え、30 分インキュベートすることで作製した。また、F-アクチンを再重合し

た MDCK 細胞は、上記の手法で重合阻害した MDCK 細胞を 3 回培地で置換し、12 時間インキュベートすることで作製した。

細胞間接着阻害と回復

上皮細胞の細胞間接着の形成に必要なカルシウムイオンをキレートすることで細胞間接着を阻害した単層 MDCK 細胞は、ジャミング状態の MDCK 細胞に 4 mM のグリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）を加え、6 時間インキュベートすることで作製した。また、細胞間接着の回復サンプルは、上記の手法で細胞間接着を阻害した MDCK 細胞を 3 回培地で置換し、1 2 時間インキュベートすることで作製した。

E-カドヘリンノックダウン

E-カドヘリン接着を阻害した単層 MDCK 細胞（tet(+)）は、4.2.1 節の手法でⅢ.①まで操作した E-cadherin shRNA MDCK を 1 日インキュベートした後、2 μm/ml のテトラサイクリンを加えて 96 時間インキュベートすることで作製した。

全ての薬剤処理を行った MDCK サンプルは、細胞の運動は抑制されており（細胞運動速度：< 3 μm/h）、ジャミングした正常な MDCK 細胞と同様の状態に保たれている（Fig. 4.2）。

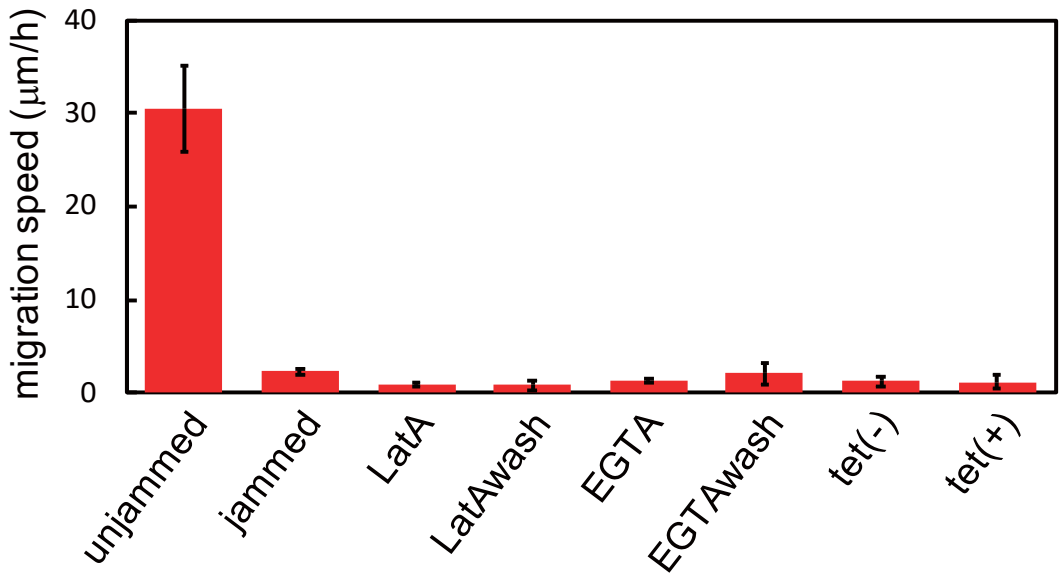


Fig. 4.2 各 MDCK サンプルの細胞の平均運動速度 ± s.d.（μm/h）。

4.2.3 細胞の免疫染色

それぞれの阻害実験サンプルの細胞骨格状態を調べるため、F-アクチンとE-カドヘリンを染色した。F-アクチンの染色には、F-アクチンに特異的に結合するファロイジン（Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin, Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いた。E-カドヘリンの染色には、E-カドヘリンに特異的に結合する1次抗体（ECCD-2 primary antibody, Life Technologies）に蛍光分子のついた 2 次抗体（Alexa Fluor 546, Life Technologies）を結合させた。各サンプルは4%パラホルムアルデヒドで30分固定を行い、0.1%Triton X-100で15分細胞膜透過処理を行ったあと、1%BSAで 1 時間非特異的結合防止処理を行った。その後それぞれの染色試薬存在下で24時間静置（4℃）することで染色を完了した。蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡（C1, Nikon）を用いて行った。

Fig. 4.3 は、F-アクチン阻害（LatA 作用）前後の F-アクチンの染色画像を示している。F-アクチン阻害により、正常細胞で細胞膜近傍に局在していた F-ア

クチンがほとんど失われていることがわかる。Fig. 4.4 は、カルシウムイオンのキレート（EGTA 作用）時と EGTA を washout した時の F-アクチンの染色画像と E-カドヘリンの染色画像を示している。カルシウムイオンのキレートにより正常細胞で細胞膜近傍に局在していた E-カドヘリンがほとんど失われ、この時の F-アクチンは正常細胞と比較して空間不均一な構造を示している。また、EGTA の washout により、E-カドヘリンと F-アクチンは再び細胞膜近傍への局在が回復傾向にあることがわかる。Fig. 4.5 は、E-カドヘリンのノックダウン前後の E-カドヘリンの染色画像を示している。E-カドヘリンのノックダウンによって、正常（tet(-)）細胞で細胞膜近傍に局在していた E-カドヘリンが、ほとんど失われていることがわかる。

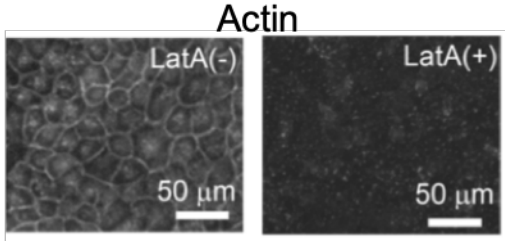


Fig. 4.3 正常サンプル（Lat(-)）と F-アクチン阻害サンプル（Lat(+)）の F-アクチン染色像。

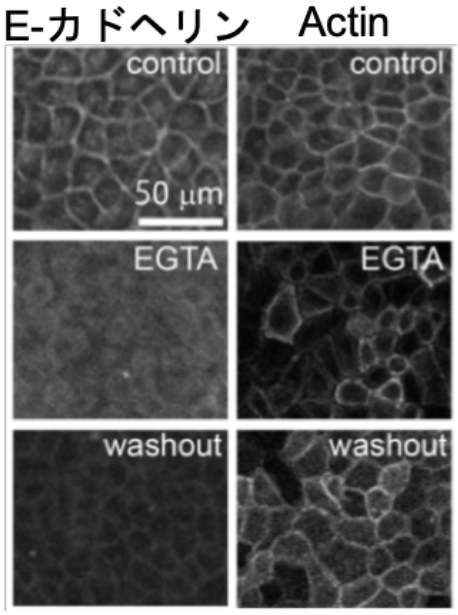


Fig. 4.4 正常サンプル（control）とカルシウムイオンキレートサンプル（EGTA）、接着回復サンプル（washout）の E-カドヘリン、F-アクチン染色像

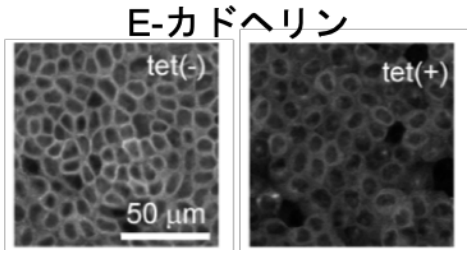


Fig. 4.5 正常な E-cadherin shRNA MDCK サンプル（tet(-)）とテトラサイクリン存在下で E-カドヘリンノックダウンを誘導した E-cadherin shRNA MDCK サンプル（tet(+)）の E-カドヘリン染色像。

4.3 結果と考察

4.3.1 F-アクチン阻害時の弾性率分布

LatA 作用による F-アクチン阻害時と LatA の washout 時の典型的な弾性率のマッピング像と弾性率の平均値を Fig. 4.6 に示す。この結果から、F-アクチン阻害時に MDCK の弾性率が全体的に低下し、LatA の washout により弾性率が再

び増加することがわかった。この結果は、単一培養細胞で見られる F-アクチン構造に依存した弾性率の変化[35-38]と同様に、単層 MDCK 細胞の弾性率が F-アクチン構造に関係していることを示唆した。また、F-アクチン阻害（LatA）時の単層 MDCK 細胞の弾性率の空間相関は、長距離の相関を示す関数が短距離で急速に低下し、弾性率の長距離相関長が細胞間距離を下回ることがわかった（Fig. 4.7）。したがって、F-アクチンの構造が、単層細胞における隣接する細胞間の弾性率の相関形成に関与していることが示唆された。さらに、LatA の washout により、弾性率の長距離相関長が再び細胞間距離を超える距離に回復することがわかった（Fig. 4.7）。この結果は、ジャミング状態で単層構造が保たれたまま F-アクチン構造が再構成されることによって、単層細胞で隣接細胞間にまたがる弾性率の相関が形成されたことを示す。

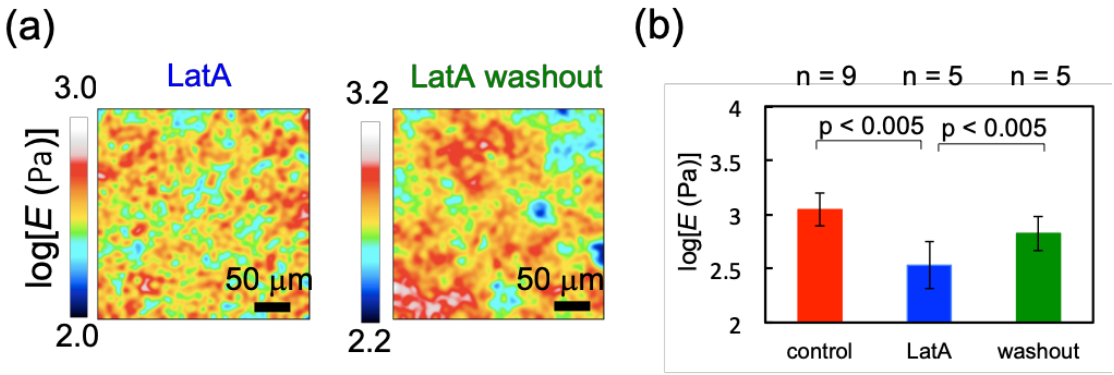


Fig. 4.6 （a）F-アクチン阻害時（LatA）、回復時（LatA washout）の MDCK 細胞弾性率空間分布。(b) 各サンプルの弾性率の平均値 ± s.d。(有意差検定：Student's *t*-test)。

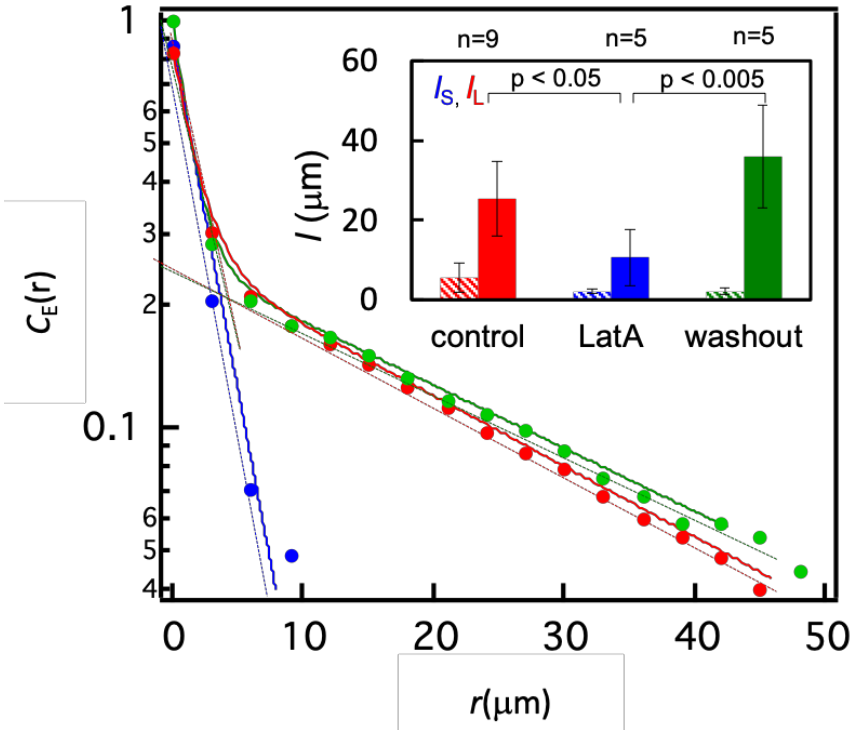


Fig. 4.7 正常（control：赤）、F-アクチン阻害（LatA：青）、F-アクチン再構成（washout：緑）での弾性率の空間相関。各サンプルの弾性率の平均短距離相関長 l_S ± s.d と平均長距離相関長 l_L ± s.d（inset）。（有意差検定：Student's *t*-test）。

4.3.2 カルシウムイオンキレート時の弾性率分布

上皮細胞では、F-アクチンはカルシウムイオン存在下で機能する複数の細胞間接着タンパク質に結合している[5,60,61]。このことから、カルシウムイオンをキレート処理（EGTA）することによる細胞間接着の阻害により、F-アクチンの細胞間接着を介するネットワーク構造がどのように単層 MDCK 細胞の弾性率分布に影響するのかを調べた。EGTA 作用による細胞間接着阻害時と EGTA の washout 時の典型的な単層 MDCK 細胞の弾性率のマッピング像と弾性率の平均値を Fig. 4.8 に示す。その結果、EGTA 処理と EGTA の washout でそれぞれ単層 MDCK 細胞の弾性率の平均値は変化しないことがわかった。一方で、弾

性率の長距離相関長は、EGTA 処理により細胞間距離を下回る値に低下し、EGTA の washout により再び細胞間距離を超える値に増加することがわかった（Fig. 4.9）。したがって、カルシウム依存の細胞間接着の阻害は、それぞれの細胞の F-アクチン構造を破壊することなく、隣接する細胞間の弾性率の相関形成に働く F-アクチンネットワーク構造の形成を抑制することを示唆する。つまり、単層細胞の弾性率の隣接細胞間で形成される相関が、細胞間接着を介する F-アクチンのネットワーク構造によって生じることを示唆した。

