

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01850

研究課題名(和文)細胞のエルゴード性を利用したがん細胞力学診断・アッセイ法の開発

研究課題名(英文)Mechanical diagnosis and assay of cancer cells based on cell ergodicity

研究代表者

岡嶋 孝治 (OKAJIMA, TAKAHARU)

北海道大学・情報科学研究院・教授

研究者番号：70280998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、がんの進行度を1細胞単位で力学的に同定する新手法の開発を目的とした。1年目は、細胞形態を制御可能なマイクロパターン基板を作製し、1細胞レオロジーを網羅計測できる広範囲AFMシステムを開発した。2年目は、マイクロパターンの形状を変化させることにより、細胞診断能が変化する可能性があること、そして、その細胞診断能が細胞内の空間位置に強く依存することを見出した。3年目は、細胞の力学特性だけでなく、細胞形状も細胞診断の有用な指標になることを見出した。また、細胞レオロジーの時間領域に依存して、細胞力学に関係する細胞構造が変化する可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞を1細胞単位で診断する技術は、究極のがん早期発見技術と言っても過言ではない。本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、がんの進行度を1細胞単位で力学的に同定する新手法を開発した。各種細胞の形態制御が可能なマイクロパターン基板と細胞力学特性の精密計測法を駆使して、1細胞レオロジーの網羅計測が可能な広範囲計測が可能なAFMシステムを開発した。本研究から、原子間力顕微鏡を用いた時間空間細胞力学計測によりがん細胞の診断が可能になった。今後は、細胞力学診断の高速化や様々な部位のがんへの適用およびアッセイの研究を開拓する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We studied a platform of atomic force microscopy (AFM)-based system that diagnoses normal and cancerous cells at the single cell level. We developed micro-fabricated substrates for patterning single cells and an AFM system allowing a large number of cells adhered on micro-patterned substrates. Using normal and pre-cancer cells, we found that the classification accuracy is highly dependent on the micro-patterned geometry and the measurement locations within the patterned cells. Furthermore, we found that the shape (height) of micro-patterned cells is also a useful indicator for single cell mechanical diagnosis. In addition, we found that AFM had a potential to map the intracellular structures at their characteristic time scales.

研究分野：生物物理学

キーワード：原子間力顕微鏡 細胞メカニクス がん細胞 細胞力学診断

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、正常がいきなりがん細胞になるのではなく、長期間にわたりがん遺伝子やがん抑制遺伝子にいくつかの変異が生じることによって発症すると考えられているが、がん化と遺伝子メカニズムの全容は未解明である。一方で、近年、細胞の力学特性のような物理学的量が、がんの進行度に依存して変化し、この細胞の力学特性の変化が、がん細胞の浸潤・転移に重要な役割をはたしていると考えられている。そこで、本研究では、申請者が近年開発した原子間力顕微鏡 (AFM) の粘弾性 (レオロジー) 計測技術を駆使して、正常細胞とがん細胞のレオロジー変数の新規な力学診断法の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、AFM 技術を駆使して、がんの進行度を 1 細胞単位で力学的に同定する新手法の開発を目的とした。1 年目は、細胞形態を制御可能なマイクロパターン基板を作製し、1 細胞レオロジーを網羅計測できる広範囲 AFM システムを開発することを目的とした。2 年目は、マイクロパターンの形状を変化させることにより、細胞のエルゴード性、およびその診断能について調べることを目的とした。またサンプル形状やサンプルの細胞間相互作用に依存する AFM 力学計測技術の開発を行った。3 年目は、細胞診断の指標として、AFM で測定される力学情報と形状 (高さ) 情報の利用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

様々な幾何学的形状に細胞をパターン化するマイクロ加工基板、および、平面・立体の次元を制御したマイクロ加工基板を作製した。正立型光学顕微鏡に AFM レオロジー計測装置を搭載した。対物レンズを用いた光でこ法を用いて、細胞サンプルの操作性を向上させ、広範囲スキャナー (設備備品費で購入) を用いて、mm スケールのサンプルの高速測定を実現した。

4. 研究成果

(1) 研究成果の概要

AFM による細胞レオロジー計測法を図 1 に示す。本手法の利点と限界等について整理し (Efremov et al. Soft Matter 2020)、AFM 細胞診断技術に利用した。特に、本研究では、応力緩和測定法とフォースモジュレーション法を用いて、細胞の空間マッピング測定を行った。

