細胞力学計測のためのマイクロ加工基板を用いた 原子間力顕微鏡法

岡嶋 孝治¹・水谷 祐輔²

¹北海道大学大学院情報科学研究科 ☎ 060-0814 北海道札幌市北区北 14 条西 9 丁目

²北海道大学大学院先端生命科学研究所 ☎ 060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目

(2012 年 6 月 10 日受付 ; 2012 年 6 月 21 日掲載決定)

Atomic Force Microscopy with Micro-Fabricated Substrates for the Measurement of Cell Mechanics

Takaharu OKAJIMA¹ and Yusuke MIZUTANI²

¹Graduate School of Information Science & Technology, Hokkaido University, Kita-ku N14, W9, Sapporo, Hokkaido 060-0814

²Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Kita-ku N10, W8, Sapporo, Hokkaido 060-0810

(Received June 10, 2012 ; Accepted June 21, 2012)

The mechanical properties of live cells are associated with various cell functions, and thus it is crucial to determine the cell elastic modulus, which is one of the fundamental quantities of matter and changes with time and frequency. Atomic force microscopy (AFM) allows us to directly measure the relaxation modulus of single cells in stress and creep relaxation measurements as well as the cell complex modulus in the force modulation. Recent progress in AFM combined with microfabricated substrates revealed the cell-cell variability of cell mechanics, in which the cell modulus exhibits a log-normal distribution depending on the frequency, according to a power-law rheology model. The AFM with micropost substrates as a force sensor demonstrated the direct measurement of intracellular force propagation through cytoskeletal networks between focal adhesions.

KEYWORDS : atomic force microscopy (AFM), single cell mechanics, power-law rheology, cell-cell variation, force propagation

1. は じ め に

培養細胞を光学顕微鏡で観察すると、環境に応じて、接着した細胞が形態を変化させ、空間を移動し、増殖する様子を観ることができる。このような細胞固有の機能・性質は、細胞の力学特性と密接に関係していることが、近年、多くの実験から明らかになってきた。細胞に働く力が、どのようにして細胞機能を制御しているのか、そのメカニズムは未だ不明な点が多いが、細胞に働いた力が細胞内の骨格構造を經由して細胞核等に伝播し、細胞核内の遺伝子発現を調節しているというモデル¹⁾や、骨格構造変化の非線形モデル²⁾など、様々な階層のモデルが提唱されている。

細胞は、多様な生体高分子や脂質等で構成されている。そして、細胞を材料とみなした場合、細胞は弾性と粘性とを併せ持つ粘弾性である。完全弾性体の場合、力学基本量の一つである弾性率は一定の値をもつが、粘弾性体である細胞の弾性率は、時間や周波数の関数になる。また、細胞の弾性率は、細胞内の動的構造変化にともなう細胞の“状態”に強く依存することから、細胞の弾性率を細胞診断のマーカーとして利用する試みが提案されている⁴⁾。このように、細胞の弾性率を精密に計測することは、細胞の力学と機能との関係を理解するための基礎と言っても過言ではない。

原子間力顕微鏡 (AFM) は、生細胞の高分解能イメージング・ナノ力学計測において強力な手法である^{5,6)}。また、AFM は接着細胞の弾性率を精密に決定できる特徴をもつ。本稿では、著者らが行っている、AFM とマ

マイクロ加工基板技術を併用した細胞粘弾性計測法を紹介したい。まず、AFMによる細胞粘弾性計測法の一般的な原理と特徴を整理し、細胞粘弾性のアンサンブル統計解析、および粘弾性体である細胞内の力伝播特性について述べる。

2. 細胞弾性率のAFM測定

AFMを用いて細胞の弾性率を測定する方法として、フォースカーブ測定が広く用いられている。フォースカーブ測定では、AFMカンチレバープローブを細胞に押し付けて、カンチレバーのたわみ量から細胞に加える力と細胞の変形量を測定する。そして、接触理論のヘルツモデルを用いて、細胞の弾性率（ヤング率）を評価する。ここで、注意すべき点は、細胞は粘弾性体であるため、フォースカーブの関数形が押し込み速度に依存する点である。速度が増加するとフォースカーブは急峻になり、速度が減少するとフォースカーブは緩やかに変化する（Fig. 1 (a)）。したがって、フォースカーブ測定から見積もられる細胞の弾性率は、測定条件に依存した“見かけ”の弾性率である。また、細胞の力学緩和現象により、フォースカーブの押し込みと引き抜きの間にヒステリシスが生じる（Fig. 1 (b)）。ヒステリシスのカーブから細胞の粘弾性を見積もることは原理的には可能であるが、実際は容易ではない。

