

CellHesion[®] 200

細胞粘弾性・接着研究のための単一細胞評価システム

単一細胞フォーススペクトロスコピー



細胞接着及び細胞構造測定のための革新的なプラットフォーム

細胞-細胞間もしくは細胞-基質間の相互間力、細胞の弾性測定、
連結構造、細胞接着および細胞応答の特性評価

単一分子から組織までの定量的測定

高度な光学イメージングとの統合
(DIC、位相、共焦点顕微鏡、TIRF、TRET等)



Nanotechnology for Life Science

接着や外部からの機械的ストレスに対する細胞応答を分子レベルの分解能で定量化

生物学における力測定とは？

細胞接着や細胞の弾性特性の研究は、ライフサイエンスの分野で非常に注目されています。細胞-細胞間もしくは細胞-基質・基板間の相互作用に関心のある研究分野は、生物物理学、生化学、細胞移動に関する医学研究、インプラントの研究、発生生物学、幹細胞研究、創傷治癒、感染と免疫応答の分野など、実に多岐に渡ります。

これまで細胞接着は、蛍光顕微鏡、キャピラリ法、もしくは回転アッセイやフローチャンバのような機械的手法を使って研究されてきました。しかしこれら手法は、定性的で解釈の難しい結果しか得られない、または操作が非常に難しいという課題を抱えています。そのため、定量性があり統計的にも信頼性のある測定手法の確定が望まれてきました。

そこで我々、JPK インストルメンツ社は、細胞-細胞間もしくは細胞-基質間の相互作用力を測定するために、CellHesion® 200 という新しいシステムを開発しました。

CellHesion® 200 は、細胞の弾性特性や、外部からの機械的ストレスに対する細胞応答を定量化することができます。また、単一分子同士の相互作用力を検出できる分解能で、細胞間に働く力を測定できます。その再現性・定量性のある測定結果は、細胞相互作用の研究に新しい道を開きました。CellHesion® 200 の解析ソフトウェアは測定データから、最大接着力、剥離イベント、テザー特性、引き剥がしに要する仕事など、細胞接着に関するパラメータを自動的に抽出します。

またCellHesion® 200 は細胞表面の異なる位置を、指定した力で押し込むことにより、細胞の弾性特性のような細胞の機械特性を評価することが可能です。解析ソフトウェアでヤング率を算出することもできます。

生きた細胞を局所的にカンチレバーセンサーでプロービングします。外力に対する機械的応答を測定し、弾性特性を定量化します。

細胞-細胞間接着力の測定の例



光学顕微鏡で観察しながら、生きた細胞をカンチレバーに化学的に結合させます。(事前にカンチレバーにフィブロネクチンなどを修飾しておきます)



1の細胞を、基板上の分子層・インプラント表面・細胞・融合性単層などの標的に近づけ、接触させます。基板はスライドガラス、カバーガラス、シャーレなど適切なものを選択します。

