

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310079

研究課題名（和文） 原子間力顕微鏡を用いた多数細胞力学の多変量解析の研究

研究課題名（英文） Statistical Analysis of Single Cell Mechanics by Atomic Force Microscopy

研究代表者

岡嶋 孝治 (OKAJIMA TAKAHARU)

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：70280998

研究成果の概要（和文）：原子間力顕微鏡（AFM）を用いて多数細胞レオロジー測定法を開発し、細胞レオロジーの統計データを、細胞力学モデルを用いて解析した。（1）細胞レオロジーの単一細胞数分布の周波数特性を明らかにした。（2）血清飢餓法により細胞同調された細胞レオロジーを明らかにした。（3）細胞レオロジーの周波数特性のアンサンブル平均と時間平均を測定し、それらの差異を明らかにした。（4）正常細胞から不死化細胞への形質転換における細胞レオロジーを測定した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the number distribution of single cell rheology by atomic force microscopy (AFM) and discuss the statistical data in connection with a modern model of cell rheology such as power-law rheology. (1) The number distribution of single cell rheology was measured as a function of external frequency. (2) The rheological behavior of cells was measured as cells were synchronized using serum starvation. (3) We succeeded to measure the ensemble- and time-averaged cell rheology and found differences between them. (4) We investigated the number distribution of power-law rheology of cells transformed from normal cells to immortalized cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：原子間力顕微鏡、多数細胞、細胞レオロジー、ナノ計測、細胞周期、細胞分化、細胞診断、統計解析

1. 研究開始当初の背景

生細胞の粘弾性（レオロジー）は、細胞運動、細胞分裂、細胞間情報伝達等の細胞機能と密接に関係する。従って、ナノ・マイクロスケールにおける単一細胞レオロジーの解明は、生命の最小単位である細胞を理解する上で基

本的に重要である。申請代表者は、過去に、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた生細胞力学の広帯域計測法を開発した。また、多数細胞計測法不可避な個体差をもつ細胞の力学を精密かつ定量的に計測するために、多数の細胞を規則的に配列し長時間培養する実験系を構築

し、細胞力学の統計情報の取得が可能な新規AFM装置を試作した。そして、細胞力学の周波数特性（細胞素弾性率）の細胞数分布が対数正規分布に従い、その統計偏差が周波数依存性を示すことを明らかにした。細胞力学と細胞機能とに関連する細胞統計情報とを組み合わせることにより、新規な細胞力学統計解析が可能になるという着想に至り、本研究を行った。

2. 研究の目的

多数細胞の統計情報を多角的に測定し、細胞力学と細胞機能との関連の高精度解析を行う。特に、生命固有の現象である（1）細胞周期、（2）細胞分化、（3）細胞運動の細胞機能に着目する。

多数細胞力学・構造の統計情報を計測するシステムの構築、および規則的に配列し長時間培養を可能とする細胞サンプルの調製とその最適化を行う。細胞サンプルにおいて、細胞周期を同調・停止させた規則配列細胞サンプル、正常細胞から異常な不死化細胞（ガン化細胞）に分化した規則配列細胞サンプル、および自発運動する規則配列細胞サンプルの調製とそれらの細胞培養の最適化条件の探索を行う。

3. 研究の方法

蛍光顕微鏡（既存、TE-2000、Nikon）に搭載した原子間力顕微鏡（既存、MFP-3D-BIO、Asylum Research）を用いて、細胞観察と細胞力学測定を行った。

AFM探針先端に装着したコロイドプローブカンチレバーを用いた。比較的長い探針先端にコロイドプローブを装着するため、カンチレバーと細胞表面との流体力学的相互作用が軽減でき、精密な複素弾性率計測が可能になった。

細胞の力学応答は、ロックイン検波を用いたフォースモジュレーションモードにより計測した。蛍光タンパク質Fucciを導入した細胞は、理研細胞バンクから購入した。Fucci導入細胞は、フラットな培養ディッシュ上で測定を行い、それ以外の細胞のフォースモジュレーション測定は細胞アレイを用いて行った。

4. 研究成果

平成21年度は、多変量解析を実現するために周波数領域測定に加えて、時間領域測定を確立した。また、規則的に配列した細胞を長時間培養可能なインキュベータの試作を行った。AFMと蛍光計測の同時計測を簡便に行うことができる装置を立ち上げ、細胞周期と細胞レオロジーとの関係を、AFMと蛍光顕微鏡測定により行った。正常細胞から不死化細胞（ガン化細胞）への遷移過程を調べるために規則配列した細胞サンプルを作成しAFMによる周