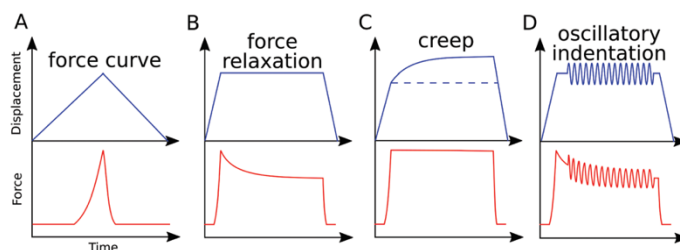


図 1 AFM による細胞レオロジー計測法

基板に接着した細胞の表面の凹凸によって、細胞の力学量は見かけ上変化する。これは AFM の長い間の課題であったが、その細胞表面傾斜依存性を調べた (Fujii et al. AIP Advances 2019)。その結果、細胞のような柔らかいサンプルは、傾斜角に対して常にヘルツモデルに近似的に従うこと (図 2 a-c) そして弾性率のマスターカーブが存在すること (図 2d) が分かった。

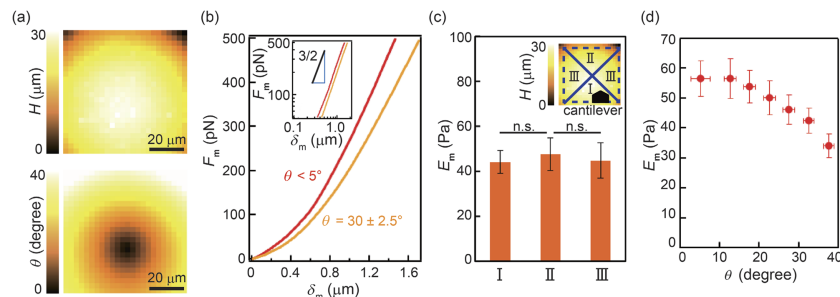
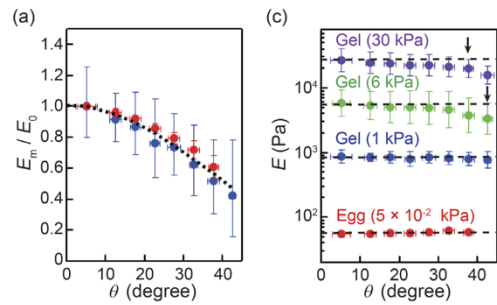


図 2 表面傾斜のあるサンプル(a)のフォースカーブ(b)と見積もられたヤング率値(c)。見積もられたヤング率は傾斜角に対して単調に減少する (d)。

そして、押し込みの経路に依存しないように非対称なずり応力を無視したモデルを用いて、見積もられた弾性率から真の弾性率を算出する解析解を導出することができた (図 3)。これにより、細胞の形状に依存せずに、細胞の弾性率を精密に計測できる手法が確立した。

図3 (a) 未受精卵 (赤) とアクリルアミドゲル (青) の弾性率の傾斜角依存性。(b) 押し込みの経路に依存しない非対称なずり応力を無視した修正ヘルツモデル。(c) 修正ヘルツモデルを用いて見積もったヤング率の傾斜角依存性。



細胞力学診断において、細胞力学特性を決定する構造の起源を理解することは重要である。そこで、フォースモジュレーション法を用いて、細胞レオロジーと細胞内骨格の空間測定を行った (図4)。その結果、AFMで見積もられる細胞レオロジーと細胞骨格 (アクチン線維) の密度の関係が、磁気ビーズマイクロレオロジーで得られる関係と一致しないことを見出した

(Tanaka et al. Jpn. J. Appl. Phys. 2020)。また、マイクロパターンの形状を変化させることにより、細胞診断能が変化する可能性があることが分かってきた。また、その細胞診断能が細胞内の空間位置に強く依存することが分かってきた。さらに、力学特性だけでなく、細胞形状も細胞診断の有用な指標になる可能性があることを見出した。本結果は、AFMの細胞力学診断の基礎として重要である。

細胞の力学物性は、細胞間相互作用に影響すると考えられているが、その詳細は不明である。がん腫瘍組織を1細胞単位で測定することを可能にするには、細胞間相互作用が細胞弾性率に及ぼす影響を調べることが重要である。そこで、単層細胞の弾性率の空間分布測定を行った (Fujii et al. Biophys. J 2019)。その結果、細胞の弾性率は均一ではなく、空間的なドメイン構造を有することを見出した (図5)。そして、このドメイン構造は、アクチン線維を脱重合することにより消滅し、さらに、細胞間接着たんぱく質の1つであるEカドヘリンを阻害しても有意にドメインサイズが減少することを見出した。このような多細胞系のAFM計測は、はじめての研究例であるが、これは本研究課題のAFM装置開発によって達成することができた。また、今回の測定は、単層の正常細胞の測定であるが、正常細胞とがん細胞の共培養系の細部御力学物性調べることも可能であり、今後はそのような計測を通じて、細胞間相互作用存在下のがん細胞診断の1細胞解析の探求を行う必要がある。予想を超える成果として、本AFM技術の一部は発生胚計測にも有用であることを示した。

