

AFM 探針による摩擦刺激が子宮頸癌細胞の機械的特性に及ぼす影響

The effects of shear stress by AFM probe on the mechanical properties of cervical cancer cells

東理大・工(学)*島村 龍汰 東理大・工(正)佐藤 魁星

東理大・工(非)金 スヨン 東理大・工(非)元祐 昌廣 東理大・工(正)佐々木 信也

Ryuta Shimamura*, Kaisei Sato**, Kim Sooyoung*, Masahiro Motosuke**, Shinya Sasaki**

* Graduate School of Tokyo University of Science, ** Tokyo University of Science

1. 緒言

近年、癌細胞の機械的特性と悪性度の関係に注目が集まっている。癌細胞の弾性率は、細胞膜の張力に依存し、その張力は細胞膜と細胞骨格タンパク質との接着により制御される。先行研究では、このタンパク質を癌細胞の細胞膜に強制的に付着させると細胞膜の弾性率が高くなり、転移能が消失し悪性度が下がることが報告されている¹⁾。また、別の先行研究では、がん細胞は転移能が低いほど凝着力が大きいことが報告されている²⁾。さらに近年では、細胞に与えられた外力に対して細胞が応答するシステムである、メカノトランスダクションに関する研究が注目され、癌治療への応用が期待されている。これまで、癌細胞に圧縮や引張応力を加えた際の転移能への影響は調査されているが、摩擦刺激についての調査事例はない。そこで本研究では、癌細胞の転移能と係る弾性率と凝着力について、AFMを用い探針による摩擦刺激が及ぼす影響について調べた。ここでは、細胞表面層の観察した結果とともに、機械的特性の変化を報告する。

2. 実験概要

2.1 実験材料

実験サンプルには子宮頸癌細胞である HeLa 細胞と、抗腫瘍作用を有する 6-チオグアニンに対する耐性を持つ TG 細胞を用いた。これらの細胞は、MEM (Minimum Essential Medium) 培地にストレプトマイシンとペニシリンの混合物、ならびにウシ胎児血清を混合し、温度 37 °C、CO₂ 濃度 5~6 % の条件下で培養を行った。Table 1 に各培養条件を示す。測定する細胞は、全て播種してから 48~72 時間経過したものをを用いた。

Table 1 Details of culture

Medium	MEM
Antibiotics	Penicillin Streptomycin
FBS	Fetal Bovine Serum
CO ₂ concentration, %	5~6
Temperature, °C	37

2.2 実験方法

摩擦刺激および紫外線が細胞の弾性率に及ぼす影響を調査するため、培養液中の細胞表面の ZX 面のフォースカーブ測定を行った。AFM は SPM-8100FM (SHIMADZU, JP) を使用した。フォースカーブ測定は、摩擦試験前後および紫外線照射前後で測定を行った。式(1)に、弾性率の算出理論である JKR2 点法の式を示す。

$$K \approx \frac{1.27F_1}{\sqrt{R(\delta_0 - \delta_1)^3}} \quad (1)$$

ここで、 K は弾性定数、 F_1 は最大凝着力、 R はカンチレバー先端の直径、 $\delta_0 - \delta_1$ は押し込み量である。上記の式を用いて、AFM 測定で得られたフォースカーブをもとに、弾性率を算出した。凝着力については、フォースカーブの最下点の斥力の値が相当する。また、フォースカーブにおける立ち上がりの傾きを二種類に分け、傾きが小さい方の斥力層の厚さ変化を、細胞表面層の変化とした。Table 2 に ZX 面のフォースカーブ測定条件、Table 3 に摩擦試験の測定条件を示す。カンチレバーには、直径 6 μm のポリスチレン球をチップレスカンチレバーの先端に取り付けた自作のコロイダルカンチレバーを使用した。使用したカンチレバーのばね定数は、0.12 N/m であった。

Table 2 AFM observation condition

Temperature, °C	37
Operation point, V	0.4
Scan speed (Z), Hz	16

Table 3 Friction tests condition

Temperature, °C	37
Scan speed, Hz	6
Contact load, nN	2.61
Scan range, μm	30×30
Time, min	30

3. 実験結果

3.1 弾性率

Figure 1 に、摩擦試験前後の HeLa 細胞の弾性率、Fig. 2 に TG 細胞の弾性率の測定結果を示す。HeLa 細胞の摩擦試験前の弾性率は 1.24 kPa、摩擦試験後の弾性率は 1.61 kPa となり、TG 細胞の弾性率は摩擦試験前 20.4 kPa、摩擦試験後 28.9 kPa となった。どちらの細胞においても、摩擦試験後に弾性率が大きくなることが確認された。