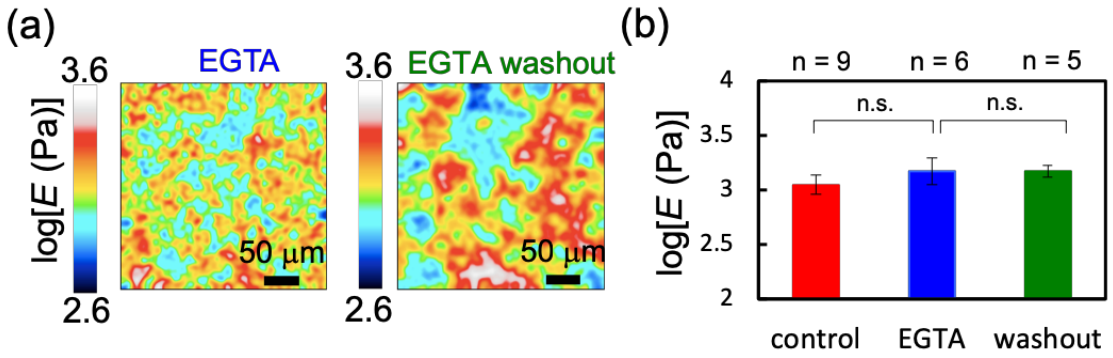


Fig. 4.8 (a)カルシウムイオンキレート（EGTA）時、回復（EGTA washout）時の MDCK 細胞弾性率空間分布。各サンプルの弾性率の平均値 ± s.d.。n.s.：非有意。（有意差検定：Student's *t*-test）。

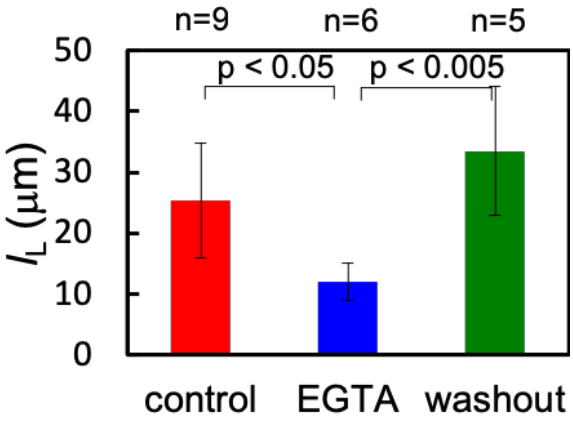


Fig. 4.9 正常、EGTA、EGTA washout での弾性率の平均長距離相関長 l_L ± s.d.。（有意差検定：Student's *t*-test）。

4.3.3 E-カドヘリンノックダウン時の弾性率分布

カルシウムイオン依存で機能する細胞間接着タンパク質の中で、E-カドヘリンは特に細胞間の力学特性の感知や相互作用に関わっている[13,58,59,62-66]。Trepat らは、細胞間接着タンパクを介して単層上皮細胞に力刺激を加えると、E-カドヘリン接着に対する力刺激が、細胞の弾性率を増加させることを示した（Fig. 4.10）[59]。そこで、E-カドヘリン接着が、F-アクチンのネットワークの構造による単層 MDCK 細胞の弾性率の空間相関形成に働く可能性を調べるため、E-カドヘリンを阻害した時の弾性率を計測した。Fig. 4.11 は、E-カドヘリンのノックダウン前後の単層 MDCK 細胞の弾性率のマッピング像と弾性率の平均値を示す。その結果、EGTA の実験と同様に E-カドヘリンのノックダウン時に細胞弾性率の平均値は変化しないことがわかった。一方で、弾性率の長距離相関長は、E-カドヘリンのノックダウンにより細胞間距離を下回る値に低下することがわかった（Fig. 4.12）。したがって、細胞間接着タンパク質の中で E-カドヘリンが、細胞間の弾性率の長距離相関を形成する F-アクチンのネットワーク構造の形成に決定的な役割を持つことを示唆した。

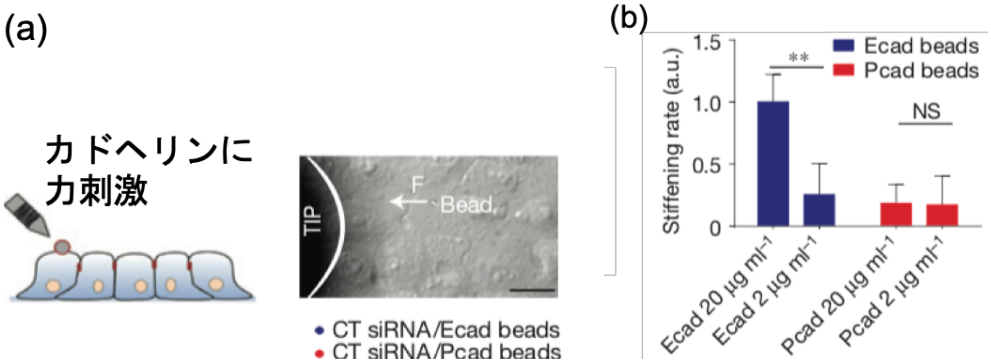


Fig. 4.10 単層上皮（MCF10A）細胞のカドヘリンタンパクへの力刺激による弾性率変化[59]。(a)カドヘリンタンパクを付着した磁性ビーズを細胞に接着させ、ビーズに力刺激を加える。(b) E-カドヘリンタンパクへの力刺激が、ほかのカドヘリンタンパク（P-カドヘリン）では見られない細胞弾性率の増加を示す。(Bazellieres, E. et al, *Nat. Cell Biol.*, **2015**, *17*, 417. より引用，改変)

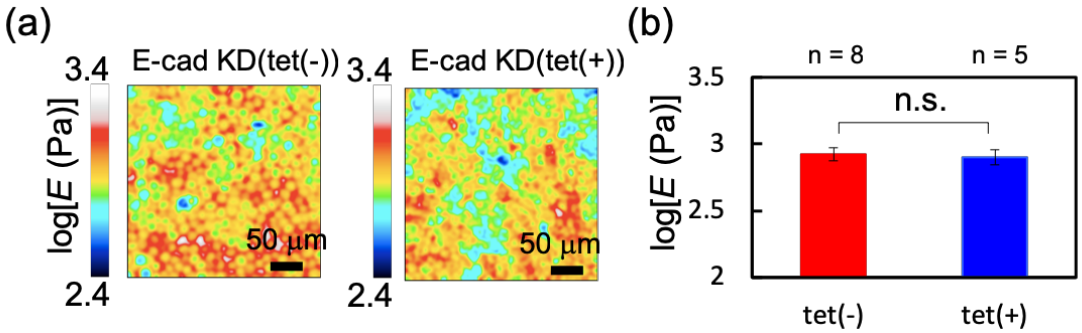


Fig. 4.11 （a）テトラサイクリン依存の E-カドヘリンノックダウン細胞 E-cadherin shRNA MDCK の正常時（tet(-)）と E-カドヘリンノックダウン時（tet(+)）の弾性率分布。(b) 各サンプルの弾性率の平均値 ± s.d.。n.s.：非有意。(有意差検定：Student's *t*-test)。

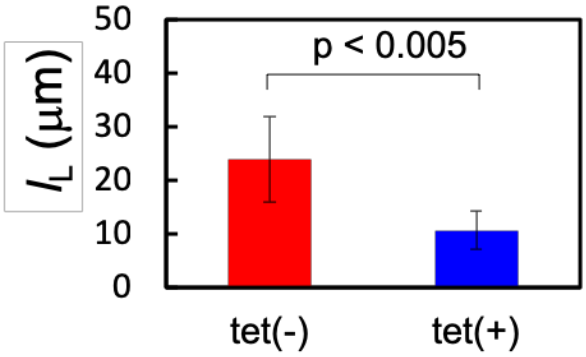


Fig. 4.12 control（tet(-)）、E-カドヘリンノックダウン（tet(+)）MDCK 細胞の弾性率の平均長距離相関長 l_L ± s.d.。(有意差検定：Student's *t*-test)。

4.3.4 考察

単層上皮細胞の弾性率の空間分布に対する F-アクチンと E-カドヘリン接着タンパク質の役割について Fig. 4.13 にまとめた。F-アクチン構造の阻害により、単層細胞の弾性率が低下し、また、F-アクチン構造の再構成により単層細胞の弾性率が増加することから、単一の培養細胞と同様に単層細胞においても F-アクチン構造が細胞弾性率に大きく関わることを示す。また、F-アクチンの構造が阻

害されることによって、単層細胞の隣接細胞間の弾性率の相関が失われることから、F-アクチン構造が単層上皮細胞における弾性率の空間分布を形成する要因であることがわかる。一方で、F-アクチンの再構成実験では、細胞がジャミング状態にも関わらず、弾性率の隣接細胞間の相関が再び形成された。この結果は、高密度化し運動性が低下する単層構造の形成過程において、長距離相関をもつ F-アクチンのネットワーク構造が形成されたのではなく、多細胞系の自発的なアクチンネットワーク構造形成であることを示唆する。また、カルシウムイオン依存の細胞間接着が複数の細胞間のアクチンネットワーク構造を形成することが知られている[67,68]。

本研究では、カルシウムイオン依存の細胞間接着タンパク質の中で、E-カドヘリンを介するアクチンネットワーク構造が、単層細胞における隣接細胞間の弾性率の相関を形成することを明らかにした。これは、細胞—基板接着を介した基板の弾性率による細胞弾性率の調節機能[7,51]と類似している。つまり、E-カドヘリン接着を介して、隣接する細胞の弾性率により細胞弾性率が調節される機能があることを示唆した。

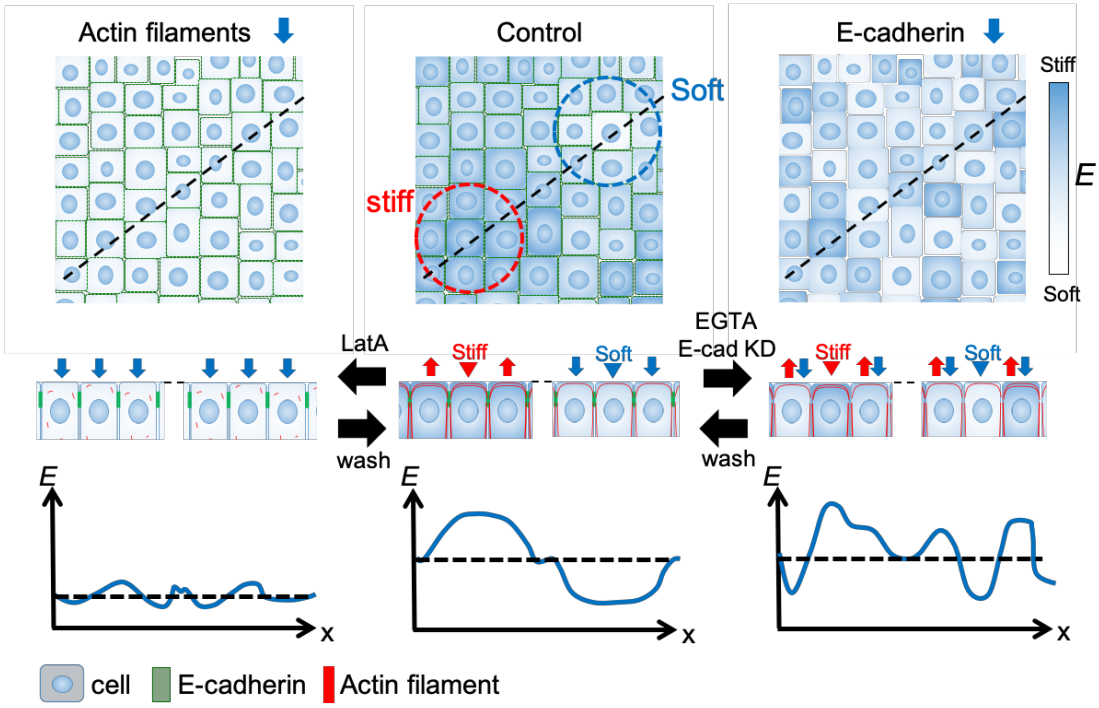


Fig. 4.13 アクチンフィラメントと E-カドヘリンの構成と阻害における単層 MDCK 細胞の弾性率の空間分布の模式図。細胞シート平面の模式図（上）は、弾性率の空間相関が、アクチンの阻害により弾性率が均一に低下することで失われ、E-カドヘリンの阻害により個々の細胞弾性率が不均一となることで失われることを示す。細胞側面の模式図（中央）は、細胞平面の模式図（上）でのドット状のラインにおける細胞弾性率と細胞内のアクチンフィラメント、E-カドヘリンの構造を示す。下部のグラフは、この側面から見た弾性率（中央）の横方向の位置 x における弾性率 E のプロットを示す。

4.3.5 結論

本実験では、前章で得られたジャミング状態の単層上皮細胞の弾性率の空間分布について、細胞骨格構造の阻害実験により、弾性率分布と細胞骨格構造の関係性を調べた。その結果、単層上皮細胞の隣接細胞間に存在する弾性率の空間相関が、F-アクチン阻害、細胞間接着阻害により失われ、阻害剤の洗い流しにより回復した。この時、細胞弾性率の値は、F-アクチン阻害時に有為に減少したが、カルシウムイオンキレートによる細胞間接着阻害時には平均値は変わらなかっ

た。また、E-カドヘリンを特異的にノックダウンした時にもカルシウムイオンのキレート実験と同様の結果が得られた。これらの結果から、単層上皮細胞では、E-カドヘリン細胞間接着を介する F-アクチンの細胞間にわたるネットワーク構造が、隣接細胞間の弾性率の調節に働いていることがわかった。この単層細胞の弾性率と細胞骨格構造の関係から、多細胞系のメカニクスを記述する、より生体機能に近い現象を再現する数理モデル形成などへの発展が期待される。

第5章　　表面傾斜のあるサンプルの AFM 弾性率計測手法の確立

5.1　研究背景および目的

5.1.1 ソフトマテリアルの AFM 計測

細胞の弾性率は、細胞接着[7,51]や細胞周期[69]、細胞分化[3]、細胞疾患[70,71]などの様々な細胞機能と関係している。さらに、細胞の弾性率は、細胞内でも空間的な弾性率の不均一性があることが知られている[37]。AFM によるソフトマテリアルの弾性率計測では、球形のプローブと平坦なサンプルとの弾性接触モデルであるヘルツモデル（式(2.27)）による解析が一般的に用いられ、この手法により培養環境における生細胞計測が精力的に行われている[32,36,44,47,72-76]。