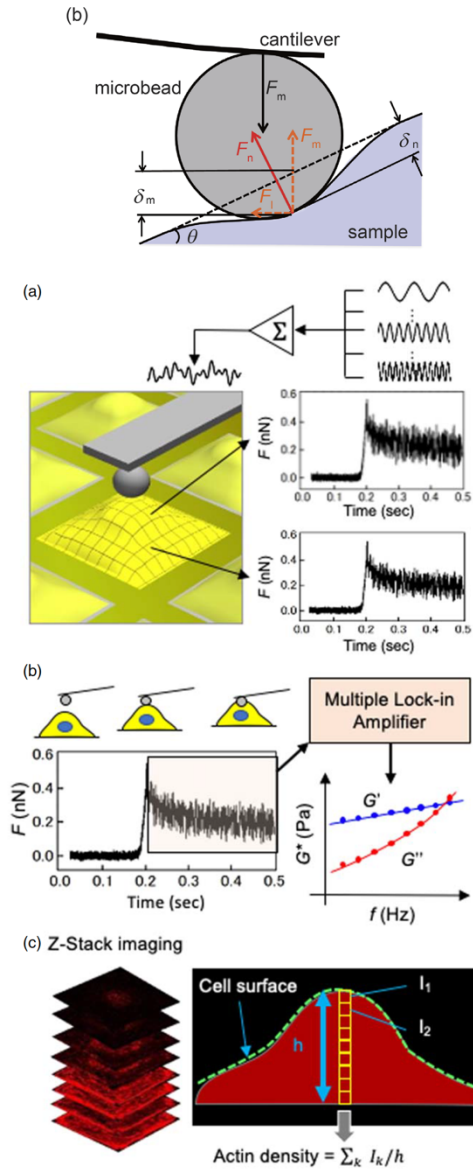


図4 マイクロパターン細胞のAFM計測(a)と細胞骨格密度測定(b)の概念図。

(2) 結論

本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、がんの進行度を1細胞単位で力学的に同定する新手法を開発した。AFMを用いた1細胞力学的診断システムを開発し、細胞のエルゴード性を満足する最適条件を探索した。細胞力学特性を精密に計測する手法を考案し、マイクロパターンの形状を変化させることにより、細胞診断能が変化する可能性があること、その細胞診断能が細胞内の空間位置に強く依存することを見出した。また、力学特性だけでなく、細胞形状も細胞診断の有用な指標になる可能性があることを見出した。そして、予想を超える成果として、本AFM技術の一部は発生胚計測にも有用であることを示した。以上の研究から、AFMを用いた時間空間細胞力学計測によりがん細胞の診断が可能になった。今後の課題は、細胞力学診断の高速化や様々な部位のがんへの適用およびアッセイである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. M. Efremov, T. Okajima, and A. Raman,	4. 巻 16
2. 論文標題 Measuring viscoelasticity of soft biological samples using atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 64-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9SM01020C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujii Yuki, Ochi Yuki, Tuchiya Masahiro, Kajita Mihoko, Fujita Yasuyuki, Ishimoto Yukitaka, Okajima Takaharu	4. 巻 116
2. 論文標題 Spontaneous Spatial Correlation of Elastic Modulus in Jammed Epithelial Monolayers Observed by AFM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1152 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.01.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Fujii, T. Okajima	4. 巻 9
2. 論文標題 Calibrating the Young's modulus of soft materials with surface tilt angle measured by atomic force microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 15028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5046372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Yuki, Koizumi Wataru C., Imai Taichi, Yokobori Megumi, Matsuo Tomohiro, Oka Kotaro, Hotta Kohji, Okajima Takaharu	4. 巻 4
2. 論文標題 Spatiotemporal dynamics of single cell stiffness in the early developing ascidian chordate embryo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01869-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 R. Tanaka, M. Sawano, Y. Fujii, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima	4. 巻 59
2. 論文標題 Relationship between rheological properties and actin filaments of single cells investigated by atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SN1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ab8e23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 K. Toyota, R. Tanaka, T. Okajima
2. 発表標題 Elasticity of Brewery Yeast under Ethanol Stress Investigated by Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 27th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM27) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Tanaka, M. Sawano, K. Kuribayashi-Shigetomi, T. Okajima,
2. 発表標題 Relationship between Rheological Properties and Actin Density in Single Cells Investigated by AFM
3. 学会等名 27th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM27) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Matsumoto, H. Sugino, S. Katsuragi, H. Tsuru, J. Narita, S. Kogaki, H. Ishida, T. Okajima,
2. 発表標題 Mechanics of cardiac fibroblasts from child patients with restrictive cardiomyopathy investigated by atomic force microscopy
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic Cardiac Vascular Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤一馬、繁富(栗林)香織、宮武由甲子、スバギョ・アグス、末岡和久、岡嶋孝治
2. 発表標題 マイクロパターン基板上に形成する微小腫瘍のcell-in-cell構造の観察