細胞固有の弾性率の測定には、細胞力学特性の周波数・時間応答を直接調べる必要がある。周波数領域の測定は、フォースモジュレーション法⁷⁾と呼ばれる（Fig. 2 (a)）。この方法は、ある振動周波数で振動させたAFMカンチレバープローブを細胞に接触させ、カンチレバー振動の振幅と位相差から細胞の弾性率を計算する。AFMの高い空間分解能を利用して、特定の周波数における細胞の粘弾性イメージング⁷⁾が可能である。また、細胞の複素弾性率の周波数測定法は、Alcaraz等により確立された⁸⁾。

Fig. 1. (a) Force curve measured in the viscoelastic materials depends on the scan speed of Z direction. (b) A hysteresis between the approach and retraction curves appears in the measurements.

Fig. 3は、AFMにより測定された細胞（線維芽細胞）の複素弾性率 G^* の実部（貯蔵弾性率） G' と虚部（損失弾性率） G'' の周波数依存性を示す⁹⁾。過去の研究において、周波数領域が 10^{-2}Hz – 10^3Hz において、 G' は周波数 f の単一べき関数となり、べき指数 α は細胞骨格構造に強く依存することが知られている^{10,11)}。細胞のべき乗則モデルは、バネとダッシュポットの要素を想定する線形粘弾性モデルとは異なり、たくさんのエネルギー極小値をもつエネルギーランドスケープの中を、細胞の弾性率に関与する“要素”のコンフォメーションが極小値のポテンシャルを遷移しながら変化する描像として考えられる^{10,11)}。べき指数 α は、極小値にトラップされて抜け出すことができない弾性状態 ($\alpha=0$) と極小値にトラップされない粘性状態 ($\alpha=1$) の中間の値をもつ。

時刻 $t=0$ において、ステップ関数の一定歪みを加えた応力緩和測定から得られる緩和弾性率 $g(t)$ は、 G^* を時間領域に変換した関数である。弾性率 $g(t)$ は、時間 t の単一べき関数と時刻 $t=0$ におけるニュートン粘性に関する項の線形結合で表される^{10,11)}。

時間領域測定として、応力緩和測定¹²⁻¹⁴⁾とクリープ測

Fig. 2. Relation between applied force F and position Z for the AFM measurement of viscoelastic properties of cells such as (a) force modulation, (b) creep, and (c) stress relaxation modes.

Fig. 3. (color online). Storage G' (filled) and loss G'' (open) moduli of cells as a function of frequency. G' follows a single power-law function.

定^{14,15)}がある。クリープ測定は、コンタクトモードイメージングのフィードバック回路を用いて、探針と細胞表面との間に働く力を一定に保ち、カンチレバー・基板間距離の時間変化を計測する (Fig. 2 (b))。AFM プロブと細胞表面の接触面積が時間の関数であることを考慮して弾性率を見積もることができる^{14,15)}。

応力緩和測定法は、細胞をある押し込み量で押し込み、その後の力緩和過程を測定する (Fig. 2 (c))。細胞が緩和すると、カンチレバーのたわみ量も変化する。したがって、厳密には、歪みは一定ではないが、細胞緩和の変位量は細胞の押し込み量の1%程であるため、良い近似で応力緩和測定と見なすことができる。

Fig. 4 は、AFM による応力緩和測定とクリープ測定の結果を示している¹⁴⁾。細胞の緩和挙動はべき関数挙動を示し、べき指数はフォースモジュレーション法から予想される値と良い一致をする。時間領域測定では、カンチレバー変位の直流成分を測定するため、AFM 装置系のドリフトの影響を受けやすいことに注意したい。

Fig. 4. (color online). (a) Stress relaxation and creep tests of cells by AFM with a microarray. (b) The relaxation curves show a single-power law function, the exponent of which is around 0.1-0.4 in different cells.