5.1.2 AFM による表面傾斜のあるサンプル計測での問題点

AFM 計測を立体的で表面に傾斜をもつサンプルに適用することを考えると、プローブの押し込み位置でサンプルが押し込み方向に対して常に垂直であるとは限らない（Fig. 5.1）。AFM による弾性率計測に用いられるヘルツの弾性接触理論では、プローブから検知されるサンプルへの押し込み力 F_{m} とサンプル表面に垂直方向にかかる力 F_{n} がつりあい、またサンプルへの押し込み量の計測値 δ_{m} とサンプルの垂直方向の変形量 δ_{n} が一致するため、計測値である F_{m} と δ_{m} を用いて式(2.27)と同様に、

$$F_{\mathrm{m}} = \frac{4}{3}\frac{E_{\mathrm{m}}R^{1/2}}{(1-\nu^2)}\delta_{\mathrm{m}}^{3/2} \tag{5.1}$$

が、ヘルツモデル式として与えられる。この式をフォースカーブにフィッティン

グすることでサンプルの弾性率 E_m を算出できる[72,77]。しかしながら、このヘルツモデルでは、サンプル表面の形状が変化することは考慮されていないため、表面傾斜のあるサンプルの傾斜面で計測値の F_m, δ_m と、サンプル表面に対して垂直方向に変化する量 F_n, δ_n とにずれが生じることが、弾性率の解析結果にどのように影響するのかはわかっていない。

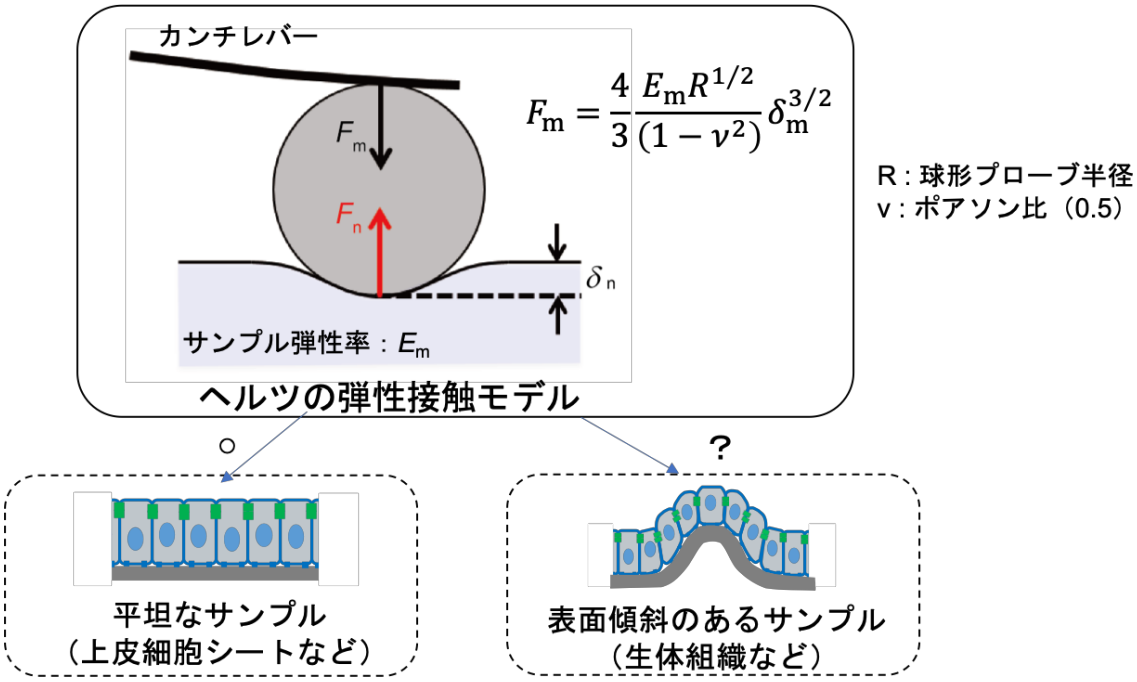


Fig. 5.1 生体組織の AFM 計測における弾性接触モデルの問題点。AFM によるサンプルの弾性率計測に広く用いられるヘルツの弾性接触モデルは、平坦なサンプルを仮定しているため、表面傾斜をもつサンプルへの適用可能性は不明。

5.1.3 目的

本研究では、ヘルツモデル解析におけるサンプル傾斜角度の影響を定量化すること、またこの影響を補正する手法を提案することを目的とした。この実現により、生体組織のような、立体的で表面傾斜をもつサンプルについて、表面形状に依存しない AFM での弾性率空間分布計測が可能になることが期待できる。最初に、空間的に表面の傾斜角度が連続的に変化しているソフトマテリアルサン

プルの AFM によるマッピング計測を行い、ヘルツモデル解析による弾性率が傾斜角度に対してどのように変化するかを調べた。さらに、傾斜のあるサンプル面での球形プローブによるサンプル押し込み時の力の釣り合いから、ヘルツモデルを拡張した傾斜に依存しない解析モデルを提案し、この傾斜補正解析モデルを用いてヘルツモデル解析による見かけの弾性率の傾斜角度依存性が補正できるかどうかを調べた。

5.2　実験方法

5.2.1 傾斜角度を持つサンプル作製

本研究では、高分子ハイドロゲル（ポリアクリルアミドゲル；PAA ゲル）と生体サンプルであるカタユウレイボヤの未受精卵をサンプルに用いた。それぞれのサンプルは、表面領域の構造が均一であり、表面位置に依存せずに弾性率は一定であると仮定できる。PAA ゲルは成分割合によって分子鎖の架橋構造を変化させることで、約 0.5 kPa や約 30 kPa のように、弾性率の異なるサンプルを自由に作製することができる。また、PAA ゲルはゲル溶液を固めて作製するため、容易に成型が可能であり、連続的に表面傾斜が異なるサンプルとして扱うのに適している。未受精卵は、< 0.1 kPa と非常に柔らかく、また球形のため、連続的に表面の傾斜角度が変化している。細胞や生体組織の多くは、数 Pa～数 kPa の弾性率をとるため、生体組織計測のための AFM 計測による弾性率の傾斜依存性を評価するサンプルとして、PAA ゲルと未受精卵は非常に適していると考えられる。

PAA ゲル

PAA ゲルは、１サンプル内で表面傾斜角度を持たせるため、半円筒型に成型

した。以下に半円筒 PAA ゲルの作製方法とその模式図（Fig. 5.2）を示す。

① 5-10% w/v（重量体積比）のアクリルアミド（Wako, Japan）と 0.25-1% w/v のビスアクリルアミド（Wako）を Mili-Q 水に溶かしたゲル溶液に、20 分間窒素ガスを流入させることで脱気する。

② ①の間に UV オゾンクリーナー（Filgen, Japan）をかけて親水化した内径 10 mm の半円筒型のガラスキャピラリーを、シラン化（Bind-Silane, Amersham Bioscience, NJ）したガラス基板上に置く。

③ 400 mg/L の過硫酸アンモニウム（重合開始剤、Wako）を①で作製したゲル溶液に加え、さらに 2.4 mL/L TEMED（N,N,N’,N’-tetramethylenediamine、重合促進剤、Wako）を加える。

④ Fig. 5.2 に示すように、③の作業の直後に②で作製したガラスの型にゲル溶液を注ぐ。

⑤ ゲル溶液を室温で 2 時間以上静置することで、完全にゲル化させる。

⑥ ゲル化した後、余分なゲルを取り除き、半円筒型のガラスキャピラリーをゆっくり取り除く。

⑦ 作製した半円筒の PAA ゲルをガラス基板ごとディッシュに移し、Mili-Q 水を注ぐ。

⑧ 室温で数日静置する。

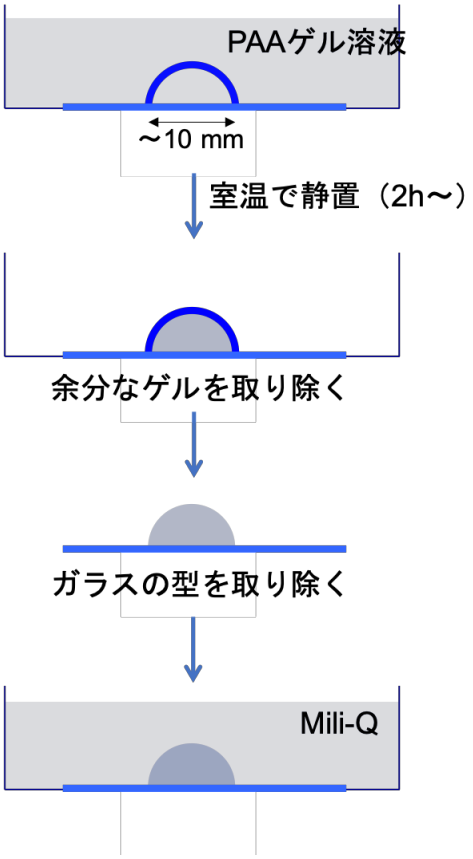


Fig. 5.2 ポリアクリルアミドゲルの作製手順。

生体サンプル

本実験ではサンプルとしてナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）から購入したカタユウレイボヤから解剖によって取り出した未受精卵を用いた。Fig. 5.3 に示すように、カタユウレイボヤは 1 個体内に卵と精子を持ち、卵はコリオンと呼ばれる卵殻に覆われている。AFM 計測のために、解剖によって取り出した卵を酵素処理によって卵殻を除去し、未受精卵を海水で満たしたディッシュ上に物理吸着させた。以下にサンプルの作製手順を示す。

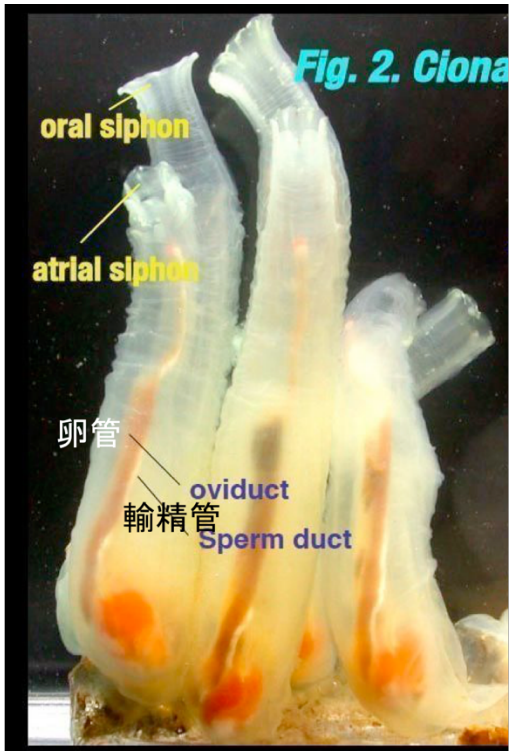


Fig. 5.3 カタユウレイボヤ。(NBRP)

① 卵管は皮膜と筋組織に覆われているため、解剖鋏でこれらを切り開く。

② 卵のみをディッシュ上に取り出す。

③ 卵殻を剥くための酵素液（チオグリコール酸ナトリウム 2 g、アクチナーゼ E 0.1 g、海水 200 ml を混合したもの）10 ml と 1N NaOH 350 μl をガラス試験管内で混合する。

④ 駒込ピペットを用いて、③で混合した液体中に②で取り出した卵を移し、全体に卵が広がるように優しくピペッティングする。

⑤ 試験管を手で握って温めることで、酵素を活性化させる。

⑥ １分置きに数滴をディッシュに移し、卵殻が剥けているか実体顕微鏡を用いてチェックを行う。

⑦ 約半数の卵殻が剥けていることが確認できたら（約 5 分)、手回し遠心機を使い、卵殻と卵を遠心分離する（1 r/s で 5 秒ほど)。

⑧ 駒込ピペットで上澄み液を吸い取り、海水を 10 ml 入れ、ピペッティングを行う。

⑨ ⑦~⑧を数回行った後、実体顕微鏡で卵殻が除去できているか観察を行う。

⑩ 卵殻が剥けていることを確認したら、海水を満たした培養ディッシュ (Iwaki) に駒込ピペットを用いて卵を移す。

⑪ 5 分ほどディッシュを静止しておくと、ディッシュ底面に卵が電気的に物理吸着し、動かなくなる。

5.2.2 実験装置と計測

AFM 計測

本実験では、自作 AFM (3.2.2 節) を用いて、液中で未受精卵と半円筒型 PAA ゲルの高さと弾性率のマッピング計測を行った (Fig. 5.4)。サンプルの高さは、フォースカーブにヘルツモデル式をフィッティングすることで、サンプル表面とカンチレバープローブが接触した位置を算出することにより決定した。AFM によるサンプルの計測領域は、各サンプルに対して、傾斜角度 ＜45° の領域で行なった。

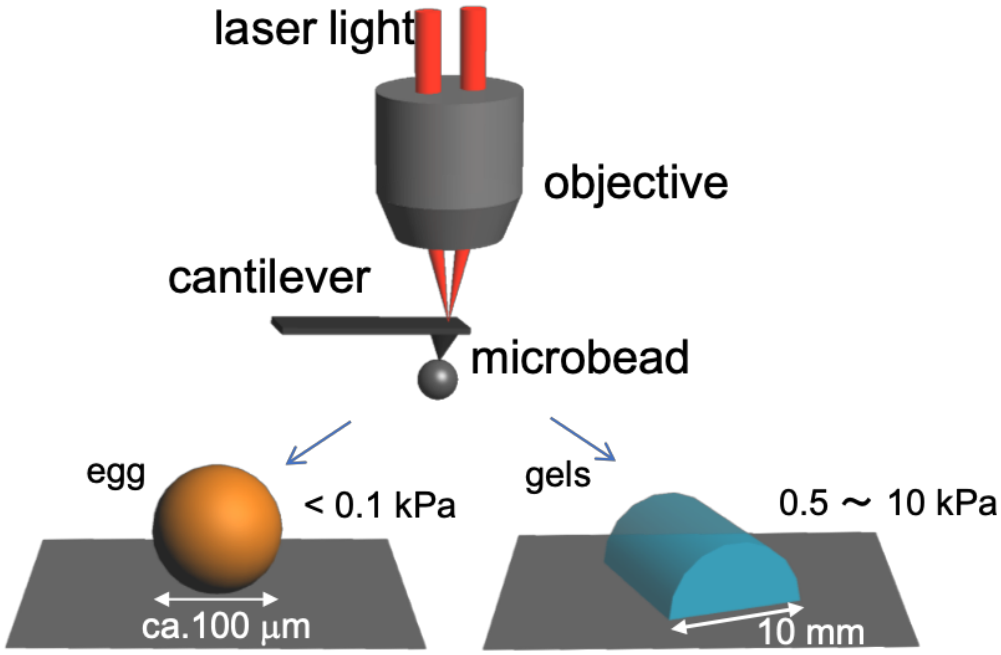


Fig. 5.4 傾斜を持つサンプル（未受精卵、半円筒型ゲル）の AFM 計測の模式図。

5.2.3 表面傾斜角度の決定

サンプル表面の傾斜角度 θ は、サンプル高さ H のマッピング画像を、Igor Pro（WaveMetrics, Lake Oswego, OR）ソフトに組み込まれているフィッティング関数から導出した。サンプル高さ H の分布は水平方向 x と y の連続関数であるから、Igor Pro ソフトにより 2 次元多項式 H にフィッティングし、このフィッティング関数から任意の位置の勾配 $\nabla H = (\mathrm{d}H/\mathrm{d}x, \mathrm{d}H/\mathrm{d}y)$を求め、そこでの傾斜角度$\theta$（$=\arctan|\nabla H|$）を算出した。これにより、計測したマッピング像に対応する傾斜角度θの像を取得した。

