

博士論文

細胞局所強度計測法による細胞 - 基質間接着の
物理的性質の解析

三好 秀明

2010年8月19日

奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科 情報生命科学専攻

三好秀明

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に
士(理学) 授与の要件として提出した博士論文である。

審査委員：

湊 小太郎 教授 (主指導教員)

箱島 敏雄 教授 (副指導教員)

杉浦 忠男 准教授 (副指導教員)

細胞局所強度計測法による細胞 - 基質間接着の 物理的性質の解析

三好秀明

内容梗概

様々な細胞機能に関わる細胞 - 基質間接着のメカニズムについて、物理的視点による実験的な研究を行った。本論文は、その細胞接着の物理的な性質の計測システムの開発とそのシステムによる細胞 - 基質間接着の物理的性質評価の結果をまとめたものである。論文は、序論と5章からなる本文と総括から構成されている。以下に各章ごとの内容を要約する。

第1章では、細胞 - 基質間接着の構造および物理的な機能について述べ、接着構造1個レベルの細胞膜局所的な物理性質計測手法について、先行研究、現状、そして問題点について言及した。

第2章では、1章で指摘した細胞局所的な物理性質計測法の現状の問題点を踏まえた、新しい計測法について述べる。本研究で開発した計測手法は、光の放射圧による顕微鏡下での微小物体操作と力計測を基盤技術としており、1つの接着構造レベルでその物理特性を決定でき、かつその性質の時間的な変化を計測可能な2つの計測モードが存在することを示した。

第3章では、本研究で開発した手法を用いて、細胞 - 基質間接着の物理的性質について評価した。まず、その接着の形成時間による物理的性質がどのように変化するか計測した結果、形成開始20分間で急速に物理的な安定性を確立する細胞接着形成の性質を観測することができ、さらにそれは細胞外からの物理的な力印加により促進されることが分かった。また、計測される物理的性質は、アクトミオシン相互作用により発生する力ではなく、細胞膜や接着の構造を支えている構造体としての

アクチンフィラメントにより影響を受けていることを明らかにした。

第4章では、細胞 - 基質間接着の物理性質の時間変化を解析した結果を示す。細胞接着形成初期段階ではダイナミックにその性質が変化しており、物理的性質を指標とすることで接着分子の結合による接着の強化、またその強化を安定化する様子が可視化できた。また、より微小な物理性質を評価するために、本研究で確立した計測法の高感度化に取り組んだ。その結果、最高で80fNの物理的性質の変化を計測できる、高感度計測法を確立することに成功した。

第5章では、インフルエンザウイルス感染による細胞が受ける物理的影響を調べた。その結果、細胞 - 基質間接着物理性質はウイルス感染後4時間後に特徴的に変化することを示した。この感染時間と細胞性質の変化の関係は、ウイルス増殖、宿主細胞の免疫系の時間変化と相関しており、ウイルス感染による細胞機能変化と物理的性質の関係性を示唆することができた。

総括では、以上の結果をまとめ、本研究で開発した細胞局所強度計測法について、今後の課題と細胞接着だけではなく様々な細胞機能に対する可能性について述べた。

キーワード

光ピンセット、高感度力計測、細胞接着、細胞局所強度、インフルエンザウイルス
*奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻学位論文, NAIST-IS-DD123456,
2010年8月19日.

Analysis for physical characteristics of the cell-matrix adhesion by measurement system of the cellular mechanical property at the local area

Hideaki Miyoshi

Abstract

The cell-matrix adhesion is related to a lot of cellular function and I analyzed by physical approach to the mechanism of the cell-matrix adhesion. In this thesis, I developed a measurement system for mechanical property of the cell at local area analyzing the adhesion property. And I measured the mechanical property of the adhesion by using the measurement system.

In first section of this thesis, I summarize the structural and physical properties of the cell-matrix adhesion. And I organized the measurement system for the mechanical property of the adhesion and indicated the problem of systems.

In second section, I developed the measurement system of the cellular mechanical property at local area for the cell-matrix adhesion. This system was based on Optical tweezers which technique was able to trap and manipulate of a micro-object and calculate the force exerted to an optically trapped object by radiation pressure. The system provide two measurement mode for the mechanical property; one is the single property measurement mode (Mode I), the other is the temporally change measurement of the property (Mode II).

In third section, I measured the mechanical property of the cell-matrix adhesion by using Mode I measurement. By using Mode I, I observed the rapidly the property increase for 20min since the cell contacted to extracellular matrix and the increase of the property is reinforced by external force. The property measured the system developed by me is influenced by not actomyosin interaction but the structural function of the actinfilament.

In forth section, I visualized dynamics of the adhesion property by using mechanical property as an adhesion-growth indicator. From visualization result, I obtained the reinforcement of the adhesion by binding/dissociation at single molecule and this reinforcement is fluctuated to be stabile phase. To detection of the tiny fluctuation of the property, I improved the resolution of the force change and the resolution was up to 80fN.

In fifth section, I investigated the physical effect of the infection of the influenza virus to the cell. From measurement result of the local mechanics by Mode I measurement, the mechanical property of the infected cell was changed at postinfected 4 hour. At the time, the cellular function and property was also varied by the virus proliferation and the immunological reaction of the host-cell to the virus infection. This result is one of the important applications of the measurement system developed by me.

Finally, I concluded these results and I considered future subjects and the availability of the measurement system of the local cellular mechanical property based on optical tweezers for the widely cellular physics investigation.

Keywords:

Optical tweezers, high-resolution force measurement, cell adhesion, local cellular mechanical property, influenzavirus

. *Doctoral Dissertation, Department of Information Systems, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD123456, July 7, 2204.

目次

序論	1
第1章 細胞 - 基質間接着の物理特性	
1-1 細胞 - 基質間接着	3
1-2 細胞 - 基質間接着物理特性計測法	
1-2-1 磁気ツイスト、磁気ピンセット	7
1-2-2 原子間力顕微鏡	9
1-2-3 光ピンセット	11
1-2-4 Traction force microscopy (TFM)	11
第2章 光ピンセット細胞局所強度計測法の開発	
2-1 光ピンセットによる微小物体操作と力計測の原理	
2-1-1 放射圧発生の原理	15
2-1-2 光ピンセットによる微小粒子の捕捉とマニピュレーション	18
2-1-3 光ピンセットによる力場計測	18
2-2 光ピンセットを基盤にした細胞局所強度計測法	
2-2-1 細胞局所物理特性計測法のシステム概要	21
2-2-2 光ピンセットシステム	21
2-2-3 粒子位置変位計測法	22
2-3 力計測のための光ピンセットバネ定数計測	26
2-4 細胞 - 基質間接着を介した細胞局所強度計測	
2-4-1 強度計測用細胞の培養と調整	30

2-4-2	粒子へのコラーゲンコーティング	30
2-4-3	細胞 - 粒子間接着形成の方法	31
2-4-4	細胞接着を介した細胞局所強度計測結果	32
2-5 細胞局所強度計測の物理モデル解析		
2-5-1	細胞接着粒子を用いた局所強度計測法の物理モデル	34
2-5-2	細胞接着粒子振動運動の運動方程式	36
2-5-3	粒子振動運動の運動方程式による細胞粘性と計測強度の関	39
2-6	まとめ	41

第3章 細胞 - 基質間接着の物理的性質評価

3-1 細胞接着形成条件の細胞強度計測に与える影響		
3-1-1 接着形成時間の細胞強度計測に与える影響の計測法		
3-1-1-1	細胞培養	43
3-1-1-2	培養細胞へのコラーゲンコート粒子の接着	46
3-1-1-3	細胞強度計測	46
3-1-1-4	強度計測条件	48
3-1-1-5	計測結果	48
3-1-1-6	考察	48
3-1-2 接着形成時の力印加による細胞強度計測への影響		
3-1-2-1	細胞培養	52
3-1-2-2	培養細胞へのコラーゲンコート粒子の接着	52

3-1-2-3	細胞への外力印加の細胞接着構造形成への影響	53
3-1-2-4	強度計測条件	53
3-1-2-5	計測結果	54
3-1-2-6	考察	54
3-2	アクチンフィラメントの細胞強度計測への影響	
3-2-1	細胞局所強度計測法に対するアクチンフィラメント影響評価法	
3-2-1-1	細胞蛍光イメージングによる阻害効果の検証	59
3-2-1-2	アクチン阻害剤の細胞接着強度への影響評価	60
3-2-1-3	強度計測条件	62
3-2-2	阻害剤処理細胞による細胞局所強度計測結果	
3-2-2-1	細胞蛍光イメージングによるアクチン阻害結果	62
3-2-2-2	アクチン阻害剤の細胞強度への影響評価	64
3-2-3	考察	67
3-3	まとめ	68

第4章 細胞接着初期構造形成過程の可視化

4-1	細胞接着形成初期過程における接着形成のダイナミクス	69
4-2	細胞局所強度計測法を用いた接着形成ダイナミクスの計測	
4-2-1	継続的細胞局所強度変化計測法	71
4-2-1-1	培養細胞へのコラーゲンコート粒子の接着と継続的な細胞強度計測	71
4-2-1-2	アクチンフィラメント形成阻害実験方法	71

4-2-1-3 強度計測条件	72
4-2-2 細胞局所強度を指標とした接着形成ダイナミクスの可視化結果	
4-2-2-1 細胞局所強度変化計測結果	74
4-2-2-2 細胞局所強度変化検出能の評価	77
4-2-2-3 細胞局所強度変化量のヒストグラム解析	77
4-2-3 考察	
4-2-3-1 細胞局所強度経時変化計測結果に関する考察	80
4-2-3-2 細胞局所強度変化量解析に関する考察	81
4-3 細胞局所強度変化検出能の高感度化	
4-3-1 細胞局所強度計測法の高感度化	83
4-3-2 細胞局所強度変化検出能評価	85
4-3-3 高感度化強度計測法を用いた細胞接着強度ゆらぎ検出	85
4-3-4 考察	89
4-4 考察	91

第5章 インフルエンザウイルス感染細胞での細胞強度計測

5-1 インフルエンザウイルス感染メカニズム	93
5-2 ヒト気道上皮細胞の細胞局所強度	
5-2-1 ヒト気道上皮細胞の細胞接着強度	
5-2-1-1 細胞接着強度計測法	98
5-2-1-2 接着時間と細胞強度の関係の解析結果と考察	99

5-2-2	ヒト気道上皮細胞におけるアクチンフィラメントの強度計測への影響	
5-2-2-1	アクチンフィラメント形成阻害効果の検証	101
5-2-2-2	アクチンフィラメントの強度計測への影響の評価	101
5-3	インフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測	
5-3-1	H292へのインフルエンザウイルス感染と感染成否評価	105
5-3-2	インフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測	
5-3-2-1	インフルエンザウイルス感染H292の細胞強度計測法	108
5-3-2-2	インフルエンザウイルス感染H292の細胞強度計測結果	108
5-3-3	考察	109
	総括	114
	業績	117
	参考文献	118
	謝辞	130

序論

細胞は、細胞膜を外界と触れる唯一の構造体とし、その中に全ての細胞内小器官を包含し、複雑な生命機能を制御している。また細胞は、それ自身、物理的な構造体であり、細胞外環境に応じて、その物理的な性質を変化させ、適応している。

血管内皮細胞がその例として、わかりやすい。血管内皮細胞は、血管の内側、すなわち血液が流れている側面に面しており、一層の細胞シート状に組織化し、血管内膜を形成している。すなわち、血管内皮細胞は、常に血流によるせん断応力や圧力にさらされている。この細胞は血流によるせん断応力を、細胞外からの機械的な刺激を化学シグナルとして細胞内に伝達するメカノセンサーにより応力を享受し、その応力への細胞応答として細胞内部構造を変化させ、その応力に最も適した形態へと変化する^{1,2}。このような血管内皮細胞の物理的な性質は、血管発生メカニズムや動脈硬化、高血圧そして癌などにも関係している。このように細胞の物理的な性質と細胞機能との関係を理解することは、細胞レベルの生命現象解明だけでなく、発生学や医学においても重要な課題である。

この細胞の物理的な性質については、古くから様々な手法を用いて、多くの研究がなされている。この計測方法は、マクロとミクロの2つに大別できる。前者は、細胞全体の物理的な性質を評価するもの³⁻⁸で、後者は、細胞表面の局所的な性質を計測するものだ。細胞の全ての機能は細胞内の分子が制御しているため、細胞の物理的な性質と分子メカニズムは切り離すことはできない。

細胞の物理的な性質と分子メカニズムとの関係を理解するためには、物理的性質の計測法により、関連する分子の欠損、変異による性質の変化をとらえることが必要になる。この変化は、マクロな計測系では、十分にとらえることはできず、ミクロな計測系の確立が必須であるが、特に高感度に力を計測できる手法が望まれている。

ミクロな細胞の物理的性質が注目されている細胞機能に、細胞 - 基質間接着がある。細胞 - 基質間接着は、膜タンパクインテグリンを介して、細胞の外側で細胞外基質と、内側でアクチンフィラメントと結合し、細胞を細胞外基質に接着させている。この接着部位では、細胞内のアクチンフィラメントで、アクトミオシン相互作用により発生する **traction force** が働いており、細胞運動や形態形成のための力として、この接着部位を介して細胞外に伝達されている⁹。一方、細胞外からは、細胞外基質からの機械的な刺激や力が、この接着部位に働いており、細胞 - 基質間接着は、この機械的な情報を化学的情報に変換し細胞内に伝達する¹⁰。細胞 - 基質間接着のこのような性質は、細胞運動や形態形成だけでなく、細胞分化やアポトーシスなどにも密接に関与している¹¹⁻¹³。また、この接着の異常化は、癌細胞の運動や生存そして血管新生などにも関わっており¹⁴、細胞 - 基質間接着は、基礎生物学、医学的な観点から非常に注目されている。このように、細胞 - 基質間接着を理解するには、これまでの分子生物、細胞生物学的な解析に加え、物理的な解析が必須となる。特に、細

胞 - 基質間接着は、細胞表面に多数存在するため、個々の細胞接着構造の物理的な性質を理解する必要がある。

そこで本研究では、この問題に取り組み、物理的な側面から細胞機能へのアプローチするために、高感度細胞局所強度計測法を開発した。この手法は、ミクロな細胞物理的性質の高感度計測を可能にするために、光ピンセットを基盤とした。光ピンセットは、光の放射圧により、顕微鏡下でミクロンサイズの微小物体を捕捉、操作できる技術である¹⁵。また、光ピンセットで捕捉された物体にかかる力を数 pN オーダーで計測できるため、様々な細胞物理的性質の計測に用いられてきた¹⁶⁻¹⁹。本研究では、開発した光ピンセットを基盤とした細胞局所強度計測法を用いて、細胞接着構造の物理特性を計測した。

第一章では、研究ターゲットである細胞 - 基質間接着およびその物理特性計測について述べる。第 2 章では、本研究で開発した細胞局所強度計測法について述べる。この計測法の細胞接着構造物理性質への適応について第 3 章で述べ、第 4 章では、細胞接着構造の形成過程での、接着構造物理性質のダイナミクスの計測について述べる。さらに第 5 章では、本研究で開発した計測手法の応用として、インフルエンザウイルス感染による、細胞の物理的な性質の変化を計測した結果について示し、最後に第 6 章において、総括を述べる。

第1章 細胞 - 基質間接着の物理特性

細胞 - 基質間接着は、様々な細胞機能に関与しており、また癌形成、転移にも関係が深い
ため、注目されている。本研究では、この細胞 - 基質間接着の性質、メカニズム理解に、
物理的な視点からアプローチする。本章では、この細胞 - 基質間接着について、その機能
と構造および物理的な性質について述べる(1-1)。またこの細胞 - 基質間接着の物理特性計
測法とその問題点について 1-2 で述べる。

1-1 細胞 - 基質間接着

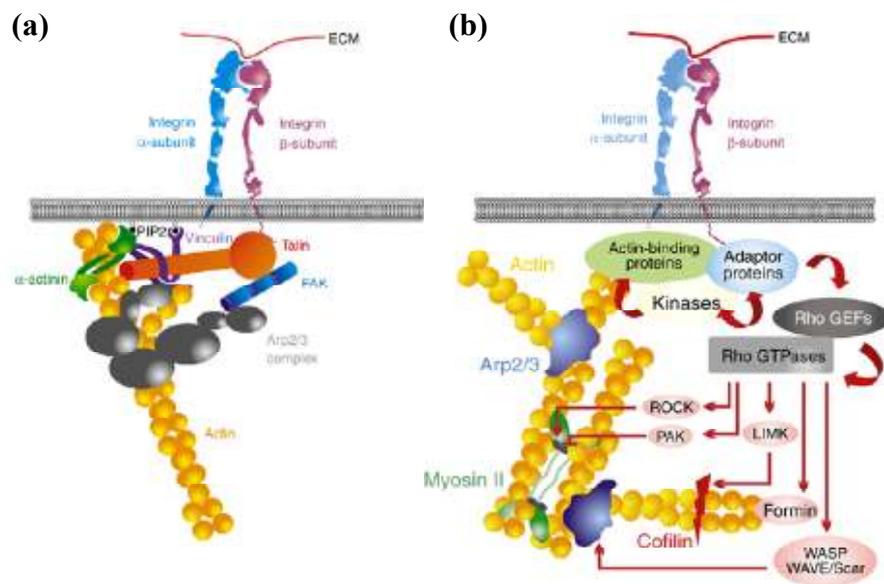
細胞と細胞外基質は、膜貫通型細胞膜タンパクのインテグリンを介して、物理的に接着
している。インテグリンは、細胞の外側で細胞外基質と、内側で接着関連タンパクを介し
てアクチンフィラメントに結合している。アクチンフィラメントは、細胞内でミオシンと
相互作用することによる張力を発生させることができ、この細胞 - 基質間接着を通して、
細胞外にその力を働かせ、細胞運動や形態形成、維持を可能にしている。アクチンフィラ
メントとインテグリンの連結は、直接ではなく、複数の分子を介しており、細胞は、それ
らの分子をコントロールすることで、細胞機能を制御している。

図 1-1(a)は、インテグリンを介した細胞 - 基質間接着構造の模式図である。タリンと α -ア
クチニンによりインテグリンの細胞質側のドメインとアクチンは連結され、ビンキュリン
は、タリンと α -アクチニンそしてアクチンに結合する²⁰⁻²⁵。さらに、ビンキュリンは、イン
テグリンを活性化し、アクチンへの結合を促し、安定な接着を形成するために、必要とさ
れている²⁶。また、ビンキュリンとは、ホスファチジルイノシトール(4,5)-ビスフォスフェ
イト(PIP2)により細胞膜につながっている。このように、アクチンとインテグリンは、複数
の方法で結合されており、この結合方法は、細胞種や個々の接着構造によって異なる²⁷。

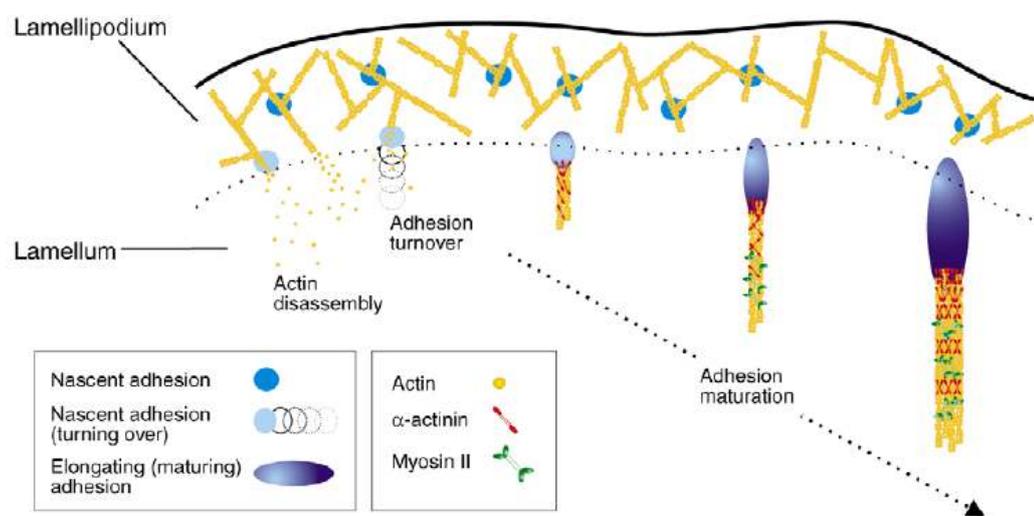
また、インテグリンからのシグナル伝達系は、細胞接着を制御している。インテグリン
は、細胞外からの機械的な情報を享受すると、それを化学的な情報に変換し、細胞内に伝
達することができる。そのため細胞は、外環境の性質により細胞接着構造を変化させるこ
とができる。図 1-1(b)は、インテグリンシグナルによる、細胞接着制御の概要を示している。
インテグリンからのシグナルにより、インテグリン細胞質ドメインを連結しているアダプ
タータンパク群が活性化され、近隣のキナーゼ群を活性化させることにより、インテグリン
- アクチン結合構造をリン酸化する。また、アダプタータンパク群は、Rac、Rho そして
Cdc42 などの Rho GTPase を介して、下流の分子ネットワークを起動させる。下流では、Arp2/3
複合体や formin によるアクチン重合化や²⁸、LIM キナーゼ - コフィリンによるアクチンの
脱重合²⁹、ミオシン軽鎖リン酸化によるミオシン II の活性化³⁰を起こす。このように、細
胞接着部位では、インテグリンとアクチンフィラメントの物理的な接着構造形成だけでは

なく、インテグリンシグナル伝達系による接着構造形成やアクチン相互作用の制御も行われている。このような接着複合体の構造、性質の変化は、細胞背の物理的な性質を変化させていると考えられるが、まだ不明な点が多い。しかし、細胞接着物理的性質の変化から各分子による接着機能変化を同定可能であると考えられ、間接的な接着の安定化や強化による物理的性質の変化は、極微小である可能性があり、高感度な計測系が必要とされる。

また、この細胞接着構造は細胞の縁(ラメリポディア)で形成され³¹、その構造を動的に変えることが知られている。図 1-2 は、細胞接着の形成過程を示した図である。ラメリポディアで形成された細胞接着は、フォーカルコンプレックス(FX)と呼ぶ。FX は、次第に接着構造をクラスター化し、大きな接着構造となる³²⁻³⁴。これを接着斑(FA)と呼ぶ。また、それと同時に、接着構造に連結するアクチンフィラメントの数が増え、 α -アクチニンによりアクチンフィラメントの太い束であるストレスファイバーが形成される³⁵。このストレスファイバーも、次第に成長し、太いストレスファイバーが接着斑に連結する形で、形成される。ここでは、ストレスファイバー内のアクチン反応による強い張力が働き、かつ、その力により接着構造が崩壊しないように、強固な細胞接着が形成されている。このように、細胞 - 基質間接着は、接着構造形成過程においてその構造的な性質を動的に変えており、それと同時に物理的な性質も変化していることは必然的に考えられる。よって、細胞 - 基質間接着の物理的な性質を計測するには、高感度でかつ、動的な変化を計測可能である必要がある。次節では、このような細胞 - 基質間接着の物理的性質の計測を想定している、マイクロな細胞物理性質計測法について述べる。



☒ 1-1



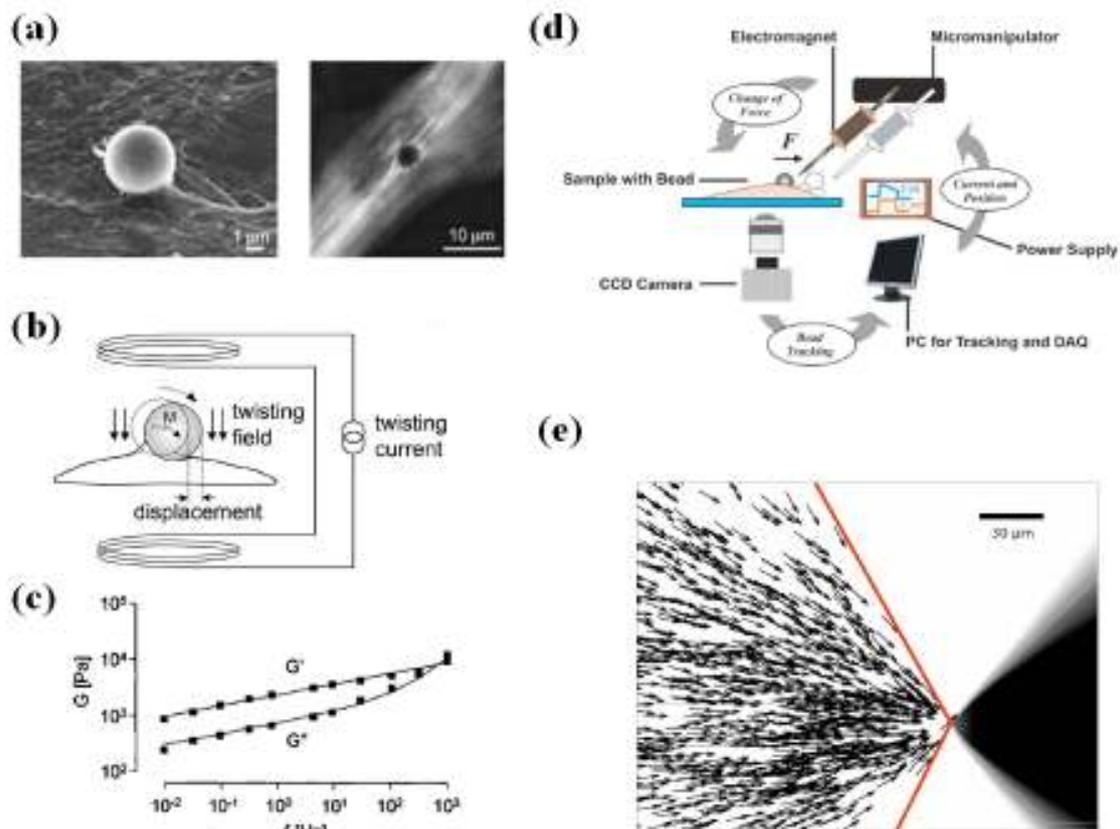
☒ 1-2

1-2 細胞 - 基質間接着物理特性計測法

細胞の局所的な物理性質を計測する方法は、いくつか開発されているが、その基盤技術は、磁性粒子ツイスト、原子間力顕微鏡そして光ピンセットに大別できる。また、細胞接着に関しては、接着斑にかかるアクチン相互作用を計測する、traction force microscopyが開発されている。以下にそれぞれについて述べる。

1-2-1 磁気ツイスト、磁気ピンセット

磁気ツイスト、磁気ピンセットは、膜タンパクに結合できるよう加工したミクロンサイズの磁性粒子を用いて、粒子が接着している部分の細胞の物理特性を計測している。図 1-3(a-c)は磁気ツイストの計測メカニズムを示している。細胞外基質を磁性粒子表面に施し、細胞に接触させると、粒子下部に接着部位を形成させることができる。図 1-3(a)は、細胞に接着した磁性粒子のようすである。図 1-3(a)左図は、細胞表面に接着した粒子の電子顕微鏡画像を示しており、右図は GFP-アクチンをトランスフェクションさせた細胞において、接着した粒子の周りにアクチンが集積し、接着構造を形成していることを示している。図 1-3(b)のように、細胞の上下において磁場を周期的に変化させることで細胞に接着させた磁気粒子を回転させ、この時の粒子運動の変化から、細胞膜の動的粘弾性を評価している³⁶⁻⁴⁰。この方法は、物理的な性質だけでなく、粒子ツイストを介して、細胞に機械的な刺激を与えることができ、機械的刺激に対する遺伝子発現の変化を計測することができる⁴¹。磁気ツイストは、細胞培養系外から磁場を変化させることで、動的粘弾性評価を実現しているため、複数の細胞全体でその物理量を計測することができ、そのため遺伝子発現変化といった、複数の細胞を用いた解析が可能である。しかし、均一な磁場を発生させ、粒子運動を制御することは難しく、計測している全ての細胞に対して、正確な値を評価できる保証はない。また、磁性粒子の細胞への接着は、ランダムで、ユーザーが計測したい細胞部位を任意に選択することができない。この問題を解決するために、磁気ピンセットが開発されている^{42,43}(図 1-3(d,e))。これは、磁場を発生できるマイクロニードルにより、局所的に磁場を発生、変化させ、任意の磁性粒子で計測することができるが、磁場や粒子運動メカニズムなどの解析が不足している。また、磁性粒子の細胞への接着を自由に操作することができないため、問題の根本的な解決にはならない。



☒ 1-3

1-2-2 原子間力顕微鏡

原子間力顕微鏡は、走査型プローブ顕微鏡の一つで、先端の鋭いカンチレバー(探針)を用いて、計測対象と探針との間に働く力を計測する。カンチレバーを原子間力がはたらく距離までサンプルに近接させると、カンチレバーはその力によりたわみ、このたわみ量を検出し力として評価する。たわみ量の計測は、レーザーをカンチレバー先端に照射し、そこで反射したレーザーを4分割フォトダイオードで検出する(図 1-4(a))。カンチレバーは自由に3次元的に操作することができるため、磁性粒子を用いた計測法での課題を解決することができる。また、カンチレバー先端を様々なタンパクや分子で修飾することができるため、汎用性が高い。

図 1-4(b)は、カンチレバー先端をリガンドタンパクで修飾し、細胞表面のレセプターとの結合力を計測している例を示している。リガンド修飾カンチレバーを細胞表面に近づけ、細胞表面のレセプターと結合させる。このカンチレバーを引き上げると、カンチレバー先端はレセプターに結合しているためたわみ、さらに引き上げ続けると、リガンド-レセプター結合が破断し、カンチレバーが細胞から引きはがされる。この時のカンチレバーにかかる力の変化を示したものが、図 1-4(c)である。原子間力顕微鏡で結合を引きはがす時のりからの変化は、図 1-4(c)のように階段状の変化を示す。この変化は、リガンド-レセプター結合が破断している様子を示しており、この階段状の力変化量をヒストグラム解析することで、一分子レベルで分子間相互作用力を評価することができる⁴⁴⁻⁴⁶。

この方法を細胞-細胞間接着に応用したものが、図 1-4(d)である。カンチレバーの先端に、分子ではなく、細胞を直接取り付け、細胞に接着させることで細胞間接着力を評価している。さらに、階段状の力変化量を推定することで、一つの接着構造レベルで結合力を評価することができる^{47,48}。

これら原子間力顕微鏡による細胞局所の物理的性質計測は、磁性粒子では不可能な、計測部位の自由な選択を可能にし、力計測感度はカンチレバー位置計測感度に依存するため、高感度な計測を実現できる。しかし、計測することが可能な力は、結合の破断力である。細胞接着においては、接着構造の動的な変化を知る必要があるため、破断力計測は動的な性質の変化を計測することはできない。

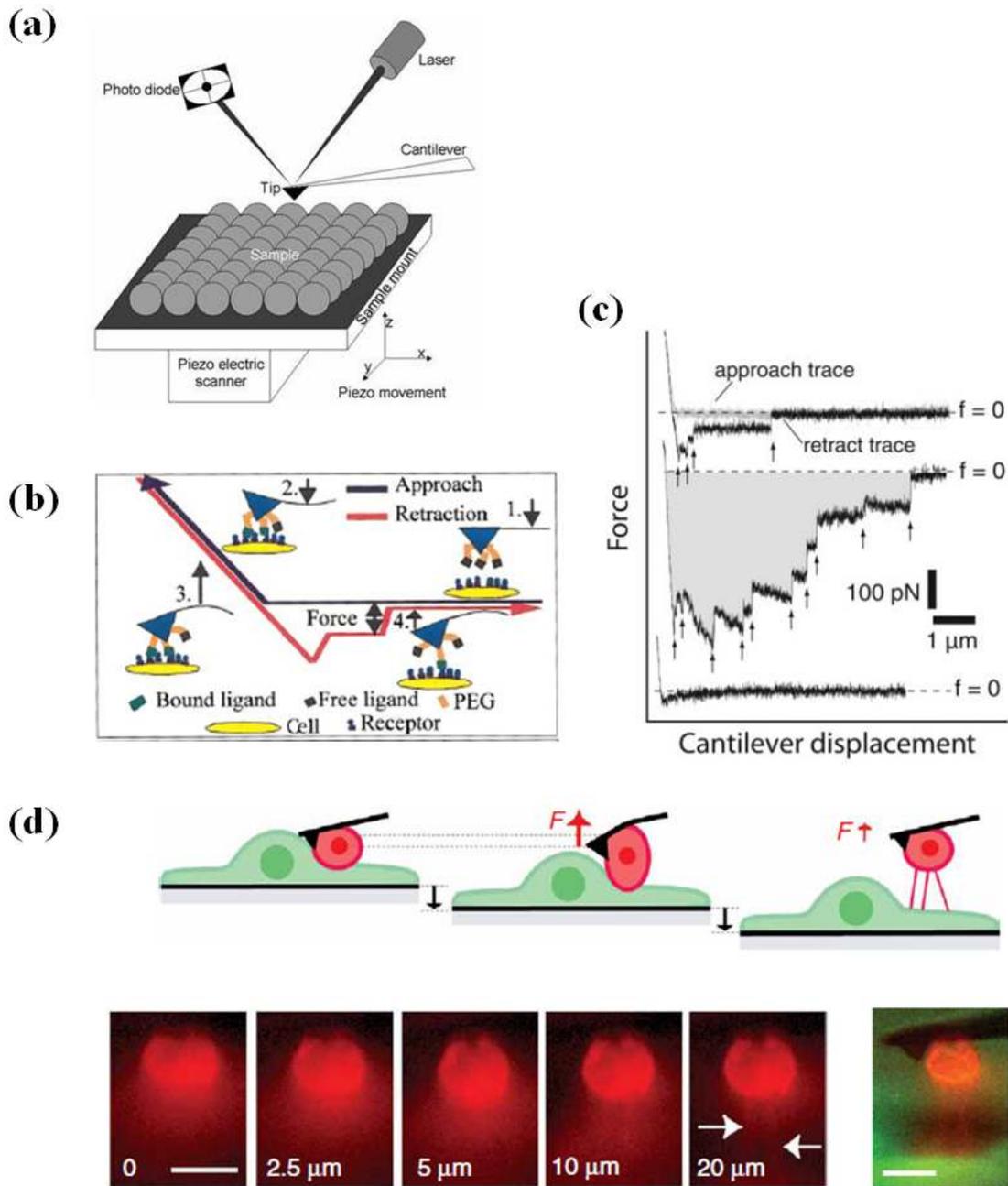


图 1-4

1-2-3 光ピンセット

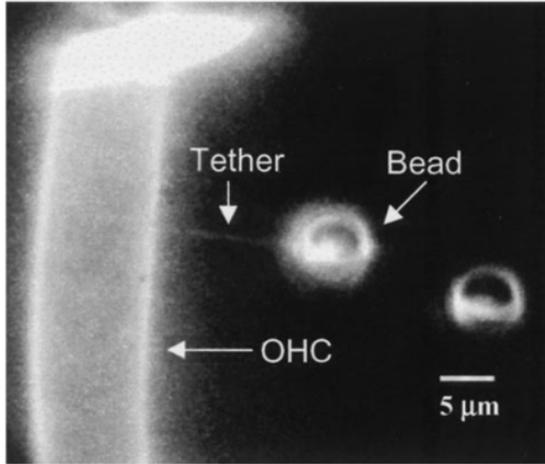
光ピンセットは、光の放射圧により、顕微鏡下で微小な物体を捕捉、三次元的な操作が可能であり、物理的な放射圧発生や捕捉物体にかかる力が詳細に解析されているため、磁性粒子による計測法の課題をクリアすることができる。光ピンセットにおいても、細胞外基質や細胞に結合できるタンパクを表面に施したマイクロサイズの粒子を用いて、物理性質が計測されている⁴⁹⁻⁵²。図 1-5(a)は、光ピンセットで捕捉した粒子を用いて、外有毛細胞の細胞膜の機械的性質を計測した実験の図である。膜を引っ張った時に発生するテザーと呼ばれる現象により、細胞膜の機械的性質を評価している。本来細胞膜は、スペクトリンなどの細胞膜を支持している膜骨格と相互作用し、形態を保持している。光ピンセットで捕捉した粒子で細胞膜を引っ張ると、細胞膜と骨格の間に働く負荷が大きくなり、ある降伏点で膜と骨格の相互作用が破壊される(図 1-5(b)の **tether formation force** の矢印)。この時、脂質膜のみが光ピンセットにより引っ張られ、その周囲の脂質膜はまだ骨格と相互作用しているため、局所的に脂質膜が伸びる現象が起こり、これをテザーと呼ぶ。テザー発生後は、一定の力に落ち着く(図 1-5(b)の **Steady state force**)。このテザーが発生する直前、すなわち降伏点をむかえる時の力を細胞の局所的な強度として評価している(図 1-5(b)の **tether formation force**)。この手法により、細胞膜と骨格の相互作用を知ることは可能であるが、テザー発生原理が不明なままであり、現在もこの現象の理解が進められている。