波数領域測定結果を得た。また、多変量解析のために、細胞内カルシウム濃度計測法を立ち上げ、AFMによる細胞力学と細胞内カルシウム濃度の同時測定システムを確立した。予備測定の結果、AFMにより力学刺激に対して、細胞間カルシウムウェーブの振る舞いや、その時間変化を追跡することが可能であった。さらに、細胞骨格構造と細胞レオロジーの多変量解析を目指して、アクチン構造の変化に対する細胞レオロジーのAFM計測を行った。その結果、アクチン脱重合により、複素弾性率の細胞数分布の平均値が減少するだけでなく、細胞数分布の標準偏差も大きく変化することが分かった。

平成22年度は、（1）細胞周期に依存した細胞レオロジー計測、（2）多数細胞レオロジーの時間空間依存性、および（3）細胞拍動現象の力学計測に関する研究を行った。（1）細胞周期に依存した細胞レオロジー計測において、血清飢餓法によりG0期に同調した細胞を細胞アレイ上に配列し、その細胞ナノレオロジー（複素弾性率）を調べた。血清飢餓同調法により処理した細胞と未処理の細胞において、複素弾性率の細胞数分布を測定し、血清飢餓法により、細胞レオロジーが変化することが分かった。

（2）多数細胞レオロジーの時間空間依存性の計測において、細胞力学のアンサンブル平均と時間平均との比較を行い、細胞力学状態の統計性を明らかにし、そのエルゴード性に関して議論した。（3）細胞拍動現象の力学計測において、AFMコンタクトモードを用いて、心筋細胞内の局所拍動特性と細胞力学特性との関連関係を明らかにした。また、細胞内拍動現象の協同性について議論した。

平成23年度は、細胞レオロジーのアンサンブル平均とその分布を精密に計測するためには、個々の細胞の個性と実験誤差とを分離することが重要である。細胞レオロジーのべき応答理論を基に、実験データから細胞レオロジーの標準偏差を抽出する方法を開発した。本手法を用いて、細胞レオロジーのアンサンブル計測と時間計測を行い、本手法の有効性を示し、細胞レオロジーにおけるアンサンブル平均と時間平均との関係を解明した。さらに、正常細胞と異常細胞との細胞レオロジーの差異を評価し、細胞周期に対する細胞レオロジーの定量化が可能になった。細胞内に存在する細胞骨格を介して力が伝播すると考えられているが、細胞レオロジーの細胞内伝播に関しては未知であり、その計測方法も確立していなかった。そこで、マイクロポストからなる力センサー基板とAFMを用いて、細胞上部から細胞下部への細胞接着点間の力伝播の周波数特性を計測する方法を開発した。そして、細胞力伝播は、弾性的であり、その伝播方向はプレストレスと類似の方向であることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① A. Okada, Y. Mizutani, A. Subagyo, H. Hosoi, M. Nakamura, K. Sueoka, K. Kawahara, and T. Okajima, Direct observation of dynamic force propagation between focal adhesions of cells on microposts by atomic force microscopy. Appl. Phys. Lett. (査読有) 99 (2011) 263703.
- ② A. Miyaoka, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara and T. Okajima, Rheological Properties of Growth-Arrested Fibroblast Cells under Serum Starvation Measured by Atomic Force Microscopy. Jpn. J. Appl. Phys. (査読有) 50(2011)08LB16.1-4.
- ③ Y. Mizutani, K. Kawahara, T. Okajima, Effect of Isoproterenol on Local Contractile Behaviors of Rat Cardiomyocytes Measured by Atomic Force Microscopy Current Pharmaceutical Biotechnology, (査読有) 印刷中.
- ④ T. Okajima, Atomic Force Microscopy for the Examination of Single Cell Rheology (Review), Current Pharmaceutical Biotechnology (査読有) 印刷中.
- ⑤ S. Hiratsuka, Y. Mizutani, P.G. Cai, M. Tsuchiya, H. Tokumoto, K. Kawahara, T. Okajima, Statistics of Single Cell Mechanics Investigated by Atomic Force Microscopy The 2010 MRS Spring Meeting Symposium U proceedings (査読有) .
- ⑥ S. Hiratsuka, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara, H. Tokumoto, T. Okajima, The number distribution of complex shear modulus of single cells measured by atomic force microscopy, Ultramicroscopy (査読有) 109 (2009) 937-941.
- ⑦ S. Hiratsuka, Y. Mizutani, A. Toda, N. Fukushima, K. Kawahara, H. Tokumoto and T. Okajima, Power-Law Stress and Creep Relaxations of Single Cells Measured by Colloidal Probe Atomic Force Microscopy Jpn. J. Appl. Phys. (査読有) 48 (2009)08JB14-1-4