5.3　結果と考察

5.3.1 ヘルツモデル解析による弾性率の傾斜角度依存性

Fig. 5.5 に、カタユウレイボヤ未受精卵表面のマッピング計測結果を示す。未受精卵は球体形状のため、表面中心部分をマッピング計測すると、中心高さが最も高く平坦で外側に向かって高さが低く傾斜角度が大きくなる。傾斜角度の異なる位置での典型的なフォースカーブを比較すると、傾斜角度の小さい位置に比べて傾斜角度の大きい位置でフォースカーブがなだらかな形状をしている。それぞれのフォースカーブは、ヘルツモデル式（2.27）に良い一致を示す。したがって、ヘルツモデル解析により得られる見かけの弾性率は、傾斜角度に依存して異なる値が算出されることがわかった。

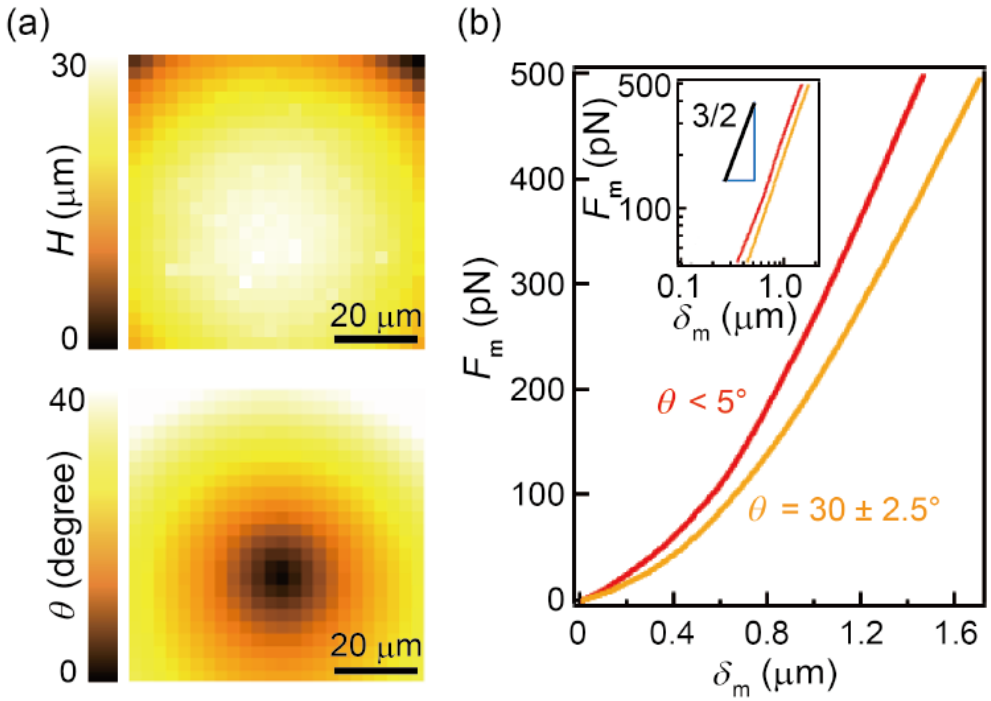


Fig. 5.5 未受精卵のマッピング計測による表面形状とフォースカーブ。(a) 未受精卵の表面高さ分布（H）と傾斜角度分布（θ）。(b) 傾斜角度の異なる位置（θ ＜5° と θ ＝30 ± 2.5°）でのカンチレバーによるサンプル押し込み量δ_mに対する押し込み力 F_m のフォースカーブ。

そこで、次にヘルツモデル解析による見かけの弾性率の傾斜角度に依存した変化の割合を調べた。未受精卵の形状（傾斜角度分布）と弾性率分布計測から、弾性率は、表面の傾斜角度の増加に依存して減少することがわかった（Fig. 5.6 a)。また、サンプルの傾斜方向に対するカンチレバーの向きは、計測した弾性率に影響を及ぼさないことがわかった（Fig. 5.6 b)。つまり、カンチレバーによる押し込み方向以外の方向への力によるカンチレバーの変形は無視できるものとして考えることができる。

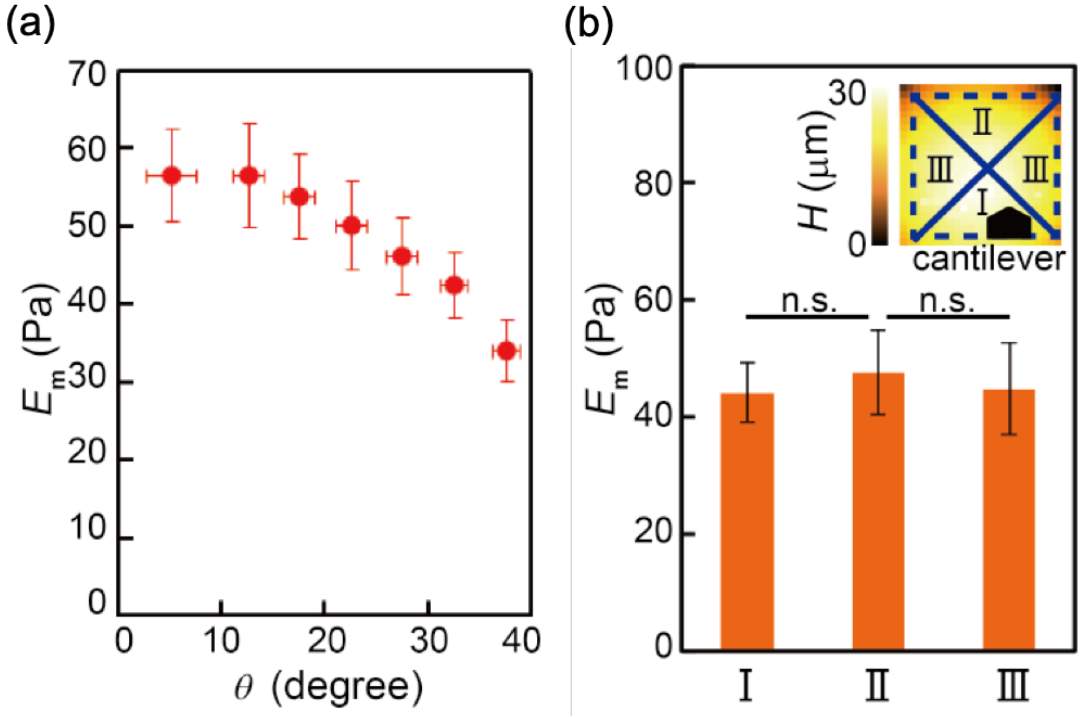


Fig. 5.6 ヘルツモデル解析による弾性率計測に対する傾斜角度依存性。(a) 弾性率とサンプル表面の傾斜角度の関係。(b) サンプル傾斜方向に対するカンチレバーの向きと弾性率値の関係。n.s.：非有意。(有意差検定：Student's *t*-test)。

未受精卵と同様に、PAA ゲルサンプル（約 1 kPa）のヘルツモデル解析による弾性率の傾斜角度依存性を調べた（Fig. 5.7)。その結果、PAA ゲルについても、

未受精卵サンプル（約 50 Pa）と同様の関数形の弾性率の傾斜角度依存性が見られた。

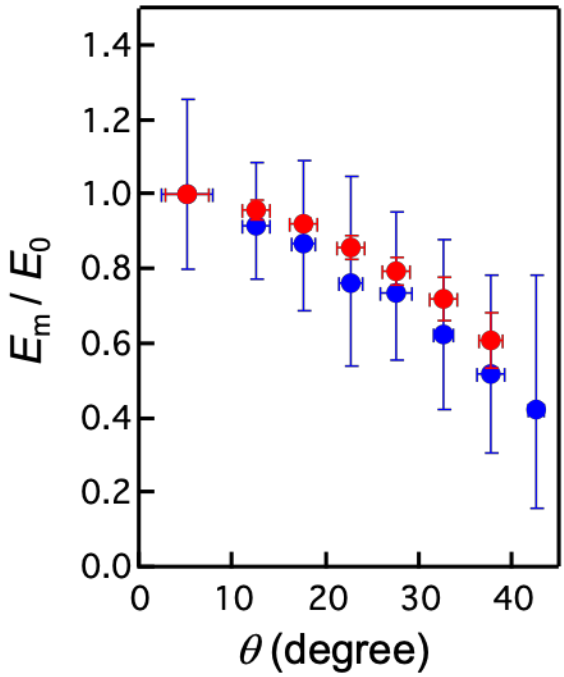


Fig. 5.7 ヘルツモデル解析によるソフトマテリアル（未受精卵：赤、PAA ゲル：青）の弾性率の傾斜角度依存性。

5.3.2 傾斜表面での弾性率の補正方法

サンプル表面に対して垂直方向にカンチレバーがサンプルを押し込む時のヘルツモデル式は、式(5.1)で与えられる。本研究では、Fig. 5.6(b)の結果からカンチレバーは押し込み方向以外の力による変形は無視できること、また非常に柔らかいサンプルであることを考慮して押し込み過程でサンプル表面に対して水平方向にかかる力（摩擦力）を無視することを仮定して、傾斜角度θのサンプル面に対する球形のカンチレバープローブによる押し込みのモデルを考えた(Fig. 5.8)。この模式図に示すように、サンプル表面の変形はヘルツの弾性接触モデルと同様であると考えると、カンチレバープローブによる押し込み力と押し込み

量の計測値（F_m、δ_m）は、傾斜角度 θ を用いてサンプル表面に対する真の押し込み力 F_n（$= F_m/\cos\theta$）と押し込み量δ_n（$= \delta_m \cos\theta$）に補正できる。これらの値をヘルツモデル式(5.1)に代入して解くと、

$$F_m = \frac{4}{3}\frac{\left(E\cos^{5/2}\theta\right)R^{1/2}}{\left(1-\nu^2\right)}\delta_m^{3/2} \tag{5.2}$$

となり、計測値（F_m、δ_m）を用いたサンプルの表面傾斜を考慮した補正ヘルツモデル式が導かれる。ここで R は球形プローブの半径、ν はサンプルのポアソン比（0.5 と仮定）を表している。式(5.2)と式(5.1)の比較から、補正ヘルツモデルの傾斜補正した弾性率 E とヘルツモデルの見かけの弾性率 E_m の関係は、

$$E_m = E\cos^{5/2}\theta \tag{5.3}$$

となる。

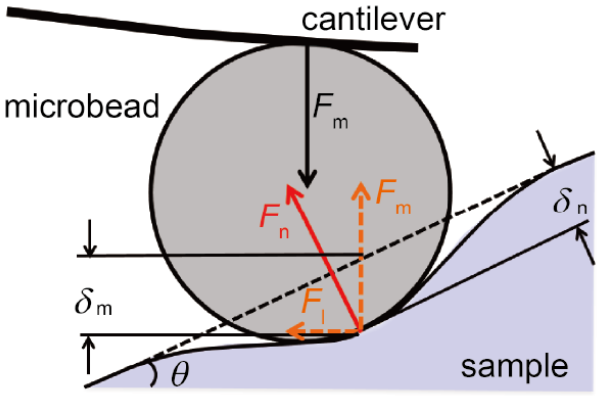


Fig. 5.8 傾斜サンプル表面に対する球形プローブによる押し込みの模式図。

補正ヘルツモデル式(5.3)の傾斜補正した弾性率 E の傾斜角度依存変化と従来のヘルツモデル解析による未受精卵（約 50 Pa）と PAA ゲル（約 1 kPa）の見かけの弾性率 E_m の傾斜角度依存変化は、良い一致を示した（Fig. 5.9 a)。この結果から、未受精卵とゲルの見かけの弾性率 E_m が、傾斜補正ヘルツモデルでサンプル本来の弾性率 E に補正可能であることがわかった。そこで、補正ヘルツ

モデルで校正した未受精卵と PAA ゲル（1 kPa）の弾性率 E は、傾斜角度が 45° 未満で傾斜角度の変化に依存せずに一定の値を示した（Fig. 5.9 b）。一方で、より弾性率の大きい PAA ゲル（6 kPa）では、補正ヘルツモデルによる弾性率は傾斜角度が 40° を超えると低く見積もられ、30 kPa の PAA ゲルでは、弾性率は傾斜角度が 30° を超えると低く見積もられた。これらの結果から、約 1 kPa までのサンプルは、今回提案した補正ヘルツモデルを用いることで、傾斜に依存しないサンプル本来の弾性率計測が可能であることが示唆された。