1-2-4 Traction force microscopy (TFM)

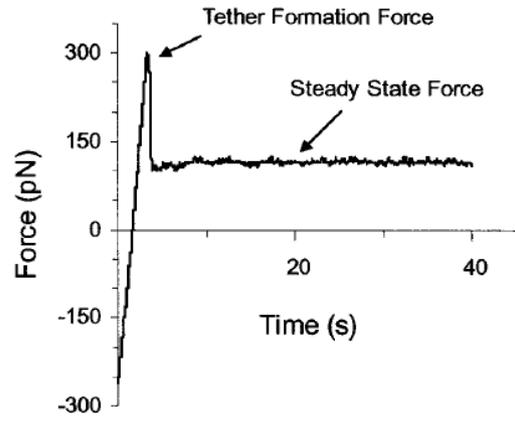
細胞接着部位の物理的な性質には、細胞内のアクチン相互作用で発生する張力も関与している。この張力は、良く研究されており、**Traction Force Microscopy(TFM)**として計測技術が確立されている。TFM の概要を図 1-6(a-c)示す。TFM は、蛍光粒子を混ぜた、柔らかいゲル基板を作成し、その上で細胞を培養することで、細胞運動時に接着斑に働く力を評価している。図 1-6(a-c)では、ゲル基板中の蛍光粒子が、接着斑にかかる張力により位置が変移し、その変位量からフックの法則により力を評価できる。力評価の際には、有限要素法により弾性体解析を行い、細胞全体にかかる力を図 1-6(c)のように評価することができ、細胞運動方向の後方で強い力が局所的に働いていることがわかる⁵³⁻⁵⁶。

また、一つの接着斑にかかる張力を計測する方法として、マイクロピラーアレイが開発されている。これは、フォトリソグラフィにより作製した型に、樹脂を流し込み、図 1-6(d)のような柱を形成させ、その上で細胞を培養することで、その柱にかかる力を評価する。この柱に細胞が接着すると、形態形成時の張力により柱が曲がり、この曲がり量を計測することで、各柱にかかる力とその方向を評価することができる(図 1-6(e,f))⁵⁷。

(a)



(b)



☒ 1-5

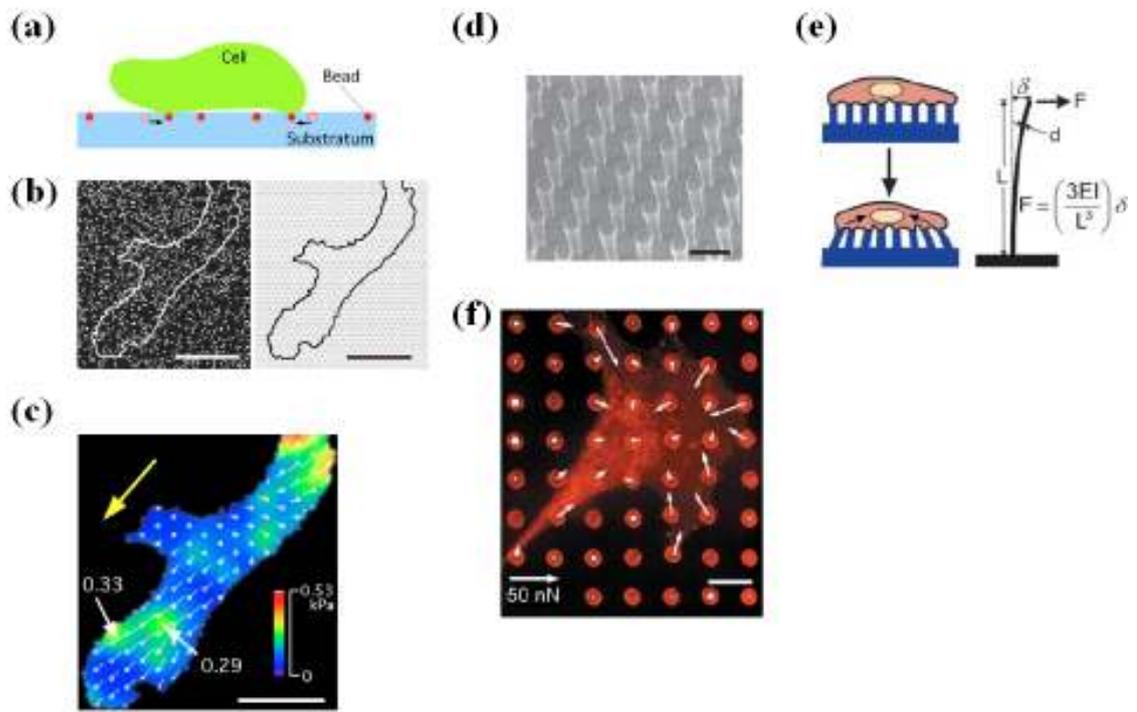


图 1-6

このように、細胞局所の物理的な性質の計測は様々な手法により試みられているが、特に細胞接着のような動的にその性質を変化させている細胞機能の、性質と分子メカニズムとの関係を明らかにするには、次の4点、

1. 細胞の自由な計測部位の選択
2. 高感度な力変化検出
3. 動的な物理的性質変化
4. 計測方法の物理的原理

を満たすことが必要である。しかし、これら全てを満たす計測法はこれまでになく、開発が期待されている。これらの要件を満たすことができる基盤技術は、光ピンセットであり、本研究では、光ピンセットを用いて、上記4点を満たすことができる、細胞局所物理的性質計測法の開発に取り組んだ。次章では、本研究で開発した、光ピンセットを基盤にした、細胞局所強度計測法について述べる。

第2章 光ピンセット細胞局所強度計測法の開発

本研究では、細胞 - 基質間接着を物理的に理解することを目的に、細胞表面局所の物理的な性質を計測する方法として、光ピンセットを基盤技術とした強度計測法を開発した。2-1 では、本計測法の基盤となる光ピンセットの原理および光ピンセットによる力計測について、2-2 では、細胞局所強度計測法の概要について述べる。また 2-3 では、開発した計測システムの評価について、2-4 では、細胞接着を介した細胞局所強度計測について述べる。また細胞の物理的な性質の計測には、その計測方法の物理的原理を明確にする必要があるため、本計測系の物理的な計測原理について 2-5 で述べる。そして最後に 2-6 で本章のまとめを述べる。

2-1 光ピンセットによる微小物体操作と力計測の原理

光ピンセットは、1986 年 A. Ashkin によって開発されたレーザーを用いた技術で^{15,58}、収束レーザービームによって放射圧を発生させることで顕微鏡下の物体をレーザービームのスポット内に閉じ込めて操作するものである。2-1-1 では、光ピンセットの原理となる放射圧発生原理について、2-1-2 では、光ピンセットによる微小粒子捕捉とマニピュレーションの原理について述べる。そして 2-1-3 では、光ピンセットのもう一つの特徴である、顕微鏡下の物体に働く微弱な力の計測原理について述べる。

2-1-1 放射圧発生原理

光マニピュレーションでは、光の放射圧を対象物体に働かせることで操作を行う。光の放射圧は、フォトンの運動量に起因する力で、対象物にフォトンが入射して散乱、反射、屈折されることで運動量変化が起こり、運動量保存則により対象物に運動量が与えられることで発生する力である。フォトンの運動量 p は

$$p = h/2\pi k \quad (2-1)$$

で与えられ、またパワー $[W]$ の光束が持つ単位時間当たりの運動量は nI/c で与えられる。ここで h はプランク定数、 c は真空中の光速、 n は媒質の屈折率、 k は媒質中の波数ベクトル ($|k| = nk_0 = 2\pi n/\lambda$, k_0 は真空中の波数、 λ は波長) である。運動量の方向は光の進行方向(波数ベクトルの方向)に一致している。このような光が境界面に入射して反射、屈折することで運動量の変化が起き、境界面で放射圧が発生する。金属のような反射物体に光が入射した場合には反射によって境界面を押すように力が発生する(図 2-1a)。屈折率の異なる誘電体との境界面に光が入射した場合には境界面で反射と屈折を起し放射圧が発生する(図 2-1b)。

また、この放射圧は、フォトンの水平方向の運動が境界面で連続であるため、境界面に対して垂直方向に発生する。この現象について幾何光学理論に基づいて述べる。図 21(c)において、運動量 M_i をもつ入射光が、屈折率 n_1 の媒質から屈折率 n_2 の媒質へ入射した場合、反射光の運動量 M_r は反射率を R とすると、

$$M_r = RM_i \quad (2-2)$$

透過光の運動量 M_t は透過率を T とすると、

$$M_t = (n_2/n_1)TM_i \quad (2-3)$$

入射光、反射光、透過光が持つ運動量の水平方向成分は、

$$\begin{aligned} \text{入射光：} & M_i \sin \theta_1 \\ \text{反射光：} & M_r \sin \theta_1 \\ \text{透過光：} & M_t \sin \theta_2 = TM_i \sin \theta_1 \end{aligned}$$

これにより、入射前後における運動量の水平方向成分の変化は、

$$\begin{aligned} & M_i \sin \theta_1 - (M_r \sin \theta_1 + M_t \sin \theta_2) \\ & = M_i \sin \theta_1 \{1 - (R + T)\} \\ & = 0 \end{aligned}$$

となり、放射圧は水平方向には生じないことがわかる。

また、入射レーザーのパワーが P の場合、一本の光線が屈折率 n_1 の媒質から屈折率 n_2 の媒質へ入射したとき、境界面に生じる放射圧の大きさ F は、以下のように理解することができる。

垂直方向の運動量は、

$$\begin{aligned} \text{入射光：} & M_i \cos \theta_1 \\ \text{反射光：} & M_r \cos \theta_1 \\ \text{透過光：} & M_t \cos \theta_2 = (n_2/n_1)TM_i \cos \theta_2 \end{aligned}$$

なので、垂直方向の運動量変化は、

$$\begin{aligned} & M_i \cos \theta_1 - (-M_r \cos \theta_1 + M_t \cos \theta_2) \\ & = M_i \{ (1+R) \cos \theta_1 - (n_2/n_1)T \cos \theta_2 \} \end{aligned}$$

となる。放射圧は、単位時間当たりの光線の運動量変化なので、垂直方向に作用する放射圧 F は、

$$F = \{ (1+R) \cos \theta_1 - (n_2/n_1)T \cos \theta_2 \} (n_1 P/c) \quad (2-4)$$

で表される。

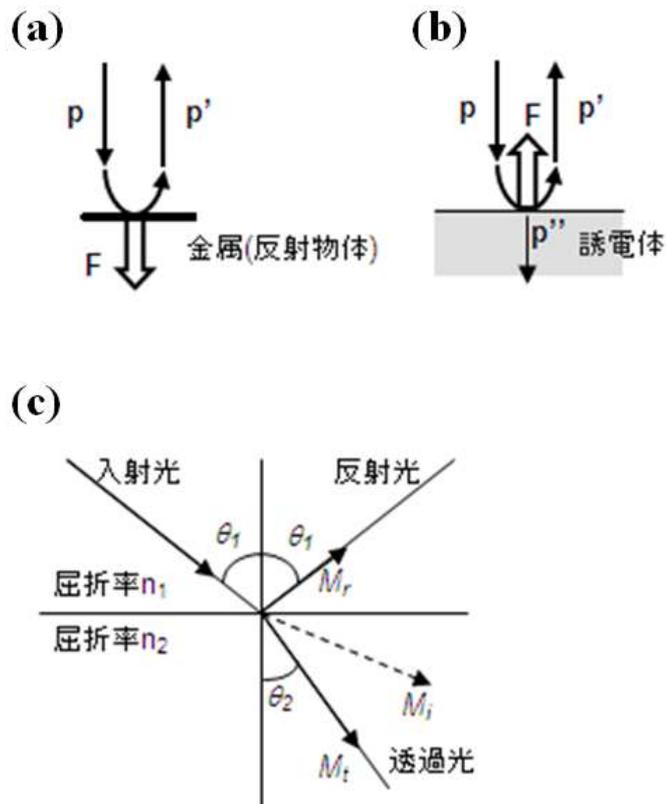


図 2-1 : 境界面での光線の反射・屈折と運動量

2-1-2 光ピンセットによる微小粒子の捕捉とマニピュレーション

光ピンセットは、2-1-1 で述べた放射圧を発生させ、顕微鏡下で微小物体を捕捉しマニピュレーションできる。本研究ではこの特性を利用して、顕微鏡下で捕捉した μm サイズの粒子を用いた手法の開発を行っている。そのため、本節では光ピンセットで微粒子を捕捉しマニピュレーションする原理について記す。

収束レーザービームが球形の対象物に入射した場合に発生する放射圧の模式図を図 3-3a に示す。入射前に光線が持っていた運動量 p が粒子を通過することで方向を変えられて運動量 p' に変化することで放射圧が発生する。放射圧の方向は $\Delta p = p' - p$ で与えられ図 2-2(a)中の F で示している。

収束レーザービームでは、このような光線が粒子に対して様々な方向から入射することで放射圧が発生している(図 2-2b)。図 2-3b において、光線 a、b それぞれによる放射圧を F_a 、 F_b で示している。粒子全体に働く力は粒子に入射する全ての光線で発生する力の合力となり、レーザービームのスポット中に引き込むように働く。この特性を利用することで、光ピンセットは顕微鏡対物レンズでレーザービームを強く集光して引き込む力を発生させることで粒子をレーザービームスポット中に三次元的に捕捉し、三次元的にマニピュレーションできる。

2-1-3 光ピンセットによる力場計測

光ピンセットによる力計測は、水中での計測が可能で、 $\text{pN}\sim\text{fN}$ といった微弱な力を高感度に検出でき、さらにレーザービームを入射するだけで計測できる簡便さという特徴があり、特に生体試料の計測によく用いられる。この性質を利用したものとして、生体分子とその機能の力学的な相互作用を計測した例があり、例えばアクチン-ミオシンの一分子レベルで発生する力の計測⁵⁹、*E.coli* の RNA ポリメラーゼの転写の際の駆動力の一分子計測⁶⁰、原核生物の DNA 結合タンパクと DNA の相互作用力の計測⁶¹ などがある。さらに、力計測を利用した生体試料の力学的特性を評価する研究もよく行われている。例えば人工脂質膜の剛性計測⁶² さらに細胞膜の力学的特性計測⁶³ などがある。

光ピンセットによる力計測は、光ピンセットで捕捉した粒子は、バネに重りをつるした状態として解析することができる。この状態では、外力 F に対する粒子位置変位 Δx の関係はフックの法則により、

$$F = k\Delta x \quad (2-5)$$

として与えられる。ここで、 k は光ピンセットのバネ定数である。時間的に Δx を計測すればその瞬間に働いていた力を求めることができる(図：2-3)。

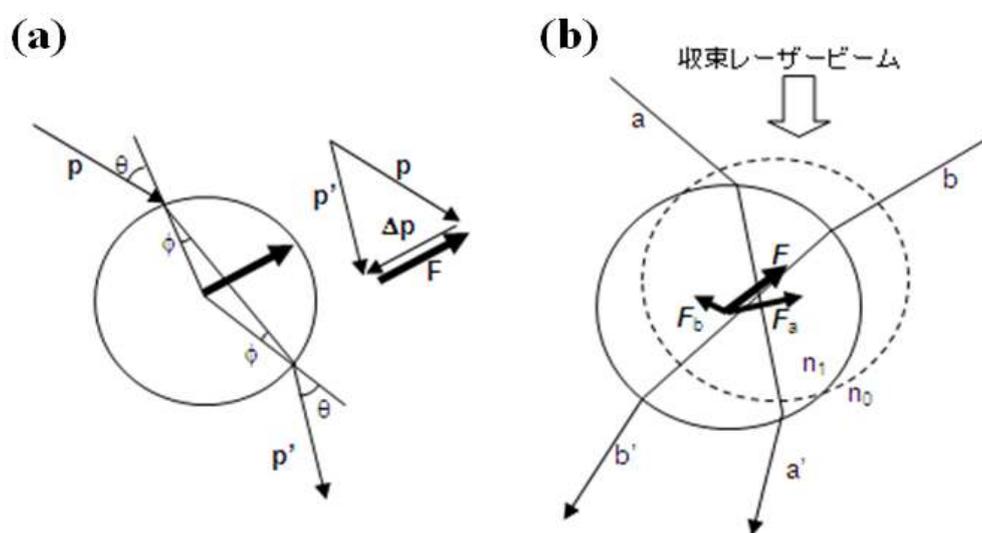


図 2-2 : 球形粒子に対する放射圧発生

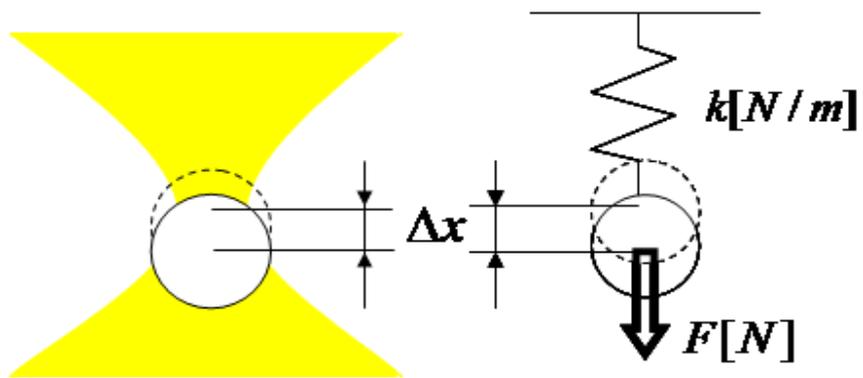


図 2-3 : 光ピンセットによる力計測の模式図

2-2 光ピンセットを基盤にした細胞局所強度計測法

本研究では、前節で示した性質を持つ光ピンセットを用いて、細胞局所の物理性質計測法を開発した。本節では、開発した計測システムについて述べる。2-2-1 では、計測システムの概要を、2-2-2 では本システム光ピンセット装置について、2-2-3 では力計測に必要となる粒子位置計測法を記す。

2-2-1 細胞局所物理性質計測法のシステム概要

この計測システムは、杉浦らにより考案された細胞触診法をベースにしており、細胞触診法は、光ピンセットで捕捉した粒子を用いた細胞局所の力学的特性計測法である[38]。本システムは、光ピンセットで捕捉した粒子を、光ピンセット用レーザービームを移動させることで、細胞膜表面へ移動させ細胞に接着させ、この粒子をカプローブとして粒子が接着している領域の細胞力学的特性を計測する。このように細胞に接着した粒子を動かすことで、接着部位に力を印加することができ、その時細胞は粒子より印加された力に対する応力(F_{cell})を粒子に対して発生させる(図 2-4(b))。この力は、細胞の粒子接着部位における弾性や粘性などの力学特性によるものである。この F_{cell} は、粒子が光ピンセットから受けている力(F_{trap})と釣り合っているため、バネモデルから F_{trap} を評価することで、細胞局所の物理的な性質を計測することができる。杉浦らの提案した手法では、この力を検出する方法を確立しているが、この力発生に起因する細胞力学的特性の確定には至っていない。そこで、本研究では、この力学的特性を確定するための手法の開発を行った。そのために、細胞に接着した粒子を一定方向・一定振幅で動作制御しその時に細胞から粒子にかかる力を定量化するシステムに発展させた。次項では、本研究で使用した光ピンセットシステムについて述べる。

2-2-2 光ピンセットシステム

本研究で用いた光ピンセット装置は、ベースとなる顕微鏡としての倒立型落射蛍光顕微鏡(ニコン社製、TE2000)と、光ピンセット用レーザービームを導入する光学系によって構成されている(図 2-5)。

光ピンセット用レーザー光源は、Nd:YVO₄ レーザー(波長 1064nm、最大出力 6W、スペクトラフィジックス社製)で、レーザービームはビームエキスパンダ(BE)を通した後、偏光ビームスプリッター(PBS)で2つに分けられる。そのうち P 偏光の光線のみがガルバノミラー光学系(GM)を通り、倒立型顕微鏡へ導出される。

本システムでは、この光ピンセットで捕捉した粒子を一定方向・一定振幅で振動運動させるためにパーソナルコンピュータ(PC)により光ピンセット光学系のガルバノミラー(GM)を一定方向・一定振幅で動作制御した。ガルバノミラーは、回転モーターの軸に反射

鏡を設置し、印加電圧に応じて回転角を変えられるミラーユニットである。回転角を変えることで光線の反射方向を変えることができる。本計測系において光ピンセットの X 軸の移動はガルバノミラーの回転角を DC 電圧で制御することで顕微鏡下での光ピンセットビームの集光位置を移動させている。DC 電圧の制御は PC 上で LabView によるプログラムで行っており、このプログラムで制御している信号を DA/AD ボードのアナログ出力から出力している。

2-2-3 粒子位置変位計測法

光ピンセットで捕捉し、振動運動させる粒子にかかる力を計測するためにはレーザービームの焦点位置と捕捉粒子の重心位置の距離を求めることが必要となる。本項では、捕捉粒子の重心位置計測法について述べる。

光ピンセットで捕捉した粒子の画像を、リレーレンズ光学系を用いて拡大し、CCD カメラ(WAT-902, Watec)で撮像した(図 2-6(a))。撮像した画像は、PC 上で NI Vision を用いて粒子重心位置を計測した。まず、画像中から光ピンセット捕捉粒子を含む関心領域(ROI)で、粒子画像を切り出す(図 2-6(b))。ガウシアンフィルタによって画像のノイズを除去した後に 2 値化(b)し、内部を穴埋めして(図 2-6(c))、特定の大きさの対象物を抽出(図 2-6(d))することで、粒子画像を切り出した。この画像から粒子重心座標を計算し、その座標を粒子位置とした。

粒子振動運動制御と粒子位置計測を同時に処理できるプログラムを Lab View で作成し、時間、出力信号値、粒子重心位置座標を記録した。

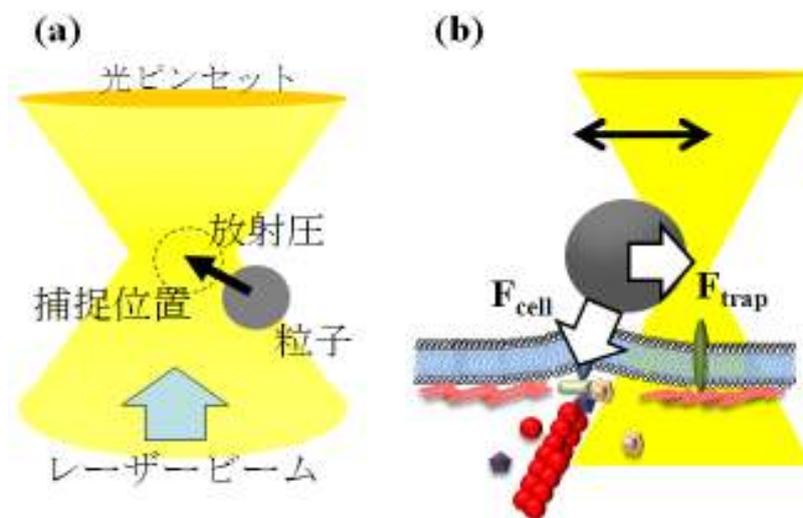


図 2-4 : 光ピンセット細胞触診システムの概要

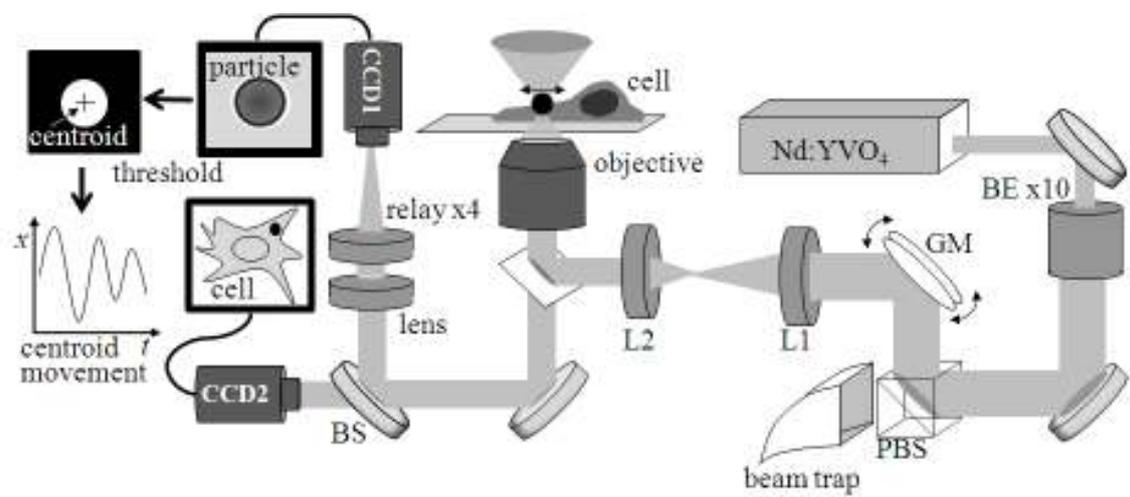


図 2-5：細胞触診用光ピンセットシステムの装置概要

BE：ビームエキスパンダ GM：ガルバノミラー L1,2：ミラー,レンズ
 PBS：偏光ビームスプリッター BS：ビームスプリッター

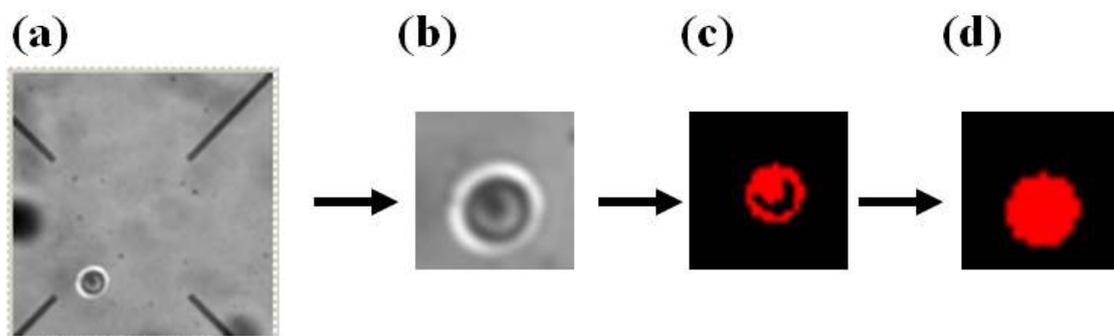


図 2-6 : 画像処理による粒子重心位置計測

a)撮像された粒子画像 b)関心領域(ROI)の抽出 c,d)粒子画像の切り出し

2-3 力計測のための光ピンセットバネ定数計測

光ピンセットで捕捉した物体にかかる力を計測するには、物体と光ピンセット用レーザービーム焦点位置との距離と光ピンセットのバネ定数が必要となる。本節では、光ピンセットバネの定数の計測原理、手法、結果について述べる。

光ピンセットの捕捉力を評価するバネ定数について、次のような理論が成り立っている。光ピンセットのトラップ位置にある粒子は周囲の媒質分子がランダムに衝突することで常に微小に運動している。また、光ピンセットで捕捉した粒子はバネに重りをつけた状態としてみなすことのできるため、捕捉物体の変位を x 、バネ定数を K とすると、ニュートン運動方程式は、次のランジュバン方程式で与えられる。

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -Kx - \zeta \frac{dx}{dt} + F(t) \quad (5.1)$$

ここで、 m は粒子質量、 ζ は媒質の粘性抵抗、 $F(t)$ は媒質分子の衝突によって粒子に及ぼされる力である。粒子がブラウン運動するとき、大きさも符号もまちまちの力 $F(t)$ のため、物体は正の方向や負の方向に動き続け、その動きもまちまちとなる。式(5.1)の微分方程式の解を求め、解 x の分布密度を求めるとガウス分布となり、この解 x の分布密度の分散は $k_B T / K$ になる。

これを求めるために、式(5.1)の両辺に x を掛けて、以下の各関係式

$$v = dx / dt$$

$$x dv / dt = x d^2 x / dt^2 = (1/2) \cdot d^2(x^2) / dt^2 - (dx / dt)^2$$

$$xv = x \cdot dx / dt = (1/2) \cdot d(x^2) / dt$$

を使い変形を行うと、

$$\frac{m}{2} \frac{d^2(x^2)}{dt^2} + \frac{\zeta}{2} \frac{d(x^2)}{dt} + Kx^2 = mv^2 + xF(t) \quad (2-5)$$

が得られる。この式の両辺の平均をとって

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (\text{運動エネルギーに対する等分配則})$$

$\langle F(t) \rangle = 0$ を考慮し、 $y \equiv \langle x^2 \rangle$ と書くとすると、

$$\frac{m}{2} \frac{d^2 y}{dt^2} + \frac{\zeta}{2} \frac{dy}{dt} + Ky = k_B T \quad (2-6)$$

の形の、新しい微分方程を解く問題に帰着する。この式の解は、

$$y = A_1 e^{-\alpha_1 t} + A_2 e^{-\alpha_2 t} + \frac{k_B T}{K} \quad (2-7)$$

となる。ここで A_1 、 A_2 は定数で α_1 、 α_2 は、

$$\alpha_1 = \frac{\beta + (\beta^2 - 8\omega_0^2)^{1/2}}{2} \quad (2-8a)$$

$$\alpha_2 = \frac{\beta - (\beta^2 - 8\omega_0^2)^{1/2}}{2} \quad (2-8b)$$

で与えられる。 $[\beta^2 - 8\omega_0^2]$ の正負のいかに問わず、 t の十分大きい値に対しては、式(2-7)の最初の2項は減衰してしまって、

$$\frac{1}{2} K y = \frac{1}{2} K \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (2-9)$$

が成り立ち、 x の分散が $k_B T / K$ になることが分かる 64。

この理論を用い、光ピンセットで捕捉した粒子の重心位置変化の分散を計測し光ピンセットのバネ定数を求めた。この時、光ピンセット光学系の $\lambda/2$ 板を回転させ光ピンセット用レーザーの強度を変化させ、各レーザー強度におけるバネ定数を評価した。

バネ定数測定用粒子サンプルは、次のように作成した。

- (1) 洗浄した 22x26 mm カバーガラスをエアブローアーで風乾
- (2) このカバーガラスの両端にトップコートを塗布、静置し乾燥させる
- (3) 洗浄した 18x18 mm カバーガラスをエアブローアーで風乾
- (4) 18x18mm カバーガラスを 22x26mm カバーガラスの上に乗せる
- (5) ミリ Q 水で適当な倍率に希釈した粒子溶液 20ml を両カバーガラスの隙間に注入する
- (6) 18x18mm カバーガラスの四方をトップコートで覆う

光ピンセットバネ定数計測用サンプルの概要図を図 2-7(a)に示す。本実験では、直径 $2\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ(日新 EM)をミリ Q 水で 1 万倍に希釈したものをを用いた。粒子画像は、リレーレンズ光学系で4倍に粒子を拡大し CCD カメラで撮像し、撮像条件は露光時間 1/1000 秒、画素サイズ 33.3 nm/pixel である。計測条件は、サンプリング間隔 2m 秒、粒子重心位置計測回数 6360 回である。バネ定数計算条件は温度(T)を 273 k、ボルツマン定数(k_B)を 1.38×10^{-23} J/k とした。これらの条件でのバネ定数計測結果を図 2-7(b)に示す。本計測では、ガルバノミラー自身の発振による計測ノイズをさけるため、ガルバノミラーを介さない光学系を用い、顕微鏡系までレーザービームを導いた。

測定結果より、光ピンセットバネ定数はレーザー強度に依存していることが分かる。本研究では、この光ピンセットバネ定数計測結果の線形領域内すなわち、レーザー強度 0 ~ 150 mW、 $\lambda/2$ 板回転角度 $140^\circ \sim 160^\circ$ の範囲内で用いる 2-7(c)。これは、計測結果よりレーザー強度 150 mW 以上では計測結果のばらつきが多く細胞触診結果の解析に用いることが困難であるゆえである。これはレーザー強度が高い場合、粒子位置変位は微小であり、粒子位置計測分解能が不足しているためバネ定数計測値がばらつくことが考えられる。また、レーザー強度が高い範囲ではレーザーによる粒子周囲の温度が変化したため、計測値に影響が出たとも考えられる。レーザー強度が高い範囲での計測値のばらつきの原因はいくつか考えられるが、計測結果の線形範囲で細胞触診を行うことで細胞力学特性の計測を性格に評価する。

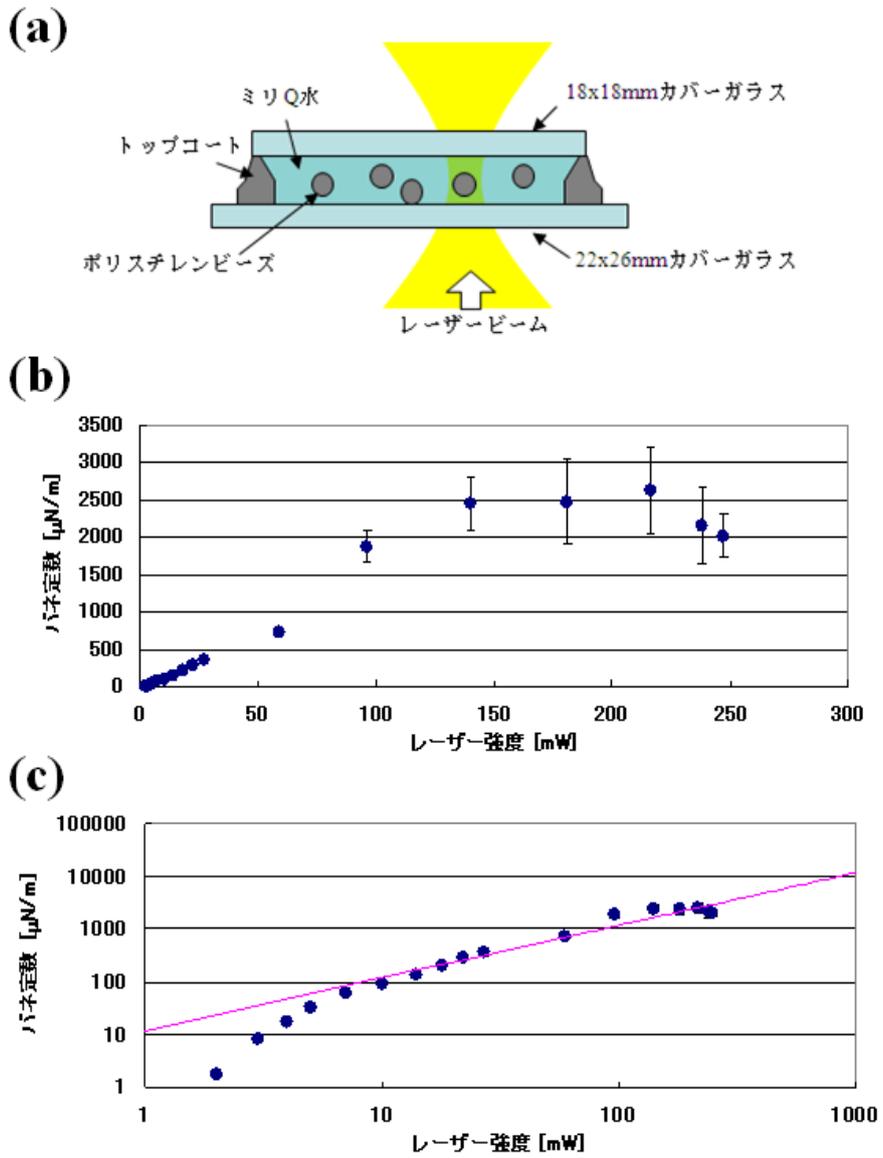


図 2-7：光ピンセットバネ定数計測方法と結果

(a) バネ定数計測実験系概要 (b) バネ定数計測結果

(c) バネ定数計測結果(両対数グラフ)

● 計測結果 — 一次の関係を表す直線

2-4 細胞 - 基質間接着を介した細胞局所強度計測

本節では実際に細胞に接着させた粒子を用いた細胞局所強度計測結果を述べる。本研究では動物培養細胞を用い、細胞に接着させる粒子は細胞外基質の一種である type-1 コラーゲンを表面に修飾したものをを用いた。2-4-1 では本研究で使用した動物細胞の培養方法 2-4-2 では粒子のコラーゲン修飾法について述べる。2-4-3 では細胞力学特性計測プローブであるミクロンサイズの粒子を細胞に接着させる手法について、2-4-4 ではその結果について言及する。

2-4-1 強度計測細胞の培養と調整

本研究では、測定対象の動物培養細胞としてマウス繊維芽細胞(Balb-3T3)を用いた。繊維芽細胞(Fibroblast)は、真皮内にあり皮膚の機能を保つ上で最も重要な細胞である。正常組織ではめだった機能は有しないが、損傷が加わると損傷部位に遊走し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生をはじめ結合組織の固有細胞である。その中でもマウス繊維芽細胞 3T3(3 days, transfer, 3×10^5 cells/50mm dish)の一種 Balb-3T3 は、接触阻害能が高く、培養が最も容易で Confluent な状態でも自然形質転換巣が形成されにくい性質を持つ。よって、細胞触診システムの確立を目指すことが目的である本研究には、性質の安定性、培養のしやすさ、細胞接着のしやすさ等の点から見て適した細胞株である。Balb-3T3 細胞の培養は次のように行った。