[学会発表] (計 27 件)

- ① R. Takahashi, Y. Mizutani, K. Kawahara and T. Okajima, Power-law rheology of normal and cancer cells investigated by atomic force microscopy, Biophysical Society 56th Annual Meeting (2012.2.24-3.1, San Diego)
- ② P.G. Cai, Y. Mizutani, K. Kawahara and T. Okajima, Temporal Variation of Single Cell Rheology Investigated by Atomic Force Microscopy, 19th International Colloquium on

Scanning Probe Microscopy (2011.12.19-21, Toyo)

- ③ Y. Usuki, Y. Mizutani, M. Tsuchiya and T. Okajima, Cell Cycle Dependence of Single Cell Rheology Investigated by AFM, 19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (2011.12.19-21, Toyo)
- ④ R. Takahashi, Y. Mizutani, K. Kawahara, T. Okajima, Power-law rheology of normal and cancer cells investigated by atomic force microscopy, 19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (2011.12.19-21, Toyo)
- ⑤ 蔡萍根、水谷祐輔、土屋雅博、岡嶋孝治 AFMによる細胞レオロジー統計量の解析法、第59回レオロジー討論会(2011.10.6-8、群馬)
- ⑥ 蔡萍根、水谷祐輔、土屋雅博、河原剛一、岡嶋孝治、AFMによる単一細胞レオロジーの個体差の精密解析、第72回応用物理学学会学術講演会(2011.8.28-9.2、山形)
- ⑦ 佐藤淳平、水谷祐輔、河原剛一、岡嶋孝治 原子間力顕微鏡を用いた水平方向の力学刺激による細胞内カルシウム応答測定、第49回生物物理学学会年会(2011.9.16-18、兵庫)
- ⑧ 高橋亮輔、水谷祐輔、蔡萍根、岡嶋孝治 原子間力顕微鏡を用いた正常細胞とがん細胞の粘弾性測定、第49回生物物理学学会年会(2011.9.16-18、兵庫)
- ⑨ P.G. Cai, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara, and T. Okajima, Spatial and Temporal Dependence of Single Cell Rheology Investigated by Atomic Force Microscopy, Biophysical Society 55th Annual Meeting (March 4-9, 2011, Baltimore)
- ⑩ 佐藤 淳平, 水谷 祐輔, 河原 剛一, 岡嶋 孝治, 原子間力顕微鏡を用いた物理刺激による細胞カルシウム応答測定、第 58 回応用物理学関係連合講演会(2011.3-24-27、神奈川)
- ⑪ 水谷 祐輔, 蔡 萍根, 土屋 雅博, 河原 剛一, 岡嶋 孝治, AFM による不死化過程における細胞粘弾性の細胞数分布解析、第 58 回応用物理学関係連合講演会(2011.3-24-27、神奈川)
- ⑫ 蔡 萍根, 水谷 祐輔, 土屋 雅博, 河原 剛一, 岡嶋 孝治, AFM による細胞内ネットワーク構造変化に対する細胞粘弾性の研究、第 58 回応用物理学関係連合講演会(2011.3-24-27、神奈川)
- ⑬ P.G. Cai, Y. Mizutani, A. Miyaoka, M. Tsuchiya, K. Kawahara, T. Okajima, Time and Space Dependent Studies in Cell Rheology by Atomic Force Microscopy, 18th