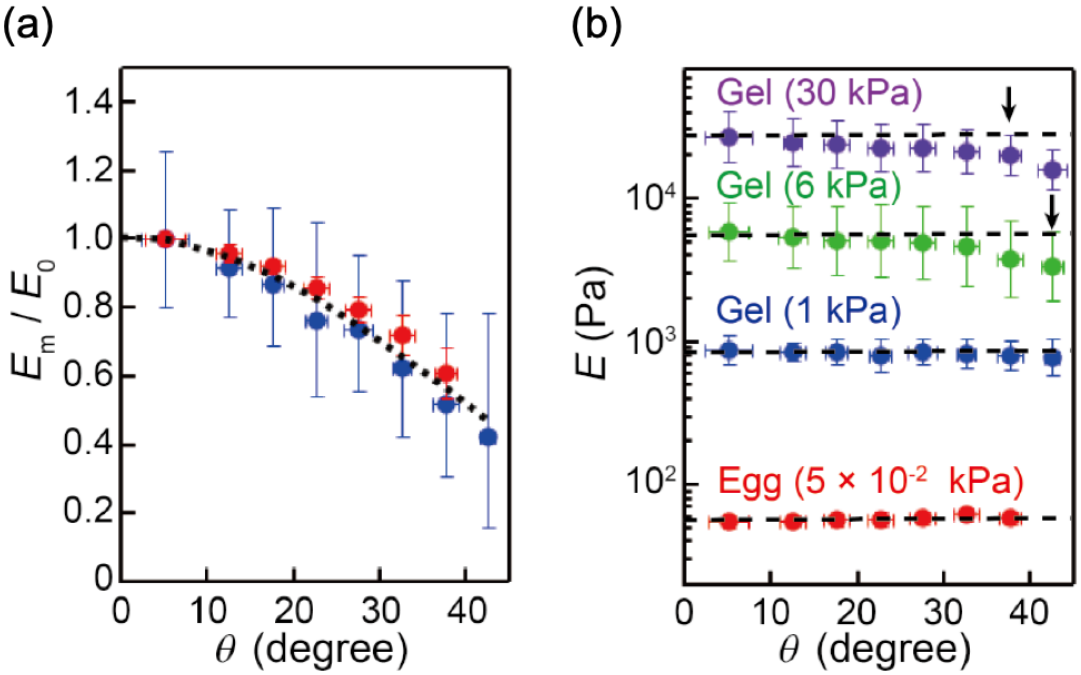


Fig. 5.9 補正したヘルツモデル式による弾性率の傾斜補正。(a) 未受精卵（赤）と 1 kPa PAA ゲル（青）の従来のヘルツモデル解析による弾性率の傾斜角度依存変化と、補正ヘルツモデルの弾性率に対する従来のヘルツモデルの弾性率の比率の傾斜角度依存変化。(b) 補正したヘルツモデル式による未受精卵と PAA ゲルの弾性率の傾斜角度依存性。

5.3.3 考察

多くの生体組織のように立体的で表面傾斜を持つサンプルの AFM による定量的な弾性率計測では、サンプル表面の傾斜に影響されない解析手法が必要で

ある。Fig. 5.10 に示すように、これまで、AFM 計測では、細胞壁と細胞膜のような多層の弾性構造や、細胞膜表面の糖鎖が存在する構造などのサンプル構造を考慮した解析モデルが報告されてきた[78,79]。しかしながら、これらの弾性接触モデルはヘルツモデルと同様に、サンプル表面に対して垂直方向への押し込みを仮定している。そこで、本研究では、ソフトサンプルの傾斜領域の弾性率計測を可能にするため、AFM 計測で得られるサンプル表面形状から傾斜勾配の分布を計算により求め、傾斜角度を考慮したサンプル表面に垂直な方向にかかる力と押し込み量を補正した解析モデルを提案した。この時、押し込み方向以外の力によるカンチレバーの変形とサンプル表面に水平方向にかかるカンチレバープローブとサンプルの間の摩擦などの力は無視した。本実験の結果から、我々の提案した解析モデル式(5.2)によって、弾性率が約 1 kPa 以下の多くの生体組織について、傾斜角度に依存しない弾性率を算出できることを明らかにした。一方で、より弾性率の高いサンプルでは、傾斜角度が大きい領域において傾斜補正ヘルツモデル式で弾性率が補正しきれないことがわかった。したがって、弾性率の高いサンプルの大きい傾斜角度領域の弾性率の定量解析のためには、サンプル表面と水平方向にかかる力（摩擦力）などを考慮した解析モデルの提案が必要となると考えられる。

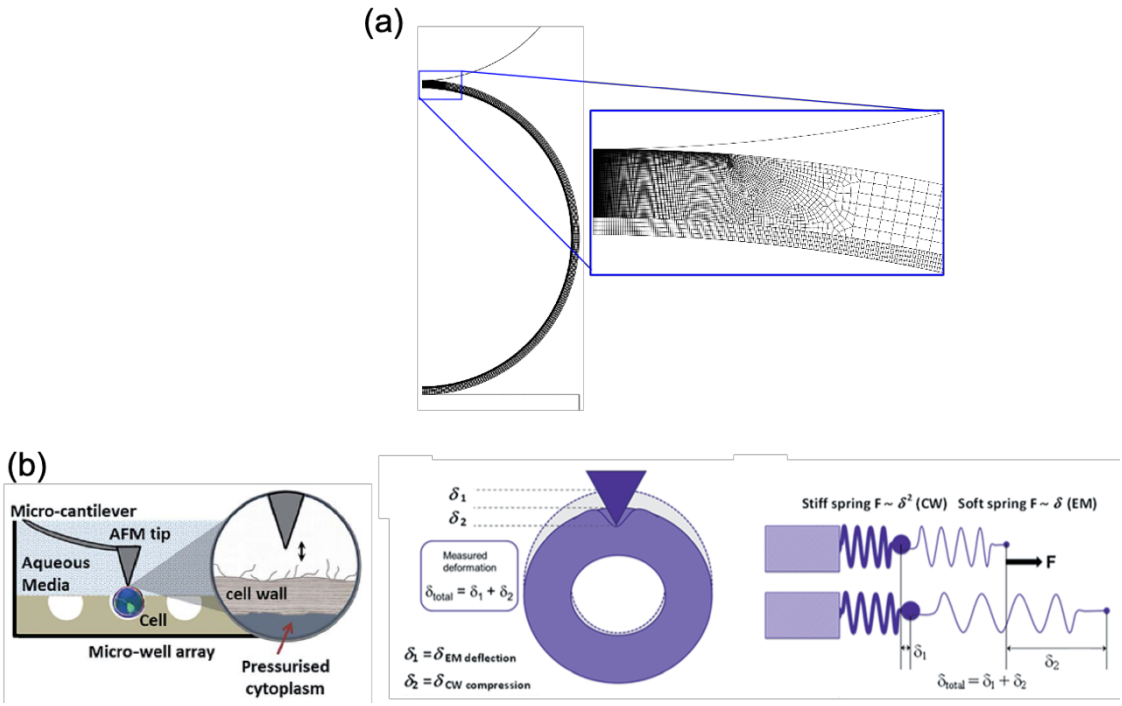


Fig. 5.10 AFM 計測に用いられるヘルツモデル以外の弾性接触モデル[78,79]。(a) 細胞壁を含む多層の弾性構造を持つサンプルの弾性接触モデル[78]。(b) 複数の弾性係数を持つサンプルを仮定した弾性接触モデル[79]。
(Mercade-Prieto, R. et al, *Eur. Biophys. J.*, **2013**, *42*, Supporting Information, 2., Bonilla, M. R. et al, *Soft Matter*., **2015**, *11*, 1283-1284. より引用)

5.3.4 結論

本実験では、AFM 計測における表面粗さの大きなサンプル表面の弾性率の傾斜依存性を調べ、柔らかいサンプルでの傾斜角度に依存しない弾性率の解析が可能な補正したヘルツモデルを提案した。このサンプルの表面傾斜に依存しない弾性率計測手法は、今後様々な立体形状を持つ生体組織サンプルでの定量的な弾性率の空間分布計測に利用できることが期待される。

第6章　　AFM による傾斜角度を持つ生体組織計測

6.1　研究背景および目的

6.1.1 生体組織の力学物性計測

多細胞系の生体組織である胚の発生や組織の形態形成などの生体機能は、組織スケールの変形を伴って進行する。このような生体組織機能は細胞間の生化学的・力学的な相互作用によって制御される。

近年の研究により、1.1.4 節で示したように、発生胚のレーザーアブレーション法による細胞接着部位の張力計測や、光ピンセットを用いた細胞間応力の計測から胚発生時の細胞レベルの力学特性の役割が明らかになりつつある。また、生体組織の組織片の変形による弾性率計測から、組織の状態と弾性率の関係があることがわかってきている。また、組織内の局所的な力学応答物性に関して、近年では、組織内の多細胞の粘弾性挙動が、磁性液滴を胚組織に注入して磁場をかけることで変形させることにより計測されるようになってきた（Fig. 6.1）[80]。

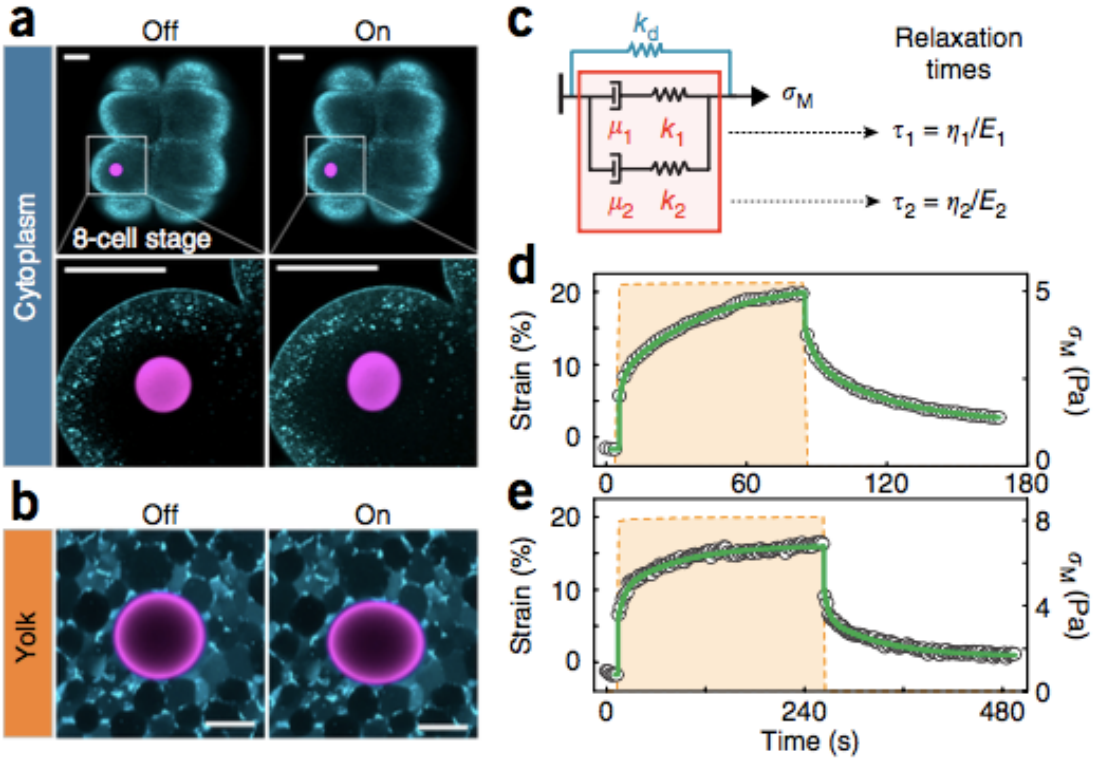


Fig. 6.1 発生胚細胞の粘弾性計測[80]。ゼブラフィッシュ発生胚細胞質中(a)と卵黄中（b）の磁性液滴の変形。(c) 粘弾性挙動計測のためのマクスウェル流体モデル。磁場をかけた時の磁性液滴の長軸方向歪み量（細胞質（d)、卵黄（e))。(Serwane, F. et al, *Nat. Metho*., **2017**, *14*, 184. より引用)

しかしながら、これらの生体組織の力学物性計測は、細胞や組織の構造の破壊や大きな変形を伴うため、侵襲性が高いことが課題であった。また、組織の弾性率計測は、計測領域がプローブ位置に依存するため、組織内の細胞物性の空間的な分布を調べるのは困難であった。そこで、生体組織の弾性率の空間分布を定量的に計測する手法として、第 5 章で提案した傾斜角度に依存しない AFM による弾性率計測法が、適当であると考えた。

6.1.2 目的

本研究では、AFM による単一細胞と多細胞組織のマッピング計測を行い、第

5 章で提案したサンプル表面の傾斜角度を考慮した解析モデルを用いて解析した。この複数の生体サンプルの計測により、提案した解析モデルの適用可能性を調べることを目的とした。さらに、発生胚を連続で弾性率のマッピング計測し、発生胚の弾性率の時空間分布の取得が本手法により可能かどうかを調べた。

6.2　実験方法

6.2.1 生体サンプル作製

上皮培養細胞

単一の培養細胞とジャミングした単層細胞サンプルをそれぞれ作製した。細胞は 3.2.1 に記述した手法で培養し、単一細胞サンプルは、ディッシュに 1.0×10^4 cells/cm^2 で播種し、24 時間培養したものとした。

カタユウレイボヤ発生胚

大きい表面傾斜をもつ立体組織サンプルとして、カタユウレイボヤの発生胚組織（Fig. 6.2）[81]を作製した。カタユウレイボヤは 1 個体内に精子と卵を持っているが、自家受精しないため、2 個体を解剖してそれぞれから精子と卵を取り出して受精を行った。AFM による胚の直接計測のため、卵殻を処理し、16〜32 細胞期の胚を海水で満たしたディッシュの底面に貼り付け、64 細胞期まで発生させた。サンプル作製の手順を以下に示す。

① 受精操作は、ホヤの発生に最適な温度（18℃前後）で行う。まず 2 匹のカタユウレイボヤを用意し、それぞれの個体の卵管と輸性管から卵と精子を別々の 10 cm ディッシュに取り出す。

② 精子の入ったディッシュに約 20 ml 海水を加える。

③ 第 5 章で示した手順で卵の卵殻を処理する。

④ 卵殻を処理した卵が張り付かないようにゼラチンでコートしたディッシュ上に海水を加え、卵殻を処理した卵を撒く。

⑤ 精子の入ったディッシュから海水を駒込ピペットで吸い取り、卵を撒いたディッシュに数滴加えて受精させる。

⑥ 5 分ほど静止した後、顕微鏡で観察して卵が回転していることが確認できれば、受精が完了した合図となる。

⑦ 受精の完了した卵を駒込ピペットで吸い取り、海水を 10 ml 加えた試験管に移して遠心し、上澄みの海水を吸い取って再び海水を 10 ml 加える操作を数回行う。

⑧ 卵の数に応じて、海水を 10 ml ほど加えた複数のゼラチンコートディッシュに、受精卵が密集しないように分けて撒き、18℃に設定したインキュベーターに入れる。