培養用試薬は、動物細胞培養用培地 DMEM Low Glucose(GIBCO)に血清として 10%の FBS(GIBCO)と抗生物質として 1%のペニシリンストレプトマイシン(GIBCO)を添加したものをを用いた。 -80°C で 1ml のセルバンカーに凍結保存されている Balb-3T3 細胞を解凍し、クリーンベンチ内で 4ml の培養用培地を採取したコーニングチューブに全量に移した。1,500 rpm、室温、5 分間遠心分離し、上清を除去後、 37°C 、5% CO_2 の条件で培養を開始した。その後、2 日間隔で新鮮な培地に交換し、80%飽和状態に達したところで継代を行った。

細胞触診用サンプルは直径 35mm のガラスボトムディッシュに細胞を播種したものをを用いた。このガラスボトムディッシュは通常の細胞培養皿の中心にカバーガラスが敷いてあり、顕微鏡観察に適したものである。本研究では光ピンセット用にレーザービームの屈折率を考慮しカバーガラスの厚さが 0.08 – 0.12mm のものをを用いた(松浪硝子)。また、細胞接着を起こすために細胞をガラスボトムディッシュに播種する前に、あらかじめ 0.01%コラーゲン(Cell matrix Type I - C, 新田ゼラチン)で 30 分、ディッシュ底面をコーティングした。

2-4-2 粒子へのコラーゲンコーティング

本研究では、ポリスチレンビーズの表面に、共有結合により type-1 コラーゲンを結合させ、この粒子を細胞に接着させることで、細胞 - 粒子間に細胞 - 基質間接着を形成させ、

その物理的な性質を計測している。ポリスチレンビーズへのコラーゲンの修飾は、Suzukiらの方法⁶⁵を用いた。この方法では、粒子表面のカルボキシル基とタンパクのアミノ基の両方と結合できる 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC)を、架橋剤として用い、タンパクと粒子間を共有結合による架橋で結んでいる。この手法によるコラーゲン処理を行うため、ポリスチレンビーズは表面をカルボキシル基で覆われている直径 2 μ m(5% w/v, Spherotech)のものを用いた。

500 μ l の粒子溶液に 1ml の 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.6)を加え、10,000rpm で 5 分間遠心分離、上清除去し洗浄した。これを 4 回繰り返して、粒子を洗浄した後、20 mM sodium phosphate buffer (pH 4.5)で再度 4 回洗浄した。この粒子は、625 μ l の 20 mM sodium phosphate buffer (pH 4.5)に懸濁し、1 分間超音波洗浄機につけ均一な粒子溶液になるよう処理した。これに、625 μ l の 2% (w/v) EDC 溶液(20 mM sodium phosphate buffer(pH 4.5))を添加し、室温で 3 時間半ゆっくりと混合させた。この粒子溶液を、10,000rpm で 7 分間遠心分離し、上清除去後、0.1 M borate buffer (pH 8.5)で 4 回洗浄した。遠心分離、上清除去後、粒子を 700 μ l の solution A (0.1 M borate buffer (pH 8.5), 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM ATP)に懸濁し、30 秒間超音波洗浄機内でソニケーションさせた。この粒子溶液に、300 μ g の type-1 コラーゲン(新田ゼラチン)を含む 500 μ l の solution A を添加し、室温で一晩混合させた。50 μ l の 0.25 M ethanolamine を添加し、30 分間混合させることで架橋形成反応を停止させ、10,000rpm で 7 分間遠心分離後、1.2 ml の solution A containing 10 mg/ml BSA で 3 回洗浄し、遠心分離後の粒子沈殿を 1 ml の stock solution (150 mM NaCl, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM ATP, 10 mg/ml BSA, 0.5 % (v/v) glycerol and 0.1% (w/v) NaN₃)に懸濁し、4 度で保存した。4 度の条件で約 6 カ月安定といわれている。計測実験には、この粒子溶液を PBS(-)で 1000 倍希釈したものを持ち、実験直前に必要量だけ希釈した。

2-4-3 細胞 - 粒子間接着形成の方法

細胞接着構造を介して細胞局所強度を計測するため、コラーゲンでコーティングした粒子を細胞表面に接着させ、粒子 - 細胞間に細胞 - 基質間接着を形成させる。本項では、2-4-2 で作製したコラーゲンコーティング粒子を光ピンセットで捕捉し、細胞表面の任意の場所に接着させる方法を示す。

- (1) 細胞サンプルの培地を除去し、PBS(-)液で 2 回洗浄する。
- (2) 細胞培養用培地を 2ml 添加し、PBS(-)液で 1000 倍に希釈した粒子を 100 μ l 添加し、CO₂ インキュベーターで 1 時間静置し、粒子を細胞近傍まで沈める。
- (3) 細胞近傍にある粒子を光ピンセット用レーザービームで捕捉する。
- (4) 対物レンズの高さを調節することでレーザービーム焦点位置を z 軸方向に操作し、粒子が細胞に押し付けられるまで、粒子位置を z 方向に操作する。
- (5) 粒子を細胞に押し付けた状態で、1 分間放置し再度 z 軸正方向へレーザービームを

操作し、捕捉している粒子が追従してこないことを観察することで、粒子が細胞に接着していることを確認する。

- (6) 再度レーザービーム焦点深度を元の位置に戻し、計測システムを作動させる。

ここで、対物レンズの高さ調節は、ピエゾアクチュエーターにより制御しており、粒子押し込み量、引き戻す量は一定値で行っている。

2-4-4 細胞接着を介した細胞局所強度計測結果

2-4-3 で細胞に1分間接着させた粒子を、2-1 で構築した光ピンセット光学系を用いて一定方向、一定振幅で振動運動させ、粒子接着領域での細胞局所強度を計測した結果を本項で示す。粒子振動運動は、光ピンセット光学系ガルバノミラーを正弦波信号で動作制御することで、光ピンセット用レーザービーム焦点位置をx-y平面上でx方向に一定振幅で正弦波様に動かし、このレーザービームで捕捉している粒子も同様に振動運動させた。細胞に接着していない状態での粒子振動運動時の粒子重心位置の軌跡を図2-8(a)に示す。図2-8の振動運動条件は、振幅500nm、周波数0.5Hz、レーザー強度140mWである。細胞に接着させていない粒子では、レーザービームの動きに追従し、同様な振幅、周期で振動運動している。

図2-8(b)は、2-4-3の方法で細胞に接着させた粒子を非接着時と同様な条件で振動運動させた時の、粒子重心位置軌跡を示している。細胞接着粒子では、レーザービームと同様な振動運動をするが、振幅が減少した。これは、粒子が細胞に接着することにより起こる現象で、接着部位での粒子運動に対する細胞からの応力により、接着粒子の運動が抑制されていると考えられる。この時、この粒子にかかる力は、非細胞接着粒子の振幅と接着粒子の振幅の差と光ピンセットバネ定数により算出でき、一回の振動運動につき、一つの力を計測できる。また繰り返し粒子を振動運動させることにより、継続的に力を計測することが可能である。

このように、細胞に接着させ、振動運動させることで粒子は細胞から物理的な力を受け、その力を本計測系で評価可能であることが分かった。次節では、接着した粒子を介した細胞強度計測法を力学的なモデルにより解析し、計測法の物理的な計測原理を解析する。

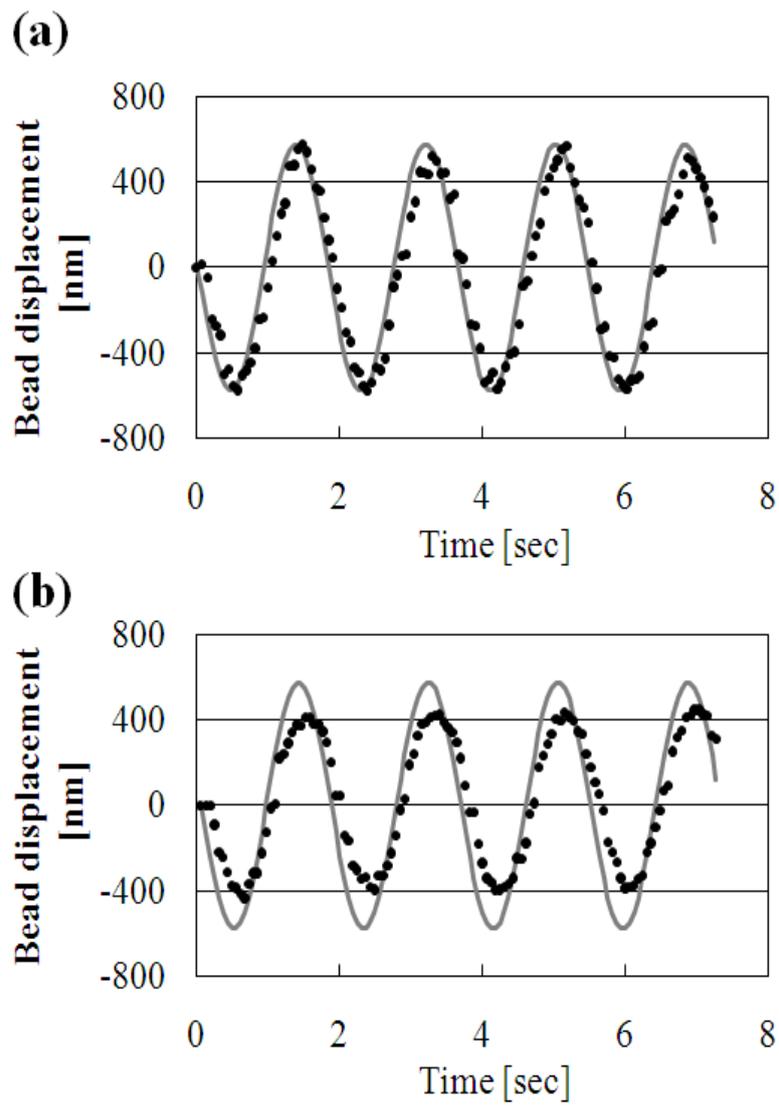


図 2-8 : 細胞接着粒子振動運動時の粒子重心位置軌跡計測結果

2-5 細胞局所強度計測の物理モデル解析

物理的な性質の計測では、計測系により何が、どのように計測されているのか正確に解析されている必要があり、本計測系でも計測原理の正確な理解が必要となる。そこで本節では、これまでに構築してきた細胞局所強度計測法の物理的な計測原理について言及する。計測系原理の解析には、細胞接着粒子の振動運動時の物理モデルを構築し、どのように細胞局所強度を計測しているのか解析する(2-5-1)。また、この物理モデルを用いて、粒子の振動運動の運動方程式を確立し、構築した物理モデルの妥当性を評価する(2-5-2)。2-5-3 では、粒子振動運動の運動方程式を用いて、計測系の物理的な検討を行う。

2-5-1 細胞接着粒子を用いた局所強度計測法の物理モデル

2-2-1 でも言及したが、本研究で開発している計測系は、細胞に接着した粒子を光ピンセットで振動運動させることで、細胞の局所的な強度を計測している。この時の粒子運動の概念図を図 2-9 に示す。

粒子は、ある点 P で細胞と細胞 - 基質間接着により接着している。また、2-1-1 で示したように、光ピンセットで捕捉された粒子では、レーザービームの放射圧は粒子表面に対し垂直方向にのみ働いており、粒子の水平方向へのすべり運動は放射圧により制限されるが、粒子の回転運動を止める力はない。このため、点 P で細胞に接着した粒子を光ピンセットで細胞平面と平行方向に動かすと、粒子は回転運動をする。この時、細胞膜は点 P で、粒子表面のコラーゲンと結合しているインテグリンを介して、巻き上げられ、この巻き上げ量(h)に応じた力(F_{bead})を粒子からもたらされる。一方細胞膜は、この巻き上げ量に応じた、弾性体としての応力(F_{cell})を粒子に働かせることになる。この F_{cell} は、粒子が光ピンセットから受ける力(F_{trap})と釣り合っている。すなわち、粒子が細胞に接着している点 P の強度により、粒子の振動運動は制限され、それが振動運動振幅の減少につながる。言い換えれば、粒子振動運動の振幅の減衰量を評価することで、接着点 P により巻き上げられる範囲の細胞膜強度を評価することができる。

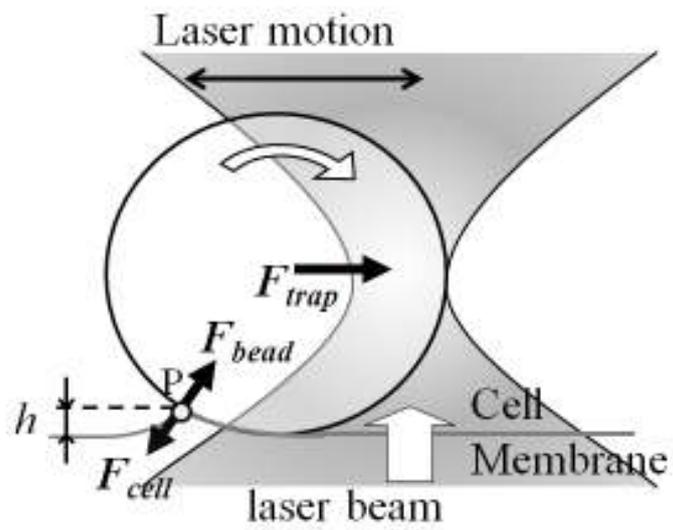


図 2-9 : 細胞接着粒子の振動運動概念図

2-5-2 細胞接着粒子振動運動の運動方程式

2-5-1 で示した細胞接着粒子の力学モデルを基に、粒子振動運動の運動方程式を導いた。このときの条件は、粒子半径を r 、粒子回転角度を θ 、振動運動の振幅を a とする。

粒子が回転角度 θ だけ回転運動したとき、粒子が巻き上げた細胞膜の高さ h は、

$$h = \frac{1}{2} r \theta^2 \quad (2-10)$$

となり、その時の粒子の運動量 x は、

$$x = r \theta \quad (2-11)$$

となる。

この時の粒子振動運動による細胞変形量に比例する細胞が粒子に与える応答力の比例定数 Y とすると、細胞の細胞変形に対する粒子への応答力 F_{cell} は、

$$F_{cell} = \frac{1}{2} Y r \theta^2 \quad (2-12)$$

となり、さらに粒子重心へかかる力 F_{bead} は、

$$F_{bead} = F_{cell} \sin \theta = \frac{1}{2} Y r \theta^3 \quad (2-13)$$

となる。式 2-11 を用い F_{bead} を変形すると、

$$F_{bead} = \frac{1}{2r^2} Y x^3 \quad (2-14)$$

となる。

また、粒子が光ピンセットから受ける力 F_{trap} は、

$$F_{trap} = \{a \sin(\omega t) - x\} k \quad (2-15)$$

となる。ここで、 ω は粒子の振動運動の角速度、 t [s] は時間、 k [μ N/m] は光ピンセットバネ定数である。

また、粒子重心位置で粒子が細胞粘性抵抗から受ける力 $F_{\eta_{cell}}$ [Pa \cdot s] は、

$$F_{\eta_{cell}} = r \eta_{cell} \frac{dx}{dt} \quad (2-16)$$

となる。ここで、 η_{cell} [Pa・s]は粒子接着点における細胞粘性抵抗を示す。

さらに、粒子は接着している細胞からのみならず、周囲の環境からの作用を受ける。その中でも特に、媒質の粘性抵抗を受けている。ストークスの定理により、

$$6\pi\eta_{med}r \frac{dx}{dt}$$

となり、ここで η_{med} [mPa・s]は培養用培地の粘性抵抗を示す。

粒子が光ピンセットから受ける力は、粒子が細胞および外環境から受ける力は運動量保存則により、つり合っている。これを基に細胞接着粒子振動運動の運動方程式は、ニュートンの運動方程式より、

$$k\{a \sin(\omega t) - x\} = m \frac{d^2x}{dt^2} + 6\pi\eta_{med}r \frac{dx}{dt} + r\eta_{cell} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{2r^2} Y(x + X_0)^3 \quad (2-17)$$

となる。ここで、 X_0 は、細胞自身の運動による粒子重心位置のずれ量である。

この運動方程式の妥当性を検証するため、4次ルンゲクッタによりこの運動方程式を数値的に解き、細胞接着粒子振動運動の粒子軌跡にフィッティングさせた。光ピンセットバネ定数 k を $964\mu\text{N/m}$ 、レーザービーム振幅 a を 500nm 、粒子回転運動角速度を $\omega=4.18\text{rad/sec}$ 、粒子半径を $r = 1\mu\text{m}$ 、培地粘性抵抗を $\eta_{med}=0.001\text{mPa}\cdot\text{s}$ 、そして $X_0 = 0$ とし、細胞のもつ力学特性[Y]、細胞粘性抵抗 $[\eta_{cell}]$ および細胞動的な性質によるずれ量 $[X_0]$ の数値を変化させ、細胞触診測定結果と数値解析による計算値の平均誤差[RMS]が最小となるように変化させている各パラメータ値を決定した。

その結果を図 2-10 に示す。この時の各パラメータの値は、細胞のもつ力学特性 $Y=848\text{N/m}$ 、細胞粘性抵抗 $\eta_{cell} = 5.8\text{Pa}\cdot\text{s}$ および細胞動的な性質によるずれ量 $X_0 = 876\text{nm}$ であった。この時、RMS は 6.56nm であった。

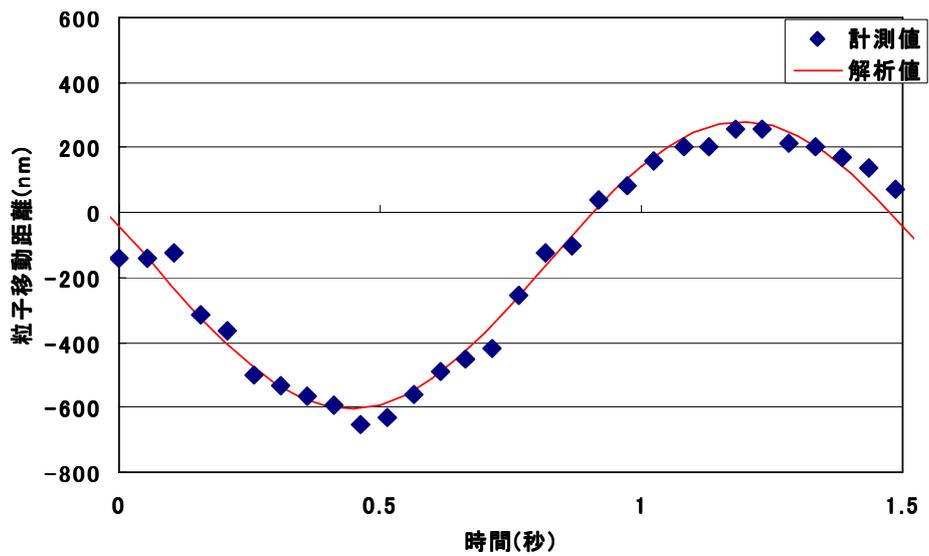


図 2-10：粒子振動運動の運動方程式の数値解と実測値とフィッティング結果

◆：実測値 赤線：数値解

2-5-3 粒子振動運動の運動方程式による細胞粘性と計測強度との関係

2-5-2 で構築した、細胞接着粒子振動運動の運動方程式により、本計測系は細胞の力学的な特性と粘性抵抗により影響を受ける可能性が示唆された。本項では、細胞の粘性抵抗 η_{cell} が細胞局所強度計測にどのような影響を与えるのか、前項で確立した運動方程式を用いて解析した。

解析方法は、光ピンセットバネ定数 k を $964\mu\text{N/m}$ 、レーザービーム振幅 a を 500nm 、粒子回転運動角速度を $\omega=4.18\text{rad/sec}$ 、粒子半径を $r=1\mu\text{m}$ 、培地粘性抵抗を $\eta_{\text{med}}=0.001\text{mPa}\cdot\text{s}$ 、そして $X_0=0$ とし、細胞粘性抵抗 $[\eta_{\text{cell}}]$ を 0 から 20 まで変化させた時の、振幅減衰量と力学特性 $[Y]$ の数値を評価した。その結果を図 2-11 に示す。これにより本計測系において、細胞粘性抵抗は、粒子振動運動振幅減衰、力学特性に影響を及ぼさないことが分かった。また、振幅減衰量と力学特性 Y の関係の近似曲線は、3 次関数となった。ゆえに振幅を計測することで細胞局所の力学的な性質を推定することができる。

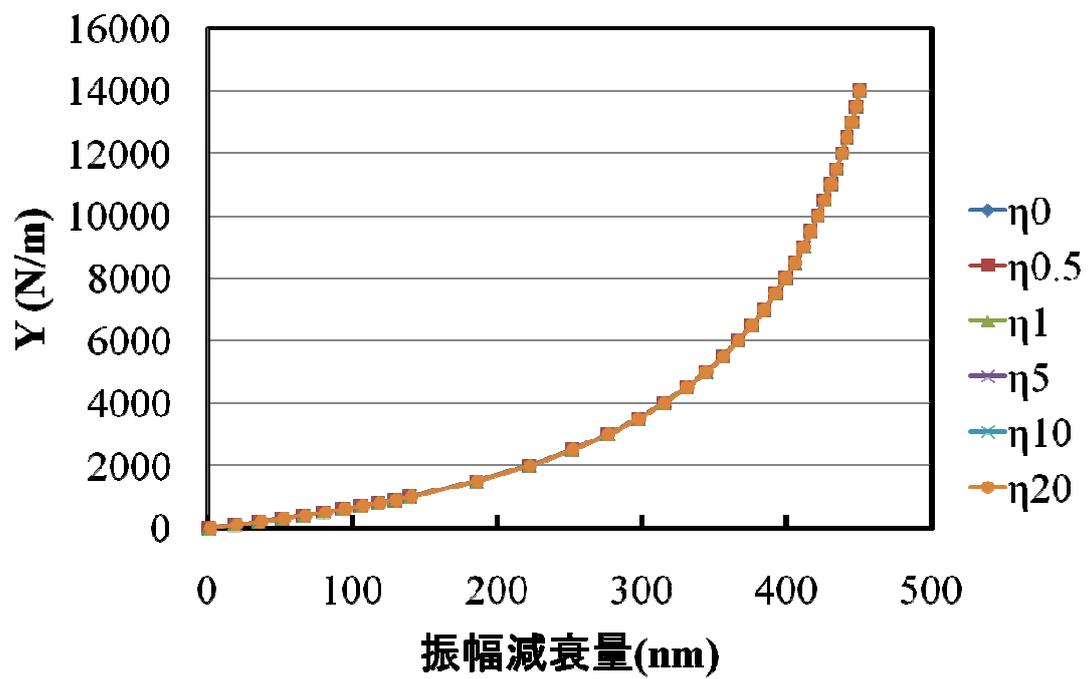


図 2-11：細胞粘性抵抗と細胞強度との関係

2-6 まとめ

本章では、本研究で開発した、光ピンセットを基盤とした細胞局所強度計測法について言及した。細胞局所強度計測において、細胞機能の物理的な性質と分子メカニズムとの関係を明らかにするには、1. 細胞上の自由な計測部位の選択、2. 高感度な力変化計測、3. 動的な物理的性質変化そして4. 計測法の物理的原理が明確であることがひとつようである。

本計測系は、光ピンセットを技術基盤とし、捕捉した粒子を用いてその粒子接着部位の強度を計測するため、1. 計測場所の自由な選択を満たしている。また、本計測系は、細胞に接着させた粒子を振動運動させることで、その粒子に細胞から働く力学的な性質を計測しており、一回の振動運動で一つの特性を評価できる。そのため、継続的に振動運動させることで、その特性の時間的な変化を計測することができる。よって、3. 動的な物理的性質変化の計測を可能にする。さらに、本章 2-5 で、本計測系の物理的な計測原理を検討し、計測原理の物理モデルが妥当であることを示した。本計測系は、光ピンセットで捕捉した細胞接着粒子を振動運動させることで、粒子が巻き上げることが可能な細胞表面の物理的な性質を計測していることが分かった。これにより、4. 計測法の物理的原理が明確であることを解決している。2. 高感度な力変化計測については、第4章で述べるが、この高感度な力計測という課題も本計測系では、十分に満たせている。よって、本研究で開発した光ピンセットを基盤とした細胞局所強度計測法は、細胞機能の物理的な性質と分子メカニズムとの関係を解明する有効な手法であると言える。

本計測系は、一回の振動運動で一つの特性を決めることができる。また、継続的な振動運動によりその特性の時間的な変化を計測することができる。粒子振動運動を介したこの計測系は、細胞に対して機械的な刺激を与えることになる。細胞は、外環境からの機械的な刺激に対して応答する機能をもっており、特に細胞接着に関してはインテグリンがメカノセンサーとしての機能を持つ。よって、細胞外からの継続的な機械刺激は、細胞性質変化をもたらすと考えられる。そのため、一回の振動運動と、継続的な振動運動によって計測される強度は区別する必要がある。ゆえに、本計測系は、単一局所強度決定と局所強度の時間変化計測の2つの計測法を持つことになり、今後、前者を **Mode I**、後者を **Mode II** と呼ぶことにする。

ここで、本計測系で評価している細胞 - 基質間接着の物理的な性質について定義する。本計測系では、細胞に接着させた粒子を光ピンセットで振動運動させ、その時に接着分子、構造と共に巻き上げることができる細胞表面構造の弾性的な性質を評価している。よって、細胞接着に関しては、粒子 - 細胞間の接着分子の数や内部の接着構造、そしてアクチンフィラメントと接着構造、細胞膜との相互作用が細胞表面構造の弾性的な性質に影響を与えていると考えられる。接着分子の増加、接着構造の強化により、粒子が巻き上げることが

できる細胞表面の面積が増え、結果として計測強度の上昇として評価される。ゆえに、計測結果は、細胞接着構造の物理的な性質を、細胞局所の弾性的性質すなわち強度として計測していると、ここでは定義する。

第 3 では、Mode I を使用した細胞 - 基質間接着の物理的性質の評価方法について、第 4 章では、Mode II の特性を活かした、細胞 - 基質間接着の物理的性質の動的な変化の検出について調べた結果を示す。

第3章 細胞 - 基質間接着の物理的性質評価

第2章で述べたように、本研究で開発した細胞局所強度計測系は、2つの計測 Mode があり、それぞれの Mode で異なる物理量を計測することができる。Mode I では、一回の粒子振動運動で、一つの物理量を決定でき、Mode II とは測定系による細胞の機械的刺激に対する応答の面で異なる。本章では Mode I を用いて細胞 - 基質間接着の物理的な性質を定量評価し、その際に計測条件によりどのような影響を及ぼされるか検討した。

3-1 で細胞接着形成条件と計測強度との関係を、さらに、3-2 では、細胞に弾性的な誠意質をもたすといわれるアクチンフィラメントの強度計測への作用を調べた結果を述べ、3-3 で本章をまとめる。

3-1. 細胞接着形成条件の細胞強度計測に与える影響

本計測系でカプローブマイクロビーズと細胞間には、細胞外基質-細胞間接着を形成させている。この細胞接着は、接着分子インテグリンを中心に、細胞接着関連分子からなる集合体構造をしている。この構造は、接着形成条件によりその構造そして形成速度などが異なる。C. S. Izzard らは、インテグリンと細胞外基質が結合した後、 $1\mu\text{m}^2$ 以下の initial adhesion が 60~90 秒以内に形成されることを示している⁶⁶。Initial adhesion は接着関連タンパクである、talin とアクチンからなり、細胞の辺縁部で形成される。この initial adhesion 形成後、細胞移動や接着に関連する vinculin が集積し、より複雑な構造である focal complex へと成長する^{66,67}。Focal complex は、細胞外基質と強固に結び付き、vinculin、paxillin そしてリン酸化タンパクなどを含むさらに複雑な構造へと変化する⁶⁸。さらに focal complex は大きくそして安定な構造へと変化し続け、さらに複雑な複合体構造である focal adhesion となる^{69,70}。この focal adhesion が細胞内で発生する細胞駆動力を伝達するに十分な構造となるには、接着形成開始後 60 分必要であることが知られている⁷¹。このように細胞-細胞外基質間接着は、形成時間によりその構造的性質が変化することが知られている (図 3-1)。

また、細胞外からの力印加もまた細胞-細胞外基質間接着形成に影響を及ぼすことも知られている。focal complex の形成には Rho の活性化が必要になるが、Rho 活性化は2つの異なる細胞接着分子機構を活性化する^{72,73}。それら分子機構は、Rho-associated kinase(ROCK) と formin homology protein mDial1 (a mammalian homologue of *Drosophila* Diaphanous protein)を介する経路である⁷⁴。ROCK を介する経路では、ミオシン軽鎖をリン酸化し、アクトミオシン相互作用を引き起こす。その結果、細胞接着部位に細胞内からアクトミオシン相互作用による力がかかる。しかし、細胞外から力が印加されると、ROCK を介する経路を迂回し

て、後者の mDia1 を介する経路が活性化される。この mDia1 経路では、profilin によるアクチン線維形成や細胞外力依存型細胞接着の成長が引き起こされる^{75,76}。このように、細胞外からの力印加によって細胞接着形成過程が変化し、本研究で使用する計測系では、カプローブマイクロビーズでの細胞外機械刺激および光ピンセットによるマイクロビーズの押しつけなどの力印加が、計測結果に影響を及ぼすことが考えられる。

そこで、本節では細胞接着を介した細胞局所強度計測における、細胞接着形成条件の影響を、カプローブマイクロビーズの細胞への接着時間(3-1-1)、接着の際の力印加(3-1-2)について調べた。

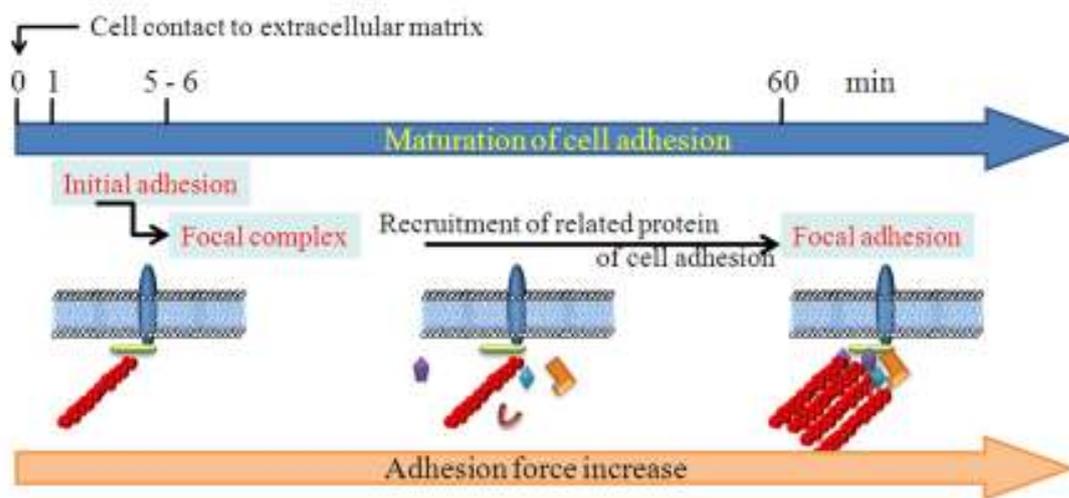


図 3-1 : 細胞接着形成過程と接着構造及び接着強度との関係の概要

3-1-1 接着形成時間の細胞強度計測に与える影響の計測法

本研究で使用する細胞強度計測法におけるカプローブマイクロビーズの細胞への接着時間の影響を調べるため、マイクロビーズ接着時間を変化させ、各接着時間で形成された細胞接着構造を介した細胞強度を計測した。特に本実験では、マイクロビーズ接着時間の調整が重要となり、これに関しては 3-1-1-2 で述べている。

3-1-1-1 細胞培養

実験 2 日前にマウス繊維芽細胞(Balb-3T3)をガラスボトムディッシュ(松浪ガラス,)で 37°C, 5% CO₂ の下培養した。使用したガラスボトムディッシュは、中央のガラス基板を 0.01% type-1 collagen in 0.01N HCl 500μl を滴下し、室温で 30 分あらかじめ修飾し、PBS(-) 2ml で 2 回洗浄したものをを用いた。

3-1-1-2 培養細胞へのコラーゲンコート粒子の接着

Balb-3T3 を培養しているガラスボトムディッシュから培養液を除去し、PBS(-) 2ml で 2 回洗浄し、ディッシュに残存している PBS(-)を完全に除去した。その後、PBS(-)で 50 倍に希釈した 100μl のプローブ粒子溶液をディッシュ中央のみに添加し、CO₂ インキュベータで 2 分間インキュベートし粒子を細胞に接着させた。非接着粒子の後からの細胞への接着を防ぐため、この段階で非接着粒子を PBS(-) 2ml で 2 回洗浄した。そして、接着している粒子に接着を形成・成長させるため 2ml の細胞培養液を添加し CO₂ インキュベータで必要時間インキュベートした。細胞培養液添加時を接着形成 2 分とし、その後 5, 10, 20, 30, 60, 90 分間インキュベートした。

一方、接着形成 0 分は細胞培養ディッシュに粒子溶液を添加し、光ピンセットで浮遊粒子をトラップ後、直接細胞膜表面に搬送し 1 分間押し当てることで粒子 - 細胞間に接着を形成させたものをを用いた(図 3-3)。

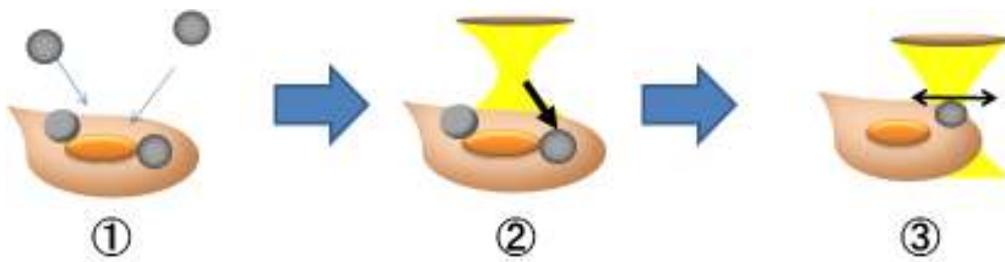


図 3-2 : 細胞接着強度計測方法プロトコル概念図
 ①細胞へのプローブ粒子接着、②接着粒子の光トラップ、
 ③トラップ粒子を用いた強度計測

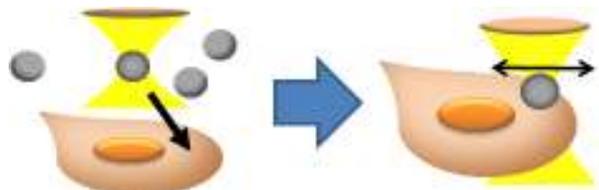


図 3-3 : 接着形成 0 分時の強度計測プロトコル概念図

3-1-1-3 細胞強度計測

接着時間 0 分の場合、1 分間の接着形成の後、細胞接着強度計測システムにより計測を開始した。また、その他の時間の場合、すでに接着している粒子を光ピンセットでトラップし、すぐに細胞接着強度計測システムにより強度計測を開始した。

計測方法は、細胞局所強度計測 Mode I を用い、一個の粒子につき、一つの細胞局所強度を評価した。また、計測粒子を選択する際に、同一細胞での計測を避けた。これは粒子加振運動による細胞への力学刺激により、細胞自身の性質が変化を回避するためである。

また、各細胞接着形成時間の強度計測において、個々の粒子での強度計測結果は統計的に処理した。

3-1-1-4 強度計測条件

強度計測用プローブ粒子はコラーゲン処理した直径 $2\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を用いた。またこの粒子捕捉および粒子加振運動は Nd:YVO4 レーザーを使用し、使用時のレーザー入射強度は 140mW とした。このときの光ピンセットバネ定数は $935\mu\text{N/m}$ である。また加振運動は、振幅 810nm 、周波数 0.5Hz で行った。粒子重心位置計測は、CCD カメラ(Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度 33msec/frame 、画素サイズ 21.19nm/pixel で行った。強度計測は、各接着時間につき $30\sim 40$ 細胞について計測した。

3-1-1-5 計測結果

第 2 章で開発した細胞強度計測システムによる、細胞接着時間 $0,5,10,20,30,60,90$ 分間ごとの細胞接着強度計測結果を図 3-4 に示す。この結果から、細胞接着強度は接着後 20 分間で急激に上昇し、約 30 分後には強度は頭打ちとなった。さらにその後は各時間において強度変化はなく安定な状態をとることが確認できた。

また各接着時間での接着強度のヒストグラムを図 3-5 に示す。この各接着時間の接着強度分布から、接着 30 分までは強度分布が右側にシフトしていることがわかる。30 分後の強度分布は $300\sim 600\text{pN}$ に集中している。また、60 分後の強度分布は $100\sim 700\text{pN}$ 、90 分後では $0\sim 700\text{pN}$ と広がり、30 分以後強度の増強とともに強度の減少もみられた。

