

Application News

No. S43

走査型プローブ顕微鏡

SPMによる細胞の観察と測定 (II) ～細胞の硬さを測る～

■ 概要

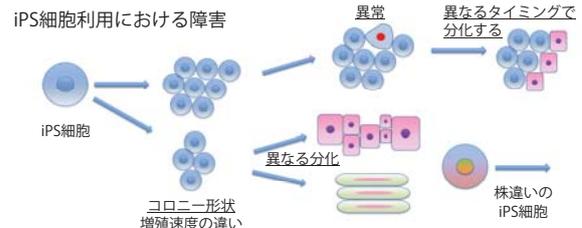
近年のiPS細胞を用いた再生医療の進歩は目覚ましく、臨床研究も報告されています。その中でiPS細胞は株由来や培養法によりコロニー形状や増殖速度などの性質が異なり

(図1)、場合によっては癌細胞になるという報告があります。個性とも言えるiPS細胞の違いは多様な細胞への分化を左右するファクターの1つと推測でき、個性の解明は再生医療にとって大きな進歩となり得えます。しかし、何が個性をもたらしているのか未解明な部分が多く、iPS細胞の利用において障害となっています。

そこで、アプリケーションニュースS38¹⁾では、走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope: SPM) を用いてiPS細胞とHeLa細胞の形状観察を行い、iPS細胞の細胞間接着がネットワーク構造であることを明らかにしました。

本報では、細胞の機械物性に着目し硬さを解析しました。HeLa細胞は硬い部分とやわらかい部分の差が少なく一様であることに対して、iPS細胞は細胞間接着部分が硬く、細胞体の部分がやわらかいことが示唆されました。

A. Kogure, T. Maruo, K. Hoshino,
K. Yamasaki, T. Fujii, H. Nakajima



何がiPS細胞の個性をもたらすのか？

図1 iPS細胞利用における障害

■ 細胞の硬さを測る

図2にSPM観察したHeLa細胞とiPS細胞の形状像(a)、(b)とZX像(c)、(d)を示します。(c)と(d)は(a)と(b)の矢印で示すXラインで探針にかかる力を試料断面方向から見た画像です。図内上側が測定開始点(空間側)で図内下側白点線が押し込み終了点で、試料形状を表しています。

ZX像では探針が試料と接触してから力を検出した位置を黄色から赤色に表示しています。ここは細胞が変形をしたことを示しており、細胞変形量が多いほどやわらかいことが分かります。

解析の結果、HeLa細胞はやわらかい部分と硬い部分の差が少なく一様であるのに対して、iPS細胞は細胞体の部分がやわらかく、細胞間接着部分が硬いことが示唆されました。