- International Colloquium on SPM (2010 12 9-11, Atagawa)
- ⑭ Miyaoka, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara and T. Okajima, Rheology of Single Cells under Serum Starvation Measured by Atomic Force Microscopy, 18th International Colloquium on SPM (2010 12 9-11, Atagawa)
- ⑮ 水谷祐輔, 蔡萍根, 宮岡敦史, 土屋雅博, 春菜ゆかり, 河原剛一, 岡嶋孝治, AFMによる形質転換過程における線維芽細胞の複素弾性率の解析, 第57回応用物理学関係連合講演会 (2010. 3. 17-20, 平塚)
- ⑯ Y. Mizutani, P. G. Cai, M. Tsuchiya, K. Kawahara and T. Okajima, Rheology of transformed cells investigated by AFM, International Scanning Probe Microscopy Conference Sapporo '10 (2010. 5. 10-12, 札幌)
- ⑰ Y. Mizutani, P. G. Cai, M. Tsuchiya, K. Kawahara, and T. Okajima, Rheology of transformed fibroblast cells investigated by atomic force microscopy, 日本生物物理学会第48回年会 (2010. 9. 20-22, 仙台)
- ⑱ 水谷祐輔, 蔡萍根, 土屋雅博, 河原剛一, 岡嶋孝治: AFMによる正常細胞から不死化細胞のナノレオロジー測定, 第58回レオロジー討論会 (2010. 10. 4-6, 仙台)
- ⑲ 水谷祐輔, 蔡萍根, 土屋雅博, 河原剛一, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡を用いた正常・老化・不死化細胞の力学統計解析, 第49回日本生体医工学会北海道支部大会 (2010. 10. 9, 札幌)
- ⑳ T. Okajima, S. Hiratsuka, Y. Mizutani, P.G. Cai, M. Tsuchiya, H. Tokumoto and K. Kawahara, Statistics of Single Cell Mechanics Investigated by Atomic Force Microscopy, (2010 MRS Spring Meeting, San Francisco, April 5-9, 2010)
- ㉑ 蔡萍根, 水谷祐輔, 土屋雅博, 岡嶋孝治, 細胞力学のゆらぎ解析: 生細胞アレイの原子間力顕微鏡測定, 第7回バイオオプティクス研究会・理研シンポジウム「蛍光相関分光と情報伝達 (7)」 合同シンポジウム (2010年12月3-4日, 東京)
- ㉒ 水谷祐輔, 土屋雅博, 河原剛一, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による心筋細胞の拍動挙動の計測, 第22回バイオエンジニアリング講演会 (2010. 1. 9-10, 岡山)
- ㉓ 平塚伸一郎, 水谷祐輔, 河原剛一, 徳本洋志, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による生細胞レオロジーの時間領域測定, 第56回応用物理学学会講演会, 2009年4月.
- ㉔ 平塚伸一郎, 水谷祐輔, 河原剛一, 徳本洋志, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による生細胞レオロジーの時間領域測定, 第56回応用物理学学会講演会, 2009年4月.
- ㉕ Y. Mizutani, D. Matsumaya, S. Hiratsuka, K. Kawahara, H. Tokumoto, T. Okajima. Mechanics of Spontaneously Beating Cardiac Myocytes Investigated by AFM, The Biophysical Society 53rd Annual Meeting, CD-ROM (The Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, MA, U.S.A., February, 2009)
- ㉖ Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara, T. Okajima, Mechanics of cardiac cells under hypertrophy induced by oxidative stress measured with an atomic force microscope (原子間力顕微鏡を用いた酸化ストレスによる細胞肥大過程の力学特性評価), 第47回日本生物物理学会年会, ppS192 (第47回日本生物物理学会年会, 徳島市, 2008.10.30-11.01)
- ㉗ 宮岡敦史, 平塚伸一郎, 水谷祐輔, 土屋雅博, 河原剛一, 岡嶋孝治, 細胞周期を同調させた生細胞のAFMレオロジー測定, 第70回 応用物理学学会学術講演会 (第70回 応用物理学学会学術講演会, 富山, 2009. 9. 8-11)

〔図書〕 (計1件)

岡嶋孝治, 実践編 プローブ顕微鏡の使い方 第2章 試料の作り方 2.5 バイオ試料の扱い, 走査プローブ顕微鏡-正しい実験とデータ解析のために必要なこと-(実験物理科学シリーズ 6) (2009.03)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 単一細胞の力学特性の計測方法および計測装置

発明者: 岡嶋孝治, 蔡萍根, 水谷祐輔, 土屋雅博

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-184403

出願年月日: (2011.8.26)

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://labs.ist.hokudai.ac.jp/cell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡嶋 孝治 (OKAJIMA TAKAHARU)
北海道大学・情報科学研究科・准教授
研究者番号：70280998

(2) 研究分担者

河原 剛一 (KAWAHARA KOICHI)
北海道大学・情報科学研究科・特任教授
研究者番号：20125397

(3) 連携研究者

()

研究者番号：