3-1-1-6 考察

本項では、細胞 - 基質間接着を介した細胞局所強度計測において、粒子 - 細胞間接着形成時間が細胞局所強度計測にどのような影響を与えるのか評価した。その結果、粒子 - 細胞間接着形成時間と共に計測強度の変化がみられた。この変化は、接着開始後 20 分間で急速に上昇し、その後強度変化は安定化した。これにより、細胞接着構造の形成過程では、まず細胞は安定で強固な細胞 - 基質間接着を形成していることが分かる。細胞運動や形態形成に必要なアクチン相互作用による大きな力に耐えうるためには、早期に安定で

強固な構造へと成長する必要があるのかもしれない。

また、強度変化安定期(30~90分)の計測強度のヒストグラムより、その強度の分布は各計測時間で異なり、接着形成時間が増すほどに分布が広がり、低強度 - 高強度の分布に変化した。この強度分布から、接着形成 60~90 分後では、細胞接着強度の減少がおり、接着構造の崩壊が引き起こされ始めていることが推測できる。特に、計測した細胞接着粒子が細胞運動進行方向と逆方向に位置している場合、接着斑崩壊の影響を受けやすい。これは、細胞運動と細胞接着との関係によるものである。第 1 章でも記述したが、細胞接着はラメリポディアとよばれる細胞運動方向前方の縁で形成され、細胞運動により細胞の本体が移動するとその接着構造は細胞後部に位置する。後部に位置した接着構造は、細胞の支持体として機能するが、その構造を破壊されると細胞自身がさらに進行方向に動くことになる。このような細胞接着構造のターンオーバーが知られており、細胞運動方向とは逆に位置する接着構造を持つ粒子による強度計測は、その構造が崩壊もしくは減衰過程にあるとすれば、低い値を示すことになる。よって、接着形成後期では、細胞運動方向と計測部位との関係を考慮する必要があることが考えられる。

このように、粒子 - 細胞間接着形成時間は細胞局所強度計測に影響を与えるため、計測条件として考慮する必要がある。また、この性質は、接着強度の上昇速度を指標とした細胞間での性質の比較、異常細胞の識別や、分子メカニズムの解析等に利用することが可能である。

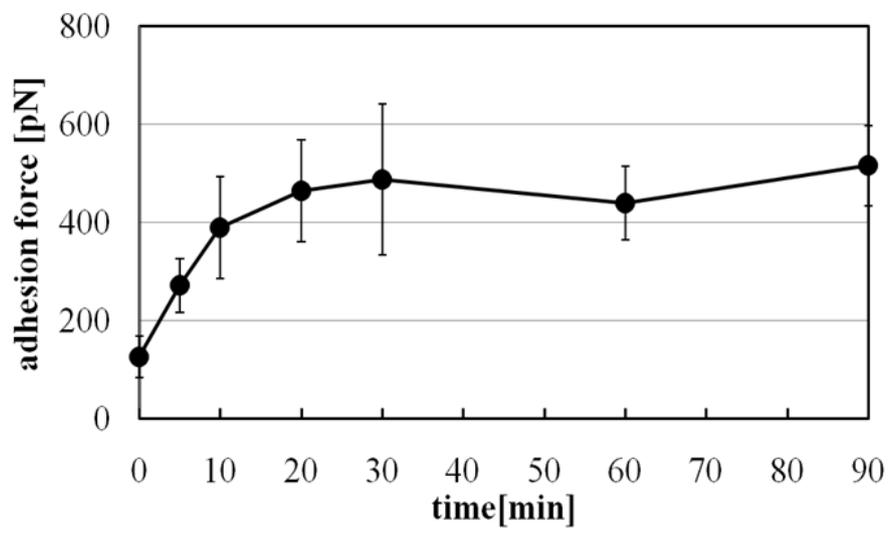


図 3-4 : 細胞接着形成時間ごとの接着強度計測結果

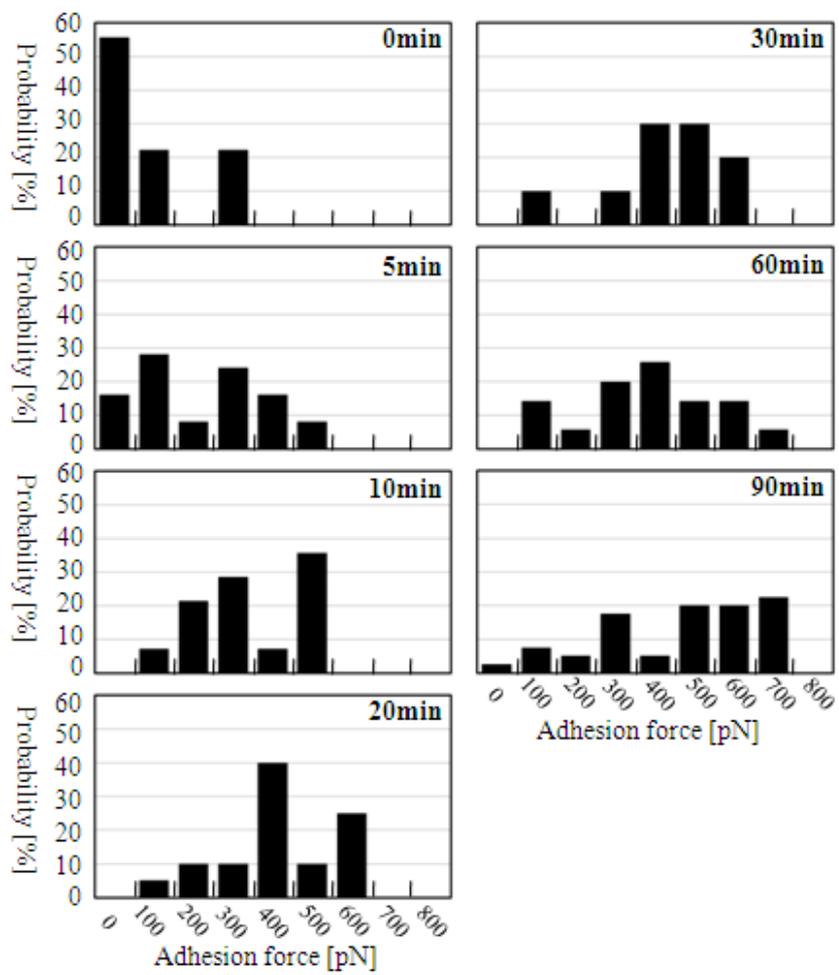


図 3-5：各接着時間における接着強度のヒストグラム

3-1-2 接着形成時の力印加による細胞強度計測への影響

本節では、細胞形成時の細胞外からの力印加による細胞強度計測に与える影響を調べるため、細胞へ力計測プローブマイクロビーズを接着させる際に光ピンセット用レーザーによる細胞への外力印加の有無、および接着時におけるレーザー強度の影響を計測した。細胞強度計測に与える影響として、外力印加による力計測プローブとしての粒子と細胞間の接着構造形成の成否、形成された細胞接着を介した強度および接着構造形成時間について調べた。

3-1-2-1 細胞培養

実験 2 日前にマウス繊維芽細胞(Balb-3T3)をガラスボトムディッシュ(松浪ガラス、)で 37°C、5% CO₂ の下培養した。使用したガラスボトムディッシュは、中央のガラス基板を 0.01% type-1 collagen in 0.01N HCl 500μl を滴下し、室温で 30 分あらかじめ修飾し、PBS(-) 2ml で 2 回洗浄したものをを用いた。

3-1-2-2 培養細胞へのコラーゲンコート粒子の接着

加圧を伴う接着形成は細胞培養ディッシュに粒子溶液を添加し、光ピンセットで浮遊粒子をトラップ後、直接細胞膜表面に搬送し必要時間押し当てることで粒子 - 細胞間に接着を形成させたものを用いた(図 3-3)。

外力印加の細胞接着形成への影響を調べるため、粒子の細胞への搬送、接触後 1 分間細胞に粒子を押し当て接着構造を形成させた。この 1 分間の接着の際に、粒子トラップレーザーの強度を 12、37、74、173、258 そして 283mW と変化させ、細胞への外力印加量と細胞接着形成との関係を調べた。

また粒子を細胞に押しつけ細胞-粒子間に細胞接着構造を形成させる際、光ピンセット用レーザーの強度を 0、22、140、247mW と変化させ、細胞接着形成における外力による加圧度合いと細胞強度計測の関係を計測した。

ただし、単一粒子で連続して各時間の強度測定をするのではなく、強度計測による機械的刺激に対する細胞応答による計測強度の変化を避けるため、一つの粒子につき設定した時間条件一つでのみ計測を行った。

3-1-2-3 細胞への外力印加の細胞接着構造形成への影響評価

外力と細胞接着構造形成との関係を調べるため、外力の印加量と接着構造形成成否、形成された接着構造を介した細胞強度との関係性を評価した。

接着構造形成成否は、光ピンセットによる粒子の細胞への接触、1分間の粒子の細胞への押し込みの後、全ての条件でレーザー強度を140mWに固定し顕微鏡対物レンズをピエゾアクチュエーターにより操作し、光ピンセット焦点位置を細胞表面からz軸方向に上昇させ、その際に光ピンセットで捕捉されている粒子の追跡の様子により評価した。粒子のz軸方向の引き上げの際、細胞接着が形成されていれば、接着した粒子は図3-6に示すように光ピンセット用レーザー焦点位置に追跡してこない。一方、接着形成の不成功および粒子引き上げ力で破断しうる未熟な細胞接着形成時には、光ピンセット用レーザー焦点のz軸方向への移動に伴い、接着粒子はレーザー焦点面に追跡する。接着時の各レーザー強度について10回接着形成実験を行い、接着形成成立率を求めた。

接着構造を介した細胞強度計測は、接着時間0分の場合、カプローブマイクロビーズの細胞への接触の後、細胞接着強度計測システムにより計測を開始した。また、その他の時間での計測において、非加圧の場合、すでに接着している粒子を光ピンセットでトラップし、すぐに細胞接着強度計測システムにより強度計測を開始した。一方加圧接着形成の場合、接着粒子はすでに光ピンセットによりトラップされているため、必要時間経過後、細胞強度計測 Mode Iにより計測を開始した。

また、各細胞接着形成時間の強度計測において、個々の粒子での強度計測結果は統計的に処理した。

3-1-1-4 強度計測条件

強度計測用プローブ粒子はコラーゲン処理した直径2 μm のポリスチレン粒子を用いた。またこの粒子捕捉および粒子加振運動はNd:YVO4レーザーを使用し、使用時のレーザー入射強度は140mWとした。また加振運動は、振幅810nm、周波数0.5Hzで行った。粒子重心位置計測は、CCDカメラ(Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度33msec/frame、画素サイズ21.19 nm/pixelで行った。強度計測は、各接着時間につき10細胞について計測した。

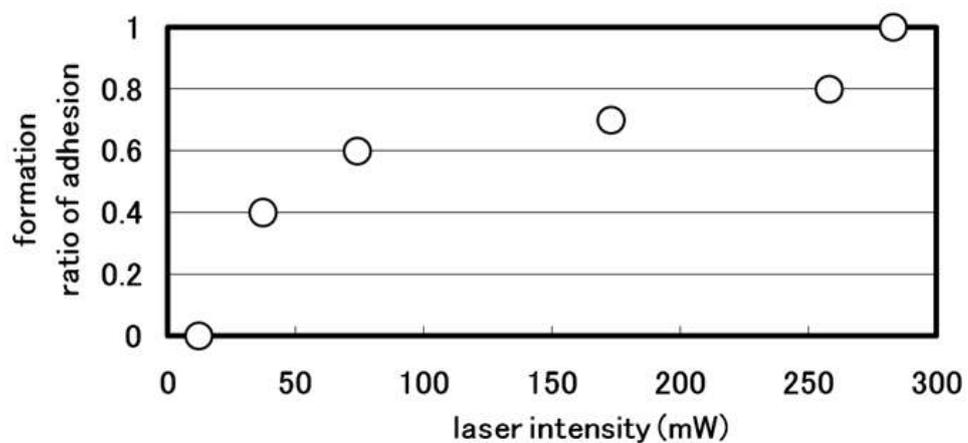
3-1-2-5 計測結果

図 3-7 において、細胞接着形成時の外力印加量の接着形成確率への影響を計測した結果を示す。この結果から、細胞接着形成確率は、レーザー強度 12mW 時には 0 であるのに対し、強度が 74mW に上昇する従い、急激に接着形成確率が上昇することがわかる。さらに 74mW 以上のレーザー強度でも、レーザー強度の増加と共に、接着形成確率は緩やかに上昇し、283mW では全ての粒子と細胞間に細胞接着が形成されていた。

また、細胞外からの力印加量の細胞強度計測に及ぼす影響を計測した結果を図 3-8 に示す。0mW および 22mW での接着形成時の外力印加では、計測した細胞強度では、有意な差は見られなかった。一方、140、247mW での外力印加条件での細胞強度は、0mW のものに比べ有意に増加しており、増加幅は 2 倍程度であった。また、147mW と 247mW では計測強度に差は見られなかった。

3-1-2-6 考察

本項では、細胞接着形成時の外力の影響を評価した。光ピンセットにより細胞に接着した粒子を 1 分間、レーザー強度を変えて外力を印加した結果、レーザー強度により形成される接着強度が変化した。また、140mW と 247mW での細胞局所強度に変化がないことから、外力による強度の増強には、ある程度の力が必要であり、その力閾値に応じた強度増強を示すのではないかと考えられる。レーザー強度を細かく振り分け、詳細な検討は必要であるが、それにより細胞が物理的な性質変化を起こす、外力の閾値を推定することが可能であり、細胞機能評価や分子メカニズムとの関係に新しい知見を与えることが可能になる。



energy(mW)	12	37	74	173	258	283
接着形成数	0	4	6	7	8	10
接着形成率	0	0.4	0.6	0.7	0.8	1

図 3-7 細胞接着形成時の外力印加量と細胞-粒子間接着形成との関係
 グラフ横軸は接着形成時の粒子捕捉レーザー強度、縦軸は接着形成成立確率を示す。

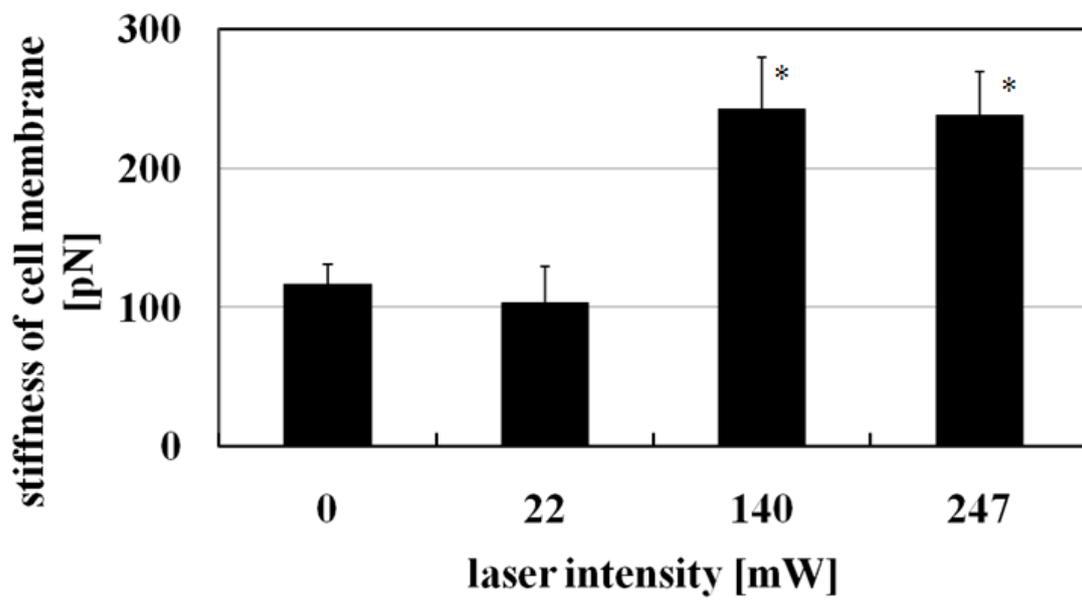


図 3-8 細胞接着形成時の外力印加量と計測強度の関係計測結果

3-2. アクチンフィラメントの細胞強度計測への影響

本節では、前章で構築した細胞強度計測法に対するアクチンフィラメントの影響を解析した結果を述べる。アクチンフィラメントは細胞骨格構成タンパクの一つで、細胞形態形成・保持や強度付与そして細胞運動などに関与しており、細胞強度との密接な関係は容易に考えられる。このほかに、本計測系では細胞接着を介して細胞局所の強度を計測しているため、細胞接着から本計測系に対し物理的な作用が働き、強度計測に影響をもたらす可能性がある。

図 3-9 では細胞接着を介した細胞局所強度計測に影響をもたらす因子について示す。前章で示した本計測系の強度計測の力学的モデルにおいて、接着粒子は細胞膜を巻き上げる運動を示した。よって本計測系は、この細胞膜巻き上げ運動により細胞膜および、細胞膜直下で膜の形態やシグナル伝達に関連している膜骨格や細胞膜裏打ちタンパクであるアクチンマイクロフィラメントや spectrin などによる細胞膜支持の影響を受けることが考えられる。

さらに細胞接着は、細胞内でアクチンフィラメントとミオシンの相互作用により発生する張力が細胞外に伝達される部位である。この張力は細胞形態形成や運動に必要とされる。この力が本計測系での細胞 - 粒子間接着部位に働くと、計測結果に影響を及ぼしている重要な要因であると推測可能である。

この他にも、接着形成タンパクの数や細胞膜構成脂質変化による膜脂質剛性の変化等様々な要因が考えられるが、本節では、細胞骨格としてのアクチンマイクロフィラメントと細胞 - 粒子間接着に直接働くアクチンフィラメントからの張力に焦点を絞り、それらの細胞局所強度計測に与える影響を調べた。3-2-1 では、アクチンフィラメントの力学的な細胞機能について、3-2-2 以降ではアクチンフィラメントの細胞強度計測系への影響評価の手法、結果について述べる。

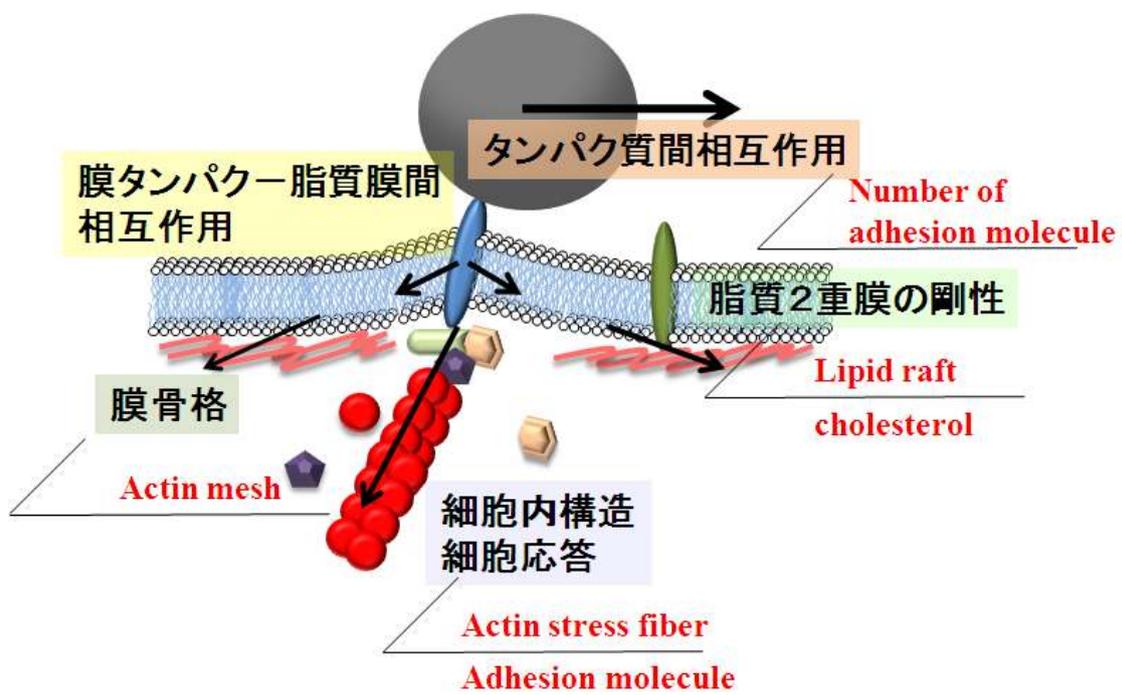


図 3-9 細胞局所強度計測に影響を及ぼす因子

3-2-1 細胞局所強度計測法に対するアクチンフィラメントの影響評価法

前章で確立した細胞局所強度に対するアクチンフィラメントの影響を評価するため、細胞強度とアクチンフィラメントの存在との関係および細胞内部でのアクトミオシン相互作用と細胞強度との関係について調べた。前者は、細胞内のアクチンフィラメント形成阻害によって、後者はアクトミオシン相互作用に関わるミオシン軽鎖リン酸化の阻害により評価した。

アクチンフィラメント形成阻害は、Cytochalasin D および Latrunculin B で行った。Cytochalasin D は、よく知られるアクチン重合阻害剤であり、繊維状アクチン(F-アクチン)の先端に結合することにより、単量体アクチン(G-アクチン)の結合を阻害することにより、アクチンの重合を阻害する。Cytochalasin D は、細胞運動⁷⁷や収縮⁷⁸、そして細胞の弾性的な性質^{79,80}に影響を与える。Latrunculin B は、G-アクチンと 1:1 で結合することにより、G-アクチンの F-アクチンへの重合を阻害する^{81,82}。このように、アクチン重合阻害メカニズムの違う阻害剤を用いて、アクチンフィラメント形成阻害実験を行う。

また、アクトミオシン相互作用は、Y-27632 により阻害した。Y-27632 は、吉富製薬(現田辺三菱製薬)で発見された ROCK(Rho-associated protein kinases)阻害剤で、ROCK の ATP 結合部位に競合的に結合し、ROCK が関わる下流の機能を阻害する^{83,84}。3-1 でも示したが、アクトミオシン相互作用はミオシン軽鎖がリン酸化されることで発生する。ROCK はミオシン軽鎖脱リン酸酵素を阻害し、ミオシンリン酸化を引き起こす。よって、Y-27632 は、ROCK を阻害することで、ミオシン軽鎖脱リン酸化を活性化させ、ミオシン軽鎖リン酸化阻害すなわち、アクトミオシン相互作用阻害を引き起こす。通常 *in vitro* では、10 μ M の濃度で使用しており、10 μ M 以上にしてもミオシン軽鎖リン酸化阻害効果はほとんど変わらないことが示されている⁸⁵。

本項では、3-2-1-1 で細胞での各種阻害剤の効果を蛍光イメージングで評価した方法について、3-2-1-2 では、各種阻害剤を用いた細胞局所強度計測の影響評価方法について示す。

3-2-1-1 細胞蛍光イメージングによる阻害剤効果の検証

実験 2 日前にあらかじめ type-1 コラーゲンでコーティングしておいた 35mm-ガラスボトムディッシュでマウス繊維芽細胞を培養した。その後、培地を除去し、PBS(-) 2ml で洗浄後、阻害剤を含む培地 2ml を添加した。それぞれの阻害剤について、Cytochalasin D は 100nM、Latrunculin B は 5 μ M そして Y-27632 は 10 μ M となるように細胞培養用培地で調製した。薬剤添加後 5% CO₂, 37 度の条件で 30 分間インキュベートした。また、各阻害剤効果の可逆性を試験するため、薬剤添加後 30 分のインキュベートの後、薬剤を含む培地を除去、PBS(-) 2ml で 2 回洗浄し、新鮮な培地(10% FBS, 1% 抗生物質を含む) 2ml を加え再度 5% CO₂, 37 度の条件で 30 分間インキュベートした。

薬剤添加および再培養それぞれの細胞に対して、次の蛍光染色を行った。細胞培養液を除去後 PBS(-) 2ml で 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (in PBS(-)) 500 μ l を添加し室温で 10 分間固定した。その後 4%パラホルムアルデヒドを除去し PBS(-) 2ml で 2 回洗浄した。0.2% Triton X-100 500 μ l に 5 分間さらし、再度 PBS(-) 2ml で 2 回洗浄した。次いで PBS(-) で 100 倍希釈した Alexa fluoro phalloidine、1 μ M Oregon green paclitaxel の順で室温、遮光条件で 20 分間染色し、次いで PBS(-) で 500 倍に希釈した DAPI で室温、遮光条件下で 5 分間染色し、PBS(-) 1ml を添加し蛍光イメージングを行った。蛍光イメージングは光源(、EM-CCD カメラ(浜松ホトニクス、)、aqua cosmos で撮像した。

3-2-1-2. アクチン阻害剤の細胞接着強度への影響評価

細胞強度計測プロトコルの概要を図 5-10 に示す。実験 2 日前にあらかじめ type-1 コラーゲンでコーティングしておいた 35mm-ガラスボトムディッシュでマウス繊維芽細胞を培養した。その後、PBS(-)で 50 倍に希釈した 100 μ l のプローブ粒子溶液をディッシュ中央のみに添加し、CO₂ インキュベータで 2 分間インキュベートし粒子を細胞に接着させた。非接着粒子の後からの細胞への接着を防ぐため、この段階で非接着粒子を PBS(-) 2ml で 2 回洗浄した。そして、接着している粒子に接着を形成・成長させるため 2ml の細胞培養液を添加し CO₂ インキュベータで 30 分間インキュベートした。その後、培地を除去し、PBS(-) 2ml で洗浄後、阻害剤を含む培地 2ml を添加した。それぞれの阻害剤について、Cytochalasin D は 100nM、Latrunculin B は 5 μ M そして Y-27632 は 10 μ M となるように細胞培養用培地で調製した。薬剤添加後 5% CO₂, 37 度の条件で 30 分間インキュベートし、細胞接着強度計測 Mode I により薬剤存在下で細胞接着強度を計測した。

さらに各阻害剤効果の可逆性を試験するため、強度計測後、薬剤を含む培地を除去し PBS(-) 2ml で 2 回洗浄し、新鮮な培地(10% FBS, 1% 抗生物質を含む) 2ml を加え再度 5% CO₂, 37 度の条件で 30 分間インキュベートした。その後再度、細胞接着強度計測システムにより薬剤存在下で細胞接着強度を計測した。それぞれの計測段階で強度計測時間を 10 分に固定した。

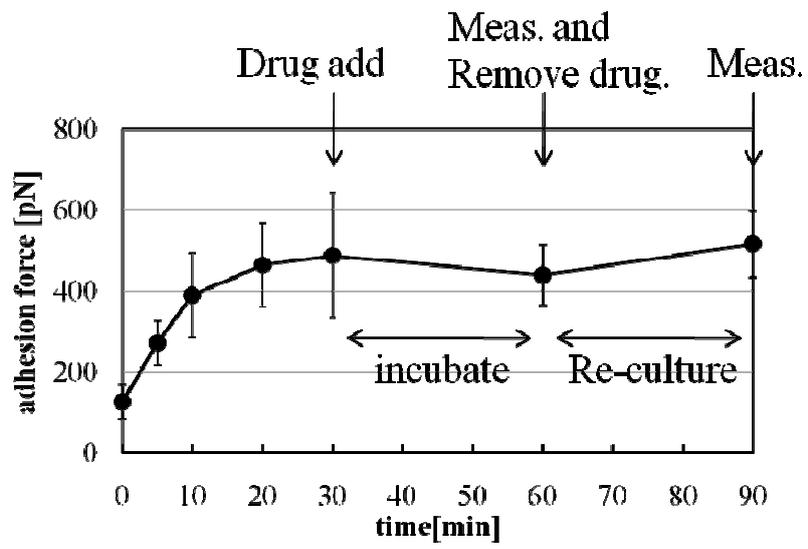


図 3-10：細胞強度計測プロトコルの概要

3-2-1-3 強度計測条件

強度計測用プローブ粒子はコラーゲン処理した直径 $2\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を用いた。またこの粒子捕捉および粒子加振運動は Nd:YVO4 レーザーを使用し、使用時のレーザー入射強度は 140mW とした。また加振運動は、振幅 810nm、周波数 0.5Hz で行った。粒子重心位置計測は、CCD カメラ(Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度 33msec/frame、画素サイズ 21.19 nm/pixel で行った。強度計測は、各接着時間につき 30~40 細胞について計測した。

3-2-2 阻害剤処理細胞による細胞局所強度計測結果

3-2-2-1. 細胞蛍光イメージングによるアクチン阻害結果

細胞蛍光イメージング結果を図 5-11 に示す。Cytochalasin D, Latrunculin B とともに control に比べ細胞内のアクチン形体が変化していることが確認できた。特に両薬剤添加時には、繊維状のアクチンを観測することができなかった。さらに Cytochalasin D と Latrunculin B を比べると、Cytochalasin D では細胞辺縁部のアクチンは存在しているのに対し、Latrunculin B では辺縁部のアクチンはなく、ドット状のもののみ観察できた。また両薬剤を除去し再度通常の培養液で再培養したものでは細胞内のアクチン量が増加していることが確認できた。Cytochalasin D では繊維状アクチンも回復しているのに対し、Latrunculin B については繊維状のアクチンの回復は観られなかった。

一方 Y-27632 については、アクチン形体に大きな変化はなく、繊維状アクチンの存在が確認でき、薬剤除去による可逆性評価においても同様に繊維状アクチンが確認できた。

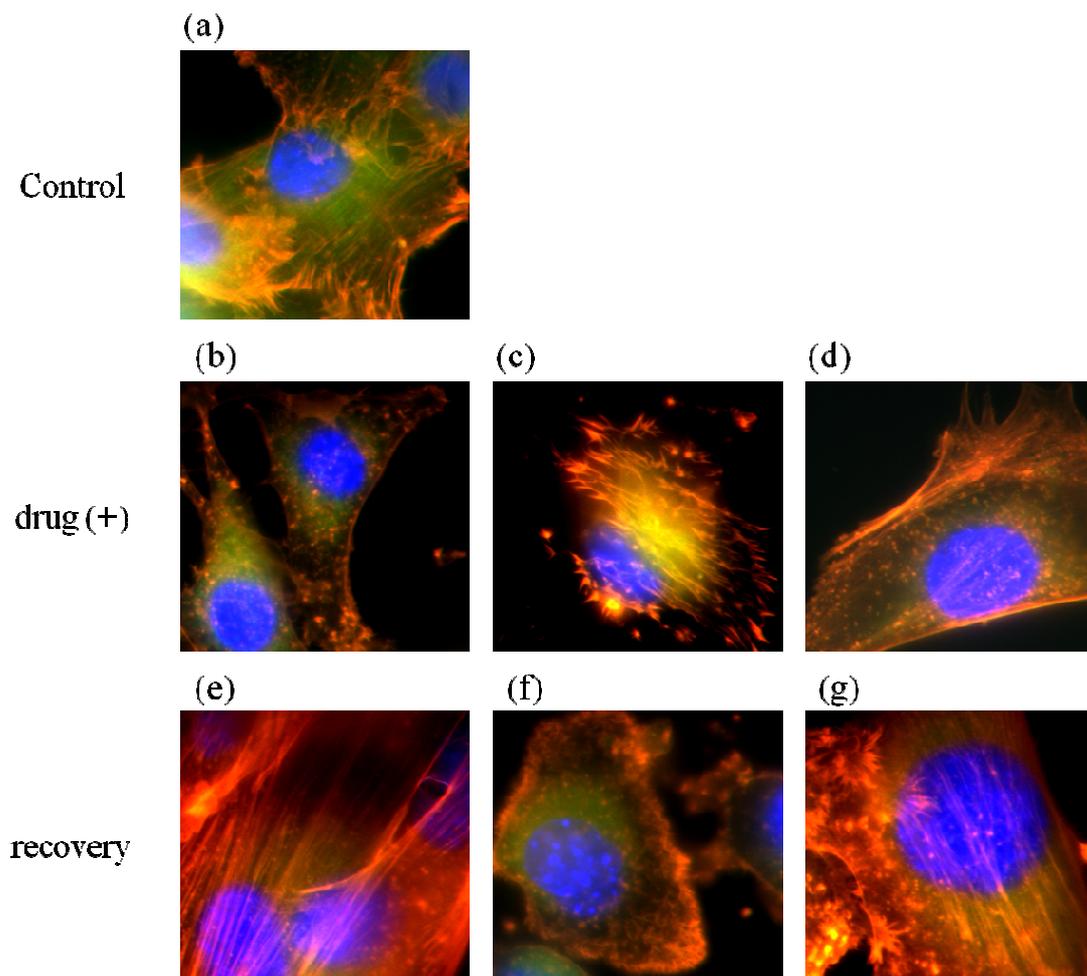


図 5-11 : 細胞蛍光イメージング結果

(a)コントロール (b)100nM Cytochalasin D (c) 5 μ M Latrunculin B (d) 10 μ M Y-27632

(e) 100nM Cytochalasin D (f) 5 μ M Latrunculin B (g) 10 μ M Y-27632

赤 : アクチン 緑 : 微小管 青 : 核

(b) - (d)は各阻害剤処理した細胞の蛍光画像

(e) - (f)は各阻害剤処理後、再度培養した細胞の蛍光画像

3-2-2-2. アクチン阻害剤の細胞接着強度への影響評価

細胞接着強度計測結果を図 5-12 に示す。各種阻害剤添加時の強度に対するコントロールとして、粒子接着開始後 60 分後の強度を計測し、その細胞接着強度は、 $437.0 \pm 35.6 \text{ pN}$ であった。そして、 100 nM Cytochalasin D および $5 \mu \text{M}$ Latrunculin B 添加時の細胞接着強度はそれぞれ、 $283.0 \pm 26.4 \text{ pN}$ 、 $262.9 \pm 46.4 \text{ pN}$ であり、コントロールに比べ有意に減少した。一方、 $10 \mu \text{M}$ Y-27632 群については $458.8 \pm 37.7 \text{ pN}$ であり、コントロール群に対して有意な変化は認められなかった。

また、阻害剤除去後の再培養時の強度に対するコントロールとして、粒子接着開始後 90 分の強度を計測し、その細胞接着強度は $586.3 \pm 39.4 \text{ pN}$ であった。そして、 100 nM Cytochalasin D、 $5 \mu \text{M}$ Latrunculin B および $10 \mu \text{M}$ Y-27632 除去後再培養時の強度は、それぞれ $500.1 \pm 39.1 \text{ pN}$ 、 $502.1 \pm 41.4 \text{ pN}$ 、 $594.3 \pm 34.3 \text{ pN}$ であった。

それぞれの条件での計測結果の強度のヒストグラムを図 5-13 に示す。Cytochalasin D および Latrunculin B 添加時の強度分布は接着開始 60 分後のコントロール群に比べ強度が低い方へ全体的にシフトした。一方 Y-27632 については分布する強度範囲は変わらないものの、分布形態は二峰性を示した。また、阻害剤除去後の計測値の分布は、コントロール群である接着開始後 90 分の強度分布および Cytochalasin D からの回復群については、 $300 \sim 400 \text{ pN}$ と $700 \sim 800 \text{ pN}$ にピークのある二峰性を示し、Y-27632 からの回復群については同様に二峰性を示すが、そのピーク値は $400 \sim 500 \text{ pN}$ と $700 \sim 800 \text{ pN}$ であった。ここで、本実験で用いている強度計測システムおよび計測条件での計測可能な強度最大値は 749.1 pN であり、これら 3 つの群で観られた $700 \sim 800 \text{ pN}$ の値は、最大検出強度を超えているものも含んでいる。一方 Latrunculin B からの回復群は、計測値分布の強度範囲は他の阻害剤からの回復群およびコントロール群と同じだが、強度分布はブロードであった。

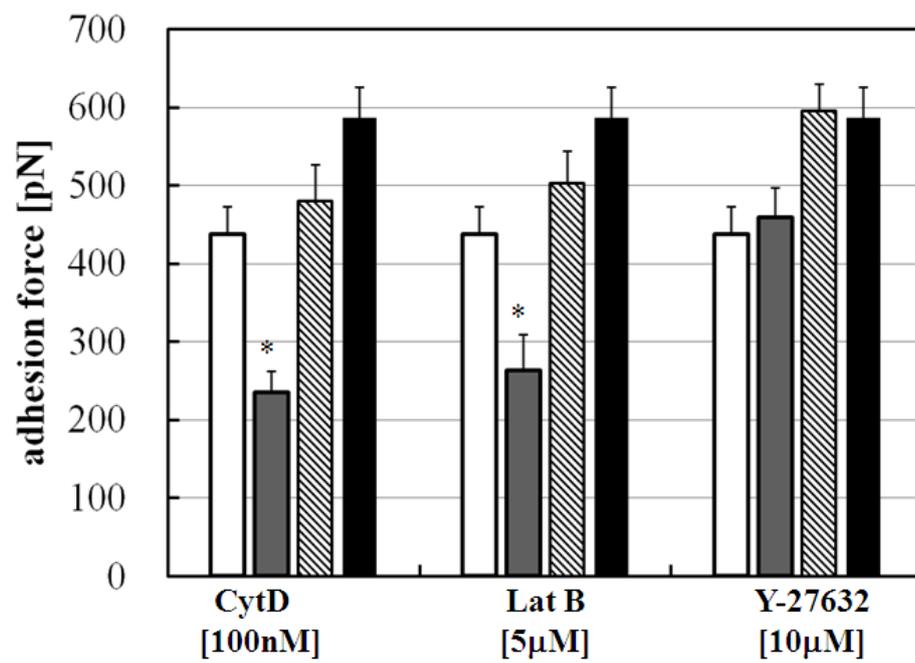


図 5-12 : アクチン阻害剤の細胞接着強度への影響計測結果

□ : control(60min), ■ : 薬剤存在下, ▨ : 再培養 ■ : コントロール(90min)

