

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22122

研究課題名（和文）マルチプローブ顕微鏡技術を用いた発生胚メカニクス計測法の開発

研究課題名（英文）Mechanical measurement of developing embryo by multi-probe scanning microscopy

研究代表者

岡嶋 孝治（OKAJIMA, TAKAHARU）

北海道大学・情報科学研究所・教授

研究者番号：70280998

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：発生胚を構成する細胞の力学特性（メカニクス）は、胚形成の決定と深く関係していると考えられている。細胞メカニクスは、張力（細胞間が引っ張り合う力）と弾性率（細胞の変形能）で定義される。したがって、これらの細胞メカニクスを1細胞レベルで計測することは、胚形成のメカニズム解明において重要である。本研究では、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、フォースカーブ測定による見かけのヤング率のタイムラプス測定、および往復フォースカーブおよび応力緩和測定による緩和弾性率のタイムラプス測定を可能とし、初期発生胚の対称分裂期と非対称分裂期の計測に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精卵の発生過程は、遺伝子や生化学的な因子に加えて、力学的な因子が重要な役割をしていると考えられているが、その時空間的挙動は未知であった。本研究では、プローブ顕微鏡を用いて発生胚の細胞の力学挙動を1細胞レベルで追跡することに成功した。本研究により、発生胚の胚形成メカニズムの物理的な理解が進展し、再生医療等の発生胚の制御技術の基礎となる。

研究成果の概要（英文）：During embryogenesis, the embryonic formation is associated with the mechanical property of cells involving the tension occurring between neighboring cells and the elastic modulus, i.e., deformability of cells. The understanding of cell mechanical behaviors is crucial to elucidate how embryonic cells are regulated by mechanical cues. In this study, we succeeded to measure the spatiotemporal dynamics of the apparent Young's modulus of cells by the atomic force microscopy (AFM) force-curve technique and the relaxation modulus of cells by approach-retraction force-curve as well as stress relaxation techniques.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞力学 プローブ顕微鏡 発生胚

### 1. 研究開始当初の背景

発生胚を構成する細胞の力学特性(メカニクス)は、胚形成の決定と深く関係していると考えられている。細胞メカニクスは、張力(細胞間が引っ張り合う力)と弾性率(細胞の変形能)で定義される。したがって、これらの細胞メカニクスを1細胞レベルで計測することは、胚形成のメカニズム解明において重要である。これまで、張力の1細胞計測は、レーザーアブレーション法や光ピンセット法を用いてなされてきた。しかし、レーザーアブレーション法細胞への侵襲度が大きいため発生過程の力学特性を追跡することが難しい。また、光ピンセット法は局所的な領域のみ測定可能であり空間特性の計測は得意ではない。さらに、弾性率においては、定量的な弾性率の1細胞計測は皆無であった。1細胞レベルの弾性率計測として、研究代表者は、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、発生過程の卵割細胞や陥入前の不均一な細胞力学特性の直接測定に成功した。マルチプローブ顕微鏡技術を発展させることで、張力と弾性率の同時計測も原理的に可能である。そして、それを実現するには、発生胚サンプルに対してコアとなるAFM計測法を最適化させることが研究を加速するために不可欠であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、発生胚の広範囲力学測定を目指して、マルチコロイドプローブカンチレバーを用いたAFMを開発し、フォースカーブ測定による見かけのヤング率のタイムラプス測定、および往復フォースカーブおよび応力緩和測定による緩和弾性率のタイムラプス測定を可能とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) マルチコロイドプローブカンチレバーの開発、(2) フォースカーブ測定法による発生胚細胞の見かけのヤング率のタイムラプス測定、(3) 応力緩和測定法による緩和弾性率のタイムラプス測定、そして(3) 往復フォースカーブ測定法による緩和弾性率決定の妥当性の検証、を行った。発生胚は、カタコウレイボヤ(ナショナルバイオリソースプロジェクトより提供していただいた)を用いた。初期発生胚の対称分裂期と非対称分裂期の計測を行った。以下にその内容を報告する。