AFM 探針先端にコロイド粒子を装着したコロイドプローブカンチレバー^{9,14,16)}は、弾性率の測定精度を向上させ、また、カンチレバーと試料表面との溶液によるダンピングを軽減させることができる。

3. 多数細胞の粘弾性測定法

単一細胞の粘弾性に限らず、細胞の諸性質を調べる場合に問題になる点は、細胞ごとの個性である。同じ培養ディッシュ内の細胞であっても、その粘弾性は無視できないほど大きくばらつく。また、細胞の分子・個体レベルの分散は、生命の最小単位である細胞において本質的な役割をもっていると考えられる¹⁷⁾。

多数の細胞の粘弾性を測定できる方法には、主に、MTC 法 (magnetic twisting cytometry)^{10,11,18,19)}、光ストレッチャー法 (optical stretcher)²⁰⁾、AFM 法^{9,16)}の3種類がある (Fig. 5)。

MTC 法は、細胞表面に接着した磁気ビーズに、変動磁場を加え、磁気ビーズの変位量から細胞の弾性率を換算する^{10,11)}。光学顕微鏡の視野内の多数の細胞を同時に計測することができるため、弾性率のアンサンブル平均を高精度に決定できる。一方で、磁気ビーズは細胞表面上のランダムな位置に接着するので、細胞間のばらつきの評価には適さない。

光ストレッチャー法は、マイクロ流路内で浮遊した細胞をレーザー光圧により捕捉し、その捕捉力による細胞の変形量から弾性率を測定する²⁰⁾。本手法は、単一細胞全体の弾性率を測定できるという利点をもつ。一方で、接着細胞を浮遊させてから測定しなければならないため、接着状態の細胞の弾性率とは異なる可能性があることに注意しなければならない。

従来、AFM は操作性が煩雑であるため、多数細胞計測に不向きであった。しかし、著者らは、AFM の精密な位置決め機構を利用して、マイクロアレイ上に配列した多数の細胞を計測する方法を提案した^{9,16)}。

Fig. 5. (color online). Schematic of (a) MTC, (b) optical stretcher, and (c) AFM for the measurement of a large number of cells.

4. AFM による細胞粘弾性の統計解析

AFM による細胞粘弾性の統計解析は、細胞マイクロアレイ基板上に高密度に配列した細胞を用いて行う。マイクロアレイ基板上の細胞は、ランダムに培養した細胞よりも、個々の細胞の位置が高く制御されていて、形態も整っている。したがって、AFM の位置制御機構を用いることにより、多数の細胞を容易に計測することが可

Fig. 6. (color online). (a) Fluorescence image of the nuclei of cells cultured on microarray. (b) AFM viscoelastic measurement of single cells cultured on microarray.

Fig. 7. (color online). (a) The number distribution of G' and G'' at different frequencies. (b) The standard deviation of $\ln G'$ as a function of frequency.

能になる (Fig. 6)。

Fig. 7 (a) は、細胞マイクロアレイを用いて AFM により測定した、細胞の貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の細胞数分布である⁹⁾。多数の細胞 (約 130 個) の測定により、細胞の弾性率に関するいくつかの特徴が明らかになった: (1) G' と G'' は対数正規分布を示す^{9, 18, 19)}。したがって、細胞の弾性率の平均値は幾何平均になる。(2) 対数正規分布の標準偏差は、周波数の増加とともに、減少する⁹⁾。そして、対数正規分布の標準偏差が、周波数の対数に対して線形である (Fig. 7 (b))。これは、細胞レオロジーの標準偏差においても、べき乗則モデルが半定量的に成り立つことを示唆する²¹⁾。本 AFM 法は、正常細胞とがん細胞の識別⁴⁾のような力学的な細胞診断技術に利用できると期待される²²⁾。

細胞マイクロアレイと AFM を用いて、細胞力学の過渡の状態を測定することもできる。例えば、Fig. 8 は細胞が接着基板上に接着していく過程の力学特性を計測した実験を示す¹⁶⁾。基板上に播種した細胞が接着していく様子 (Fig. 8 (a)) は、光学顕微鏡観察や AFM イメージング (Fig. 8 (b)) により定性的にわかる。しかし、細胞接着の過渡状態における細胞の弾性率は未知であった。Fig. 8 (c) に示すヒストグラムは、接着時間 3 時間から 9 時間における、細胞の見かけの弾性率の細胞数分布を示している。細胞数は約 300 個である。細胞の初期接着過程において、対数正規分布を満たしながら、接着時間の増加とともに平均の弾性率は増加するが、標準偏差はほぼ不変であることがわかった。

Fig. 8. (color online). (a) Suspended cells adhere on substrates through adhesive protein by changing their morphology with the cytoskeletal structures. (b) AFM topographic images of cells adhered on microarray substrate. (c) Histogram of the apparent Young's modulus, E , of cells in the wells of the microarray after incubation for 3 h, 6 h, and 9 h. The histograms were fitted to a single log-normal distribution function.