* : $p < 0.05$

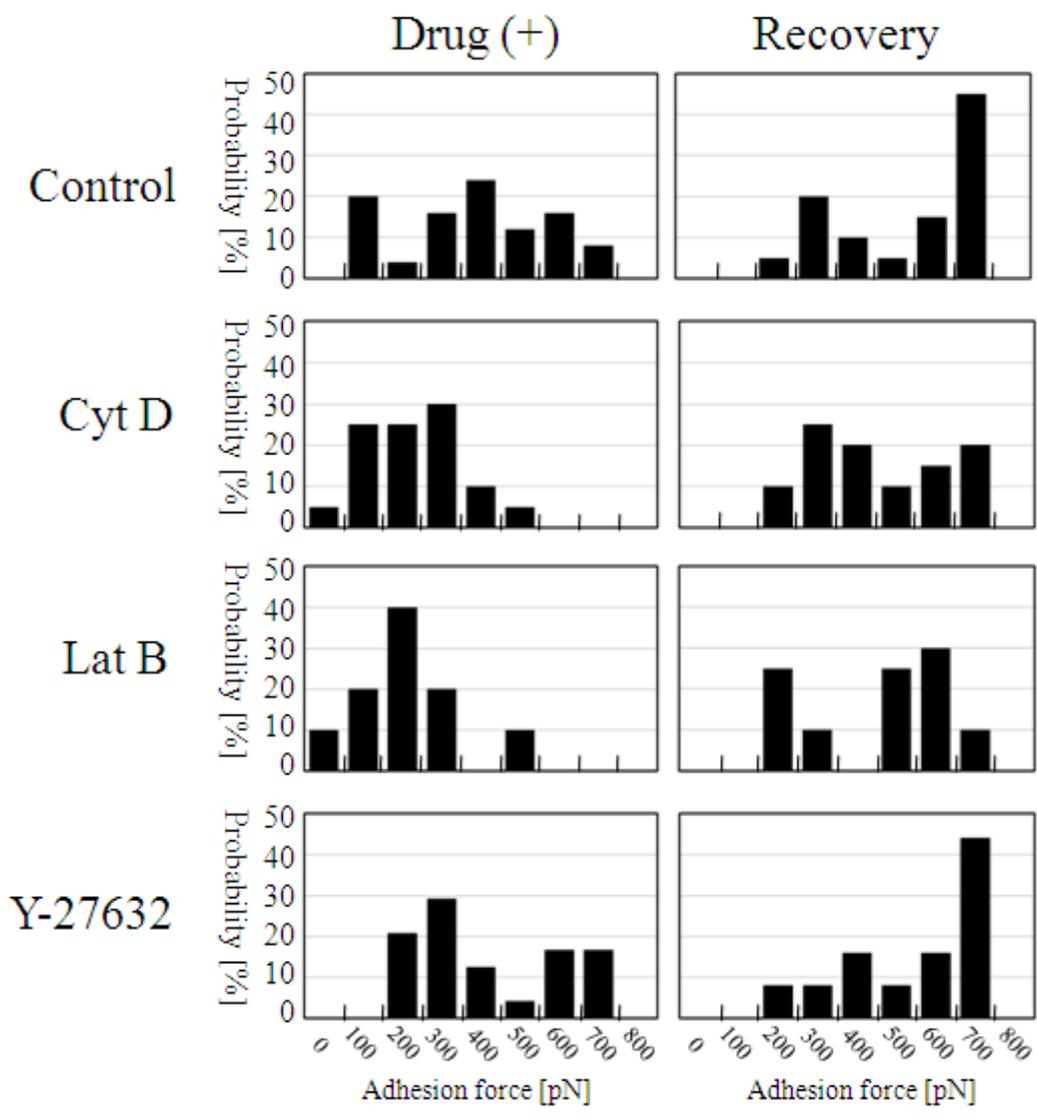


図 5-13 : 細胞強度分布のヒストグラム

3-2-3 考察

本節では、アクチンフィラメントの細胞局所強度計測への影響を、アクチンフィラメント形成阻害剤およびアクトミオシン相互作用阻害剤により評価した。アクチンフィラメント形成阻害には、Cytochalasin D と Latrunculin B の阻害メカニズムが異なる2つのアクチン重合阻害剤を用いた。これらアクチン重合阻害剤を作用させた結果、細胞内の F-アクチンの消失を蛍光イメージングで確認し、さらに細胞局所強度の有意な減少を確認した。減少量はコントロール群に比べて約 1/2 であった。また、阻害剤を除去し、再度通常の生育条件で再培養したところ、F-アクチンの再形成が確認でき、さらに細胞局所強度の回復がみられた。これにより、細胞局所強度の阻害剤による減少は、F-アクチンの減少によるもので、アポトーシスによる細胞死ではないことが確認できる。

一方、アクトミオシン相互作用は、Y-27632 によるミオシン軽鎖リン酸化阻害により、その機能を阻害した。その結果、細胞内での F-アクチンの消失はみられず、細胞局所強度も変化しなかった。これにより、本計測系で計測している細胞局所強度は、細胞内でアクトミオシンにより接着部位に働く張力ではなく、細胞膜内側近傍に位置する、構造体、支持体としてのアクチンフィラメントの物理的な性質を評価していることが分かった。

3-3 まとめ

本章では、細胞局所強度計測 Mode I による細胞 - 基質間物理的性質の評価について述べた。3-1 では、粒子 - 細胞間接着条件が強度計測に及ぼす影響を調べることにより、細胞 - 基質間接着の物理的な性質が接着条件によりどのように変化するのか評価した。3-1-1 では、粒子 - 細胞間接着形成時間と接着構造を介した細胞局所強度との関係を解析した結果、接着形成時間に伴い計測強度が増強することが分かった。また、強度の増強は、細胞への粒子接着後、20 分間で急速に進行し、その後は統計的には一定の値を示した。しかし、計測強度のヒストグラムにより、細胞 - 粒子間接着形成 30 分以降では、形成時間に伴い強度分布が広がり、接着構造の崩壊に向かう低強度の細胞接着が出現した。3-1-2 では、光ピンセットのレーザー強度を変え、捕捉粒子による粒子 - 細胞間接着形成時に外力を印加した時の、強度変化を調べた。その結果、レーザー強度を上げ、捕捉粒子を介して大きな外力を細胞接着部位に働かせると、細胞局所強度が上昇した。これは細胞 - 基質間接着が外力によりその形成速度を変化させ、外環境に応じた接着を形成していることを示唆している。よって、本研究で確立した、光ピンセットを基盤とした細胞局所強度計測は、粒子の細胞への接着条件により影響を受け、また接着条件を変化させることで細胞接着機能の物理的なメカニズムを評価することができる。

また、3-2 では、計測強度へのアクチンフィラメントの影響を、アクチンフィラメント形成阻害剤およびアクトミオシン相互作用阻害剤を用いて評価した。Cytochalasin D と Latrunculin B を用いてアクチンフィラメント重合阻害した細胞で細胞局所強度を計測すると、通常の計測結果に比べ、強度が 1/2 に減少し、阻害剤を除去しアクチンフィラメントを再形成させると元に戻った。また、Y-27632 でアクトミオシン相互作用を阻害した細胞では、強度は変化しなかった。その結果、本計測系では細胞内部でのアクトミオシンによる張力ではなく、細胞膜近傍のアクチンフィラメント構造による強度を計測していることが分かった。アクチンフィラメントの機能を区別して細胞局所の強度を計測できることは、複雑な構造、機能を持つ細胞接着の物理的な性質の理解に大きく貢献できる。

第4章 細胞接着初期構造形成過程の可視化

第2章で確立した細胞局所強度計測法は、Mode I での単一の強度計測だけでなく、Mode II により、その強度の時間変化を計測することができる。これまでの研究で細胞接着初期過程において、接着強度の強化やそれらに関わる分子などが解明されつつあり、細胞接着形成過程のダイナミックな性質と分子との関係を解析する必要がある。そこで、本研究で確立した細胞局所強度計測法での継続的な強度計測 (Mode II) を用いて、細胞強度を指標として、細胞接着初期過程のダイナミクスの可視化を試みた。

4-1 では細胞接着初期過程に起こる接着構造形成のダイナミクスについて述べる。4-2 では、第二章で確立した細胞局所強度計測法を用いた細胞接着形成初期過程におけるダイナミックな性質の計測方法、結果について、4-3 では、細胞強度変化検出能の高感度化、および高感度化細胞強度計測法を用いた細胞接着初期過程における接着強化のゆらぎの検出について述べる。

4-1 細胞接着形成初期過程における接着形成のダイナミクス

細胞 - 基質間接着が、細胞内から発生するアクチン相互作用による牽引力や細胞外からの機械的な刺激により崩壊せず、それらの物理的なバランスを制御するには、強固で安定した構造でなければならない。第3章でも述べたが、接着構造形成時間や外力により接着構造を成長させて、より大きな外力にも絶えられるような強固な構造となり、実際に3-1でも計測されている。このような接着構造の成長による強化、安定化は細胞接着形成初期段階でも同様である。

細胞 - 基質間接着は、細胞の縁であるラメリポディアで形成され始める。形成直後は、接着分子のインテグリンとアクチンフィラメントが **talin** によって結合されている、簡素な構造をしている。ここに、細胞接着構造に関連するタンパクが集積し、細胞接着複合体を形成する。この段階を接着形成初期(initial adhesion)と呼ぶ。Initial adhesion が複雑な構造へと成長すると、各 initial adhesion に結合しているアクチンフィラメントが細胞内で結合し、initial adhesion 同士の会合が起こり、接着構造が肥大化する。よって、特に initial adhesion では、様々な分子の集積、結合そして反応により接着構造の性質がダイナミックに変化していると言われている。Initial adhesion に関連する分子の物理的な作用は様々な手法で解析されているが、接着形成メカニズムを理解するために、実際の接着形成時にリアルタイムにその現象を評価方法が必要とされている。

Initial adhesion における接着構造の物理的な変化は、インテグリンのクラスターリング、接着関連分子による構造の強化に分けられる。インテグリンのクラスターリングは、細胞接着部位にインテグリンを集積し、接着強度を増強させる⁸⁶⁻⁸⁹。細胞膜中に存在するインテグリンを、細胞膜の局所的な部位である接着部位に集積させるために、細胞外ではインテグリン

ンのリガンドである細胞外基質のクラスターリングが起こり、集積したインテグリンと結合することにより、細胞接着強度を増強させている。また細胞内では、インテグリンとアクチンに直接結合し、それぞれを架橋している **talin** により、クラスターリングしたインテグリンとアクチンフィラメントを結合させ、インテグリン - 細胞外基質結合が安定し、細胞接着強度も増強する⁹⁰。

さらにインテグリンクラスターリングは、インテグリン同士の物理的な距離を近づける。インテグリン同士が接近すると、細胞内で各インテグリンに **talin** を介して結合しているアクチンフィラメント同士が接合しアクチンストレスファイバーへと成長する。この現象が起こるための細胞外基質の間隔は 73nm 以下と知られている。このように、インテグリンクラスターリングは空間的に細胞接着形成を制御している⁹¹。

また、細胞内では他の細胞接着関連分子による接着力の強化が起こっている。細胞接着形成初期において、**vinculin** の接着構造への集積が接着強化に関わっていることが知られている⁹²。**Vinculin** は、細胞内で **talin** とアクチンフィラメントの双方に結合し、それらの結合力を強化している。また、**Src family** キナーゼは、下流シグナルのキナーゼを活性化させることで細胞 - 基質間接着を強化している⁹³⁻⁹⁵。また、この **Src family kinase** の一つである **Fyn** は、**RPTP-a** により活性化され、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンと細胞骨格の結合を強化することが知られている⁹⁶。このように特に **initial adhesion** ではインテグリンとアクチンフィラメント架橋の物理的な強化が構造的そして化学的に制御されており、様々なタンパクが関わっている。

そのため、**initial adhesion** の物理的な性質は、インテグリン - 細胞外基質の結合やアクチンフィラメントとインテグリンとの連結といったダイレクトに接着力に関わってくる現象だけでなく、細胞内でのシグナル伝達や接着構造の構造的な変化による強度の強化、安定化といった間接的に細胞接着力に関わるものの影響を受けることになる。**Initial adhesion** の成長過程はこれらの現象を起こしながらどのように形成されていくのか、接着形成メカニズム解明のために、そのような接着構造のダイナミクスに関して関心が寄せられている。

4-2 細胞局所強度計測法を用いた接着形成ダイナミクスの計測

本節では、第二章で示した細胞接着を介した細胞局所強度計測法を用いた、細胞接着形成初期過程における細胞局所強度経時変化を計測について述べる。前節で示したように、細胞接着形成初期過程において、initial adhesion の成熟過程には、インテグリンクラスターリングや talin そして vinculin や c-Src などによる接着強度の強化が起こることが知られており、この細胞接着強化が細胞接着形成における物理的なダイナミクスを生み出すと考えられる。よって、本節では継続的な細胞局所強度計測法を用いて、細胞接着構造を介した細胞局所強度を指標とすることで、細胞接着形成のダイナミックな変化を可視化することを目的に実験した。

4-2-1 では、第二章で確立した細胞局所強度計測法による継続的細胞強度計測の方法に関して、細胞への力計測プローブ粒子の細胞への接着方法および継続的な強度計測方法についてそして 4-2-2 では計測結果について述べる。また、本計測系で計測される強度は細胞内のアクチンフィラメント、特に膜近傍に位置する微小なアクチンフィラメントの影響を受けることを第 3 章で明らかにした。よって継続的な細胞局所強度計測の結果もそれらの影響を受けると予想されるため、検証する必要がある。4-2-1-2 でアクチンフィラメント形成阻害剤を添加した際の細胞局所強度計測方法を、4-2-2 でその結果について言及する。

4-2-1 継続的細胞局所強度変化計測方法

4-2-1-1 培養細胞へのコラーゲンコート粒子の接着と継続的な細胞強度計測

図 4-1 に細胞局所強度計測法 Mode II による計測プロトコルの概要図を示す。Balb-3T3 細胞培養ディッシュから培養液を除去し、PBS(-) 2ml で 2 回洗浄し、新しい培養用培地を 2ml 添加する。そして粒子溶液を添加し、光ピンセットで浮遊粒子をトラップ後、直接細胞膜表面に搬送し 1 分間押し当てることで粒子 - 細胞間に接着を形成させた(図 4-1)。1 分間の接着形成の後、細胞接着強度計測システムにより計測を開始し、30 秒間継続的に細胞局所強度を計測した(図 4-1)。長時間の継続的な計測は、細胞膜の流動や細胞内反応による細胞接着構造自体の移動が考えられ、これが細胞強度計測に影響を及ぼす。よって今回は長時間計測を避け、30 秒間に限定して細胞強度変化を計測した。

4-2-1-2 アクチンフィラメント形成阻害実験方法

継続的な細胞局所強度計測へのアクチンフィラメントの影響を調べるため、サイトカラシン D 共存下での細胞局所強度を継続的に計測した。ここでは、Cytochalasin D 共存下細胞

強度計測の方法を示す。

Cytochalasin D は、和光純薬工業から購入し、ジメチルスルホキシドで 20mM となるように溶解しストック溶液とした。この溶液を 10% FCS、1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で最終濃度 1 μ M となるように希釈し、細胞への Cytochalasin D 添加の前にはあらかじめ用意しておいた。細胞はマウス繊維芽細胞 Balb-3T3 を用い、実験 2 日前にあらかじめ type-1 コラーゲンでコーティングしておいた 35mm-ガラスボトムディッシュで培養した。実験当日細胞培養用培地を除去し、あらかじめ 37 度で温めておいた PBS(-) 2ml で 2 回洗浄し、37 度に加温しておいた 1 μ M Cytochalasin D を含む培養液を 2ml 添加し、37 度、5%CO₂ の条件下で 40 分静置した。その後、type-1 コラーゲンをコーティングした直径 2 μ m の粒子を添加し、Cytochalasin D 共存下での継続的細胞局所強度計測を行った。また、コントロールとして Cytochalasin D 溶液の溶媒であるジメチルスルホキシドを 0.05%のみ含む条件下でも同様に細胞を処理し、継続的な細胞局所強度を計測した。

4-2-1-3 強度計測条件

強度計測用プローブ粒子はコラーゲン処理した直径 2 μ m のポリスチレン粒子を用いた。またこの粒子捕捉および粒子加振運動は Nd:YVO₄ レーザーを使用し、接着形成および強度計測時のレーザー入射強度は 140mW とした。このときの光ピンセットバネ定数は 935 μ N/m である。また加振運動は、振幅 810nm、周波数 0.5Hz で行った。粒子重心位置計測は、CCD カメラ(Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度 33msec/frame、画素サイズ 21.19 nm/pixel で行った。

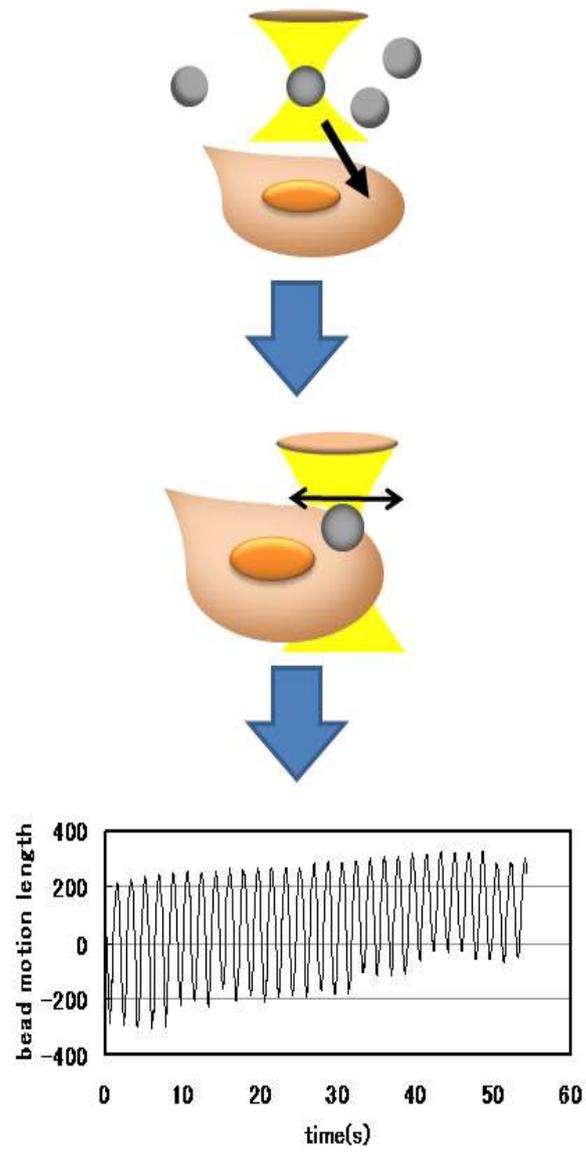


图 4-1

4-2-2 細胞局所強度を指標とした接着形成ダイナミクスの可視化結果

4-2-2-1 細胞局所強度経時変化計測結果

60 秒間の細胞局所強度計測で細胞強度の動的な変化を計測でき、ほとんどの計測結果で細胞局所強度の強化がみられた。その変化の様子はいくつかのパターンに大別でき、図 4-2 に良く見られるパターンを示した。図 4-2(a)は、階段状の計測強度強化の様子を示している。また、計測強度は常に増加するのではなく、図 4-2(b)のように一度階段状に増加した強度が再度、増加前と同じ強度に減少するものもみられた。これら 2つの細胞強度変化パターンは、各々単独で起こるだけでなく、両方の反応が併に見られることもある。また、このような階段状の強度増加、減少だけでなく、細胞強度の増加と減少を繰り返しながら細胞強度を増強させるものもみられ、その様子を図 4-2(c)に示す。図 4-2(c)のパターンをみると、細胞強度がいったん増加した後、中間状態にいったん減少し再度緩やかに増加後の強度に強化され、この強度の弛緩と強化が繰り返し起こり、安定な細胞強度強化状態へ遷移する様子が観測できている。

また、0.05% DMSO および 1 μ M Cytochalasin D 共存下での細胞局所強度の時間変化計測結果を図 4-3 に示す。Cytochalasin D 共存下でも同様な細胞強度の動的な変化が計測された。図 4-3(a)では、強度の緩やかな上昇の後、計測開始 5 秒後でいったん減少し、20 秒後には再び先に増強されていた値に戻っている。このような減少は図 4-3(b)、(c)でもみられ、階段状の強度の上昇と減少が、Cytochalasin D 存在下でも計測されている。

次に、このような細胞接着構造形成過程における接着強度のダイナミックな変化の変化量のヒストグラム解析により、どのような特徴的な変化をしているのか検討する。

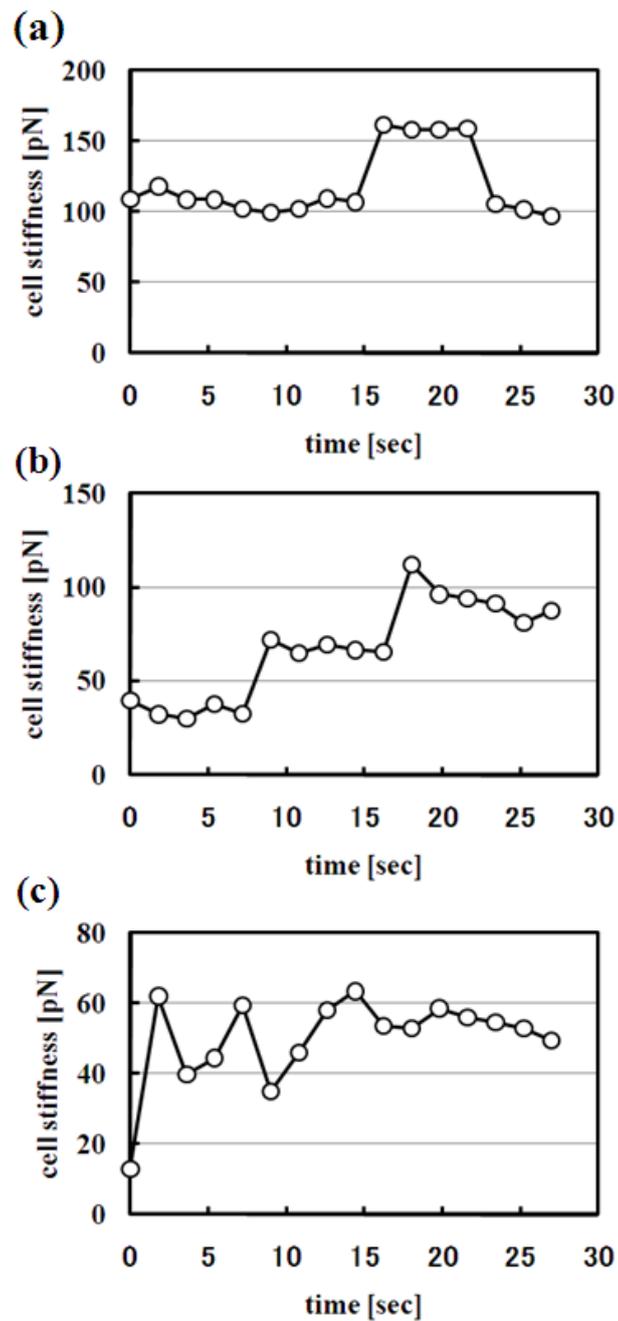


図 4-2 細胞局所強度の継続的な計測結果

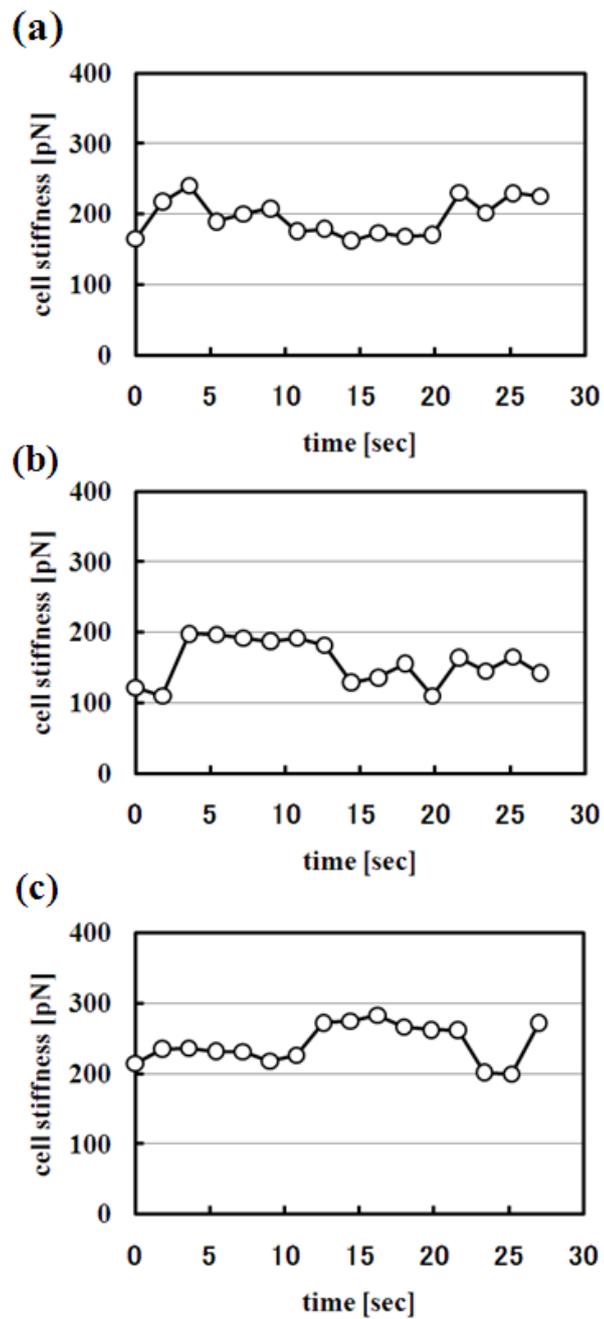


図 4-3 サイトカラシンD 共存下の細胞局所強度の時間変化

4-2-2-2 細胞局所強度変化検出能の評価

細胞接着構造形成過程の強度変化特性を推定するために、強度変化量を計測結果より求める。細胞強度変化量は、各計測点の前後との強度差とし、図 4-4(a)の Force step がその変化量を示している。この Force step を計算する際、全ての強度変化が有効、すなわち粒子加振運動中の計測誤差ではなく細胞応答の結果による強度変化かどうか区別する必要がある。流振動運動中には細胞からの応答だけではなく、粒子周囲環境の細胞培養液の粘性抵抗を受けるため、計測環境による強度計測誤差を見積もる必要がある。そのために、ここでは本計測系における強度変化計測誤差を見積もる。本計測系は、光ピンセットを基盤に力を計測しているため、その力計測には粒子振動運動の振幅を計測しており、この振動運動振幅のばらつきが結果として力計測誤差となる。そこで、細胞非接着状態、すなわち水溶液中でカプローブ粒子を捕捉したのみの状態で捕捉粒子を加振させ、その時の振幅のばらつきを評価し、強度計測誤差を見積もった。

コラーゲン処理した直径 $2\mu\text{m}$ の強度計測用プローブ粒子を用い、粒子捕捉、振動運動時のレーザー入射強度は 140mW とした。このときの光ピンセットバネ定数は $935\mu\text{N/m}$ である。また振動運動は、振幅 560nm 、周波数 0.5Hz で、25 秒間継続的に粒子を加振しその時の振幅を計測した。振幅変動の計測結果を図 4-4(b)に示す。計測した振幅の標準偏差は 9.09nm であり、このとき計測強度のばらつきは 8.5pN となる。よって 8.5pN 以下の強度変化は、本計測システムにおける粒子振動運動による計測誤差とみなす。

4-2-2-3 細胞局所強度変化量のヒストグラム解析

前目での細胞強度変化量算出法を基に、細胞接着形成初期過程における細胞強度変化量の特徴量分布のヒストグラムを図 4-5 に、 0.05% DMSO、 $1\mu\text{M}$ Cytochalasin D 共存下の強度変化量ヒストグラムを図 4-5(a,b)に各々示す。前目で計測した本システムにおける細胞強度計測誤差は図中では error として扱っている。

図 4-5 において、ヒストグラムのピークは約 16pN 、 28pN 、 44pN 付近に位置した。一方 Cytochalasin D 溶媒である 0.05% DMSO 共存下では、 14pN 、 22pN 、 40pN と非共存下に比べ全体的に数 pN 程度低下する傾向にあった。また、 $1\mu\text{M}$ Cytochalasin D 存在下では、強度変化量のピークは 22pN 付近に現れた。DMSO と Cytochalasin D では、低域の強度変化ではほとんど差はなく、高域の強度変化で少し差がみられた。

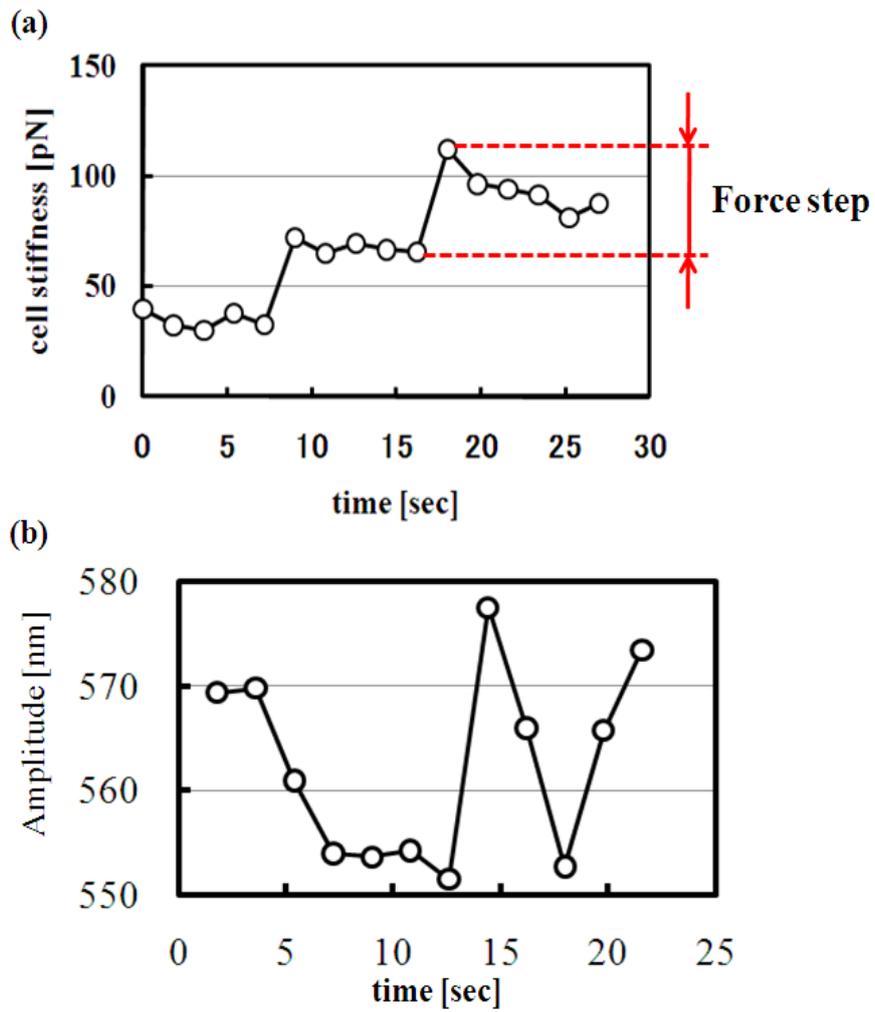


図 4-4 細胞局所強度変化量算出法(a)と粒子振動運動振幅のばらつき(b)

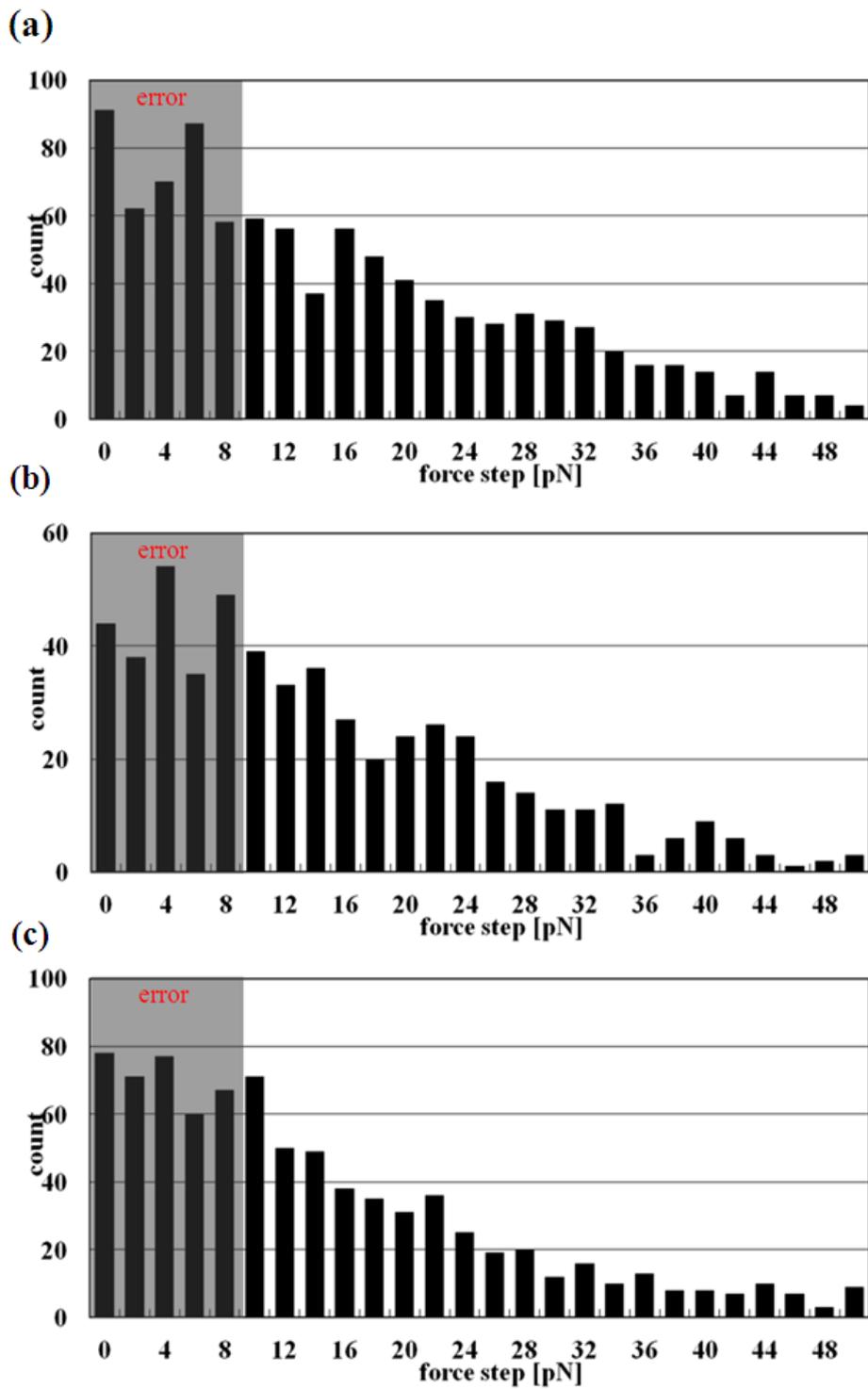


図 4-5 細胞強度変化量分布のヒストグラム
 (a) 薬剤非存在下、(b)0.05% DMSO 存在下
 (c)1μM Cytochalasin DD 存在下

4-2-3 考察

4-2-3-1 細胞局所強度経時変化計測結果に関する考察

本実験結果より、本研究で開発した細胞局所強度計測法を用いて継続的に細胞強度を計測することで、細胞接着を介した細胞局所強度のダイナミックな変化を可視化することができた。また、DMSO および Cytochalasin D 共存下でも同様にダイナミックな細胞強度変化の様子がみられた。これは、計測された細胞強度のダイナミックな変化は、アクチンフィラメントに依存しないことを示している。本計測系は、力計測プローブとしての粒子と細胞間に細胞外基質 - 細胞接着を形成させており、特に本実験では細胞接着形成初期過程という未熟な接着構造を対象としている。よって、細胞と粒子間では接着構造の initial adhesion から focal complex への成長が進んでおり、先にも述べた、接着強化因子の vinculin や paxillin の集積、接着分子であるインテグリンの集積と接着部位での数の増加による接着面積の増大などが起こっていると考えられる。そのため、細胞強度のダイナミックな時間変化はそれらの因子の影響を反映した結果という可能性も考えられる。ゆえに、本計測系を用いることで、細胞強度を指標として細胞接着の強化の様子を可視化できたと考えられる。