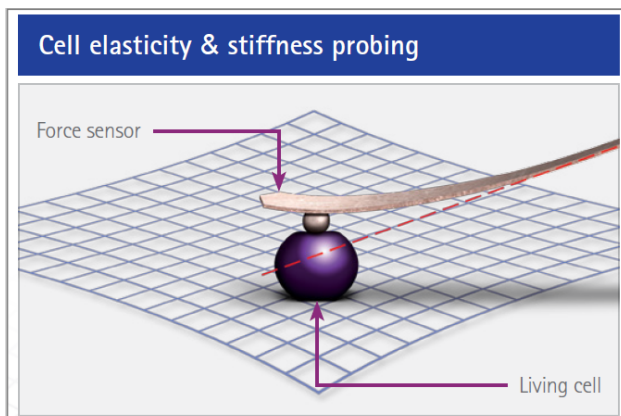


設定した反応時間(接触時間)経過後、 piezo素子でカンチレバーを垂直方向(Z軸方向)に持ち上げるにより、カンチレバー上の細胞を基板上の細胞から引き離します。



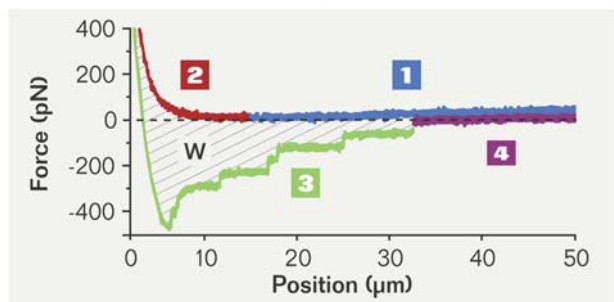
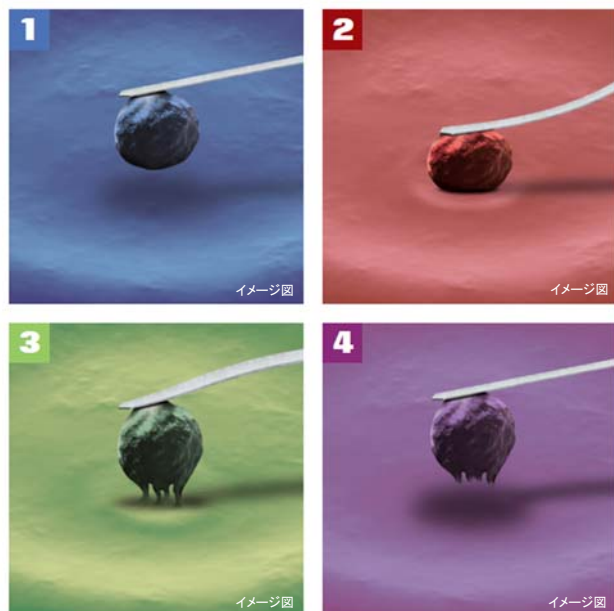
細胞が標的に接着した場合には、引き離す時に大きな抵抗がかかります。この際カンチレバーは大きくたわみ、その変位をカンチレバー検出用ディテクタで測定します。

カンチレバーはバネ板の形をしており、そのたわみ量から実際の接着力とエネルギーを求めることができます。例えば、接着に寄与している単一分子の結合イベントを定量化することができます。カンチレバー側の細胞、結合対象、条件を変えながら繰り返し実験を行い、統計的にデータを出します。



光学系との融合と充実した環境制御機能

細胞－基板間接着力の測定原理



フォース・ディスタンスカーブの測定例
引き離し時の仕事量や剥離過程の観察、最大接着力、弾性パラメータ等の一分子のイベントを定量化することができます



オリンパス製顕微鏡とインキュベータに搭載されたCellHesion® 200

倒立顕微鏡用に開発された力測定モジュール

カールツァイス、ライカ、ニコン、オリンパスの市販倒立顕微鏡に改造を加えることなく簡単に搭載し、光学観察と同時に力測定実験を進めることができます。CellHesion® 200 の実験中に、TIRF、CLSM、FRAPやカルシウムイオンのイメージングなどの蛍光手法を用いて細胞の観察することにより、接着過程や細胞骨格動態に関係する分子レベルのメカニズムを研究することができます。また、倒立顕微鏡の透過照明法の一つである、微分干渉顕微鏡や位相差顕微鏡のリアルタイム観察機能も、CellHesion® 200 と同時に使用することができます。

光学観察手法は、移動する細胞に力を加えるときや細胞の状態を確認する際に重要です。光学観察手法から得られた構造に関する情報を、微小力測定結果と比較することができます。

環境制御

CellHesion® 200 は生きた細胞を測定対象とすることに特化したシステムです。35mm径のシャーレ(ガラスボトムあり・なし)やカバーガラスのような標準的な基板に対応しているため、従来の細胞培養で使用している環境で実験を行うことができます。

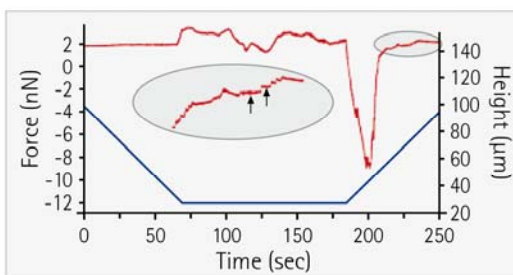
JPK PetriDishHeater™(シャーレ用)やJPK BioCell™(カバーガラス用)と組み合わせることで、温度制御(15℃ ~60℃)や、溶液の交換、ポートからのCO₂も制御にも対応。さらに、既存のインキュベータとCellHesion® 200 を組み合わせることもできます。(使用できるインキュベータ機種については担当営業にお問い合わせください)

カンチレバーホルダなど、細胞・バッファと接触する全てのパーツを洗浄することができますので、コンタミの心配もありません。

カンチレバーセンサーの垂直移動距離が長いので、大きな細胞でも実験を行うことができ、また接着力の強い細胞でも基板から引き離すことが可能です。



アフリカツメガエル生細胞の力学測定各段階
接近(50秒)
接触(1分24秒)
引き離し(3分50秒)