5. 細胞内を伝播する力の直接測定

細胞は、接着点を介して周囲の細胞外マトリクスと接着する。細胞と細胞外マトリクスとの間に働く力は、細胞骨格を介して細胞内部の細胞核やその他の細胞内小器官に長距離に伝播する^{23, 24)}。そして、この力による細胞内構造の変化が、遺伝子発現等の細胞機能の制御と密接に関係していると考えられている¹⁾。したがって、細胞骨格を介する力伝播を直接計測する技術は重要である。著者らは、AFM とマイクロポスト基板（マイクロピラー基板とも呼ばれる）²⁵⁾を用いて、細胞内を伝播する力の時空間応答を計測する手法を開発した²⁶⁾。

測定系の概念図を Fig. 9 に示す。マイクロポスト基板は、多数のマイクロスケールの柱（マイクロポスト：micropost）が並んだ基板である²⁶⁾。ポリジメチルシロキサン（PDMS）の主剤/硬化剤比を調整することにより

Fig. 9. (color online). AFM measurement of force propagation in cells on micropost substrate.

Fig. 10. (color online). (a) Direct measurement of intracellular force propagation in response to a modulation force in a direction perpendicular to the micropost substrate with a period T by AFM. (b) Optical microscopic image of cell sample with AFM cantilever. The arrows show a traction force before the force modulation. (c) Time series of lateral force magnitude applied to microposts during the modulation at different frequencies with $3T$ by AFM. Letters correspond to those in (b).

様々な硬さのマイクロポストを作製することができる。硬さが既知である柔軟なマイクロポストの上底面に細胞を接着させる。次に、接着タンパク質をコートしたコロイドプローブカンチレバーを細胞の上部に接着させて、コロイドプローブと細胞との間に接着点が形成される。そして、カンチレバーを垂直方向に振動させ (Fig. 10 (a)), 細胞下部の接着点に伝播する力をマイクロポストのたわみ量の変化から計測する。

マイクロポストのたわみ量は、光学顕微鏡とそれに装着した CCD カメラを用いてマイクロポストの画像を取得し、LabVIEW で自作した画像解析ソフトウェアで解析した (Fig. 10 (b))。AFM カンチレバーの位置を周期的 ($0.01\text{--}0.5\text{ Hz}$) に変化させると、細胞上部で測定される細胞の弾性率は、Fig. 3 に示すようにべき乗則を示す。一方で、興味深いことに、カンチレバーの振動変位とマイクロポストに働く力との間には、顕著な位相差は観測されなかった。また、細胞の初期牽引力と力伝播の向きは同じであった²⁶⁾。このことは、この周波数帯域において、細胞骨格を介して伝播する力は、弾性的であることを示唆する。また、伝播した力の大きさが外力の大きさに依存せず、一定になる細胞変位領域 (Fig. 10 (c) の矢印) が観測されることから、細胞内部の力伝播は非線形的であることが示唆された。さらに、測定ごとに、細胞内を伝播する力の大きさが変化することから、観測された力伝播が細胞骨格のリモデリングの影響を強く受けていると考えられる。このように、離散的な力を高感度に計測できるマイクロポスト基板と細胞の局所領域に精密な外部刺激を加えることができる AFM を併用した本測定法は、細胞内の複雑な骨格構造が生み出す力伝播関数を調べる有用な手法になると期待される。

6. ま と め

粘弾性である細胞の弾性率を計測するための、AFM とマイクロ加工基板技術を組み合わせた計測法を紹介した。細胞マイクロアレイを用いることにより、弾性率の統計分布を解析することが可能になり、細胞物性の個性の起源の探求や、細胞診断技術への応用が期待される。マイクロポスト基板を用いることにより、細胞内の力伝播を直接測定することができる。マイクロ加工基板技術は、様々な細胞研究に用いられているが、今後 AFM との融合が急速に進むと期待される。

細胞の力学特性を理解するためには、分子レベルのミクロな物性と細胞単位レベルの物性（弾性率）との両方の理解が必須である。本稿では、後者について述べたが、AFM の優れた点は、これら両方のスケールを計測することができる点である。細胞の理解において、