特に、階段状の強度変化は特徴的な現象である。このような強度変化をする現象にタンパクや低分子などの結合がある。タンパク-タンパク間や受容体-リガンドの結合が 1 分子または多分子同時に結合、解離する際の強度変化は、階段状の変化を示す。よって、図 4-2(a)にみられるような階段状の強度変化は、関連する分子の結合、解離反応に伴う強度変化を示していると考えられる。ゆえに図 4-2(a)、(b)、図 4-3(b)、(c)でみられる階段状の強度変化は、この反応がアクチンフィラメントに依存しないことから細胞接着関連分子の結合、解離反応を示している可能性を考えることができる。

また、図 4-2(c)では、急激な強度の上昇の後、中間状態へ遷移し、その後緩やかに増強後の強度に強化されることを繰り返し最終的には強度が強化される様子を示している。これは、細胞強度強化の不安定さを示すと考えられる。計測系では細胞に接着させた粒子を一定方向に加振させながら、その振動運動を制限する細胞からの力を計測している。よって、図 4-2(c)の計測開始 5 秒間のような反応から、いったん強度強化に大きく起因している分子の結合による粒子加振運動の制限するものの、強化された強度が弱いため、粒子振動運動により強化形成が破断し、強度が減少する様子が推測できる。また、減少した強度は強化前のものとの中間程度であること、そしてその後の強度の緩やかな強度強化がみられることから、先に起こった分子とは違うものが関与する強度強化の安定化機構が存在し、強化の安定化と破断を繰り返し、粒子加振運動の制限による粒子からの外力に応じる強度を獲得していると考えられる。

4-2-3-2 細胞局所強度変化量解析に関する考察

細胞接着構造形成過程の強度変化特性を推定するために、細胞強度変化量のヒストグラムより強度変化の分布を解析した結果、約 28pN 付近に緩やかなピークを観測できた(図 4-5(a))。この値は、細胞外基質と接着分子インテグリンの結合力に似ている。

これまでに、光ピンセットや原子間力顕微鏡を用いて細胞外基質とそのアゴニストであるインテグリンの結合力評価による細胞接着のメカニズム解明およびモデル化がおこなわれている。P. P. Lehenkari らは原子間力顕微鏡を用いて細胞外基質とインテグリンの結合破断力を評価している。原子間力顕微鏡のカンチレバーに細胞外基質である fibronectin のインテグリン結合部位であるペプチド(Arg-Gly-Asp)を施し、細胞にカンチレバーの先端を接着させカンチレバーを細胞から引きはがす際にカンチレバーにかかる力の変化の様子から、その破断力は 32 ~ 97 pN 程度としている⁴⁴。また、F. Li らは同様に原子間力顕微鏡を用いた fibronectin とインテグリンの結合破断力を計測しており、結合破断力は 50 ~ 60 pN で、特に活性化した $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの場合 70pN であることを示している⁹⁷。さらに R. I. Litvinov らは光ピンセットで捕捉した粒子を用いて、fibrinogen とインテグリンの結合破断力を計測しており、その力は 80 ~ 100 pN としている⁹⁸。このように原子間力顕微鏡や光ピンセットを用いて、細胞外基質とインテグリンの結合を物理的に引きはがし、結合破断力を計測しており往々にして 30 ~ 100pN 程度の範囲である。このばらつきは、結合破断時の計測条件に依存しているために起こる。

一方 O. Thoumine らは光ピンセットで細胞を捕捉し、fibronectin で覆った基板に細胞を押しつけ、引きはがす際の結合破断力を計測しているが、解析には破断力だけではなく物理化学的に細胞外基質とインテグリンの結合、解離においてインテグリンが細胞外基質を結合することで発生する力を評価している⁹⁹。その研究の中でインテグリンが Fibronectin と結合することによる結合力は約 20pN 程度と見積もっている。

結合破断力は、無理やり分子間の結合を引きはがすために必要な力を評価している。一方、O. Thoumine らの実験結果は分子が結合することによりもたらされる力を評価している。本計測系で評価した細胞強度変化量は O. Thoumine らが見積もった細胞外基質とインテグリンの結合力に近い値を検出することができており、20 ~ 30 pN でみられる強度変化の特徴量は、結合破断力ではなく、インテグリンの一分子の結合、解離にともなう力の変化であると考えられる。

また、この 28pN の力は、DMSO 存在下で 22pN に減少し、Cytochalasin D 存在下でも DMSO 存在下同様の値を示したことから、この 6pN の変化は DMSO の影響を受けた結果であることが分かる。DMSO はグリセロールと共に、生体組織や細胞を低温や凍結から保護するクライオプロテクタントとして知られる。DMSO の生体膜や細胞機能への影響はあまり知られていないが、DMSO の濃度依存にジパルミトイルフォスファチジルコリンの鎖融解相転移温度を上昇させ、細胞膜の主要構成脂質であるホスファチジルエタノールアミンの相転

移性質を変化させるなど、細胞膜の膜脂質に対してその性質を変えることが知られている¹⁰⁰⁻¹⁰²。よって、6pNの微小な変化は、DMSOによる細胞膜脂質の性質の変化が一つ原因と考えられる。したがって本研究で確立した細胞局所強度計測は、細胞膜脂質の性質変化を計測可能であると期待できる。

また、16、44pNのピークは、DMSO存在下で数pNシフトしたが、Cytochalasin D存在下では検出できなかった。詳細な検討が必要であるが、結果としてこの2つの特徴量はアクチンフィラメントによる影響であることが推測できる。アクチンフィラメントの結合か、もしくは接着分子による安定化なのかは判別できないが、initial adhesion成長過程におけるアクチンフィラメントに依存した現象であることが分かる。

ここで、細胞強度変化量分布では、計測系の力変化検出分解能のため、8.5 pN以下のものは誤差として処理した。しかし、より詳しく細胞強度変化を解析するためには、数pNまたはサブpNレベルの微小強度変化を検出する必要がある。そこで次節では、本細胞局所強度計測システムの強度変化検出能高感度化について述べる。

4-3 細胞局所強度変化検出能の高感度化

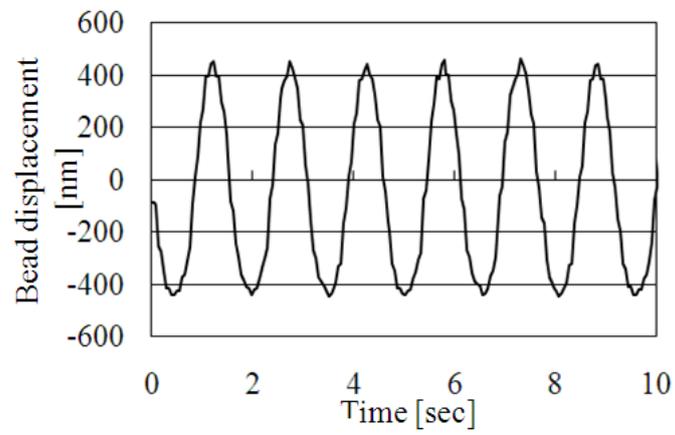
前節で述べたとおり、継続的な細胞局所強度計測により、細胞接着構造形成過程の接着強度のダイナミクスを可視化できた。さらにその強度変化量を解析することで20~30pN程度の特徴量を持つことを示した。しかし、さらに詳しく細胞接着形成過程のダイナミクスを解析するためには、微小な強度変化を検出できる高感度な力計測システムに改善する必要がある。そこで、本節では、現行の細胞局所強度計測法の高感度化を4-3-1で、高感度化の結果を4-3-2で述べる。そして、4-3-3では、高感度化強度計測法を用いて細胞接着形成過程の詳細な解析結果を示す。

4-3-1 細胞局所強度計測法の高感度化

第2章で確立した細胞局所強度計測系は、粒子振動運動の振幅の変化からカプローブ粒子にかかる力を、振動運動の位相から粘性抵抗を計測している。また、本計測系の力学的なモデルを用いた数値計算により、細胞局所強度は粘性抵抗ではなく粒子深度運動振幅に依存していることがわかっている。よって細胞局所強度のみを議論するには、粒子振動運動の振幅情報のみが必要となり、前節で示したとおり、この振幅のばらつきが強度計測誤差となる。よって、計測システムによる粒子振動運動のばらつきを低減させることは、細胞局所強度変化量検出の高感度化の一つの解となる。

現行システムでは、粒子振動運動は正弦波で制御しており、振幅は各頂点値より計算している(図4-6(a))。また、粒子振動運動時の慣性力や外環境の粘性抵抗により振動運動各頂点での粒子位置にばらつきがでる。よって頂点一点での振幅決定では、各振動運動の振幅のばらつきが大きくなると考えられる。そこで、振動運動の各頂点位置決定時に、多点の平均値から算出できるように、粒子加振条件を、正弦波から方形波に変更した。方形波での粒子深度運動の結果を図4-6(b)に示す。方形波では、粒子振動運動頂点では複数回粒子位置を計測し、その後次の頂点位置に粒子を移動させ再度頂点での粒子位置計測を複数回行うことを繰り返す。よって各頂点位置決定は、頂点での粒子位置の平均から求めることができ、粒子振動運動振幅をより安定に計測することができる。

(a) Sinusoidal



(b) Rectangular signal

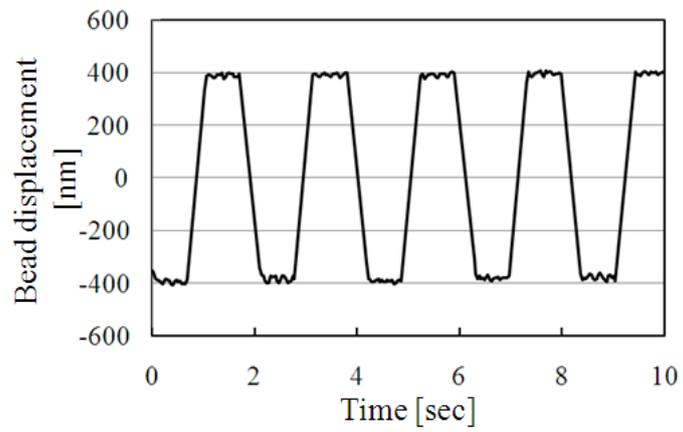


図 4-6 粒子振動運動パターン

4-3-2 細胞局所強度変化検出能評価

本項では、前項で示した方形(Rectangular)波による細胞局所強度変化検出能を評価し、正弦波での強度変化検出能と比較する。細胞局所強度変化検出能評価は、4-2-2-3 で示した方法を用いる。また、正弦波および方形波での粒子振動運動による強度変化検出能を調べた結果を図 4-7 および表 4-1 に示す。正弦波での粒子加振では、強度変化検出能は 0.15 pN ~ 6.5pN であった。一方、方形波では 0.08 pN ~ 3.39 pN と正弦波の約半分程度検出能を高めることができた。特にサブ pN オーダーの強度変化を検出できるレーザー強度範囲を広く確保することができ、より詳細な細胞接着形成過程の解析を可能にすると考えられる。また、図 4-8 では、実際に細胞局所強度を計測した時の、粒子振動運動の様子を示す。方形波の時も現行のシステムと同様に粒子振動運動の抑制がみられ、方形波による細胞局所強度計測は、実際の細胞強度計測にも適用可能であることがわかる。次項では、方形波による細胞局所強度計測法を用いて詳細な細胞接着形成過程の解析を行う。

4-3-3 高感度化強度計測法を用いた細胞接着強度ゆらぎ検出

4-3-1 での結果より、継続的な細胞強度計測により、細胞接着を介した細胞局所強度のダイナミックな変化を可視化することができたことを示した。ここでは、前項で示した高感度細胞局所強度計測法を用いて、細胞接着形成初期過程における細胞接着強度の微小変化を検出する。計測方法は前項と同様とした。計測条件は、より詳細な力変化を検出するために光ピンセット用レーザー強度を細胞接着形成時は 140mW、強度計測時には 59mW とし、計測時のレーザー強度におけるバネ定数は 590 $\mu\text{N/m}$ である。粒子振動運動周期は 0.5Hz とし、この時、粒子振動運動頂点での粒子位置計測回数は 10 回となり、その平均値から振幅を求めた。

図 4-9 に約 40 秒間の細胞局所強度計測結果を示す。図 4-9(a)から、これまでと同様な細胞強度の増強が確認できている。また、計測開始 20 秒目には階段状の強度変化がみられており、計測開始 20 秒間では、不安定な細胞強度の繰り返しおこる弛緩と強化が計測できている。さらに、階段状の強度の増強の後も同様に、強度上昇直後の中間状態への弛緩がみられ、計測開始 40 秒後に中間状態へ弛緩した強度の、強度上昇後の値への再強化がみられた。またこの過程において、強度再強化の不安定な揺らぎを計測することができた(図 4-9(b))。図 4-9(b)は、図 4-9(a)の一部を抜粋したものである。これまでに計測された細胞強度の強化とその強化成立に伴う揺らぎとは異なる大きさで細胞強度が揺らいでいるのがわかる。細胞強度の上昇と急激な弛緩の後、数 pN オーダーでの強度の上昇と弛緩を繰り返しており、その後細胞強度の再強化が成立している。

このような数 pN 程度の強度の揺らぎの特徴量を推定するために、細胞強度変化量の分布をヒストグラムにより解析した。その結果を図 4-9(c)に示す。特徴的なピークは見られなかったため、ガウシアンフィッティングにより解析した。その結果、中央値が 1.67pN、標準偏差 1.14pN となった。

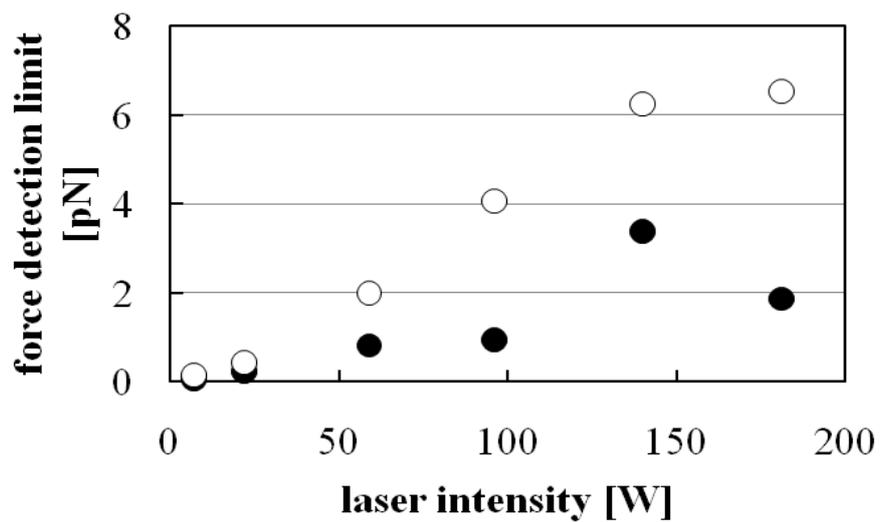


図 4-7 細胞局所強度変化検出能

○：正弦波、●：方形波

energy (W)	Ramp (pN)	Sin (pN)
0.003	0.08	0.15
0.0107	0.24	0.43
0.021	0.82	2.00
0.039	0.94	4.06
0.056	3.39	6.26
0.074	1.87	6.54

表 4-1 正弦波および方形波での細胞局所強度変化検出能

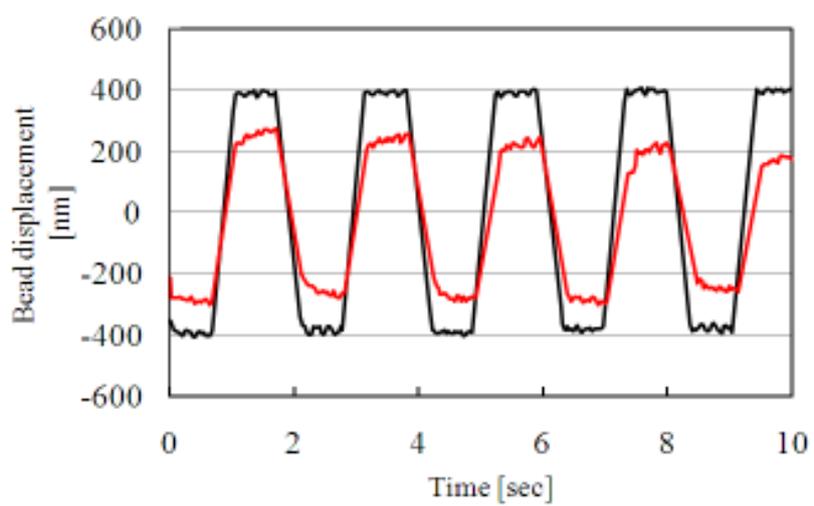


図 4-8 細胞接着、非接着時の方形波粒子振動運動結果
黒線：非細胞接着、赤線：細胞接着時

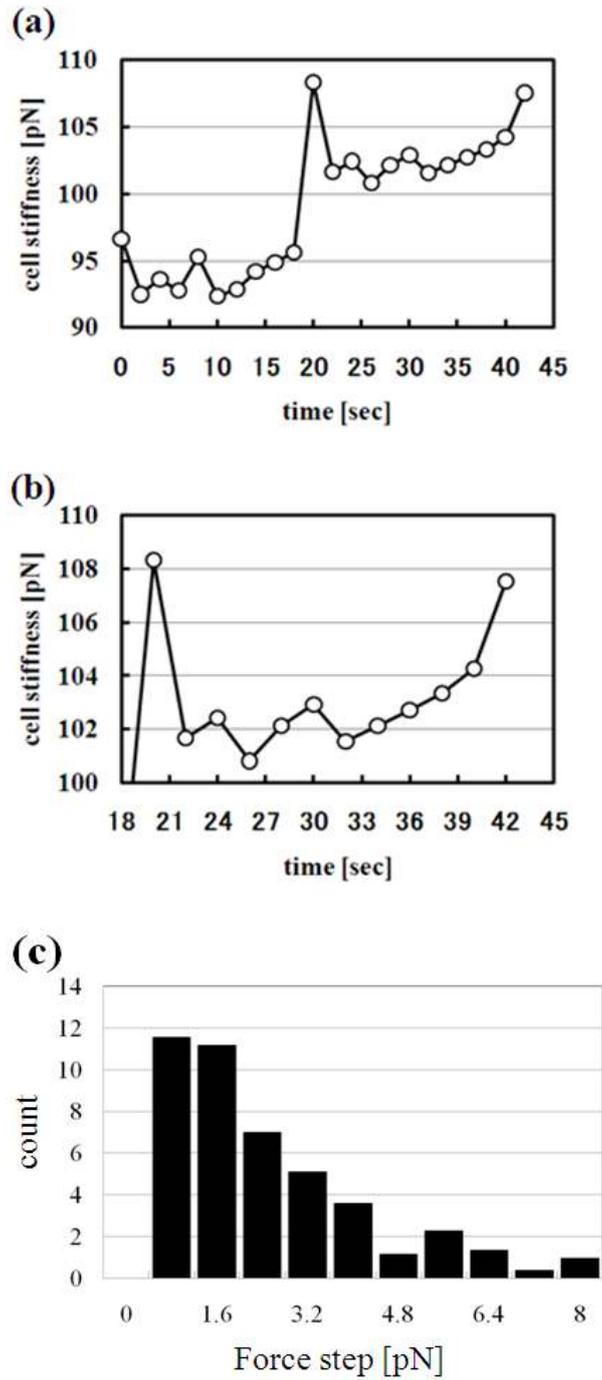


図 4-9 高感度細胞局所強度計測法による細胞接着形成過程の強度変化
 (a) 細胞局所強度計測結果 (b) 計測結果(a)の一部抜粋
 (c) 強度変化量のヒストグラム

4-3-4 考察

現行の正弦波粒子振動運動による細胞局所強度計測法を方形波での粒子加振に変更することで、細胞強度変化検出能を最高 80fN にまで高めることができた。計測システムのサブ pN オーダーへの高感度化は、タンパク質間相互作用の結合破断力および分子の結合、解離によりもたらされる数 10pN ~ 100pN 程度の力変化を十分に検出することが可能である。この高感度化細胞局所強度計測法を用いて、細胞接着初期過程における強度変化を計測した結果、約 2pN の特徴を持つ強度の微小な揺らぎを検出することができた。また、図 4-9(a) では、細胞接着強度強化をさらに強化、安定化するような強度の揺らぎを検出することができた。このような強度の変化は、**talin** によるインテグリン - フィブロネクチンのすべり結合によって起こる現象に酷似している¹⁰³。G. Jiang らは、細胞外基質のフィブロネクチンとインテグリンによる細胞接着初期過程において、光ピンセットにより負荷をかけた際に、2pN の力によって繰り返し破断される特異的な分子間すべり結合を見出している (図 4-10)。このような力変化は図 4-9(b) のものと類似している。詳細な検証は必要であるが、強度計測を高感度にすることにより、このような数 pN の分子間相互作用による強度変化をとらえることを十分に示唆できる。さらに、本計測系はサブ pN オーダーの強度変化検出能を保持しているため、結合、解離だけでなく分子間相互作用の性質変化による強度のごく微小な変化の検出や、そのような強度計測を通して新たに生体分子の力学的な機能を見出せる可能性が考えられる。

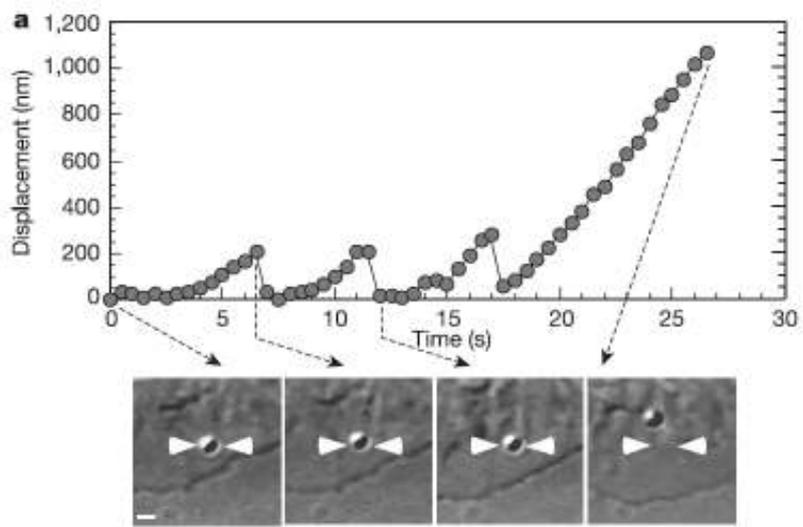


图 4-10

4-4 考察

継続的な細胞局所強度計測の結果、細胞接着形成初期過程における細胞局所強度のダイナミックな変化を計測することができ、強度を指標とし細胞接着初期過程における、接着の強化を可視化することができた。さらに強度変化の特徴量は約 28pN であり、細胞外基質とインテグリン一分子の結合、解離によりもたらされる力に近いものが得られた。また、強度計測法を正弦波による粒子振動運動から方形波に変更することで、細胞局所強度変化量検出能を最高 80fN まで高めることができた。この高感度化細胞局所強度計測法を用いることで、数 pN 程度の微小な強度変化を検出することができた。

これらの結果より、細胞接着初期過程において、インテグリン結合の増加によつ細胞接着の強化以外に、その接着強化は不安定であり強化初期段階の接着強度は揺らいでいること、またその不安定なインテグリン結合による接着強化をさらに安定化する機構が備わっていることがわかった。さらに、そのインテグリン結合の安定化機構も初期には不安定であり、それをさらに安定化させる機構も存在することが考えられる。

これらを基に、細胞接着初期過程の接着強化機構をモデル化したものを図 4-11 に示す。細胞接着が強化されると、細胞外基質とインテグリンの物理的な距離が近づき、結合形成可能な距離になる分子数が増加し、細胞外基質-インテグリン結合が形成される確率が上がる⁶⁸。そしてこれまでであった細胞接着構造の辺縁で新しく細胞外基質-インテグリン結合が形成され、接着面積が増加しそして接着強度が大幅に増強する。このインテグリン-細胞外基質結合をより安定に強化する機構が始動する。この後に、インテグリンを介した細胞接着の増強の強化をさらに強固にさせる機構が働き、細胞接着の強化が進行する。ここで、細胞接着強化が発生しても、その強化の安定が成立しなければ強化された接着構造は破綻し、もとの状態に戻り、一方強化の安定化が成立することで細胞接着の強化が成立する。

このような機構は、インテグリンがメカノセンサーであり、接着する環境に必要な強度を持つ細胞接着の形成に必要な機構であり、細胞運動や形態形成そして分化、発生などの様々な細胞機能の制御に関与していると考えられる。よって、今後細胞接着強度を指標として細胞強化現象と分子との関係を解析することで細胞接着形成メカニズムを物理的に解明でき、接着の以上かによるガン転移能獲得、亢進のメカニズムに迫れるのではないかと期待できる。さらにそれらの分子を制御することで接着形成の亢進や抑制による新薬開発の標的分子の発見にも繋がる。

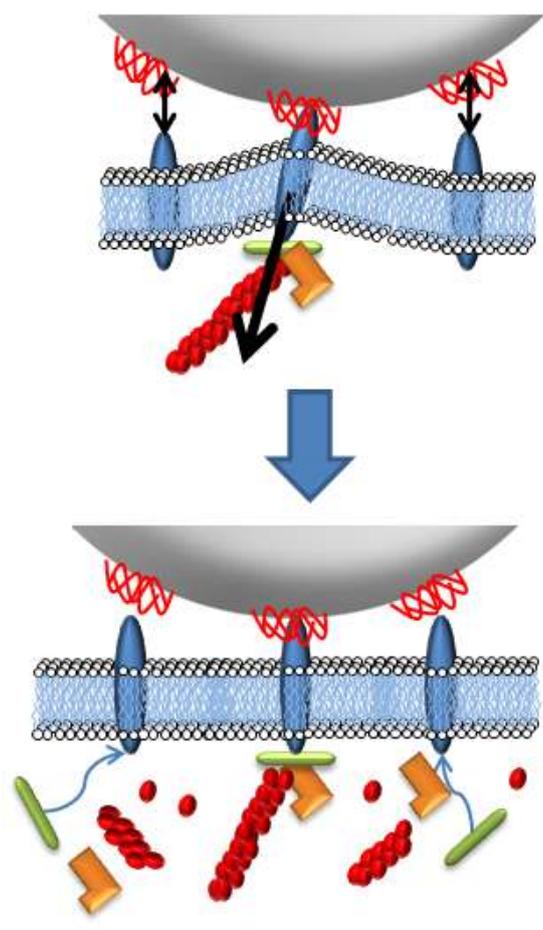


图 4-11

第5章

インフルエンザウイルス感染細胞での細胞強度計測

本章では、これまでに確立してきた細胞接着構造を介した細胞局所強度計測法の生物学的課題への応用例として、インフルエンザ感染による細胞物理的性質の変化について解析をした結果を示す。インフルエンザウイルスは季節性感染症、近年の H1N1 や H5N1 型ウイルスのパンデミックにより、世界的に最もよく知られるウイルスである。そのウイルス感染の解明、治療法の開発は、臨床医学、分子生物学、疫学等により急速に進行しており、様々な知見が積み重ねられている。これら生化学、分子生物学等の知見に比べ、ウイルス感染と細胞物理的性質の関係についての知見は少ない。そこで、本章では、インフルエンザウイルス感染時の細胞局所物理特性を計測することで、ウイルス感染と細胞物理的性質の関係を試みる。

5-1 ではインフルエンザウイルス感染メカニズムについて述べる。5-2 では、インフルエンザ感染用細胞であるヒト気道上皮細胞(NCI-H292)での細胞局所強度計測について、5-3 では、インフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測を述べる。

5-1 インフルエンザウイルス感染メカニズム

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、8本に分節した(-)鎖 RNA を遺伝子として持つウイルスである^{104,105}。その構造は、宿主細胞膜由来の脂質二重層からなるウイルス外被で囲まれ、80~120 nm の粒子構造をなすエンベロープウイルスである(図 5-1(a))。その外被にはヘマグルチニン(HA)やノイラミニダーゼ(NA)そしてイオンチャネルである M2 が存在している(図 5-1(b))。この脂質二重層はウイルス核内で M1 にて裏打ちされており、核内部には(-)鎖 RNA ゲノムと RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの核タンパク複合体(RNP)が存在している(図 5-1(c))¹⁰⁶。

このインフルエンザウイルスが細胞に感染し、増殖するには大きく 3 つのメカニズムがある。それは、1.インフルエンザウイルスの宿主細胞への接着と取り込み、2.ウイルス/ウイルス RNA の細胞核内への搬送と核内での複製、そして 3.複製されたウイルス RNA/タンパクによるウイルスの再構築と細胞膜への輸送、膜外への放出である。その過程の模式図を図 5-2 に示す¹⁰⁷。インフルエンザウイルスは、ウイルス自身のヘマグルチニンと細胞膜表面の糖たんぱくの糖鎖(シアル酸)との結合を介して、宿主細胞膜へ結合する(図 5-2(a))。結合したウイルスはエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、エンドソームに包含され細胞内を輸送される(図 5-2(b))。細胞内では pH 依存膜融合によりエンドソームとウイルス外被が融合し、ウイルス構成物質が細胞質に放出される(図 5-2(c))。細胞質に放出された

ウイルス RNP(vRNP)は細胞質から核内へ輸送され、複製された(+)鎖 mRNA は細胞外に輸送されウイルスタンパクが合成される(図 5-2(d-g))。合成されたウイルスタンパクはウイルス RNA 複製補助や vRNP の再集合のために細胞質から核内へ輸送され、感染後期において核内で vRNP が再構築され、核外へ搬送される(図 5-2(h-j))。vRNP とウイルスタンパクは核近傍からエキソサイトーシスにより細胞膜近傍へ搬送され、宿主細胞膜を外被として細胞外へ出芽し、ノイラミニダーゼによりウイルスと細胞の結合部であるヘマグルチニンとシアル酸残基の結合が解離され、ウイルスは細胞外へ放出される(図 5-2(k,i), 5-3(a))。このノイラミニダーゼを阻害し、複製されたウイルスの細胞外への放出を妨げる抗インフルエンザ薬としてザナミビルとオセルタミビルが実用化されている¹⁰⁸。細胞膜でのウイルス再構築では、ウイルス構成物質が細胞膜近辺で正確に物理的に局在している必要がある。ウイルス外被脂質膜支持体である M1 はこの現象の中心的な役割を担っている。M1 は vRNP と結合し、さらに M1 は細胞膜とも結合し細胞外被支持を構成していると考えられている(図 5-3(b))。ウイルス感染後期では、宿主細胞内で複製されたウイルス構成物質が細胞膜近辺に集合し、さらに HA や NA そして M2 などのウイルス細胞膜が細胞膜での出現しそれらタンパクの局在化が起こる。これらの過程は脂質ラフトとアクチンフィラメントなどにより実行されている¹⁰⁹⁻¹¹¹。このように、ウイルスの細胞感染および複製されたウイルスの細胞外への放出において、細胞内だけでなく、細胞膜構成成分や出芽などの細胞膜形態変化が起こり、細胞膜の物理的な性質の変化が予想される。しかし、そのような物理的性質の解析はされておらず、ウイルス感染と細胞の物理的な関係は知られていない。

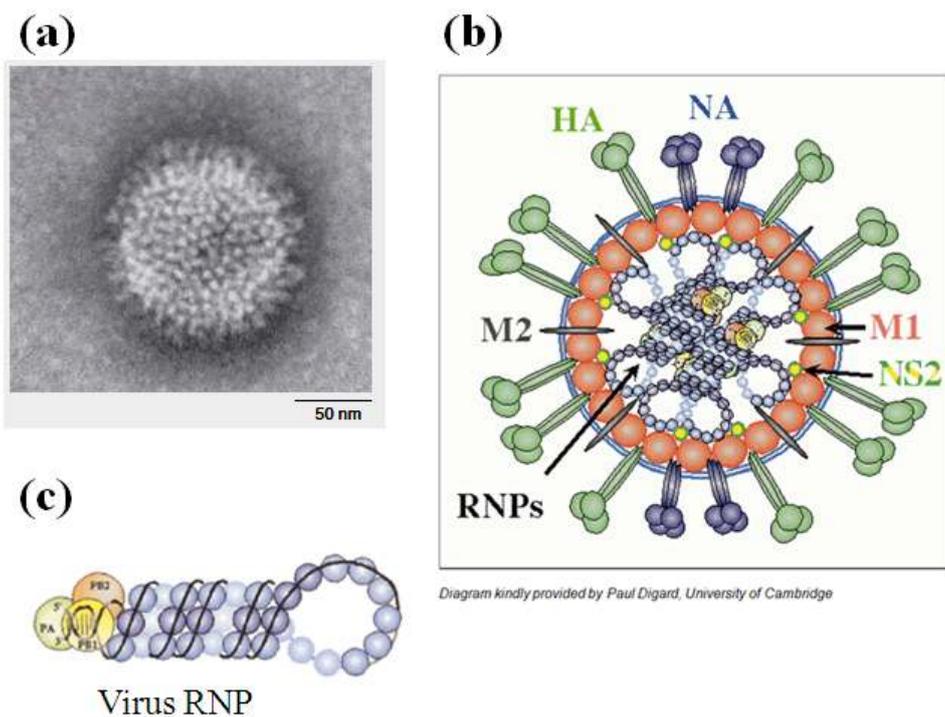


図 5-1 インフルエンザウイルスの形態と構造
 (a)インフルエンザウイルスの電子顕微鏡像(ref)
 (b) インフルエンザウイルス構造模式図(ref)
 (c) インフルエンザウイルス RNP の構造(ref)