### 4. 研究成果

(1) マルチコロイドプローブカンチレバーを用いた原子間力顕微鏡(AFM)の開発  
発生胚は数 $10\mu\text{m}$ の凹凸を有している。従って、市販のASFMカンチレバーをそのまま計測に利用することが難しい。そこで、カンチレバー探針に直径約 $10\mu\text{m}$ のシリカビーズを直列に積むことによりカンチレバーのレバーとサンプル表面の接触を防ぎ、カンチレバーとサンプル表面間の水圧による効果を軽減させることに成功した(図1)。このマルチコロイドプローブカンチレバーにより安定した発生胚計測が可能になった。

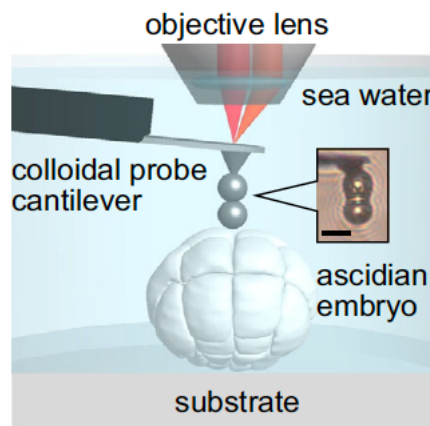


図1 マルチコロイドプローブカンチレバーの模式図。  
挿入図: 光学顕微鏡写真(スケールバーは $10\mu\text{m}$ )。

#### (2) フォースカーブ測定法による発生胚測定

マルチコロイドプローブカンチレバーを用いてフォースカーブ測定を行った。その結果、植物極側で発見した1細胞レベルの見かけのヤング率の変化のタイムラプス計測に成功し、そのヤング率の時空間変化が、アピカルのアクトミオシン構造と密接に関係していることを見出した。さらに、サブ細胞の弾性率変化も捉えることに成功した。

#### (3) 応力緩和測定法による発生胚測定

細胞分裂期にヤング率の増減が生じること、また、非対称期の植物極側では、1細胞レベルでヤング率が大きく変化することが分かったが、その弾性成分と粘性成分の寄与は不明であった。そこで、マルチコロイドプローブカンチレバーのAFM応力緩和測定法を用いて、発生胚細胞の緩和弾性率のタイムラプス測定を行った。その結果、見かけのヤング率の増減は、特徴的な時間の弾性率と流動性の両方が時空間的に変化していることを見つけた。さらに、緩和弾性率を詳細に解析することにより、静的弾性率の存在を明らかにし、この静的弾性率も発生胚の過程において変化することを見出した。

#### (4) 往復フォースカーブ測定法による発生胚測定

上記のように、応力緩和測定では、発生胚細胞の緩和弾性率をダイレクトに決定することができる。一方で、応力緩和過程の測定のため1つのマッピング測定に長時間を要し、タイムラプスの時間分解能は著しく低下してしまう。この問題を補間する方法として、往復フォースカーブ測定法による発生胚測定を行った。その結果、応力緩和測定法で得られた緩和弾性率の時空間変化の挙動を高い時間分解能で計測することに成功した。

#### (5) その他の成果

マルチプローブ顕微鏡の発生胚計測のために、発生胚の基本構造である単層細胞の運動性と電界依存性を評価し、その形態変化に関する知見を得ることができた。

以上のように、プローブ顕微鏡を用いて、発生胚の1細胞ごとの弾性率の定量解析にはじめて成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横堀恵美、藤井裕紀、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応力緩和測定
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 小川美優、廣野航平、藤井祐紀、岡嶋孝治
2. 発表標題 静電界存在下の細胞運動の測定：実験システムの構築
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 廣野航平、藤井裕紀、松本悠暉、田中あや、中島寛、岡嶋孝治
2. 発表標題 細胞集団運動の定量解析法の比較
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 廣野航平、田中あや、藤井裕紀、松本悠暉、中島寛、岡嶋孝治
2. 発表標題 硬さパターンゲル上の少数細胞・細胞集団の運動性
3. 学会等名 第67回応用物理学会春期学術講演会
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・革新的走査型プローブ顕微鏡技術で拓くナノプローブ生命科学の新展（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 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 横堀恵美、岡嶋孝治
2. 発表標題 ホヤ発生胚の応力緩和測定
3. 学会等名 第5回ホヤ研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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

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