⑨ 3 時間ほど経つとちょうど 32 細胞期まで発生が進行するので、インキュベーターから取り出し、海水を 10 ml ほど加えた 6 cm 培養ディッシュ(Iwaki)に幾つかの胚を撒く。

⑩ 数分後、ディッシュに胚が張り付いたことを光学顕微鏡で観察し、AFM 装置にサンプルを設置して計測を行う。

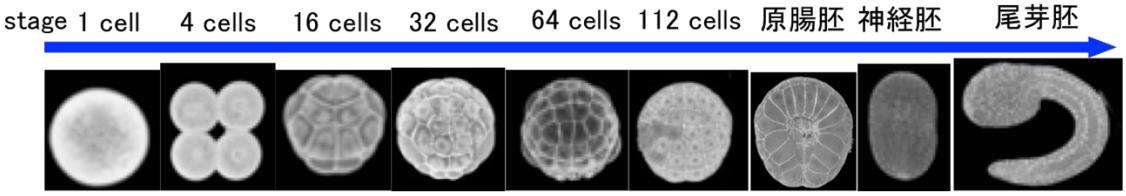


Fig. 6.2 ホヤの初期発生ステージ [81]。
(Hotta, K. et al, *Dev. Dyn.*, **2007**, *236*, 1795. より引用，改変)

6.2.2 実験装置と計測

AFM 計測

Fig.6.3 に示すように、第 3 章の実験で用いたものと同じ自作 AFM を使用し、ホヤ初期胚の弾性率分布を計測した。図のように、ホヤの成育環境である海水中で計測を行った。AFM 計測のため、ホヤ胚はディッシュ底面に軽く張り付いた状態となっている。この時、張り付きによって胚の発生が停止することはなく、光学顕微鏡による観察で Fig. 6.2 の右端に示される尾芽胚期まで発生することが観察できた。

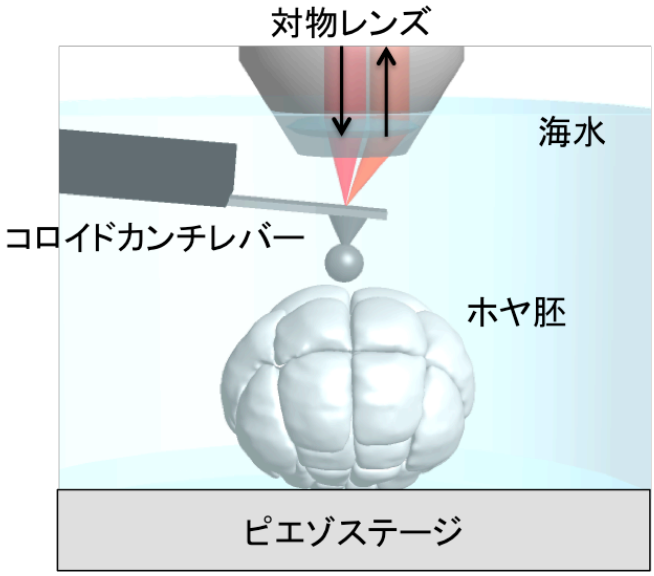


Fig. 6.3 自作 AFM によるホヤ胚計測の模式図。

6.3　結果と考察

6.3.1 生体サンプル弾性率分布の傾斜補正前後の比較

本実験では、単一培養細胞、単層上皮細胞、ホヤ発生胚の AFM 計測を行い、第 5 章で提案した弾性率の傾斜角度依存性の補正によって、従来のヘルツモデルによる見かけの弾性率マッピング像がどのように変化するのかを調べた。Fig. 6.4 に示すように、単一細胞と単層上皮細胞では、傾斜角度補正によって弾性率のマッピング像の見た目はほとんど変化していなかった。一方で、ホヤ発生胚では、傾斜角度が大きい領域で、従来のヘルツモデル解析による見かけの弾性率が、傾斜角度補正によって大きく変化し、同一の細胞内で空間不均一な分布を示していた見かけの弾性率が、傾斜角度補正によって細胞内で均一な弾性率を示した。

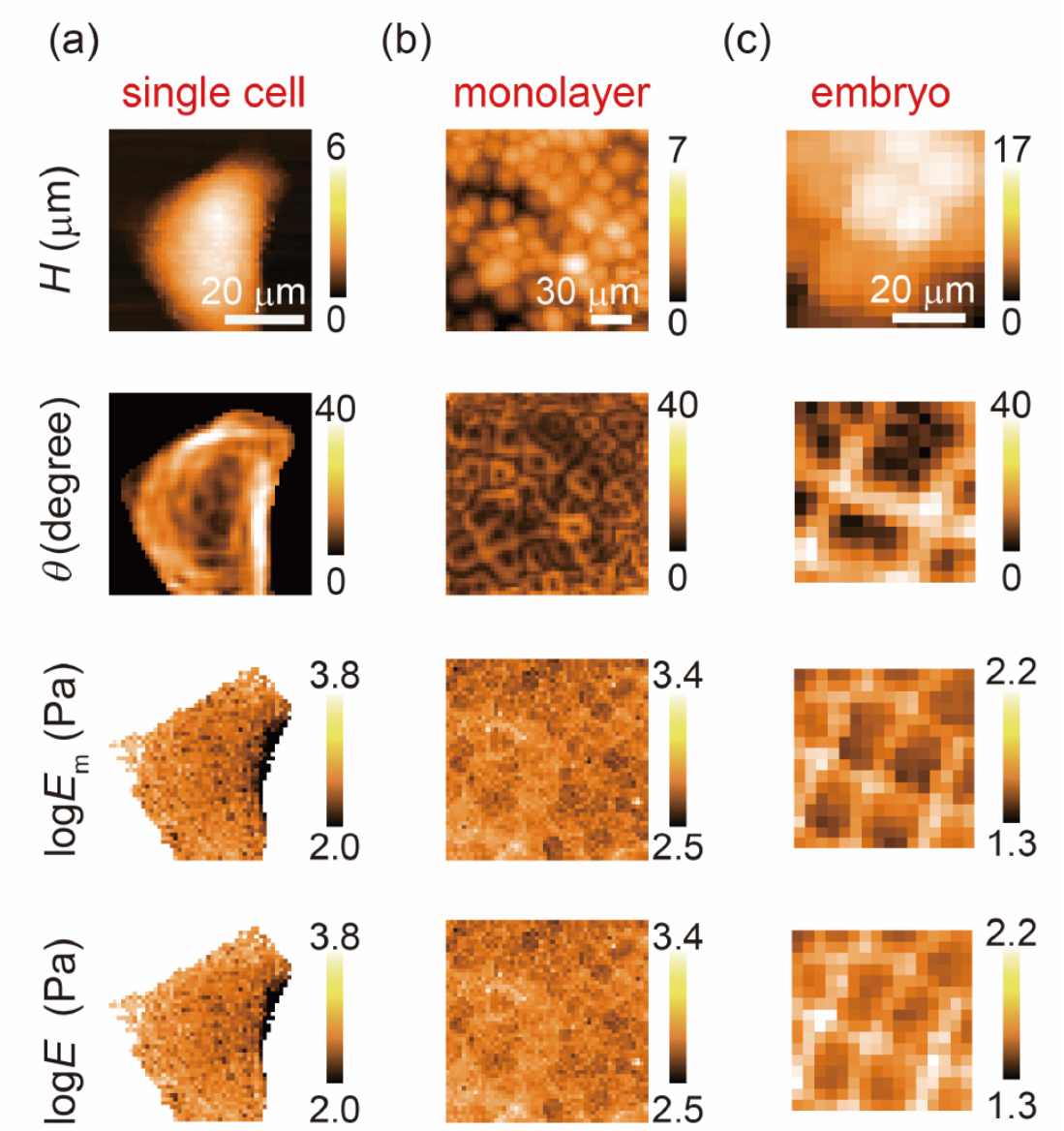


Fig. 6.4 単一 MDCK 細胞(a)、単層 MDCK 細胞(b)、ホヤ発生胚(c)の、高さ H、傾斜角度 θ、ヘルツモデル解析による見かけの弾性率 E_m と傾斜補正モデル解析による弾性率 E のマッピング像。

6.3.2 AFM による生体組織の時空間分布計測

本実験では、44 細胞期から 64 細胞期までの発生過程での連続弾性率マッピング計測した（Fig. 6.5)。その結果、1 回の細胞分裂を含む同一領域の弾性率分布の時間発展像の取得に成功した。傾斜角度補正前の弾性率と補正後の弾性率

を比較すると、一部の傾斜の大きい箇所で明らかに補正によって弾性率が変化していることがわかる。一方で、傾斜角度が 40° を超えている部分や細胞間領域の傾斜が大きい谷になっている部分では、一部弾性率の補正がしきれていない部分も見られる。また、弾性率像から、発生胚組織内の細胞が、細胞分裂に向けて明らかに弾性率が増加し、分裂後に弾性率が減少していることがわかる。

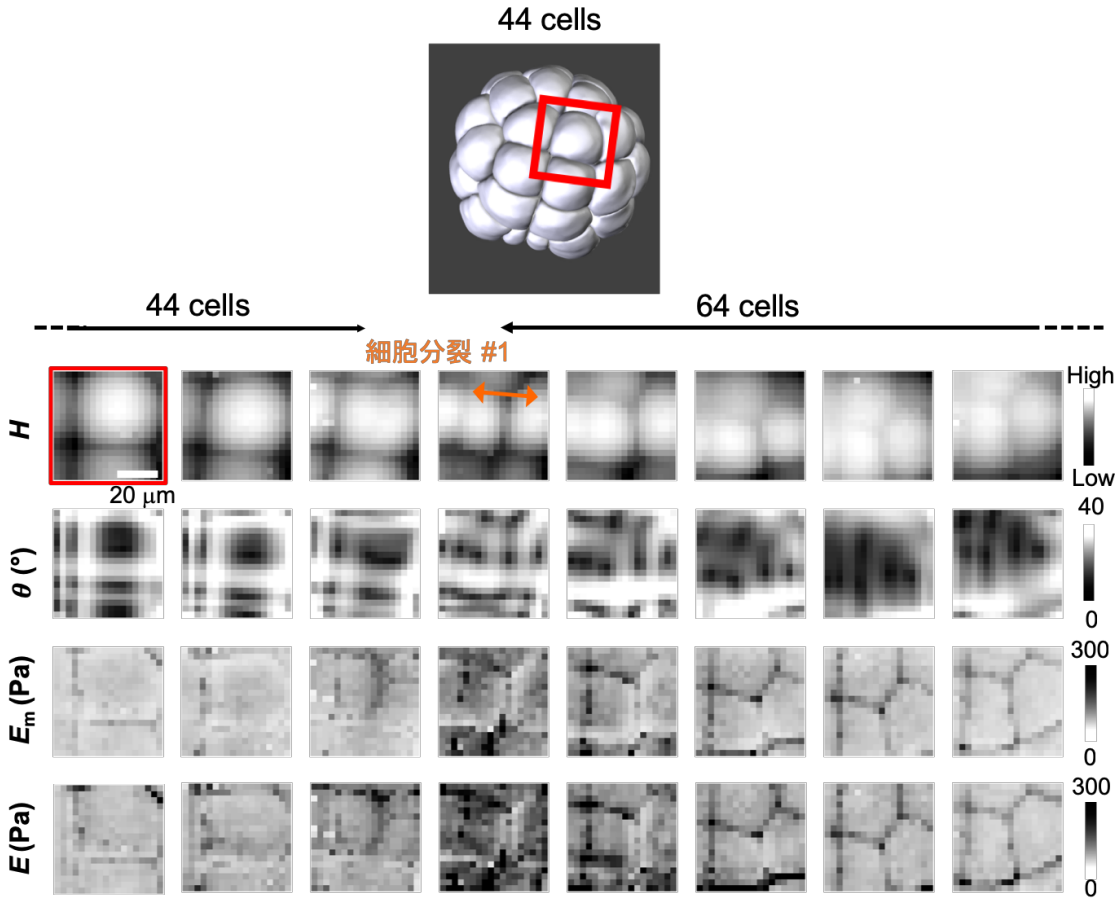


Fig. 6.5 カタユウレイボヤ発生胚の形状像 H と傾斜角度像 θ、傾斜補正前後の弾性率像（E_m, E）の時間発展。44 細胞期から 64 細胞期までの発生胚のマッピング範囲内で 1 度の細胞分裂（#1）が観察できる。傾斜角度の大きい部分で傾斜角度補正によって弾性率が大きく補正されていることがわかる。細胞分裂時に細胞の弾性率が増加し、分裂後に減少している。

6.3.3 考察

これまで、細胞・多細胞組織の AFM 計測による弾性率計測では、サンプル表面に対して垂直な押し込みを仮定したヘルツモデルが用いられてきた。しかしながら、第 5 章で示したように、サンプル表面の粗さによって生じる傾斜部分では、従来のヘルツモデルでは弾性率が低く見積もられて算出されるという問題があった。そこで、単一培養細胞、単層上皮細胞、発生胚の生体サンプルで弾性率のマッピング計測を行い、傾斜角度を用いた弾性率の補正による弾性率分布の変化を調べた。その結果、単一培養細胞と単層上皮細胞は、全体的に平坦な形状であり、傾斜角度による補正を行なう前後で弾性率のマッピング像に大きな変化は見られなかった。一方で、発生胚の表面は傾斜の大きい領域が存在し、傾斜角度による補正を行う前は同一細胞内で見られた弾性率の不均一性が、補正後に細胞内で均一な弾性率分布を示した。これらの結果から、単一培養細胞や単層上皮細胞などの比較的平坦な生体サンプルでは、ヘルツモデル解析による弾性率への傾斜角度の影響は少なく、従来行われてきたこれらのサンプルの弾性率計測の値の妥当性は失われない。一方で、立体的な表面傾斜を持つ生体組織の AFM 計測には、定量的な弾性率分布の算出のために傾斜角度補正モデルの適用が必要であると考えられる。

発生胚の連続弾性率マッピング計測の結果、細胞分裂に同期した細胞弾性率の時空間変化が見られた。この変化は、単一培養細胞で見られる細胞分裂時の弾性率の時間変化と同様の結果であった[82-88]。このことから、単一培養細胞レベルの細胞分裂のメカニクスが多細胞組織内でも維持されていることがわかった。今後は、このような生体組織の弾性率マッピング計測が、組織陥入や形態変化における細胞メカニクスの研究に応用されることが期待できる。