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小倉花歩、繁富(栗林)香織、スバギョ・アグス、末岡和久、岡嶋孝治、
2. 発表標題 原子間力顕微鏡による単一がん細胞診断能の評価：細胞形状依存性
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関玲央捺、杉本健太、岡嶋 孝治、
2. 発表標題 分岐形態形成過程の組織力学測定のための原子間力顕微鏡
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土生飛翔、田中良昌、藤井裕紀、岡嶋 孝治
2. 発表標題 多細胞系力学測定のための原子間力顕微鏡の開発
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 繁富香織、宮武由甲子太田悠介、アグス・スバギョ、末岡和久、笠原正典、岡嶋孝治
2. 発表標題 癌腫瘍組織のダイナミクス観察のためのマイクロ・ナノパターン基板
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 AFMによる1細胞・細胞集団のナノメカニクス
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 AFMによる1細胞・多細胞系のナノ力学計測
3. 学会等名 2019年日本表面真空学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 AFMによる多細胞系のメカニクス
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 ソフトマテリアル研究部会 第6回講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡による細胞・組織メカニクスの定量化
3. 学会等名 第67回応用物理学会春期学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉花歩、田中良昌、繁富（栗林）香織、スバギョアグス、末岡和久、岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡による単一がん細胞力学診断：細胞形状依存性
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Okajima, R. Tanaka, M. Nagase, K. Ogura, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka
2. 発表標題 Single Cancer Cell Diagnosis Based on Power-Law Rheology by AFM
3. 学会等名 ACSIN-14&1CSPM26（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中良昌、永瀬萌、繁富（栗林）香織、スバギョ・アグス、末岡和久、岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡測定による細胞形状・細胞レオロジー変数を用いた単一がん細胞診断法の評価
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 AFMによる発生胚のメカニクス
3. 学会等名 2021年応物春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡：細胞・組織のメカニクス測定
3. 学会等名 日本薬剤学会・物性FGセミナー2020（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M.Matsumoto, H.Suginobe, H.Tsuru, J.Narita, S.Kogaki, H.Ishida, T.Okajima
2. 発表標題 Intracellular structures and mechanical properties of cardiac fibroblasts from pediatric patients with restrictive cardiomyopathy
3. 学会等名 28th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM28) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y.Fujii, T.Matsuo, T.Okajima
2. 発表標題 Measuring Mechanical Properties of Developing Embryo with Tandemly Arranged Colloidal Probe AFM
3. 学会等名 28th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM28) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた初期発生胚の時空間メカニクス-AFMを用いた発生胚メカニクス計測法
3. 学会等名 第5回ホヤ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Okajima
2. 発表標題 Nanomechanics of cell and tissue probed by atomic force microscopy
3. 学会等名 6th International Conference on Electronic Materials and Nanotechnology for Green Environment (ENGE 2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 AFMによる細胞・組織の力学情報の定量化
3. 学会等名 2020年第81回応用物理学会秋季学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 バイオAFM計測：1細胞から多細胞へ
3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 藤井裕紀、岡嶋孝治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 生体の科学 70巻4号	

1. 著者名 藤井裕紀、岡嶋孝治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 高分子学会	5. 総ページ数 2
3. 書名 高分子	

1. 著者名 重川 秀実、吉村雅満、目良 裕、岡嶋 孝治	4. 発行年 2020年
2. 出版社 近代科学社	5. 総ページ数 192
3. 書名 ナノ計測	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	末岡 和久 (Sueoka Kazuhisa) (60250479)	北海道大学・情報科学研究院・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------