3.2 凝着力

Figure 3 に、摩擦試験前後の HeLa 細胞の凝着力、Fig. 4 に TG 細胞の凝着力の測定結果を示す。HeLa 細胞の摩擦試験前の凝着力は 1.64 nN、摩擦試験後は 2.39 nN となり、TG 細胞の弾性率は摩擦試験前 3.92 nN、摩擦試験後 8.24 nN となった。どちらの細胞においても、摩擦試験後に凝着力が大きくなることが確認された。

3.3 細胞表面層

Figure 5 に、摩擦刺激前後の HeLa 細胞の細胞表面層変化の測定結果を示す。摩擦試験前は 0.51 μm 、摩擦試験後は 0.33 μm となり、摩擦試験後に細胞表面層が薄くなることが確認された。

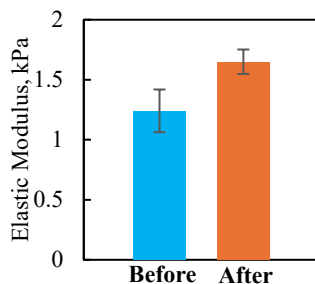


Fig.1 Elastic modulus of HeLa

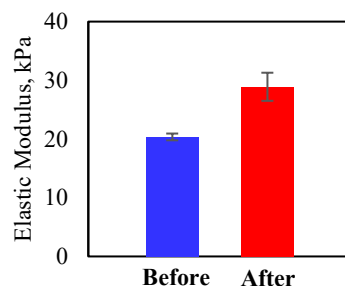


Fig.2 Elastic modulus of TG

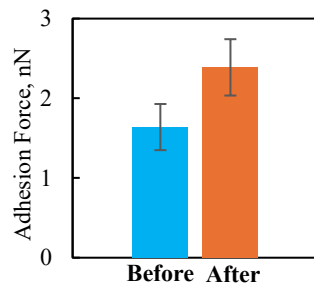


Fig.3 Adhesion force of HeLa

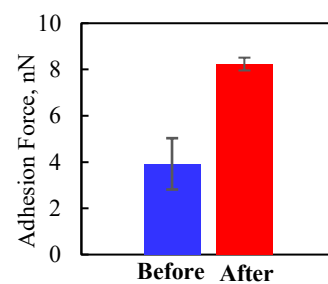


Fig.4 Adhesion force of TG

4. 考察

4.1 弾性率

細胞の機械的強度を担う細胞骨格タンパク質の一つとして、細胞内にはアクチンフィラメントというタンパク質の重合体が存在する。先行研究により、細胞に機械的刺激が加わると、Fig. 6 のように新たなアクチンフィラメントの重合反応が生じること、アクチンの重合が起き際には細胞膜が伸び細胞膜張力が増加すること、細胞の弾性率は細胞膜の張力に依存することが報告されている^{1,3,4)}。本実験においては、摩擦により細胞の弾性率が増加することが確認された。これは、機械的刺激の一種である摩擦によってアクチンの重合反応が生じたことで、細胞膜の伸長と細胞膜の張力増加が発生したためと考えられる。

4.2 凝着力

細胞と細胞外の物質を接着させる分子として、インテグリンというタンパク質が存在する。インテグリンは細胞表面に存在しており、 α 鎖と β 鎖によって構成されるヘテロ二量体である。インテグリンは、機械的刺激によって活性化し、接着構造を強化させることが知られている。本研究においては、細胞外物質としてのカンチレバー探針が、インテグリンの働きで細胞と接着したことが考えられる。Fig. 7 の様に摩擦が機械的刺激として作用し、インテグリンが活性化したことによって接着が強化され、凝着力が増加したものと考えられる。

4.3 細胞表面層

本研究において細胞表面層として認識した部分は、グリコカリックス層 (Endothelial glycocalyx layer : EGL) であると考えられる。EGL は、糖たんぱく質で構成された脆弱な糖鎖構造からなり、細胞運動において潤滑効果を示すことが知られている。本実験においては、Fig. 8 の様に AFM 探針での摩擦刺激により EGL が摩耗したことが考えられる。また、EGL は癌細胞の転移能を高めるという報告⁵⁾がされており、摩擦刺激による EGL の摩耗は、がん細胞の転移を抑制し悪性度を低下させることが期待される。