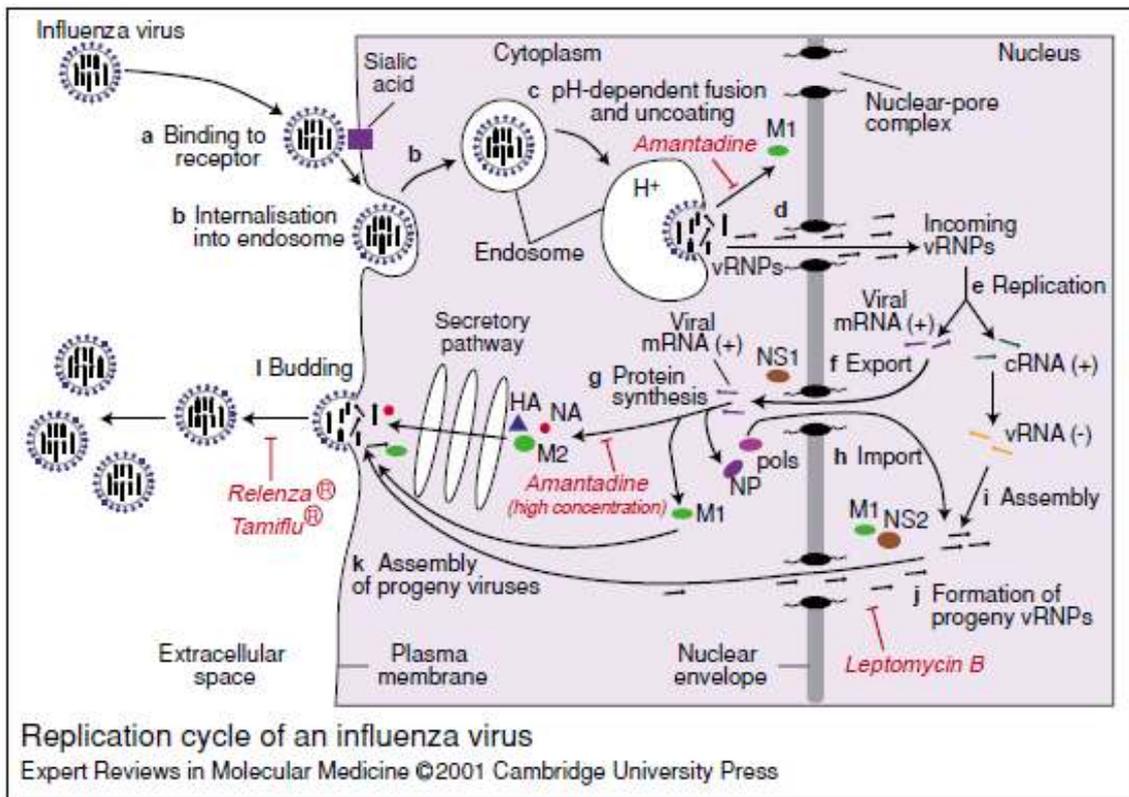


図 5-2 インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染機構

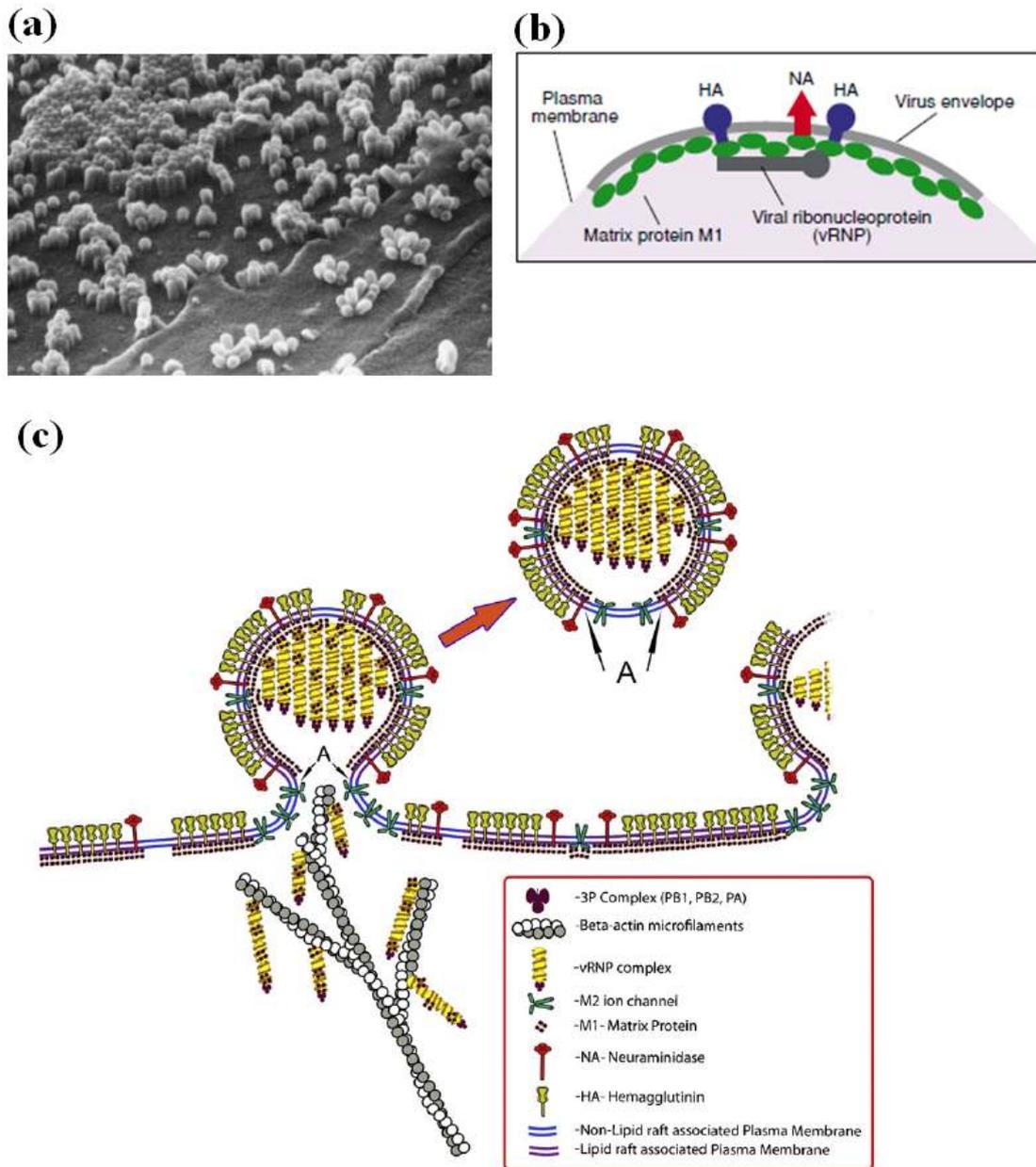


図 5-3 ウイルス感染後期の細胞膜の様子

- (a) ウイルス出芽段階の細胞膜電子顕微鏡像(ref)
- (b) ウイルス感染後期のウイルス構成タンパクと宿主細胞膜との関係概念図(ref)
- (c) ウイルス出芽と宿主細胞との関係概念図(ref)

5-2 ヒト気道上皮細胞の細胞局所強度

前項で示したように、ウイルスの細胞感染および複製されたウイルスの細胞外への放出において、細胞内だけでなく、細胞膜構成成分や出芽などの細胞膜形態変化が起こることが知られている。そのような細胞変化の結果、細胞膜の物理的な性質の変化が予想されるがそのような物理的性質の解析はされておらず、ウイルス感染と細胞の物理的な関係は知られていない。本章では、ウイルス感染と細胞の物理的な性質との関係解明の一助とすべく、ウイルス感染による細胞膜の物理的な性質変化の計測を試みる。インフルエンザウイルスを細胞に感染させるために、これまでに用いてきたマウス繊維芽細胞ではなく、ヒト気道上皮細胞(NCI-H292)を用いる必要がある。よって、ウイルス感染による細胞膜性質変化を解析するために、正常な状態でのヒト気道上皮細胞の物理的な性質を調べなければならない。そこで本節では、本研究で確立した細胞接着構造を介した細胞局所強度計測法を用いた、ヒト気道上皮細胞の細胞膜の物理的性質を計測した結果について述べる。

5-2-1 では、ヒト気道上皮細胞への強度計測用プローブ粒子接着状態と計測強度との関係について述べ、5-2-2 でヒト気道上皮細胞におけるアクチンフィラメントの強度計測への影響を評価した結果を述べる。

5-2-1 ヒト気道上皮細胞の細胞接着強度

第3章1節では、マウス繊維芽細胞での細胞接着状態と強度計測の関係について調べ、力計測用粒子 - 細胞間の細胞接着形成時間、接着形成時の外力により計測される強度は影響を受けることを示した。本項でも同様にヒト気道上皮細胞において、粒子-細胞間接着状態の違いによる計測強度の受ける影響を調べるために、力計測用粒子の細胞への接触時間をコントロールし、接着形成時間と計測強度との関係を計測した。ヒト気道上皮細胞(NCI-H292)は、以降 H292 と呼ぶ。

5-2-1-1 細胞接着強度計測法

NCI-H292 の培養は、Balb-3T3 と同様の試薬、手法で行った。H292 は 0.01% type-1 コラーゲンをコーティングしたガラスボトムディッシュで、計測 2 日前より培養したものを用いた。接着形成方法は 3-1-1-2、および細胞強度計測方法は Mode I を用いた、接着形成時間は、0、5、10、20、30、60 分とした。強度計測条件は、強度計測用プローブ粒子はコラーゲン処理した直径 2 μ m のポリスチレン粒子を用いた。またこの粒子捕捉および粒子加振運動は Nd:YVO4 レーザーを使用し、使用時のレーザー入射強度は 140mW とした。このときの光ピンセットバネ定数は 935 μ N/m である。また加振運動は、振幅 810nm、周波数 0.5Hz で行った。粒子重心位置計測は、CCD カメラ(Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度 33msec/frame、画素サイズ 21.19 nm/pixel で行った。強度計測は、各接着時間につき 30~40 細胞について計測した。

5-2-1-2 接着時間と細胞強度の関係の解析結果と考察

図 5-4 に接着形成時間ごとの細胞局所強度計測結果を示した。H292(図 5-4 中の○)での細胞強度計測の結果、接着開始 10 分にかけて急速な強度強化が起こり、その後緩やかな上昇が続いた。第 3 章で述べた Balb-3T3 についても図 5-4 に示しているが(図 5-4 中の●)、H292 と比べると、接着開始 10 分目までは同様な強度形成の立ち上がりを示した。また、接着開始 10~30 分にかけては、H292、Balb-3T3 ともに緩やかな上昇はするものの、その傾きに僅かな差がみられた。また、形成開始後 60 分にかけて Balb-3T3 は減少傾向にあったが、一方 H292 では上昇した。

H292 での接着時間と強度計測の関係を調べた結果、Balb-3T3 での結果と同様な強度変化がみられた。この結果より H292 での細胞接着を介した細胞局所強度計測は細胞と力計測用粒子との接着状態を考慮する必要があることがわかる。

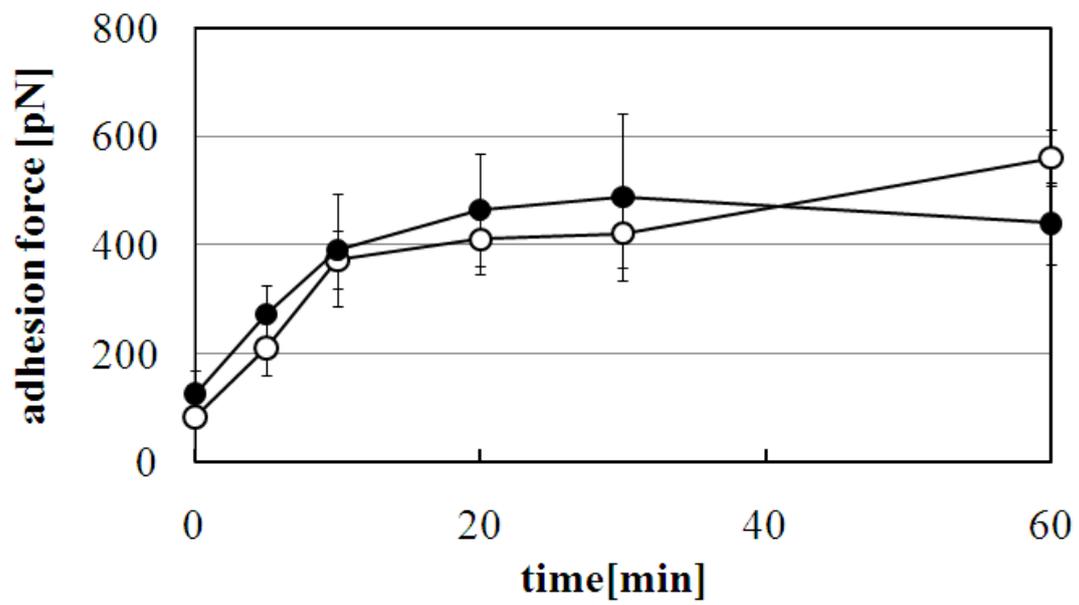


図 5-4 接着形成時間と細胞局所強度の関係

● : Balb-3T3 での細胞局所強度

○ : H292 での細胞局所強度

5-2-2 ヒト気道上皮細胞におけるアクチンフィラメントの強度計測への影響

ヒト気道上皮細胞におけるアクチンフィラメントの強度計測への影響を評価するために、第3章2節と同様にアクチンフィラメント形成阻害、アクトミオシン相互作用阻害による細胞強度計測が受ける影響を調べた。アクチンフィラメント形成阻害は、サイトカラシン D を用い、アクトミオシン相互作用は、Y-27632 により阻害した。アクチン形成阻害については、細胞蛍光イメージングにより検証した(5-2-2-1)。およびアクチンフィラメントの強度計測への影響については 5-2-2-2 に示した。

5-2-2-1 アクチンフィラメント形成阻害効果の検証

各種薬剤での細胞処理および細胞染色は 3-2-2-1 と同様の手法で行った。各種薬剤処理条件は、5 μ M Cytochalasin D、10 μ M Y-27632 とした。細胞蛍光標識は、薬剤添加および再培養それぞれの細胞に対して、4%パラホルムアルデヒドおよび 0.2% Triton X-100 で処理し、Alexa fluoro phalloidine、Oregon green paclitaxel、DAPI にてアクチンフィラメント、微小管および核を其々染色した。蛍光イメージングは EM-CCD カメラ(浜松ホトニクス、)、aqua cosmos で撮像した。

イメージング結果を図 5-5 に示す。この結果、5 μ M Cytochalasin D 処理後アクチンフィラメントの消失がみられ、薬剤除去後再培養することでアクチンフィラメントの回復がみられた。また、10 μ M Y-27632 ではアクチンフィラメント形態に変化はなく、薬剤除去、再培養後も変化は見られなかった。これより、Cytochalasin D によるアクチンフィラメント形成阻害効果を検証することができた。

5-2-2-2 アクチンフィラメントの強度計測への影響の評価

Cytochalasin D および Y-27632 にアクチンフィラメント形成/機能阻害時の細胞局所強度計測方法は、3-2-2-2 で示した手法と同様である。粒子接着形成時間は 30 分とし、その後薬剤処理 30 分の後、細胞局所強度を計測した。強度変化のコントロールとして、Cytochalasin D 溶液の溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)を用い、最終濃度 0.5%で細胞に添加した。強度計測条件は、強度計測用プローブ粒子はコラーゲン処理した直径 2 μ m のポリスチレン粒子を、またこの粒子捕捉および粒子加振運動は Nd:YVO4 レーザーを使用し、使用時のレーザー入射強度は 140mW とした。このときの光ピンセットバネ定数は 935 μ N/m である。また加振運動は、振幅 810nm、周波数 0.5Hz で行った。粒子重心位置計測は、CCD カメラ (Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度 33msec/frame、画素サイズ 21.19 nm/pixel で行った。強度計測は、各接着時間につき 30~40 細胞について計測した。

細胞局所強度計測結果を図 5-6 に示す。結果、Cytochalasin D 溶液の溶媒ジメチルスルホキシドでは、通常条件の接着条件のものとは比べ変化はなく、Cytochalasin D 処理により、計測強度が有意に減少した。また、Y-27632 では、通常接着条件およびジメチルスルホキシド処理のものとは比べて、変化はみられなかった。

この結果より、H292においても細胞接着を介した細胞局所強度計測法は細胞内のアクトミオシン相互作用による **traction force** ではなく、細胞膜および細胞膜付近に存在する微小なアクチンフィラメントとの相互作用による影響を受けていることがわかる。

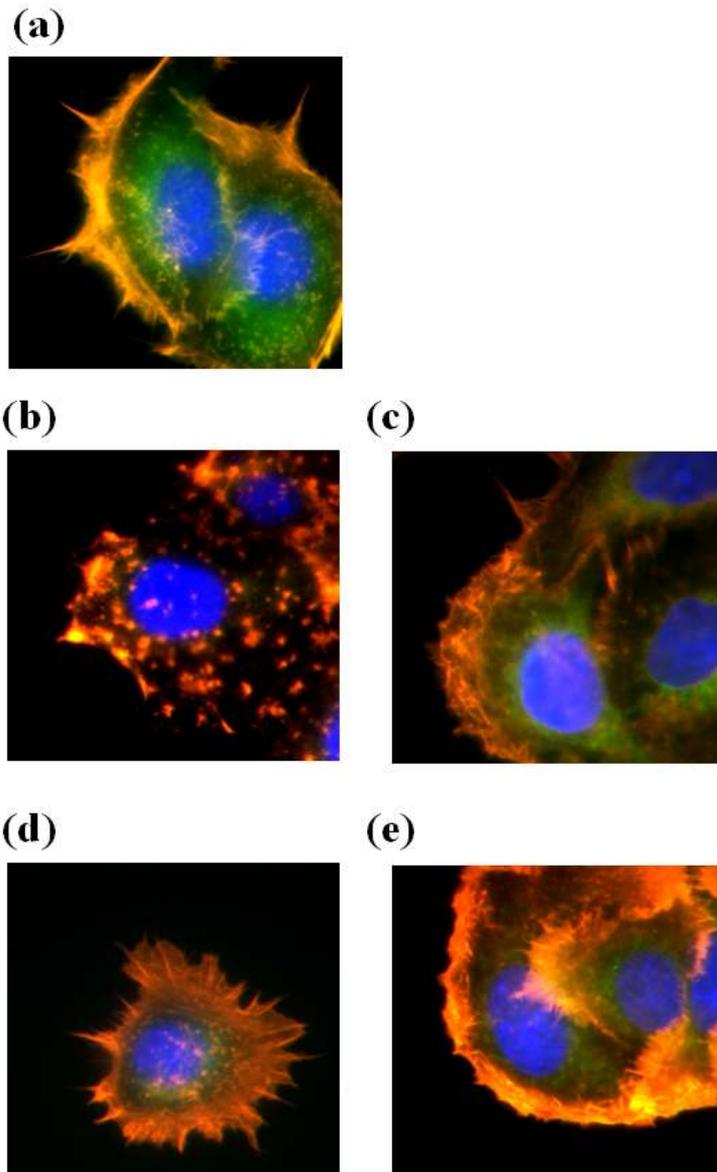


図 5-5 H292 蛍光イメージング

(a) コントロール(0.5% ジメチルスルホキシド)

(b) 5 μ M Cytochalasin D (d) 10 μ M Y-27632

(c) 5 μ M Cytochalasin D 除去後再培養 (e) 10 μ M Y-27632 除去後再培養

赤：アクチン 緑：微小管 青：核

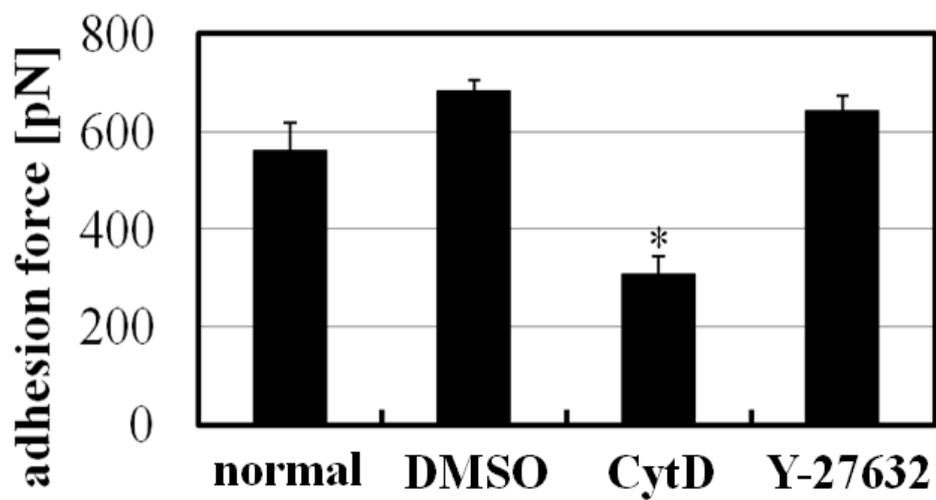


図 5-6 アクチンフィラメントの細胞強度計測への影響評価

normal : 接着形成 60 分後の細胞接着強度

DMSO : 0.5% ジメチルスルホキシド

CytD : 3 μ M Cytochalasin D Y-27632 : 10 μ M Y-27632

*は $p < 0.05$ を示す。

5-3 インフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測

本節では、本研究で確立した細胞接着を介した細胞局所強度計測法を用いて、インフルエンザ感染細胞の物理的な性質について述べる。本章 1 節で述べたとおり、インフルエンザウイルス感染によって、細胞内だけでなく細胞膜やその付近の性質が変化し、特にウイルスの細胞外への出芽時には、細胞膜でのウイルスタンパクの局在化や脂質ラフト、アクチンフィラメントにより細胞膜の物理的性質の変化が予測される。本節では、これまでに確立してきた細胞局所強度計測法を用いて、インフルエンザウイルス感染細胞の物理的性質の評価を試みる。特に、インフルエンザウイルスが細胞に付着してからどのように細胞膜の性質が変化するのか、ウイルス感染時間が異なる細胞での強度計測により解析する。

5-3-1 では、H292 へのインフルエンザウイルス感染方法と感染成否の判定について、5-3-2 ではインフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測の方法と結果について述べ、5-3-3 で考察を行う。

5-3-1 H292 へのインフルエンザウイルス感染と感染成否評価

インフルエンザウイルス感染およびそれに続くウイルス感染細胞での解析のすべては、法政大学生命科学部生命機能学科分子ウイルス研究室本田教授指導のもと、法政大学にて執り行った。

H292 にインフルエンザウイルスを感染させ、感染に伴う細胞の物理的な性質変化を解析するために、インフルエンザウイルスの細胞への感染成否を評価した。ウイルス感染の成否は、ウイルス RNA を蛍光色素で標識後、細胞に感染させ、細胞内でウイルス RNA による蛍光の有無により評価した。ウイルス RNA 蛍光標識には、LDS-751 を用いた。LDS-751 は、高いストークスシフトを起こす性質を持つため多重染色でよく使用され、DNA への結合の場合、最大励起波長は 543nm、最大蛍光波長は 712nm となる。また RNA への結合では、最大励起波長、最大蛍光波長はそれぞれ、590nm、607nm となる。

LDS-751 によるインフルエンザウイルス蛍光標識の前に、LDS-751 を PBS(-)で 20 倍希釈し、結晶化 LDS-751 を除去するために 15,000 rpm で 10 分遠心分離した。上清のみを 1 μ l 採取し、5 μ l のウイルス溶液に混合し室温で 10 分インキュベートし、インフルエンザウイルスのウイルス RNA を蛍光標識した。蛍光標識ウイルスを、PBS(-)で 2 回洗浄し 2ml の培養液を入れた H292 培養ディッシュに添加し、37 度、5%CO₂ で 60 分インキュベートの後蛍光観察を行った。光源は水銀ランプを用い、画像取得には EM-CCD カメラ(iXon^{EM}, Andor)を用いた。対物レンズは油浸 Plan Fluor, x100, NA1.30(Nikon)を用いた。

LDS-751 標識インフルエンザウイルス感染 H292 の蛍光画像を図 5-7(a)に示す。蛍光標識インフルエンザウイルスを感染させた結果、核近傍に点状の蛍光をみることができる。図 5-7(a)の核辺縁にみられる集合体は、おそらく LDS-751 によるミトコンドリアが染色された

結果と予想される。

また、インフルエンザウイルスが細胞に感染すると、アポトーシスが起ることが知られている¹¹²。細胞へのインフルエンザウイルス感染後約 14~21 時間でアポトーシスが誘導される¹¹³。またウイルス感染後の type-I,II インターフェロンの発現による免疫反応が、腫瘍壊死因子(TNF)誘導型アポトーシスによる生体防御機構に関係している¹¹⁴。一方ウイルス自身は、インフルエンザウイルス構成タンパクである NS-1 により、アポトーシスの抑制を誘導し、宿主細胞の自滅を防いでいる¹¹³。そこで、H292 へのウイルス感染成否をさらに評価するために、インフルエンザウイルス感染によるアポトーシスの誘導を目視で確認した。その結果を図 5-7(b,c)に示す。図 5-7(b)は正常状態の H292 培養細胞の顕微鏡像である。図 5-7(c)は、インフルエンザウイルス感染後 24 時間培養した H292 の顕微鏡像である。両方の細胞は同時に調整し、総培養時間は同様である。正常状態の H292 は、細胞増殖を続けコンフルエントな状態となっている。一方インフルエンザウイルス感染細胞は、一部の細胞が浮遊しており、アポトーシスが誘導されていることを示す。

RNA 蛍光色素標識インフルエンザウイルスの細胞内への侵入の確認、およびインフルエンザウイルス感染後のアポトーシスの誘導により、本実験での H292 へのインフルエンザウイルスの感染成立が確認された。

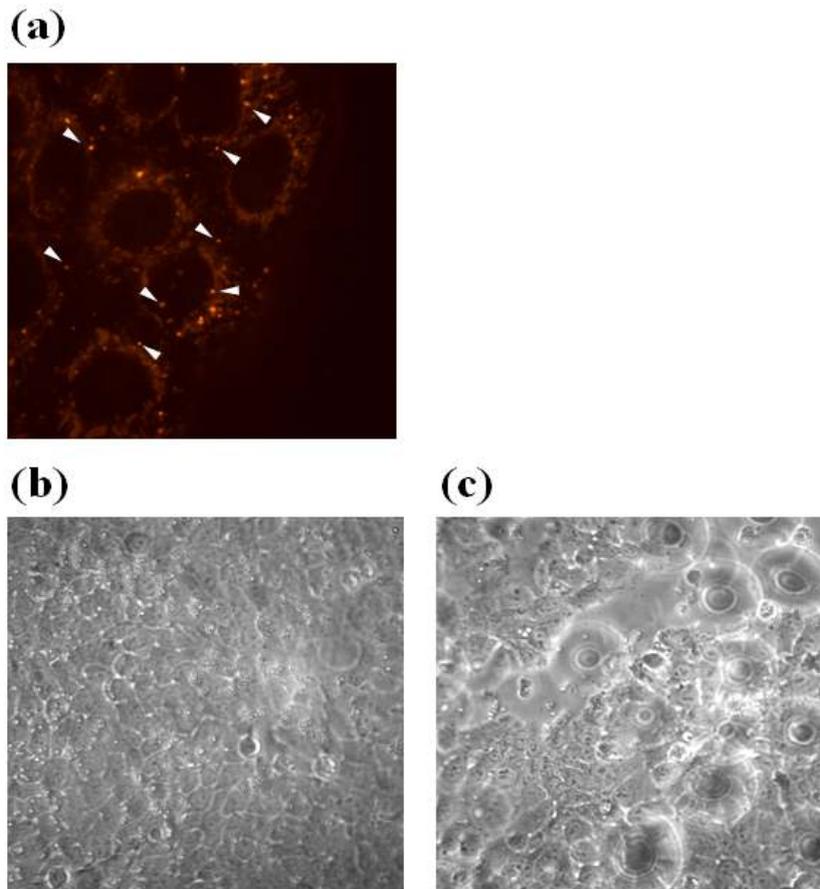


図 5-7 H292 へのインフルエンザウイルス感染成否確認結果

(a) LDS-751 によりウイルス RNA を蛍光標識されたインフルエンザウイルスの細胞への感染 60 分後の細胞蛍光イメージング結果

(図中矢印はインフルエンザウイルスを示す。)

(b) 正常培養中の H292 位相差画像

(c) インフルエンザウイルス感染 24 時間後の H292 位相差画像

5-3-2 インフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測

インフルエンザウイルス感染による細胞物理的性質がどのように変化するのか調べるために、本節ではこれまでにウイルス感染用細胞である H292 での細胞局所強度計測、H292 へのインフルエンザウイルス感染成否を評価した。本項では、インフルエンザウイルス感染 H292 での細胞強度を計測し、インフルエンザウイルス感染と細胞物理的性質との関係を調べる。まず、5-3-2-1 でインフルエンザウイルス感染 H292 での細胞強度計測法について述べ、5-3-2-2 で実際の計測結果を示す。

5-3-2-1 インフルエンザウイルス感染 H292 の細胞強度計測法

これまでの細胞局所強度計測とは異なり、インフルエンザウイルスを使用した実験となるため、そのすべてを法政大学分子ウイルス研究室で行っている。そのため、本研究で確立してきた細胞局所強度計測システムを法政大学に導入し、実際に細胞強度を計測した。

法政大学へ導入した細胞強度計測システムでは、基本となる計測システムはこれまでのものと同様であるが、光ピンセットシステムはシグマ光機製を、顕微鏡本体は倒立顕微鏡 ECLIPSE-Ti(Nikon)を用い、対物レンズは油浸 Plan Fluor, x100, NA1.30(Nikon)を用いた。力計測用プローブ粒子は、これまでと同様に type-1 コラーゲンで表面をコーティングした直径 $2\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを用いた。細胞強度計測時の力計測プローブ粒子 - 細胞間の接着形成時間は 1 分とした。

この計測系での細胞局所強度計測条件は、使用時のレーザー入射強度はレーザー出力を 500mW とした。このときの光ピンセットバネ定数は $780\mu\text{N/m}$ である。また加振運動は、振幅 550nm 、周波数 0.5Hz で行った。粒子重心位置計測は、CCD カメラ(Watec WAT-902)で粒子画像を撮像し、撮像時のシャッター速度 33msec/frame 、画素サイズ 43nm/pixel で行った。細胞強度計測は 37° 、 $5\%\text{CO}_2$ の状態で細胞を保持しながら行った。

また、H292 へのインフルエンザウイルス感染時間は、非感染細胞をウイルス感染 0 時間、細胞培養ディッシュにウイルス溶液(無染色)を添加後 15 分間、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37° でインキュベーションしたものを感染後 15 分とし、2、4、6、8、10 時間ウイルス感染させた H292 について細胞強度を計測した。細胞強度計測時間は、各時間 1 時間とし、一つの細胞につき 1 回の強度計測とし、各ウイルス感染時間につき 40 細胞についての細胞強度を計測した。

5-3-2-2 インフルエンザウイルス感染 H292 の細胞強度計測結果

インフルエンザウイルス感染細胞での細胞局所強度計測結果を表 5-1 および図 5-8 に示す。ウイルス非感染細胞では、 $199\pm 15\text{ pN}$ となり、ウイルス感染後の細胞強度も 4 時間目を除き、ほぼ同等の値を示した。ウイルス感染後 4 時間目では、細胞局所強度は $169.3\pm 13\text{ pN}$ に減少した。しかし、感染後いずれの時間に対しても、統計的に有意な変化ではなかった。

図 5-9 では、各感染時間での計測強度分布のヒストグラムを示す。非感染細胞では、 $100\sim 300\text{pN}$ にわたり強度分布が広がっており、ウイルス感染 2 時間後には、強度分布は

100~200pN に集中する傾向にあった。さらに感染後 4 時間後には 150pN に著しいピークがみられた。その後、6、8、10 時間にかけて、再度細胞強度分布はブロードな状態へと遷移した。そこで、100~200pN の計測された細胞強度に注目し、その感染時間に伴う割合の変化をグラフ化した(図 5-10)。図 5-10 では、100pN、150pN、200pN をそれぞれ、○、●、△で示し、各感染時間における各々の強度の計測強度全体に対する割合を示している。ウイルス感染初期には、150~200pN の強度が上昇し、感染後 4 時間にかけて、150pN 細胞局所強度に遷移する。その後、細胞強度は、100~150pN へと減衰することがわかる。

5-3-3 考察

本研究で確立した細胞接着を介した細胞局所強度計測法を用いて、インフルエンザウイルス感染により、細胞表面局所の物理的な性質がどのように変化するか調べた。5-3-1 では、ヒト気道上皮細胞 (H292)へのインフルエンザウイルス感染の成否を、ウイルス RNA を蛍光標識することで細胞内に侵入したウイルスを可視化し、ウイルス感染成立を確かめた。また、インフルエンザウイルス感染によりアポトーシスが誘導されることも確認した。5-3-2 では、インフルエンザウイルス感染時間により細胞局所強度がどのように変化するか実際に計測した。その結果、統計的有意差はなかったものの、計測強度は、感染後 4 時間にかけてある一定の値に収束することがわかった。これにより、ウイルス感染後 4 時間目には、細胞表面特に細胞膜と微小アクチンフィラメントの物理的な性質が変化していることが推測できる。

ここで、インフルエンザウイルス感染 4 時間後での細胞機能変化について言及する。インフルエンザウイルス感染による細胞内環境の変化は、インフルエンザウイルスの増殖による変化、インフルエンザウイルスタンパクによる宿主タンパク発現抑制、そして宿主細胞の免疫応答による変化の 3 つである。インフルエンザウイルス増殖のための、ウイルスタンパク質の合成は、感染後 1.5 時間で検出可能なレベルになり、4 時間目にはピークに達する。また、ウイルスの細胞への接着と解離に関係する HA や NA は感染後 4 時間目から 8 時間後にかけて増殖する。また、宿主細胞内のタンパク発現はインフルエンザウイルス感染により抑制され、主要なヒートショックタンパク質である HSP70 の宿主内での発現は、感染後の時間経過に連れて抑制され、感染後 4 時間後には 80%抑制される¹⁶。この HSP70 の発現抑制は、インフルエンザウイルスタンパク質の一つである NS1 が関与していることが調べられている。NS1 は宿主細胞 mRNA 前駆体のポリ A 付加部位の数十塩基上量にある、AAUAAA ポリ A シグナル結合因子である CPSF に結合し、CPSF による mRNA 前駆体のポリ A 部位切断と付加反応を阻害する。これにより、宿主細胞内で転写された遺伝子は mRNA 前駆体以降への転写、翻訳が阻害され、タンパク発現が抑制される¹¹⁵。

また、インフルエンザウイルス感染は、インターフェロン(IFN)系の自然免疫を発動させる。ウイルス感染後 4 時間で IFN- β 発現を制御するタンパク群の発現がみられ、IFN- β は感染後 12 時間後に誘導されることが知られている。4 時間後に誘導される遺伝子である

MxA¹¹⁶、OAS¹¹⁷ はインフルエンザウイルス増殖抑制作用を持つ。また、インフルエンザウイルスタンパク質の NS1 は IFN-a/b 転写因子である IRF3 の活性化を阻害し、宿主細胞免疫系に対する防御機構もインフルエンザウイルス内には備わっている¹¹⁸。

このように、インフルエンザウイルス感染 4 時間後は、ウイルス構成タンパクの宿主内での発現、宿主自身のタンパク発現抑制がピークを迎える時間、さらに宿主細胞内での免疫系の発動開始時間でもあり、宿主細胞内環境は劇的に変化していると予測できる。このような変化は、細胞外へのシグナル伝達の場合でもある細胞膜近傍でも発生しているはずであり、そのような変化によって細胞局所的な強度や細胞外との接着状態が変化すると考えられる。

現在、本実験結果を踏まえ、細胞強度に関係する細胞膜および接着について、法政大学分子ウイルス学研究室で生化学的な解析を進めていただいている。現在解析途中であるが、インフルエンザウイルス感染 4 時間後の生化学的解析の結果、細胞膜ではコレステロールの増加が薄層クロマトグラフィーにより確認されている。また、リアルタイム PCR により、インテグリンと接着関連分子である vinculin、talin の発現量が、非感染細胞に比べ抑制されていることが確認されており、ウイルス感染による細胞機能変化の新しい知見が期待される。

このようにインフルエンザウイルス感染細胞による細胞局所強度計測の結果、ウイルス感染による細胞表面の物理的な強度の変化を観測でき、さらにこの強度変化により脂質膜や接着構造に関する分子を推定することができた。本実験は、本研究で開発した細胞局所強度計測系により、細胞機能における物理的な性質と分子的な機能を結び付けることができた一例として、大きな意味を持つ。

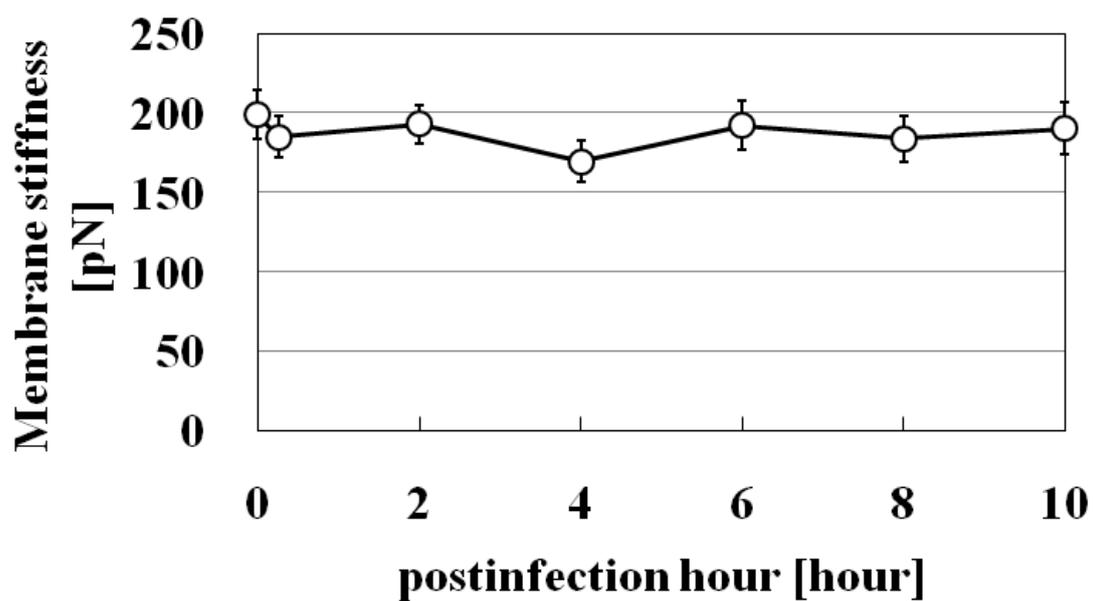


图 5-8

p.i.h	0hour	15min	2hour	4hour	6hour	8hour	10hour
number	42	42	42	42	41	42	31
Average[pN]	199.0	185.0	192.9	169.3	192.1	183.9	190.3
STD[pN]	15.0	13.2	12.2	13.0	15.7	14.5	16.6