6.3.4 結論

本実験では、単一培養細胞、単層上皮細胞、発生胚サンプルに対して AFM 計測を行い、傾斜角度補正前後の弾性率分布の比較を行った。その結果、立体的な表面粗さを持つ発生胚サンプルでは、傾斜角度補正によって傾斜角度の大きい領域で弾性率が大きく変化したことから、立体的な多細胞組織の AFM 計測には、弾性率の傾斜角度補正が不可欠であることがわかった。また、発生胚の弾性率分布の時間発展計測を行い、生体組織内の細胞物性の時空間的変化を明らかにすることに成功した。このことから、AFM を用いた立体的な組織弾性率分布計測は、生体組織を構成する細胞弾性率の時間発展を生きた状態で計測可能であり、細胞メカニクスと生体組織のメカニクスを結ぶ重要な力学計測手法である。

第7章　　結論

7.1　本研究の結語

本研究では、多細胞系の生体組織における細胞力学特性の空間分布の解明を目的とした。最初に、単層上皮細胞内で弾性率が空間的にどのように分布し、細胞間の力学的相互作用によって空間的な力学特性が維持されているのかを解明するために、(1) 原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、単層上皮細胞の弾性率のマッピング計測を行い、弾性率の空間分布を調べた。次に、立体的な多細胞組織の細胞レベルでの定量的な弾性率分布を計測することを目指して、(2) サンプル表面の傾斜に依存しない AFM による弾性率計測が可能な弾性接触モデルの提案を行った。さらに、この提案したモデルによって、(3) AFM を用いて発生胚表面の弾性率の時空間分布計測を行った。以下に本研究で得られた各章の結論を示す。

第 3 章では、AFM による弾性率のマッピング計測により、単層上皮細胞の弾性率の空間分布特性を調べた。弾性率の空間自己相関関数を用いて弾性率の空間相関長を求めると、ジャミング状態の運動性、細胞分裂が抑制された単層上皮細胞において、細胞中心間距離を超える範囲に弾性率の相関があることを明らかにした。

第 4 章では、アクチンフィラメント骨格阻害と細胞間接着タンパク質阻害における単層上皮細胞の弾性率の空間分布特性を調べた。アクチンフィラメント阻害により、弾性率が低下し、弾性率の空間相関長が細胞直径を大きく下回った。このことから、アクチンフィラメント構造が単層上皮細胞の細胞間に維持される弾性率の起源であることを初めて明らかにした。また、E-カドヘリン細胞間接着タンパク質の阻害により、弾性率の平均値は変化せずにばらつきが増加し、

また弾性率の空間相関長が細胞直径を下回った。このことから、E-カドヘリン接着を介するアクチンフィラメントの細胞間ネットワーク構造が、隣接する細胞間の弾性率の相関を形成していることを明らかにした。

第 5 章では、AFM 計測で用いられるヘルツモデルによる弾性率が、柔らかいサンプル表面の傾きにより変化する押し込み時の傾斜角度にどのように依存して変化するのかを調べ、この傾斜角度を考慮した弾性率の解析モデルを提案した。従来のヘルツモデルで算出した弾性率は、傾斜角度に依存した減少が見られ、この傾向は、傾斜角度を導入してサンプル表面に垂直な力と変形を考慮した補正ヘルツモデル式を導入することで、傾斜角度に依存しない値に校正された。

第 6 章では、発生胚組織の AFM 計測に傾斜角度を考慮した解析モデルを適用し、弾性率の時空間分布測定を行った。発生胚表面の形状は、常に大きく変化しているため、傾斜角度による弾性率の校正の利用価値は高い。この計測により、発生胚において、組織内の細胞分裂過程を含む弾性率分布の時間発展を初めて計測することに成功した。

本研究で行われた、多細胞系の生体組織の弾性率マッピング計測とその解析手法の考案によって、細胞弾性率の多細胞組織内での時空間分布の詳細を明らかにした。単層上皮細胞の弾性率の空間相関性の解明により、基礎的な多細胞系のメカニクスの解明や単層上皮細胞の細胞弾性率も含めたモデリングへの応用が期待される。また、傾斜角度に依存しない生体組織の弾性率計測手法の提案により、立体的な複雑な形状をとる発生胚などの組織を細胞レベルの分解能で弾性率分布を計測可能となったことにより、生体組織形成のメカニクスの解明の発展が期待できる。

7.2　今後の展望

本研究の単層上皮細胞の弾性率計測により、E-カドヘリン接着を介したアクチンフィラメントのネットワーク構造が、細胞間での相互弾性率の調整機能に働くことを明らかにした。しかしながら、単層細胞のジャミング形成と弾性率空間分布の形成との間の関係は不明である。そこで、AFM 計測の高速化やレオロジー計測の導入により、上皮細胞のジャミング過程における動的な力学特性の時空間分布の変化を調べることで、創傷治癒などの生体内における細胞集団運動と安定化のメカニクスの詳細を明らかにすることができると考えられる。

また、傾斜角度を考慮した弾性接触モデルによって表面傾斜を持つ生体組織の弾性率マッピング測定が可能になった。しかし、弾性率が数 k Pa を超えるサンプルでは、傾斜角度の大きい領域の弾性率を補正しきれないことがわかった。そこで、より弾性率の大きい生体組織の傾斜に依存しない弾性率計測を可能にするために、サンプルとプローブの間の摩擦の効果を入れるなどして、より適用範囲を広げた弾性接触モデルの提案が期待される。また、今後は、カタユウレイボヤ以外の生体組織計測に適用することと、また発生胚組織の陥入や組織形態変化などの生体組織機能の発現時に適用することにより、生体組織のメカニクスについての研究をより発展できると考えられる。

参考文献

1. Bao, G., and S. Suresh. 2003. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nat. Mater.* 2:715-725.
2. Wang, N., J. D. Tytell, and D. E. Ingber. 2009. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10:75-82.
3. Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126:677-689.
4. Lo, C.-M. W., H-B. Dembo, M. Wang, Yu-li. 2000. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophys. J.* 79:144-152.
5. Heisenberg, C. P., and Y. Bellaiche. 2013. Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* 153:948-962.
6. Levayer, R., and T. Lecuit. 2012. Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* 22:61-81.
7. Solon, J., I. Levental, K. Sengupta, P. C. Georges, and P. A. Janmey. 2007. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93:4453-4461.
8. Califano, J. P., and C. A. Reinhart-King. 2010. Substrate Stiffness and Cell Area Predict Cellular Traction Stresses in Single Cells and Cells in Contact. *Cell Mol Bioeng* 3:68-75.
9. Kraning-Rush, C. M., J. P. Califano, and C. A. Reinhart-King. 2012. Cellular traction stresses increase with increasing metastatic potential. *PLoS One* 7:e32572.
10. Lekka, M., D. Gil, K. Pogoda, J. Dulinska-Litewka, R. Jach, J. Gostek, O. Klymenko, S. Prauzner-Bechcicki, Z. Stachura, J. Wiltowska-Zuber, K. Okon, and P. Laidler. 2012. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch. Biochem. Biophys.* 518:151-156.
11. Brugués, A., E. Anon, V. Conte, J. H. Veldhuis, M. Gupta, J. Colombelli, J. J. Muñoz, G. W. Brodland, B. Ladoux, and X. Trepat. 2014. Forces driving epithelial wound healing. *Nat. Phys.* 10:683-690.
12. Yamaguchi, N., T. Mizutani, K. Kawabata, and H. Haga. 2015. Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin beta1 and PI3K. *Sci. Rep.* 5:7656.
13. Tambe, D. T., C. C. Hardin, T. E. Angelini, K. Rajendran, C. Y. Park, X. Serra-Picamal, E. H. Zhou, M. H. Zaman, J. P. Butler, D. A. Weitz, J. J. Fredberg, and X. Trepat. 2011. Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nat. Mater.* 10:469-475.
14. Bi, D. P., J. H. Lopez, J. M. Schwarz, and M. L. Manning. 2015. A density-independent

rigidity transition in biological tissues. *Nat. Phys.* 11:1074-1079.

15. Park, J. A., J. H. Kim, D. P. Bi, J. A. Mitchel, N. T. Qazvini, K. Tantisira, C. Y. Park, M. McGill, S. H. Kim, B. Gweon, J. Notbohm, R. Steward, S. Burger, S. H. Randell, A. T. Kho, D. T. Tambe, C. Hardin, S. A. Shore, E. Israel, D. A. Weitz, D. J. Tschumperlin, E. P. Henske, S. T. Weiss, M. L. Manning, J. P. Butler, J. M. Drazen, and J. J. Fredberg. 2015. Unjamming and cell shape in the asthmatic airway epithelium. *Nat. Mater.* 14:1040-1048.
16. Bi, D. P., X. B. Yang, M. C. Marchetti, and M. L. Manning. 2016. Motility-Driven Glass and Jamming Transitions in Biological Tissues. *Phys Rev X* 6.
17. Atia, L., D. P. Bi, Y. Sharma, J. A. Mitchel, B. Gweon, S. A. Koehler, S. J. DeCamp, B. Lan, J. H. Kim, R. Hirsch, A. F. Pegoraro, K. H. Lee, J. R. Starr, D. A. Weitz, A. C. Martin, J. A. Park, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. 2018. Geometric constraints during epithelial jamming. *Nat. Phys.* 14:613-+.
18. Bambardekar, K., R. Clement, O. Blanc, C. Chardes, and P. F. Lenne. 2015. Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:1416-1421.
19. Farhadifar, R., J. C. Roper, B. Aigouy, S. Eaton, and F. Julicher. 2007. The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Curr. Biol.* 17:2095-2104.
20. Campinho, P., M. Behrndt, J. Ranft, T. Risler, N. Minc, and C. P. Heisenberg. 2013. Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly. *Nat. Cell Biol.* 15:1405-1414.
21. Arnold, T. R., J. H. Shawky, R. E. Stephenson, K. M. Dinshaw, T. Higashi, F. Huq, L. A. Davidson, and A. L. Miller. 2019. Anillin regulates epithelial cell mechanics by structuring the medial-apical actomyosin network. *eLife* 8.
22. Lim, C. T., E. H. Zhou, and S. T. Quek. 2006. Mechanical models for living cells - A review. *J. Biomech.* 39:195-216.
23. Sato, M., M. J. Levesque, and R. M. Nerem. 1987. An application of the micropipette technique to the measurement of the mechanical properties of cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Biomech. Eng.* 109:27-34.
24. Trickey, W. R., F. P. Baaijens, T. A. Laursen, L. G. Alexopoulos, and F. Guilak. 2006. Determination of the Poisson's ratio of the cell: recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration. *J. Biomech.* 39:78-87.
25. Henon, S., G. Lenormand, A. Richert, and F. Gallet. 1999. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* 76:1145-1151.

26. Dao, M., C. T. Lim, and S. Suresh. 2003. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *J Mech Phys Solids* 51:2259-2280.
27. Fabry, B., G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, and J. J. Fredberg. 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.* 87:148102.
28. Fabry, B., G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet, and J. J. Fredberg. 2003. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 68:041914.
29. Park, C. Y., D. Tambe, A. M. Alencar, X. Trepat, E. H. Zhou, E. Millet, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. 2010. Mapping the cytoskeletal prestress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C1245-1252.
30. Binnig, G., C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933.
31. L. Wilson, P. T. M., B. P. Jena, and J. H. Horber. 2002. Atomic force microscopy in cell biology. *New York: Academic Press* 68.
32. V. J. Morris, A. R. K., and A. P. Gunning. 2009. Atomic force microscopy for biologists. 2nd ed. *Imperial College Press*.
33. Heidemann, S. R., S. Kaech, R. E. Buxbaum, and A. Matus. 1999. Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *J. Cell Biol.* 145:109-122.
34. Bernal, R., P. A. Pullarkat, and F. Melo. 2007. Mechanical properties of axons. *Phys. Rev. Lett.* 99:018301.
35. Domke, J., S. Dannöhl, W. J. Parak, O. Müller, W. K. Aicher, and M. Radmacher. 2000. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 19:367-379.
36. Rotsch, C., and M. Radmacher. 2000. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 78:520-535.
37. Cai, P., Y. Mizutani, M. Tsuchiya, J. M. Maloney, B. Fabry, K. J. Van Vliet, and T. Okajima. 2013. Quantifying Cell-to-Cell Variation in Power-Law Rheology. *Biophys. J.* 105:1093-1102.
38. Cai, P., R. Takahashi, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka, J. M. Maloney, K. J. Van Vliet, and T. Okajima. 2017. Temporal Variation in Single-Cell Power-Law Rheology Spans the Ensemble Variation of Cell Population. *Biophys. J.* 113:671-678.

39. Garcia, S., E. Hannezo, J. Elgeti, J. F. Joanny, P. Silberzan, and N. S. Gov. 2015. Physics of active jamming during collective cellular motion in a monolayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:15314-15319.
40. Zamir, E. A., V. Srinivasan, R. Perucchio, and L. A. Taber. 2003. Mechanical asymmetry in the embryonic chick heart during looping. *Ann. Biomed. Eng.* 31:1327-1336.
41. Marmottant, P., A. Mgharbel, J. Kafer, B. Audren, J. P. Rieu, J. C. Vial, B. van der Sanden, A. F. Maree, F. Graner, and H. Delanoe-Ayari. 2009. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:17271-17275.
42. A-Hassan, E., W. F. Heinz, M. D. Antonik, N. P. D'Costa, S. Nageswaran, C. A. Schoenenberger, and J. H. Hoh. 1998. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 74:1564-1578.
43. Alexander, S., L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire, and J. Gurley. 1989. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *Journal of Applied Physics* 65:164.
44. Radmacher, M., M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland, and P. K. Hansma. 1996. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 70:556-567.
45. Landau, L. D., E. M. Lifshit͡s, A. M. Kosevich, and L. P. Pitaevskiĭ. 1986. Theory of elasticity. Pergamon Press, Oxford Oxfordshire ; New York.
46. Sneddon, I. N. 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Engng Sci* 3:47-57.
47. Butt, H.-J., B. Cappella, and M. Kappl. 2005. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.* 59:1-152.
48. Hutter, J. L., and J. Bechhoefer. 1993. Erratum: ‘‘Calibration of atomic-force microscope tips’’ [Rev. Sci. Instrum. 64, 1868 (1993)]. *Rev. Sci. Instrum.* 64:3342.
49. Butt, H. J., and M. Jaschke. 1995. Calculation of Thermal Noise in Atomic-Force Microscopy. *Nanotechnology* 6:1-7.
50. Massiera, G., K. M. Van Citters, P. L. Biancaniello, and J. C. Crocker. 2007. Mechanics of single cells: rheology, time dependence, and fluctuations. *Biophys. J.* 93:3703-3713.
51. Tee, S. Y., J. P. Fu, C. S. Chen, and P. A. Janmey. 2011. Cell Shape and Substrate Rigidity Both Regulate Cell Stiffness. *Biophys. J.* 100:L25-L27.
52. Hoh, J. H., and C. A. Schoenenberger. 1994. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* 107:1105-1114.