ピエゾの高さ(青線)
フォースカーブ(赤線)
膜繫留因子(矢印)

データご提供
ドイツ
カールスルーエ工科大学
C.Gonnermann様
D. Stamov博士
C.Franz博士

CellHesion® 200 ソフトウェア

制御ソフトウェアは使い易く、大量のデータを容易に扱うことができます。システムの制御も簡単です。また、簡単なスクリプトを使うことにより、フォースカーブ測定のパラメータを詳細に設定したり、マッピングモードが使用可能です。バッチ処理機能を行うことで、大量のデータをボタンひとつで解析することができます。

CellHesion® 200 装置仕様

- 単一分子から細胞全体、組織まで測定可能
- 搭載可能倒立顕微鏡
 - カールツァイス AxioObserver、Axiovert A1
 - ニコン Ti/TE 2000
 - オリンパス IXシリーズ
 - ライカ DMIシリーズ
- 使用可能顕微鏡モード
 - 微分干渉や位相差および蛍光/共焦点手法 (TIRF, FRAP, LSM等)
- カールツァイス AxioZoom、ライカ Z16などの正立顕微鏡と組み合わせ可能
- うねりの大きな表面の測定にも対応する自動Zレンジ調整
- カンチレバー移動距離 110 μm 以上
- キャパシタンスセンサ方式高速クローズドロップフィードバック制御
- モーターステージ: 駆動域20×20mm
- 温度制御・溶液循環・CO₂制御実験可能
 - BioCell™ カバーガラス用
 - PetriDishHeater™ 35 mm シャーレ用 (Wilco社、BD社、WPI社製 ガラスボトムディッシュも可)
- パーツ洗浄可能
- 既存のインキュベータと組み合わせ可能(特定機種)
- 細胞間相互作用のパラメータをバッチ処理で高速表示
- 単一分子のイベント、引き離し仕事量、最大接着力、剥離イベントの回数、ヤング率などの弾性パラメータを一つのシステムで測定



CellHesion®200 をカールツァイス製AxioObserverに搭載



JPK PetriDishHeater™ ディッシュの温度制御が可能

Literature

- **Gonnermann et al. (2015):**Quantitating membrane bleb stiffness using AFM force spectroscopy and an optical sideview setup. *Integr. Biol.*, doi:10.1039/C4IB00282B
- **Omidvar et al. (2014):**Atomic force microscope-based single cell force spectroscopy of breast cancer cell lines: An approach for evaluating cellular invasion. *Journal of Biomechanics* 47(13),3373-3379, doi:10.1016/j.jbiomech.2014.08.002
- **Pagliara et al. (2014):**Auxetic nuclei in embryonic stem cells exiting pluripotency. *Nature Materials* 13,638-644, doi:10.1038/nmat3943
- **Siamantouras et al. (2014):**Quantitative investigation of calcimimetic R568 on beta cell adhesion and mechanics using AFM single-cell force spectroscopy. *FEBS Letters* 588(7), 1178-1183, doi:10.1016/j.febslet.2014.02.058
- **Schubert et al. (2014):**Assay for characterizing the recovery of vertebrate cells for adhesion measurements by single-cell force spectroscopy. *FEBS* 588(19),3639-48, doi:10.1016/j.febslet.2014.06.012
- **Te Riet et al. (2014):**Dynamic coupling of ALCAM to the actin cortex strengthens cell adhesion to CD6. *J. Cell Sci.* 127(Pt 7),1595-1606, doi:10.1242/jcs.141077
- **Fredrichs et al. (2010):**Quantifying cellular adhesion to extracellular matrix components by single-cell force spectroscopy. *Nature Protocols* 5(7), 1353-1361, doi:10.1038/nprot.2010.89



ブルカー・ジャパン株式会社ナノ表面計測事業部
 東京事務所
 東京都中央区新川1-4-1
 Tel.: 03-3523-6361
 Fax: 03-3523-6364
 E-mail: info-nano.bns.jp@bruker.com

Visit the JPK web site for more information and sign up for our eNewsletter. Web address: www.jpk.com



装置仕様は装置改良のため予期なく変更される場合がございます。
 All rights reserved. © 2012.
 この資料に記載された社名および製品名は商標または登録商標です。