AFM は今後益々重要な計測技術になるに違いない。

謝 辞

本研究に関わった研究室の多くの学生（平塚伸一郎君，土屋雅博君，岡田晃典君，蔡萍根さん）に感謝したい。また，共同研究者の徳本洋志先生（北海道大学（当時），中央大学（現在）），河原剛一先生（北海道大学），末岡和久先生（同大学）のグループに感謝致します。最後に，研究資金面で支援していただいた，文部科学省，日本学術振興会，新エネルギー・産業技術総合開発機構に感謝致します。

文 献

- 1) N. Wang, J.D. Tytell and D.E. Ingber : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 75 (2009).
- 2) A. Besser and U.S. Schwarz : *Biophys. J.* **99**, L10 (2010).
- 3) P. Kollmannsberger and B. Fabry : *Annu. Rev. Mater. Res.*, **41**, 75 (2011).
- 4) S.E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao and J.K. Gimzewski : *Nat. Nanotechnol.* **2**, 780 (2007).
- 5) A. Ikai : “The World of Nano-Biomechanics : Mechanical Imaging and Measurement by Atomic Force Microscopy”, (Elsevier Science, 2007).
- 6) V.J. Morris, A.R. Kirby and A.P. Gunning : “Atomic Force Microscopy for Biologists”, (Imperial College Press 2nd. Ed., 2009).
- 7) M. Radmacher, R.W. Tillmann and H.E. Gaub : *Biophys. J.* **64**, 735 (1993).
- 8) J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepas, B. Fabry, R. Farré and D. Navajas : *Biophys. J.* **84**, 2071 (2003).
- 9) S. Hiratsuka, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara, H. Tokumoto, T. Okajima : *Ultramicroscopy* **109**, 937 (2009).
- 10) B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas and J.J. Fredberg : *Phys. Rev. Lett.* **87**, 148102 (2001).
- 11) B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N.A. Taback, E.J. Millet and J.J. Fredberg : *Phys. Rev. E* **68**, 041914 (2003).
- 12) E.M. Darling, S. Zauscher, J.A. Block and F. Guilak : *Biophys. J.* **92**, 1784 (2007).
- 13) T. Okajima, M. Tanaka, S. Tsukiyama, T. Kadowaki, S. Yamamoto, M. Shimomura and H. Tokumoto : *Nanotechnology* **18**, 084010 (2007).
- 14) S. Hiratsuka, Y. Mizutani, A. Toda, N. Fukushima, K. Kawahara, H. Tokumoto and T. Okajima : *Jpn. J. Appl. Phys.* **48**, 08JB17 (2009).
- 15) H.W. Wu, T. Kuhn and V.T. Moy : *Scanning* **20**, 389 (1998).
- 16) Y. Mizutani, M. Tsuchiya, S. Hiratsuka, K. Kawahara, H. Tokumoto and T. Okajima : *Jpn. J. Appl. Phys.* **47**, 6177 (2008).
- 17) B. Snijder and L. Pelkmans : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 119 (2011).
- 18) G. Massiera, K.M. Van Citters, P.L. Biancaniello and J.C. Crocker : *Biophys. J.* **93**, 3703 (2007).
- 19) M. Baland, N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon and F. Gallet : *Phys. Rev. E* **74**, 021911 (2006).
- 20) J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H.M. Erickson, R. Ananthakrishnan, D. Mitchell, J. Käs, S. Ulvick and C. Bilby : *Biophys. J.* **88**, 3689 (2005).
- 21) J.M. Maloney and K.J. Van Vliet : *arXiv* : 1104.0702v2 (2011).
- 22) T. Okajima : *Curr. Pharm. Biotech.* in press.
- 23) S. Hu, J. Chen, B. Fabry, Y. Numaguchi, A. Gouldstone, D.E. Ingber, J.J. Fredberg, J.P. Butler and N. Wang : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C1082 (2003).
- 24) S. Hu, L. Eberhard, J. Chen, J. Christopher Love, J.P. Butler, J.J. Fredberg, G.M. Whitesides and N. Wang : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C1184 (2004).
- 25) J.L. Tan, J. Tien, D.M. Pirone, D.S. Gray, K. Bhadriraju and C.S. Chen : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1484 (2003).
- 26) A. Okada, Y. Mizutani, A. Subagyo, H. Hosoi, M. Nakamura, K. Sueoka, K. Kawahara and T. Okajima : *Appl. Phys. Lett.* **99**, 263703 (2011).