表 5-1

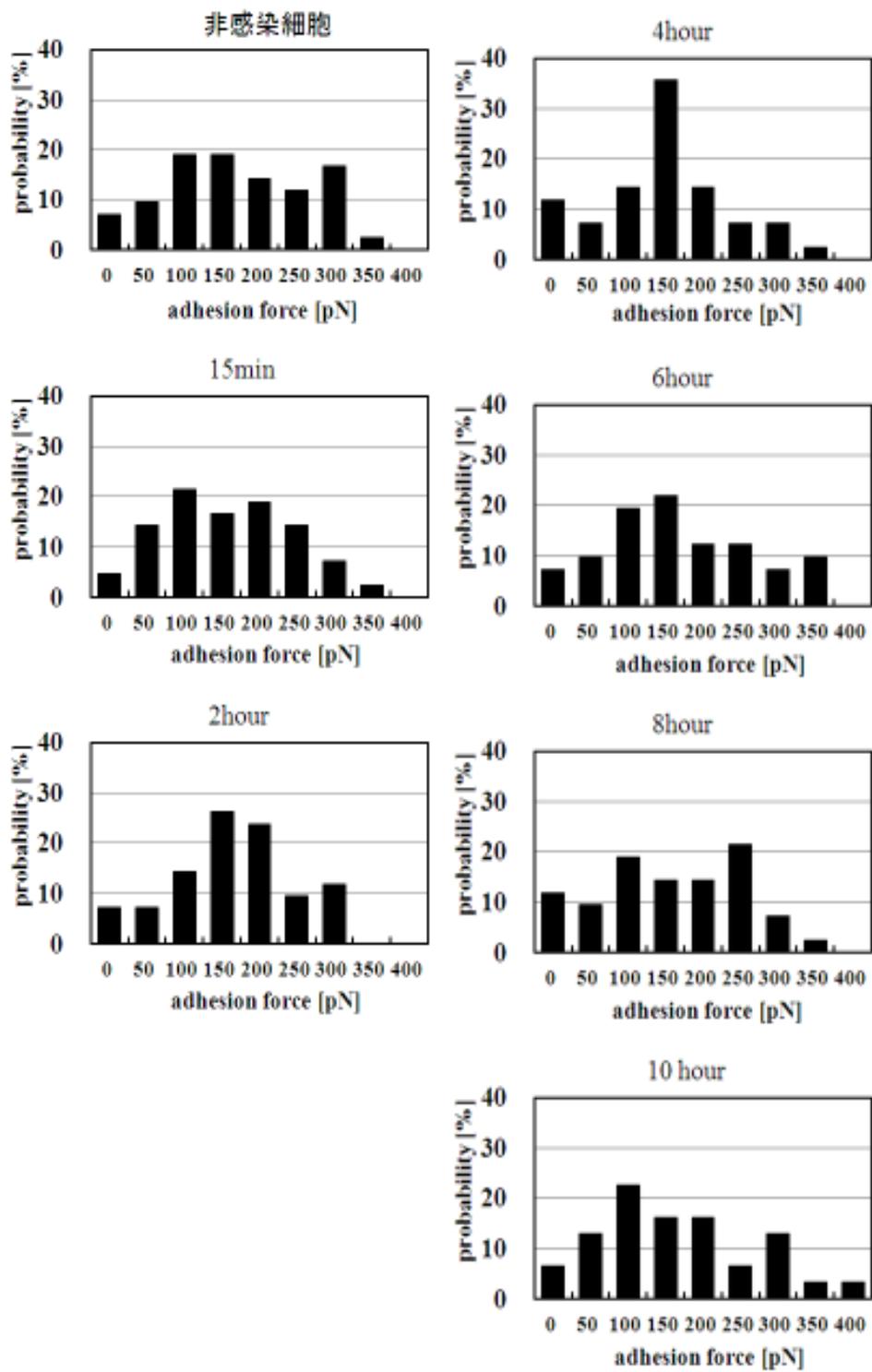


図 5-9

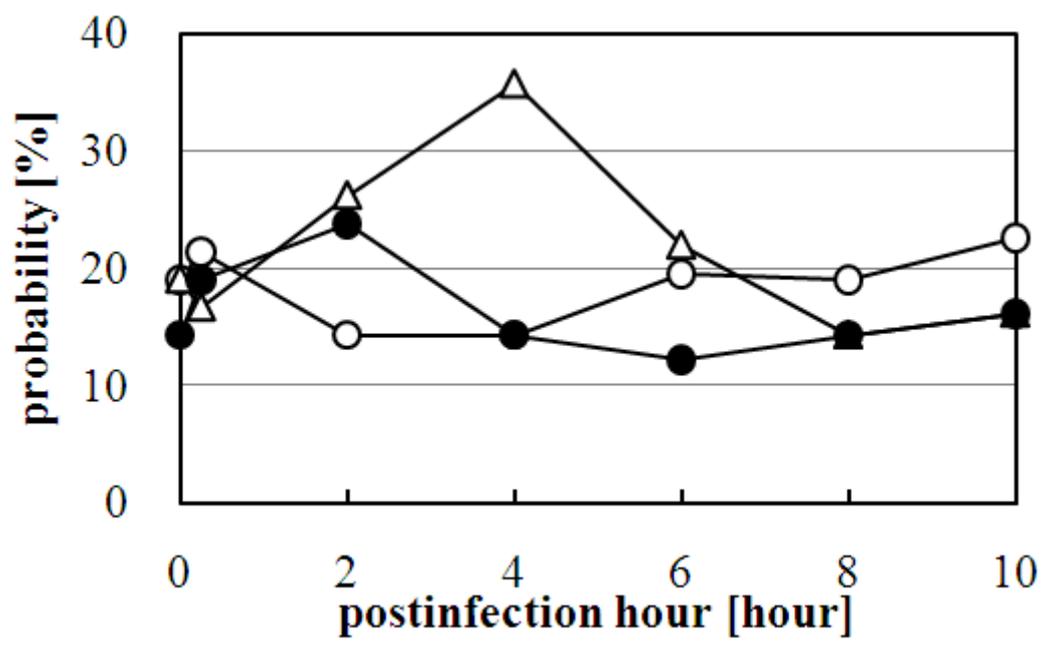


图 5-10

総括

本論文は、細胞運動、アポトーシスそして癌形成、転移など基礎生物学、医学的にも関心が集まっている細胞 - 基質間接着のメカニズムについて、物理的な視点からアプローチした研究報告である。接着メカニズムに関して、これまでに分子生物学、細胞生物学的な手法により、接着形成に関係する分子の同定が進み、さらに近年では、ナノバイオロジーの発展に伴い、ナノテクノロジーを利用した様々な方法でそれぞれの分子の接着に及ぼす機能が解明されつつある。このように、細胞接着メカニズムに関して、分子的な情報が蓄積されているが、それらの分子がどのように強固で安定な細胞接着形成に関わっているか、不明な点が多い。特に、細胞内外から機械的な力を常に受けている接着構造は、物理的な性質と分子との関係が深いと考えられている。そこで本研究では、細胞接着のメカニズム解明に対して、物理的な視点で分子と接着機能の関係にアプローチした。

第1章では、細胞接着構造の物理的な性質を理解するための、細胞局所物理的性質計測法を述べ、現状と問題点を指摘した。この計測法は磁気、原子間力そして光ピンセットなどの技術を基盤に、様々な方法が開発されている。しかし、1. 細胞における計測部位選択の自由度、2. 高感度な力検出、3. 特定な力学性質だけでなくその動的な変化の検出、4. 計測法の物理的なメカニズムの明確さが、細胞接着のような細胞局所的な物理性質を評価するために必要であると指摘した。

第2章では、それらの指摘内容を踏まえ、光ピンセットを基盤にした細胞局所物理性質計測法について言及した。光ピンセットは、顕微鏡下で微小な物体を自由に操作でき、かつその物体にかかる力を評価することができる。この性質を利用して、光ピンセットで捕捉したミクロンサイズの粒子を細胞に接着させ、振動運動させることで細胞局所を変形させる力を働かせ、粒子がその細胞から受ける力を、物理モデルを用いて評価した。その結果、粒子を細胞に接着させることで、粒子の振動運動の様子が変化し、その変化量から力を計測することで粒子接着部位の細胞局所強度計測を可能にした。光ピンセットで捕捉した粒子は自由に操作できるため、細胞上の計測したい部位を計測者が自由に選ぶことができる。また、それにより計測部位ごとの評価、解析が可能となる。また、光ピンセットで捕捉し、振動運動させている粒子にかかる力は、一回の振動で一つの力を計測することができる(Mode I)。よって、断続的に振動運動させることで、その力の時間的な変化が計測可能である(Mode II)。これらの点により、第1章で指摘した1、3を満たすことができ、さらに計測系の物理的なメカニズムを検討し、運動方程式を導きそのモデルの妥当性を示した。このように本計測系は、計測原理の物理的なメカニズムが明確であり、指摘4の課題を解決することができる。指摘2. については、第4章で評価しているが、最高で80fNの極めて微小な力変化を検出することができる。よって、この課題も満たすことができ、本計測系は細胞接着の物理的な性質評価に最適な手法であることを示した。

第3章では、本研究で確立した計測法を用いて、細胞 - 基質間接着の物理的な性質を評

価した。本計測系 **Mode I** を用いて細胞接着形成時間とその強度の関係を解析した結果、接着形成開始 20 分間で急速な強度の上昇を確認できた。また、この形成は細胞外からの力の印加により増強することが分かった。また、ここで計測されている強度は細胞内のどのような因子により影響を受けているのか評価した。細胞膜近傍で機械的な性質を与えている因子にアクチンフィラメントがある。またこれは、接着部位にも結合しており、細胞内のアクチン相互作用による張力を接着部位を介して細胞外に働かせている。よって、本計測系では、この張力により粒子運動が変化しているのか、それとも細胞の構造的な性質により影響されているのか不明であり、接着機能を評価するためには、識別しなければならない。そのため、アクチンフィラメントの形成阻害剤 **Cytochalasin D** と **Latrunculin B** を加え、さらにアクチン阻害剤 **Y-27632** で処理した細胞の強度を評価した。その結果、本計測系で評価されている強度は、アクチンの細胞内での生化学的な機能ではなく、構造的な機能により影響を受けていることが判明した。

第 4 章では、**Mode II** を用いて細胞接着形成初期過程において、その物理的な性質が時間的にどのような振る舞いをするのか評価した。接着初期は、接着構造形成に関わる様々な分子が接着部位に集合、結合し動的に接着の性質が変化していると考えられているが、現状としてこの現象は分子構造やイメージングによる予測的ではない。そこで、接着形成過程の動的な変化を計測するために、本計測系 **Mode II** を用い、細胞接着の物理的な性質を指標として、その動的な変化の可視化を試みた。細胞へ粒子を 1 分間接着した後に、継続的にその粒子を振動運動させた結果、動的な接着強度の変化を観測することができた。その結果、細胞強度が分子の結合/解離により階段状に変化する様子が観測でき、さらに階段状の接着強度上昇は、不安定な状態から安定状態へと遷移することが分かった。また、これらはアクチンフィラメント非依存的に発生することも判明した。このような強度の変化がどのような特徴量を持っているかヒストグラムにより解析した結果、**28pN** の特徴量を示し、細胞外基質 - インテグリン 1 分子の結合力に近い値を示し、この値もアクチンフィラメント非依存的であることが分かった。また、**DMSO** による膜性質変化により数 **pN** 低い値にシフトしたことから、本計測系では細胞膜脂質と膜タンパクの物理的な関係を計測することが可能であることを示唆できた。また、アクチンフィラメントに依存する特徴量は **16pN** および **44pN** にみられた。

そして第 5 章では、本研究で確立した細胞局所強度計測の適応例の一つとしてインフルエンザウイルス感染による細胞の物理的な性質の変化を解析した結果について述べた。インフルエンザウイルス感染細胞の感染時間と物理的な性質の関係を計測した結果、ウイルス感染後 4 時間後に特徴的な計測強度分布の変化が確認できた。ウイルス感染 4 時間目は細胞内でのウイルスタンパクの増幅、宿主細胞免疫系タンパク発現が顕著になる時間である。そのため、さらなる解析は必要であるがインフルエンザ自身および宿主細胞応答などの細胞な環境変化に加え、細胞表面の物理的な環境も変化していることが示唆できた。

このように、本研究で確立した強度計測法は、細胞局所的強度評価に最適で、単一物理

量計測による細胞機能評価や、継続的な強度評価によるダイナミックな物理的性質の変化を可視化することが可能である。分子生物学的な検証やレーザー光による細胞毒性、計測系による機械的刺激など検討すべき課題は多数残っているが、本研究により計測系の基盤を評価、提示できたと考えている。

分子生物学的な検証では、計測系に与える分子の発現、機能阻害により、どのような影響がみられるのか評価することが必要であるが、この評価を通して新しく分子と物理的な性質を結び付ける新しい知見が得られることも期待できる。さらにインフルエンザウイルスでの感染と強度の解析は、検証を積み重ねる必要はあるが、今後癌細胞での接着構造を介した強度解析や転移能との関係性を評価し、そのメカニズム解明の一つのツールとして普及できる重要な適応例である。また、今回は粒子コーティングをコラーゲンのみで行ったが、他の細胞外基質を使用することで、幅広い細胞接着現象に適応可能であり、他にも膜タンパクに結合できるように処理することで、その適応範囲は細胞接着にとどまらず様々な細胞機能に対して応用できる。

業績

査読付学術論文

1. Hideaki Miyoshi, Tadao Sugiura, Kotaro Minato, “Cell Palpation System Based on a Force Measurement by Optical Tweezers for Investigation of Local Mechanical Properties of a Cell Membrane”, Jpn. J. Appl. Phys., vol.48, p. 120223, 2009. 第 2 章

査読付国際会議発表

1. Hideaki Miyoshi, Tadao Sugiura, Kotaro Minato, “Cell response measurement by mechanical stimulation with an optically manipulated microbead”, Focus on Microscopy 2008, Program and Abstract book, p. 176, April 2008. 第 2 章
2. Hideaki Miyoshi, Tadao Sugiura, Kotaro Minato, “Cell palpation system for local mechanical properties of a cell with an optically manipulated particle”, Bios part of SPIE Photonics West, Paper Number:7182-37, January 2009. 第 2,3 章
3. Hideaki Miyoshi, Tadao Sugiura, Kotaro Minato, “Growth Process and Mechanics of Cell Adhesion Investigated by Optical Tweezers”, Biophysical Society 54th Annual Meeting, November 2010. 第 3,4 章

査読付国内学会

1. 三好秀明・杉浦忠男・湊小太郎, 光ピンセットによる機械的刺激に対する細胞応答計測法の開発, 第 55 回応用物理学関係連合講演会, 講演予稿集 p. 1073, 2008 年 3 月
2. 三好秀明・杉浦忠男・湊小太郎, 光ピンセットによる機械的刺激に対する細胞応答計測法の開発, 第 47 回日本生体医工学会大会, 生体医工学, Vol.46, p. 120, 2008 年 5 月
3. 三好秀明・杉浦忠男・湊小太郎, 光ピンセット細胞触診システムによる細胞接着の力学的アプローチ, 日本生物物理学会第 46 回年会, 講演予稿集, p S154, 2008 年 12 月
4. 三好秀明・杉浦忠男・湊小太郎, Integrin behavior on single molecular level in a cell investigated with high sensitive force measurement system, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 要旨集, p181, 2009 年 6 月
5. 三好秀明・杉浦忠男・湊小太郎, Visualization for dynamics of single focal adhesion formation, 日本生物物理学会第 47 回年会, 講演予稿, p S56, 2009 年 10 月

参考文献

1. 三俣 昌子, "血流に反応する血管内皮細胞", *The Journal of Japanese College of Angiology*, vol.43, No.11, 733-743 (2003)
2. K. Naruse, "Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch", *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 274, 1532-1558 (1998)
3. K. Nagayama, S. Yanagihara and T. Matsumoto, "A novel micro tensile tester with feed-back control for viscoelastic analysis of single isolated smooth muscle cells", *Medical Engineering & Physics*, 29, 620-628 (2007)
4. J. L. Mege, C. Capo, A. M. Benoliel and P. Bongrand, "Use of cell contour analysis to evaluate the affinity between macrophages and glutaraldehyde-treated erythrocytes", *J. Biophys.*, vol.52, 177-186 (1987)
5. F. Guilak, J. R. Tedrow, and R. Burgkart, "Viscoelastic properties of the cell nucleus", *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, 269, 781-786 (2000)
6. R. Merkel, R. Simson, D.A. Simson, M. Hohenadl, A. Boulbitch, E. Wallraff, and E. Sackmann, "A micro mechanic study of cell polarity and plasma membrane cell body coupling in dictyostelium", *J. Biophys.*, vol.79, 707-719 (2000)
7. R. M. Hochmuth, "Micropipette aspiration of living cells", *J. Biomech.*, 33, 15-22 (2000)
8. V. Heinrich, A. Leung, and E. Evans, "Nano- to microscale dynamics of p-selectin detachment from leukocyte interfaces. II. Tether flow terminated by p-selectin dissociation from PSLG-1", *J. Biophys.*, vol.88, 2299-2308 (2005)
9. N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger, "Force and focal adhesion assembly a close relationship studied using elastic micropatterned substrates", *Nat. Cell Biol.*, vol.3, 466-472 (2001)
10. B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada, "Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk", *Mole. Cell Biol.*, vol.2, 793-805 (2001)

11. S. M. Frisch and H. Francis, "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis", *J. Cell Biol.*, vol.124, 619-626 (1994)
12. S. M. Frisch, K. Vuori, E. Ruoslahti, and Po-Young Chan-Hui, "Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase", *J. Cell Biol.* Vol.134, 793-799 (1996)
13. K. B. Kaplan, J. R. Swedlow, D. O. Morgan, and H. E. Varmus, "c-Src enhances the spreading of src^{-/-} fibroblast on fibronectin by a kinase-independent mechanism", *Genes & Development*, 9, 1505-1517 (1995)
14. H. Jim, and J. Varner, "Integrins : roles in cancer development and as treatment targets", *Brit. J. Cancer*, 90, 561-565 (2004)
15. A. Ashkin, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles", *Opt. Lett.*, vol.11, 288-290 (1986)
16. J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich, "Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps", *Nature.*, vol.368, 113-119 (1994)
17. T. Ota, T. Sugiura, and S. Kawata, "Rapture force measurement of biotin-streptavidin bonds using optical trapping", *Appl. Phys. Lett.*, vol.87, 043901 (2005).
18. B. D. Brower-Toland, C. L. Smith, R. C. Yeh, J. T. Lis, C. L. Peterson, and M. D. Wang, "Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.99, 1960-1965 (2002)
19. M. J. Footer, J. W. J. Kerssemakers, J. A. Theriot, and M. Dogterom, "Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol.104, 2181-2186 (2007)
20. L. Hemming, D. J. Rees, V. Ohanian, S. J. Bolton, A. P. Gilmore, B. Patel, H. Priddle, J. E. Trevithick, R. O. Hynes, and D. R. Critchley, "Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site", *J. Cell Sci.*, vol.109, 2715-2726 (1996)

21. A. Horwitz, K. Duggan, C. Buck, M. C. Berckerle, and K. Burridge, "Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage", *Nature*, vol.320, 531-533
22. C. A. Okey, F. M. Pavalko, and K. Burridge, "An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit *in vivo*", *J. Cell Biol.*, vol.111, 721-729 (1990)
23. K. Burridge, and P. Mangeat, "An interaction between vinculin and talin", *Nature*, vol.308, 744-746 (1984)
24. A. P. Gilmore, and K. Burridge, "Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate", *Nature*, vol.381, 531-535 (1996)
25. R. P. Johnson, and S. W. Craig, "F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and talin domains", *Nature*, vol.373, 261-264 (1995)
26. T. Volberg, B. Geiger, Z. Kam, R. Pankov, I. Simcha, H. Sabanay, J. L. Coll, E. Adamson, and A. Ben-Ze'ev, "Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption", *J. Cell sci.*, vol.108, 2253-2260 (1995)
27. X. Zhang, G. Jiang, Y. Cai, S. J. Monkley, D. R. Critchley, and M. P. Sheetz, "Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction", *Nat. Cell Biol.*, vol.10, 1062-1068 (2008)
28. T. D. Pollard, "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol.36, 453-465 (2007)
29. Y. L. Wang, "Flux at focal adhesion: slippage clutch, mechanical guide, or signal depot", *Sci. STKE*, vol.2007, pe10 (2007)
30. K. Clark, M. Langestag, C. G. Figdor, and F. N. von Leeuwen, "Myosin II and mechanotransduction: a balancing act", *Trends, Cell Biol.*, vol.17, 178-186 (2007)
31. T. M. Svitkina, and G. G. Borisy, "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmiling of actin filament array in lamelipodia", *J. Cell Biol.*, vol.145, 1009-1026 (1999)

32. C. D. Nobes, and A. Hall, "Rho, Rac, and Cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fiber", *Cell*, vol.81, 53-56 (1995)
33. K. Rottner, A. Hall, and J. V. Small, "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics", *Curr. Biol.*, vol.9, 640-649 (1999)
34. R. Zaidel-Bar, C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger, "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells", *J. Cell Sci.*, vol.116, 4605-4613 (2003)
35. G. Giannone, B. J. Dubin-Thaler, O. Rossier, Y. Cai, O. Chaga, G. Jiang, W. Beaver, H. G. Dobereiner, et al., "Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation", *Cell*, vol.128, 561-575 (2007)
36. G. M. Maksym, B. Fabry, J. P. Bulter, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, J. D. Laporte, and J. J. Fredberg, "Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz", *J. Appl. Physiol.*, vol.89, 1619-1632 (2000)
37. B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, and J. J. Fredberg, "Scaling the microrheology of living cells", *Phys. Rev. Lett.*, vol.87, 148102-1-4 (2001)
38. B. Fabry, G. N. Maksym, S. A. Shore, P. E. Moore, R. A. Panettieri, J. P. Bulter, and J. J. Fredberg, "Signal transduction in smooth muscle selected contribution: time course and heterogeneity of contractile response in cultured human airway smooth muscle cells", *J. Appl. Physiol.*, vol.91, 981-994 (2001)
39. S. M. Mijailovich, M. Kojic, M. Zivkovic, B. Fabry, and J. J. Fredberg, "A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting", *J. Appl. Physiol.* Vol.93, 1429-1436 (2002)
40. B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Bulter, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet, and J. J. Fredberg, "Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells", *Phys. Rev. E*, vol.68 (2003)

41. J. Chen, B. Fabry, E. L. Schiffrin, and N. Wang, "Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol.280, C1475-C1484 (2001)
42. P. Kollmannsberger, and B. Fabry, "High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications", *Rev. Sci. Instr.*, vol.78, 114301 (2007)
43. C. T. Mierke, P. Kollmannsberger, D. P. Zitterbart, J. Smith, B. Fabry, and W. H. Goldmann, "Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin talin domain", *Biophys. J.*, vol.94, 661-670 (2008)
44. P. P. Lehenkari, and M. A. Horton, "Single integrin molecule adhesion force in intact cells measurement by atomic force microscopy", *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, vol.259, 645-650 (1999)
45. J. Zlatanova, S. M. Lindsay, and S. H. Leuba, "Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope", *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol.74, 37-61 (2000)
46. E. A. Evans, and D. A. Calderwood, "Forces and bond dynamics in cell adhesion", *Science*, vol.316, 1148-1153 (2007)
47. L. Ng, H. H. Hung, A. Sprunt, S. Chubinskaya, C. Ortiz, and A. Grodzinsky, "Nanomechanical properties of individual chondrocytes and their developing growth factor-stimulated pericellular matrix", *J. Biomech.*, vol.40, 1011-1023 (2007)
48. Z. Li, B. Anvari, M. Takashima, P. Brecht, J. H. Torres, and W. E. Brownell, "Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers", *Biophys. J.*, vol.82, 1386-1395 (2002)
49. S. E. Ermilov, D. R. Murdock, F. Qian, W. E. Brownell, and B. Anvari, "Studies of plasma membrane mechanics and plasma membrane-cytoskeleton interactions using optical tweezers and fluorescence imaging", *J. Biomech.*, vol.40, 476-480 (2007)
50. S. A. Ermilov, D. R. Murdock, D. E. Daye, W. E. Brownell, and B. Anvari, "Effect of salicylate on plasma membrane mechanics", *J. Neurophysiol.*, vol.94, 2105-2110 (2005)

51. G. Koster, A. Cacciuto, I. Derenyi, D. Frenkel, and M. Dogterom, "Force barriers of membrane tube formation", *Phys. Rev. Lett.*, vol.94, 068101 (2005)
52. I. Titushkin, and M. Cho, "Distinct membrane mechanical properties of human mesenchymal stem cells determined using laser optical tweezers", *Biophys. J.*, vol.90, 2582-2591 (2006)
53. Y. Iwatabe, and S. Yumura, "Actin-based propulsive forces and myosin-II-based contractile forces in migrating *Dictyostelium* cells", *J. Cell Sci.*, vol.121, 1314-1324 (2008)
54. S. A. Maskarinec, C. Franck, D. A. Tirrell, and G. Ravichandran, "Quantifying cellular traction forces in three dimensions", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.106, 22108-22113 (2009)
55. B. Sabass, M. L. Gardel, C. M. Waterman, and U. S. Schwarz, "High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances", *Biophys. J.*, vol.94, 207-220 (2008)
56. V. Vogel, and M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions", *Mol. Cell Biol.*, vol.7, 265-275 (2006)
57. J. L. Tan, J. Tien, D. M. Plone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, "Cells lying on a bed of microneedle : An approach to isolate mechanical force", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.100, 4, 1484-1489 (2003)
58. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane, "Optical Trapping And Manipulation of Single Cells Using Infrared-Laser Beams", *Nature*, vol.330, 769-771 (1987)
59. J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich, "Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometer steps", *Nature*, vol.368, 113-119 (1994)
60. H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, and J. Gelles, "Transcription Against an Applied Force", *Science*, vol.270, 1653-1657 (1995)
61. R. T. Dame, M. C. Noom, and G. J. L. Wuite, "Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation", *Nature*, vol.444, 387-390 (2006)

62. G. Koster, A. Cacciuto, I. Derenyi, D. Frenkel, and M. Dogterom, “Force Barriers for Membrane Tube Formation”, *Phys. Rev. Lett.*, vol.94, 068101 (2005)
63. D. R. Murdock, S. A. Ermilov, A. A. Spector, A. S. Popel, W. E. Brownell, and B. Anvari, “Effects of Chlorpromazine on Mechanical Properties of the Outer Hair Cell Plasma Membrane”, *J. Biophys.*, vol.89, 4090-4095 (2005)
64. 米沢富美子, “ブラウン運動 第9版”, 物理学 one point, 27 (2007)
65. N. Suzuki, H. Miyata, S. Ishiwata, and K. Kinoshita Jr, “Preparation of bead-tailed actin filaments: estimation of the torque produced by the sliding force in an in vitro motility assay”, *Biophys. J.*, vol.70, 401-408 (1996)
66. C. S. Izzard, “A precursor of the focal contact in cultured fibroblasts”, *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol.10, 137-142 (1988)
67. J. A. DePasquale, and C. S. Izzard, “Evidence for an actin-containing cytoplasmic precursor of the focal contact and the timing of incorporation of vinculin at the focal contact”, *J. Cell Biol.*, vol.105, 2803-2809 (1987)
68. C. D. Nobes, and A. Hall, “Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia”, *Cell*, vol.81, 53-62 (1995)
69. B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada, “Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol.2, 793-805 (2001)
70. B. Geiger, and A. Bershadsky, “Assembly and mechanosensory function of focal contacts”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol.13, 584-592 (2001)
71. E. Zamir, M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B. Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger, “Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts”, *Nat. Cell Biol.*, vol.2, 191-196 (2000)

72. E. A. Clark, W. G. King, J. S. Brugge, M. Symons, and R. O. Hynes, "Integrin-mediated signal regulated by membranes of the Rho Family of GTPases", *J. Cell Biol.*, vol.142, 573-586 (1998)
73. K. Rottner, A. Hall, and J. V. Small, "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics", *Curr. Biol.*, vol.9, 640-648 (1999)
74. N. Watanabe, T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, and S. Narumiya, "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization", *Nat. Cell Biol.*, vol.1, 136-143 (1999)
75. N. Watanabe, P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, B. M. Jockusch, and S. Narumiya, "p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin", *EMBO*, vol.16, 3044-3056 (1997)
76. D. Reveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A. D. Bershadsky, "Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an Mdia1-dependent and ROCK-independent mechanism", *J. Cell Biol.*, vol.153, 1175-1186 (2001)
77. R. D. Mulins, J. A. Heuser, and T. D. Pollard, "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.95, 6181-6186 (1998)
78. M. S. Kolodney, and R. B. Wysolmerski, "Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study", *J. Biol. Chem.*, vol.117, 73-82 (1992)
79. E. L. Elson, "Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function", *Annu. Rev. Biophys. Biol. Chem.*, vol.17, 397-430 (1988)
80. N. Wang, J. P. Butler, and D. E. Ingber, "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton", *Science*, vol.260, 1124-1127 (1993)
81. M. Coue, S. L. Brenner, I. Spector, and E. D. Korn, "Inhibition of actin polymerization by latrunculin A", *FEBS Lett.*, vol.213, 316-318 (1987)

82. I. Spector, N. R. Shochet, D. Blasberger, and Y. Kashman, "Latrunculin-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D", *Cell Motil. Cytoskel.*, vol.13, 127-144 (1989)
83. K. Itoh, K. Yoshioka, H. Akedo, M. Uehata, T. Ishizaki, and S. Narumiya, "An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells", *Nat. Med.*, vol.5, 221-225 (1999)
84. T. Ishizaki, M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nomura, M. Maekawa, and S. Narumiya, "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinase", *Mol. Pharmacol.*, vol.57, 976-983 (2000)
85. H. Nakagawa, K. Yoshioka, E. Miyahata, Y. Fukushima, M. Tamura, and K. Itoh, "Intrathecal administration of Y-27632, specific Rho-associated kinase inhibitor, for rat neoplastic meningitis", *Mol. Cancer Res.*, vol.3, 425-433 (2005)
86. M. Arnold, E. A. cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blummel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, and J. P. Spatz, "Activation of integrin function nanopatterned adhesive interfaces", *Chem. Phys. Chem.*, vol.5, 383-388 (2004)
87. E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J. P. Spatz, "Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands", *J. Biophys.*, vol.92, 2964-2974 (2007)
88. L. Y. Koo, D. J. Irvine, A. M. Mayes, D. A. Lauffenburger, and L. G. Griffith, "Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus", *J. Cell Sci.*, vol.115, 1423-1433 (2002)
89. F. Coussen, D. Choquet, M. P. Sheetz, and H. p. Erickson, "Trimers of the fibronectin cell adhesion domain localize to actin filament bundles and undergo rearward translocation", *J. Cell Sci.*, vol.115, 2581-2590 (2002)
90. P. Roca-Cusachs, N. C. Gauthier, A. del Rio, and M. P. Sheetz, "Clustering of $\alpha_5\beta_1$ integrins determines adhesion strength whereas avb3 and talin enable mechanotransduction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.106, 38, 16245-16250 (2009)

91. C. Selhuber-Unkel, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, J. P. Spatz, "Cooperativity in adhesion cluster formation during initial cell adhesion", *J. Biophys.*, vol.95, 11, 5424-5431 (2008)
92. D. Choquet, D. P. Felsenfeld, and M. P. Sheetz, "Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkage.", *Cell*, vol. 88, 39-48 (1997)
93. D. P. Felsenfeld, P. L. Schwartzberg, A. Venegas, R. Tse, and M. P. Sheetz, "Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src.", *Nat. Cell Biol.*, vol.1, 200-206, (1999)
94. G. Giannone, and M. P. Sheetz, "Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways." *Trends. Cell Biol.*, vol.16, 213-223 (2006)
95. M. H. Ginsberg, A. Partridge, and S. J. Shattil, "Integrin regulation", *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol.17, 509-516 (2005)
96. G. von Wichert, G. Jiang, A. Kostic, K. D. Vos, J. Sap, and M. P. Sheetz, "RPTP- α acts as a transducer of mechanical force on α_v/β_3 -integrin-cytoskeleton linkages", *J. Cell Biol.*, vol.161, 143-153 (2003)
97. F. Li, S. D. Redick, H. P. Erickson, and V. T. Moy, "Force measurements of the $\alpha_5\beta_1$ integrin-fibronectin interaction", *J. Biophys.*, vol.84, 1252-1262 (2003)
98. R. I. Litvinov, H. Shuman, J. S. Bennett, and J. W. Weisel, "Binding strength and activation state of single fibronectin-integrin pairs on living cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.99, 11, 7426-7431 (2002)
99. O. Thoumine, P. Kocian, and A. Kottelat, "Short-time binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis", *Eur. Biophys. J.*, vol.29, 398-408 (2000)
100. V. I. Gordeljiy, M. A. Kiselev, P. Lesieur, A. V. Pole, and J. Teixeira, "Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures", *J. Biophys.*, vol.75, 2343-2351 (1998)

101. W. P. Williams, P. J. Quinn, L. I. Tsonev, and R. D. Koynova, "The effects of glycerol on the phase behavior of hydrated distearoylphosphatidylethanolamine and its possible relation to the mode of action of cryoprotectants", *Biochem. Biophys. Acta*, vol.25, 123-132 (1991)
102. R. Koynova, J. Brankov, and B. Tenchov, "Modulation of the lipid phase behavior by kosmotropic and chaotropic solutes", *Eur. Biophys. J.*, vol.25, 261-275 (1997)
103. G. Jiang, G. Giannone, D. R. Critchley, E. Fukumoto, and M. P. Sheetz, "Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin", *Nature*, vol.424, 334-337 (2003)
104. V. M. Mosley, and R. W. G. Wyckoff, "Electron Microscopy of the virus of influenza", *Nature*, vol.157, 263 (1946)
105. P. C. Roberts, and R. W. Compans, "Host cell dependence of viral morphology", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.95, 5746-5751 (1998)
106. P. C. Roberts, R. A. Lamb, and R. W. Compans, "The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation", *Virology*, vol.240, 127-137 (1998)
107. G. R. Whittake, "Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine", *Exp. Rev. Mole. Med.*, vol.3, 1-13 (2001)
108. A. Moscona, "Neuraminidase inhibitors for influenza", *NEJM*, vol.353, 1363-1373 (2005)
109. M. Simpson-Holley, D. Ellis, D. Fisher, D. Elton, J. McCauley, and P. Digard, "A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions", *Virology*, vol.301, 212-225 (2002)
110. S. Barman, and D. P. Nayak, "Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells", *J. Virol.*, vol.81, 12169-12178 (2007)
111. D. P. Nayak, R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou, and S. Barman, "Influenza virus morphogenesis and budding", *Virus Res.*, vol.143, 147-161 (2009)

112. T. Takizawa, S. Matsukawa, Y. Higuchi, S. Nakamura, Y. Nakanishi, and R. Fukuda, "Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells", *J. Gen. Virol.*, vol.74, 2347-2355 (1993)
113. O. P. Zhirnov, T. E. Konakova, T. Wolff, and H.-D. Klenk, "NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis", *J. Virol.*, vol.76, 1617-1625 (2002)
114. E. L. Brincks, A. Katewa, T. A. Kucaba, T. S. Griffith, and K. L. Legge, "CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection", *J. Immunol.*, vol.181, 4918-4925 (2008)
115. M. E. Nemeroff, S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller, and R. M. Krug, "Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs", *Mol. Cell*, vol.1, 991-1000 (1998)
116. O. Haller, and G. Kochs, "Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity", *Traffic*, vol.3, 710-717 (2002)
117. A. G. Hovanessian, "Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2',5'-oligoadenylate synthetases", *J. Interferon Res.*, vol.11, 199-205 (1991)
118. J. Talon, C. M. Horvath, R. Polley, C. F. Basler, T. Muster, P. Palese, and A. Garcia-Sastre, "Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein", *J. Virol.*, 74, 7989-7996 (2000)

謝辞

本研究は多くの方々のご指導、ご協力を得て実現することができました。

本研究を行う機会と環境を与えてくださり、多大なるご指導、ご支援を賜りました奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科湊小太郎教授に心から御礼申し上げます。

研究発表の際、筆者の発表に耳を傾けて頂き、貴重なご意見を賜りました奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科箱嶋敏雄教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたって常にご指導とご助言を頂き、励ましてくださいました奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科杉浦忠男准教授に感謝の意を表します。

研究発表の際、筆者の発表に耳を傾けていただいたほか、研究生活全般における助言を頂いた佐藤哲大助教、中尾恵助教に深く感謝いたします。

大阪府立成人病センター研究所生物学部門伊藤和幸博士、由井理洋博士には、第 3 章での細胞生物学的実験に関しご支援いただき、深く感謝いたします。

法政大学工学部生命機能学科分子ウイルス学研究室の本田文江教授には、第 5 章において、インフルエンザウイルス関連の実験にご指導、ご支援いただき、深く御礼申し上げます。

また、博士号取得に際し、多大なご支援をいただいた株式会社キアゲンならびに同社 Automation システム部の皆さまに、深く感謝いたします。

大学院生活あるいは研究を行うにあたり、様々な面でサポート頂いた奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科生命機能計測学講座の皆様に深く感謝いたします。

最後に、大学院までの多大な支援を頂いた家族に深く感謝いたします。