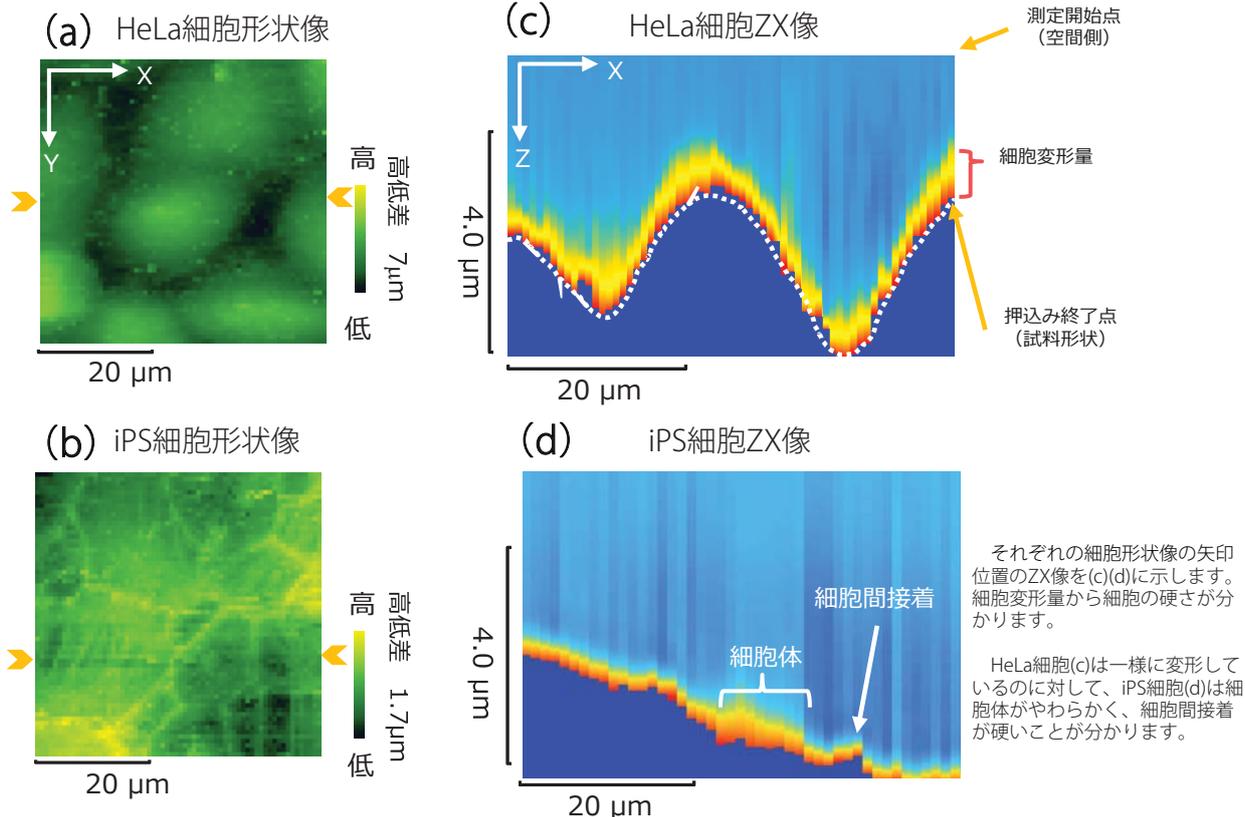


図2 HeLa細胞とiPS細胞の形状像とZX像

■SPMによる観察と測定

図3にSPM構成図を、図4に液中観察構成図を示します。SPMは観察にビームやレンズを使用しない点において光学顕微鏡や電子顕微鏡と異なりますが、分解能は透過電子顕微鏡に匹敵します。SPMは微小な針（探針）で試料をなぞり、探針-試料間に働く微小な力をカンチレバーのたわみとして検出することで形状像を得ることができます。SPMで一般的な観察法であるコンタクトモード、ダイナミックモードでは試料表面を横方向に走査しますが、細胞のようにやわらかく大きい凹凸の場合は細胞表面を引きずってしまい正常な形状像を得ることが困難でした。その解決方法としてフォースカーブ測定を利用しました。

図5にフォースカーブ測定説明図を示します²⁾。フォースカーブ測定はスキナナZを変えながら力をプロットする測定で^{3) 4) 5)}、横方向走査をしないため細胞を引きずることなく、やわらかく大きい凹凸も観察測定できます。今回は細胞への押し付け力（斥力）を2.5nNとしました¹⁾。探針が試料接触してから2.5nNに到達するまでの距離を比較することで試料の硬さを知ることができます。

測定エリアを64×64点でマッピング測定後、得られたZXY情報と各点のフォースカーブから形状像とZX像を形成しました。カンチレバーはバネ定数0.15N/mを用い、測定は培養液中で細胞が生きた状態で行いました。