53. Dimitriadis, E. K., F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, and R. S. Chadwick. 2002. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys. J.* 82:2798-2810.
54. Szabó, B., G. J. Szöllösi, B. Gönci, Z. Juranyi, D. Selmeczi, and T. Vicsek. 2006. Phase transition in the collective migration of tissue cells: experiment and model. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 74:061908.
55. Angelini, T. E., E. Hannezo, X. Trepat, M. Marquez, J. J. Fredberg, and D. A. Weitz. 2011. Glass-like dynamics of collective cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:4714-4719.
56. Puliafito, A., L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson, and B. I. Shraiman. 2012. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:739-744.
57. Hardin, C., K. Rajendran, G. Manomohan, D. T. Tambe, J. P. Butler, J. J. Fredberg, R. Martinelli, C. V. Carman, and R. Krishnan. 2013. Glassy dynamics, cell mechanics, and endothelial permeability. *J. Phys. Chem. B* 117:12850-12856.
58. le Duc, Q., Q. M. Shi, I. Blonk, A. Sonnenberg, N. Wang, D. Leckband, and J. de Rooij. 2010. Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner (vol 189, pg 1107, 2010). *J. Cell Biol.* 191:891-891.
59. Bazellières, E., V. Conte, A. Elosegui-Artola, X. Serra-Picamal, M. Bintanel-Morcillo, P. Roca-Cusachs, J. J. Muñoz, M. Sales-Pardo, R. Guimerà, and X. Trepat. 2015. Control of cell-cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome. *Nat. Cell Biol.* 17:409-420.
60. Lecuit, T., and P. F. Lenne. 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:633-644.
61. Ladoux, B., and R. M. Mège. 2017. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 18:743-757.
62. Halbleib, J. M., and W. J. Nelson. 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20:3199-3214.
63. Lecuit, T., P. F. Lenne, and E. Munro. 2011. Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:157-184.
64. Maître, J. L., H. Berthoumieux, S. F. G. Krens, G. Salbreux, F. Jülicher, E. Paluch, and C. P. Heisenberg. 2012. Adhesion Functions in Cell Sorting by Mechanically Coupling the Cortices of Adhering Cells. *Science* 338:253-256.
65. Mertz, A. F., Y. Che, S. Banerjee, J. M. Goldstein, K. A. Rosowski, S. F. Revilla, C. M.

Niessen, M. C. Marchetti, E. R. Dufresne, and V. Horsley. 2013. Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:842-847.

66. Ng, M. R., A. Besser, J. S. Brugge, and G. Danuser. 2014. Mapping the dynamics of force transduction at cell-cell junctions of epithelial clusters. *eLife* 3:e03282.
67. Rothen-Rutishauser, B., F. K. Riesen, A. Braun, M. Günthert, and H. Wunderli-Allenspach. 2002. Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J. Membr. Biol.* 188:151-162.
68. Ivanov, A. I., A. Nusrat, and C. A. Parkos. 2004. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol. Biol. Cell* 15:176-188.
69. Kelly, G. M., J. I. Kilpatrick, M. H. van Es, P. P. Weafer, P. J. Prendergast, and S. P. Jarvis. 2011. Bone cell elasticity and morphology changes during the cell cycle. *J. Biomech.* 44:1484-1490.
70. Lekka, M., P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, and A. Z. Hrynkiewicz. 1999. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.* 28:312-316.
71. Cross, S. E., Y. S. Jin, J. Rao, and J. K. Gimzewski. 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology* 2:780-783.
72. Rotsch, C., K. Jacobson, and M. Radmacher. 1999. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:921-926.
73. Haga, H., S. Sasaki, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki, and T. Sambongi. 2000. Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton. *Ultramicroscopy* 82:253-258.
74. Radmacher, M. 2002. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods Cell Biol.* 68:67-90.
75. Mizutani, Y., M. Tsuchiya, S. Hiratsuka, K. Kawahara, H. Tokumot, and T. Okajima. 2008. Elasticity of living cells on a microarray during the early stages of adhesion measured by atomic force microscopy. *Jpn. J. Appl. Phys.* 47:6177-6180.
76. Schillers, H., C. Rianna, J. Schape, T. Luque, H. Doschke, M. Walte, J. J. Uriarte, N. Campillo, G. P. A. Michanetzis, J. Bobrowska, A. Dumitru, E. T. Herruzo, S. Bovio, P. Parot, M. Galluzzi, A. Podesta, L. Puricelli, S. Scheuring, Y. Missirlis, R. Garcia, M. Odorico, J. M. Teulon, F. Lafont, M. Lekka, F. Rico, A. Rigato, J. L. Pellequer, H. Oberleithner, D. Navajas, and M. Radmacher. 2017. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological

Samples. *Sci. Rep.* 7:5117.

77. Jiao, Y., and T. E. Schäffer. 2004. Accurate Height and Volume Measurements on Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* 20:8.

78. Mercade-Prieto, R., C. R. Thomas, and Z. Zhang. 2013. Mechanical double layer model for Saccharomyces cerevisiae cell wall. *Eur. Biophys. J.* 42:613-620.

79. Bonilla, M. R., J. R. Stokes, M. J. Gidley, and G. E. Yakubov. 2015. Interpreting atomic force microscopy nanoindentation of hierarchical biological materials using multi-regime analysis. *Soft matter* 11:1281-1292.

80. Serwane, F., A. Mongera, P. Rowghanian, D. A. Kealhofer, A. A. Lucio, Z. M. Hockenbery, and O. Campas. 2017. In vivo quantification of spatially varying mechanical properties in developing tissues. *Nature Methods* 14:181-186.

81. Hotta, K., K. Mitsuhara, H. Takahashi, K. Inaba, K. Oka, T. Gojobori, and K. Ikeo. 2007. A web-based interactive developmental table for the ascidian Ciona intestinalis, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. *Dev. Dyn.* 236:1790-1805.

82. Matzke, R., K. Jacobson, and M. Radmacher. 2001. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat. Cell Biol.* 3:607-610.

83. Stewart, M. P., J. Helenius, Y. Toyoda, S. P. Ramanathan, D. J. Muller, and A. A. Hyman. 2011. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 469:226-230.

84. Salbreux, G., G. Charras, and E. Paluch. 2012. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 22:536-545.

85. Lancaster, O. M., M. Le Berre, A. Dimitracopoulos, D. Bonazzi, E. Zlotek-Zlotkiewicz, R. Picone, T. Duke, M. Piel, and B. Baum. 2013. Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Dev. Cell* 25:270-283.

86. Fischer-Friedrich, E., A. A. Hyman, F. Julicher, D. J. Muller, and J. Helenius. 2014. Quantification of surface tension and internal pressure generated by single mitotic cells. *Sci. Rep.* 4:6213.

87. Ramanathan, S. P., J. Helenius, M. P. Stewart, C. J. Cattin, A. A. Hyman, and D. J. Muller. 2015. Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement. *Nat. Cell Biol.* 17:148-159.

88. Sorce, B., C. Escobedo, Y. Toyoda, M. P. Stewart, C. J. Cattin, R. Newton, I. Banerjee, A. Stettler, B. Roska, S. Eaton, A. A. Hyman, A. Hierlemann, and D. J. Muller. 2015. Mitotic cells contract actomyosin cortex and generate pressure to round against or escape epithelial confinement. *Nat. Commun.* 6:8872.

謝辞

本研究は 2016 年 4 月より 2019 年 9 月にかけて、北海道大学大学院情報科学研究科細胞生物工学研究室において行われました。

本研究室、岡嶋孝治教授には、本研究を行うにあたり、装置開発の方針や研究の進め方の議論、学会および論文発表などのあらゆる面で、懇切なご指導、ご鞭撻をいただきましたこと、心より感謝いたします。

北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野、藤田恭之教授、梶田美穂子助教（現東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野　日本学術振興会特別研究員（RPD））には、本研究を行うにあたり、E-カドヘリンノックダウン MDCK 細胞サンプルのご提供、また研究方針に対してご助言をいただきましたこと、心より感謝いたします。

北海道大学新渡戸スクールの繁富香織特任准教授には、学会および論文発表、また本論文をまとめるにあたり、ご助言をいただきましたこと、心より感謝いたします。

細胞生物工学研究室の皆様方には、本研究を行うにあたり、多くの面でご助言、ご助力をいただき、本論文を執筆することができましたこと、心より感謝いたします。

最後に、本研究に携わって頂いた皆様の、多岐にわたる今後のご活躍をお祈りし、謝辞とさせていただきます。

引用許諾

第 3 章―第 4 章の著者が筆頭著者として投稿した論文の図は、Biophysical Society.から引用許諾（Account # : 3001486351）を得て引用した。第 5 章―第 6 章の著者が筆頭著者として投稿した論文の図は、引用許諾を必要としない AIP Advances.から引用した。

研究業績

1. 主著学術論文（本論文に直接関係の論文）

（1） Y. Fujii, T. Okajima, Calibrating the Young's modulus of soft materials with surface tilt angle measured by atomic force microscopy, AIP Advances 9, 015028 (2019).

（2） Y. Fujii, Y. Ochi, M. Tsuchiya, M. Kajita, Y. Fujita, Y. Ishimoto, T. Okajima, Spontaneous spatial correlation of elastic modulus in jammed epithelial monolayers observed by AFM, Biophysical Journal 116, 1152-1158 (2019).

2. その他の論文

2.1 主著論文

（1） M. Tanaka#, Y. Fujii#, K. Hirano, T. Higaki, A. Nagasaki, R. Ishikawa, T. Okajima, K. Katoh (# equal contribution), Fascin in lamellipodia contributes to cell elasticity by controlling the orientation of filamentous actin, Genes to Cells (2019).

2.2 共著論文

（1） A. Tanaka, Y. Fujii, N. Kasai, T. Okajima, H. Nakashima, Regulation of Neuritogenesis in Hippocampal Neurons using Stiffness of Extracellular Microenvironment. PLOS ONE 13, e0191928(2018)

3. 国際学会発表

（１） Y. Fujii and T. Okajima, Mapping cell stiffness of living embryo during the developmental process by atomic force microscopy, *ACSIN-14&ICSPM26*, Sendai, (2018).

（２） Y.Fujii, T. Imai, W. Koizumi, K. Hotta, K. Oka, T.Okajima, Spatiotemporal change in cell stiffness during early embryogenesis investigated by atomic force microscopy, *62nd Annual Meeting Biophysical Society*, California, (2018).

（３） Y.Fujii and T.Okajima, Quantifying elastic modulus of soft samples with tilting angle by atomic force microscopy, *ICSPM25*, Atagawa, (2017).

（４） Y. Fujii and T. Okajima, Spatial mechanical heterogeneity in epithelial cell sheet : an atomic force microscopy study, *Mechanobiology of Disease*, Singapore, (2016).

（５） Y. Fujii, W. Koizumi, K. Hotta, K. Oka, T. Okajima, Quantifying local elastic modulus of living embryo by atomic force microscopy, *ICSPM23*, Niseko, (2015).

（６） Y. Fujii, W. Koizumi, K. Hotta, T. Okajima, Spatial-Temporal Oscillation in Elastic Modulus of Embryo during the Early Development, *SFS2015*, Kyoto, (2015).

4. 国内学会発表

（１） 藤井 裕紀、今井 太一、小泉 航、堀田 耕司、岡 浩太郎、岡嶋 孝治、原子間力顕微鏡による発生胚の弾性率のタイムラプス測定、 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会、（2018）

（2） 藤井 裕紀、今井 太一、小泉 航、堀田 耕司、岡 浩太郎、岡嶋 孝治、初期胚発生過程における細胞弾性率と細胞骨格構造の時空間変動、第 55 回日本生物物理学会大会、（2017）

（3） 藤井 裕紀、小泉 航、今井 太一、堀田 耕司、岡 浩太郎、岡嶋 孝治、原子間力顕微鏡による初期発生胚の弾性率のタイムラプスイメージング、 第 54 回日本生物物理学会大会、 （2016）

（4） 藤井 裕紀、小泉 航、堀田 耕司、岡 浩太郎、岡嶋 孝治、原子間力顕微鏡によるホヤ初期発生胚の弾性率の時空間測定、 第 53 回生物物理学会、 （2015）

（5） 藤井 裕紀、越智 勇貴、梶田 美穂子、藤田 恭之、岡嶋 孝治、単層上皮細胞における細胞弾性率の空間不均一構造、 第 67 回細胞生物学会、 （2015）

（6） 藤井 裕紀、越智 勇貴、岡嶋 孝治、単層上皮細胞シートの複素弾性率の空間分布：原子間力顕微鏡測定、 第 52 回日本生物物理学会年会、（2014）

（7） 藤井 裕紀、越智 勇貴、岡嶋 孝治、原子間力顕微鏡による単層上皮細胞の粘弾性の空間不均一性、 第 66 回日本細胞生物学会、 （2014）

5. その他

特許

（1） 田中 あや、手島 哲彦、中島 寛、岡嶋 孝治、藤井 裕紀、「細胞足場材料、細胞モデル、及び細胞足場材料の製造方法」、 特願 2017-032733 、（2017 年 2 月 23 日）

賞罰

（1） 2016 年　日本生物物理学会学生発表賞 「原子間力顕微鏡による初期発生胚の弾性率のタイムラプスイメージング」（共著者：小泉 航、今井 太一、堀田 耕司、岡 浩太郎、岡嶋 孝治）

（2） 2015 年 International Symposium on Fluctuation and Structure Out of Equilibrium 2015 (SFS2015) Best Poster Award for Young Researcher “Spatial-Temporal Oscillation in Elastic Modulus of Embryo during the Early Development”

外部資金獲得状況（研究代表者として獲得したもの）

（1） 日本学術振興会特別研究員（DC2, 17J01389）、 「原子間力顕微鏡による発生胚メカニクスの時空間挙動の研究」、 2017 年度から 2 年間、 研究経費：¥1,700,000