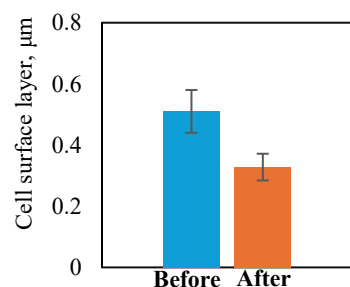


Fig.5 Cell surface layer of HeLa

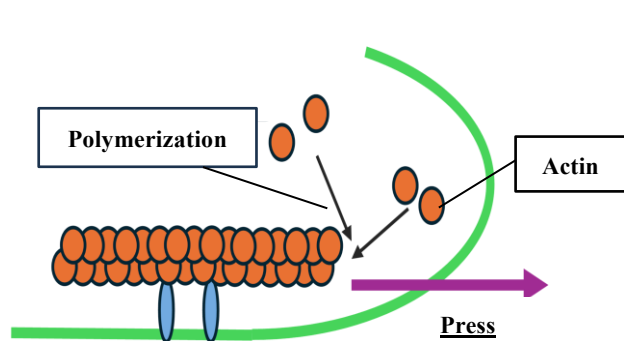


Fig. 6 Actin polymerization

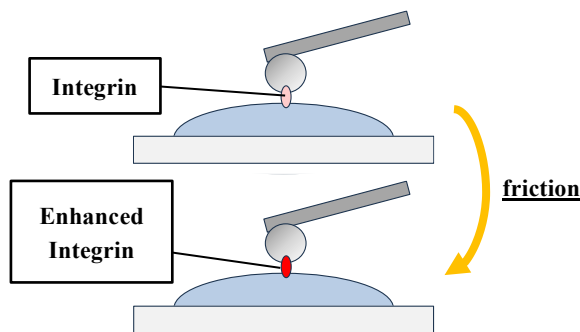


Fig. 7 Integrin enhancement by friction

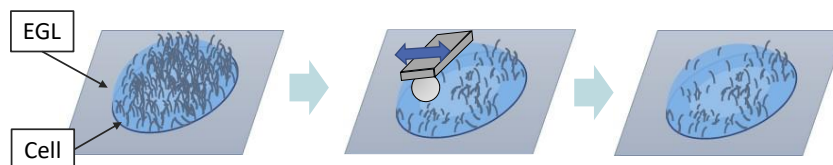


Fig. 8 Wear mechanisms of EGL

5. 結言

AFM 探針による摩擦刺激が、子宮頸癌細胞の機械的特性に与える影響を調査した結果、以下の知見を得た。

- (1) 摩擦刺激により、HeLa 細胞および TG 細胞の弾性率が上昇することが確認された。この原因は、細胞への機械的刺激により新たなアクチン重合が促され、細胞膜の張力が増加したためと考えられる。
- (2) 摩擦刺激により、凝着力は HeLa 細胞および TG 細胞両者で上昇することが確認された。この原因は、細胞への機械的刺激により細胞表面のインテグリンが活性化し、細胞表面とカンチレバー間の接着が強化したためだと考えられる。
- (3) 摩擦刺激により、細胞表面層が減少することが確認された。これは、摩擦刺激によってグリコカリックス層が摩耗したことが考えられる。グリコカリックス層の摩耗は、癌細胞の転移を抑制することで、悪性度を低下させる可能性がある。

文献

- 1) K. Tsujita, R. Satow, S. Asada, Y. Nakamura, L. Arnes, K. Sako, Y. Fujita, K. Fukami & T. Itoh: Homeostatic membrane tension constrains cancer cell dissemination by counteracting BAR protein assembly, *Nature Communications*, 12, 1 (2021) 5930.
- 2) M. Kane, P. Beri, J. Tuler, I. L. Williams, A. Kumar, S. Klein, P. Katira, and A. J. Engler: Adhesion strength of tumor cells predicts metastatic disease in vivo, *Cell Reports*, 44, 3 (2025) 5930.
- 3) C. Higashida, T. Kiuchi, H. Mizuno, M. Maruoka, S. Narumiya, K. Mizuno, N. Watanabe: F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins, *Nature Cell Biology*, 15, 4(2013) 395–405.
- 4) K. Tsujita, T. Takenawa, T. Itoh: Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation, *Nature Cell Biology*, 17, 6 (2015) 749-758.
- 5) H. Wang, G. Zhang, Y. Liu, Y. He, Q. Guo, Y. Du, C. Yang, F. Gao: Glycocalyx hyaluronan removal-induced increasing of cell stiffness delays breast cancer cells progression, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 82, 1 (2025), 82-96.