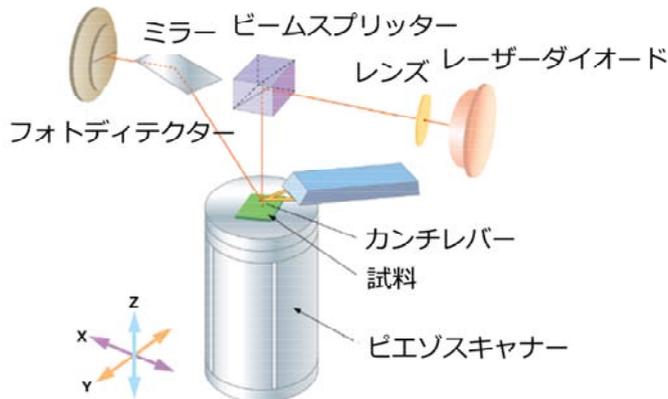


図3 SPM構成図

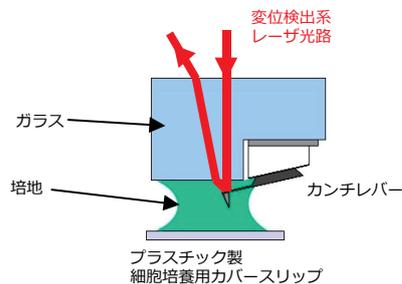
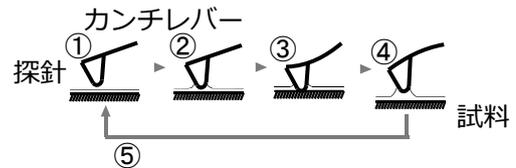
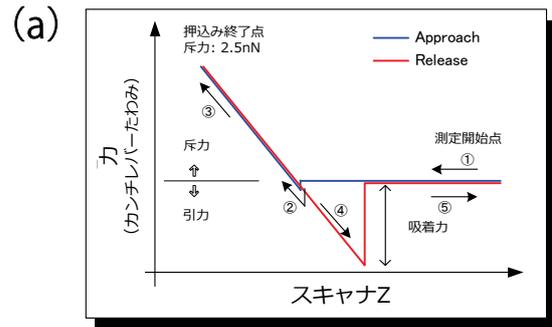


図4 液中観察構成図
本構成で液中観察しました。



(b)



図5 フォースカーブ測定説明図

- (a) スキナナZを変えながら、探針にかかる力を計測します。2.5nNに達したところで押し込み（Approach）をとめ、引き離します（Release）。各測定点の2.5nNに到達したZ位置を結ぶと形状像が形成されます。探針と試料が接触した②の位置から設定斥力に到達する③までの距離が試料変形量となり、これを比較することで試料の硬さを測ることができます。
- (b) 指で押してボールの形状を探ることをイメージするとわかりやすい。

■まとめ

SPM測定によってHeLa細胞とiPS細胞の硬さ測定を生きたままの状態で行いました。HeLa細胞は様な硬さであるのに対して、iPS細胞は細胞間接着が硬いことが示唆されました。この硬い細胞間接着がiPS細胞の未分化維持や多能性に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられます。SPMによる細胞の硬さ測定は再生医療研究に新たな視点を与えてくれることが期待されます。

■参考文献

- 1) A. Kogure, T. Maruo, K. Hoshino, K. Yamasaki, H. Nakajima, Shimadzu Application News No.S38 SPM による細胞の観察と測定 (1) ~ iPS 細胞とHeLa 細胞の観察 ~, 2019.
- 2) 秋永広幸監修, 走査型プローブ顕微鏡入門, オーム社, 2013.
- 3) 竹下文隆, 小暮亮雅, 藤井岳直, 本橋憲行, 落谷孝広, 走査型プローブ顕微鏡によるエクソソーム表面の物性解析, 細胞工学, Vol.32 No.1, 2013.
- 4) 浅川雅, 岡嶋孝治, 大西洋, 走査型プローブ顕微鏡, 共立出版, 2017.
- 5) Koichi Nakanishi, Akinori Kogure, Takenao Fujii, Ryohei Kokawa and Keiji Deuchi, Development of method for evaluating cell hardness and correlation between bacterial spore hardness and durability, *Journal of Nanobiotechnology*, 2012.

(試料ご提供 東京慈恵会医科大学 再生医学研究部 岡野ジェイムス洋尚教授、原央子助教)

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年9月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。