

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01821

研究課題名（和文）高速イオン伝導顕微鏡による極めて柔らかい細胞力学構造の時空間動態定量化技術の開発

研究課題名（英文）Developments of measuring nanomechanical dynamics of a fragile cell surface by scanning ion conductance microscopy

研究代表者

渡邊 信嗣（Shinji, Watanabe）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：70455864

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、走査型イオン伝導顕微鏡（SICM）により細胞表層のナノ形状および弾性率を時空間マッピングする技術を開発した。系統的に悪性度を変化させた8種類のがん細胞に対して開発した技術を適応し、表面粗さ、易動度、弾性率といったSICM計測データを用いて、8種類のがん細胞がよく分類できることを示した。さらに、3次元培養したオルガノイドを長時間にわたってSICMで計測できる系を構築し、オルガノイド中の単一細胞の形状および弾性率の時間変化を追跡することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存技術では計測困難である生きた細胞表層のナノ形状や力学動態を長時間にわたって低侵襲かつ高時空間分解能で可視化する技術をSICMを用いて開発した。2次元培養した単一細胞に対する計測だけでなく3次元培養したオルガノイドといった背の高い組織様の多細胞もSICMにより長時間計測可能な測定系を構築した。SICMで計測した細胞表層ナノ形状・ナノ力学動態といった細胞表層情報より、細胞の生理状態を分類する手段の可能性を見出した。走査型プローブ顕微鏡では、通常アクセスが困難な生きた細胞の基底面のナノ構造・力学動態を可視化することも成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a technique for simultaneously measuring the topography and elasticity of cell surfaces with high spatiotemporal resolution using Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM). We applied this technique to eight types of cancer cells with systematically varying malignancies. Our findings indicate that SICM data, such as surface roughness, motility, and elasticity, can effectively classify these eight types of cancer cells. Furthermore, we established a system for long-term SICM measurement of 3D-cultured organoids, successfully tracking the temporal changes in shape and elasticity of individual cells within the organoids.

研究分野：ナノサイエンス

キーワード：細胞計測 走査型プローブ顕微鏡 走査型イオン伝導顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する細胞には外部からの力学的な刺激を感じる機能が備わっており、自身の形態や構造を変化させたり、増殖能や運動性といった生理機能すら調整していることが知られている。こういった生体が発現する力学的な挙動や力学的な刺激に対する細胞の応答を、物理的な計測を通じて理解し、細胞機能メカニズムの解明を目指すメカノバイオロジーがここ10年ほどで急速に発展し、基礎生物学研究のみならず医療・デバイスといった応用研究に至るまで大きな影響を与えている。今や、細胞の力学応答は生命科学における普遍現象として広く認識され、解明されるべき最重要課題の一つに位置づけられるようになった。このような背景のもと、細胞のどこに、こういった種類の、どの程度の量の力が生じて、それらがどのように変動するのか、といった細胞の力学挙動を精密に定量化する技術が求められている。現在、このような力を可視化し定量化する計測技術で中心的な役割を果たしているのが原子間力顕微鏡 (AFM) である。AFM は微小な針で細胞表面を押すことで針に応答する力が直接得られるという計測原理で、空間分解能に優れた様々な細胞サブ構造がナノ解像度で可視化されるため、AFM により多くの重要な力学特性の知見が得られてきた。一方で、針と細胞との物理接触が必須であり、脆弱な細胞を破壊してしまうので長時間にわたる計測が困難である。加えて、相対的な力分解能自体は非常に高いが、絶対値が数 10 Pa 程度以下の非常に小さい応力の計測がそもそも難しい。これら従来計測手法の課題により、非常に柔らかい細胞ナノ構造が検出されずに見落とされ、脆弱な細胞種に対する力学応答の理解も遅れている。したがって、極めて弱い力の細胞力学特性を計測する技術の開発は、メカノバイオロジーにおける新しい領域の開拓に直結するといえる。

2. 研究の目的

本研究では、代表者が有する高速イオン伝導顕微鏡 (SICM) 技術を進展させ、従来不可能だった細胞界面のナノスケールの動的物理プロセスの可視化に挑む。また、細胞表面のナノ形状や極めて弱い力学機械特性の動態データから細胞の状態を分類可能な特徴を探求し、生細胞界面のナノ計測技術を世界に先駆けて開拓する。

3. 研究の方法

3.1 SICM の概要

SICM はガラスナノピペットを探針として用いる走査型プローブ顕微鏡の一種である。本研究では、ナノピペットを生理塩濃度の電解液で充填し、同じく生理溶液環境にある細胞表面にナノピペットを近接させて細胞表面の情報計測する。ナノピペット内と試料空間のバス溶液に配置した銀/塩化銀電極間にバイアス電圧を印加することで、ナノピペット先端開口を通るイオン電流が得られる。定バイアスの条件では、このイオン電流は、ナノピペット先端と試料表面がナノピペット開口径程度の距離程度に近接すると、1%程度の変化が生じるため、イオン電流変化によって、試料表面位置を検出できる。

3.2 SICM を用いた弾性率計測手法の拡張

本研究で開発した SICM による弾性率計測の原理の概要を述べる。ナノピペットが試料表面に近づくと、試料表面には、ナノピペット先端から生じる流体的圧力がかかる。細胞試料では、表面は柔らかい細胞膜であるため、この圧力によって細胞膜は局所的に変形する。ピペット先端に生じる圧力は、バス溶液表面とナノピペットに充填した電解液の表面との高さの差によって変化する。本研究でのセットアップでは、ピペット先端に流れがなければ、 $p_0 = 200$ Pa 程度の圧力差が生じている状況である。実際は、ピペット先端に生じる微小な流れによって、ピペット先端では数 10 Pa 程度の非常に小さい流体力学的な圧力が生じていると見積もられる。細胞表面の弾性率の違いによって変形の程度は変化する結果、ナノピペットの垂直位置の変化に対するイオン電流の変化の程度に違いが生じる。このイオン電流 ピペット Z 位置をプロットしたものを IZ 曲線とここでは呼ぶ。イオン電流値が、ピペットを近接させる前の電流値の 99-98% 程度に変化する領域における IZ 曲線の傾きから、細胞表面の弾性率が得られる。IZ 曲線の傾きを弾性率に変換するための変換係数は、細胞表面を線形弾性体とみなして、ストークス方程式に基づく有限要素法 (FEM) シミュレーションによって計算される。ナノピペットの先端形状が変換係数の重要なファクタとなるため、本研究では、ナノピペットの先端形状は透過型電子顕微鏡 (TEM) で計測し、その影響を FEM シミュレーションに反映している。本研究では、1 次 Mooney-Rivlin solid の超弾性材料モデルを用いて、非常に柔らかく大きく変形する表面に対する IZ 曲線から得られる弾性率の変換係数を FEM シミュレーションにより計算した。このモデルでは、ひずみエネルギー密度関数 W は以下のように構成される。

$$W = C_{01}(\bar{I}_2 - 3) + C_{10}(\bar{I}_1 - 3) + D_1^{-1}(J - 1)^2$$

ここで、 C_{01} , C_{10} 歪み応答、 D_1 は体積応答に関する材料依存性の定数、 \bar{I}_1 , \bar{I}_2 それぞれは第1第2不変量、 J は変形勾配のヤコビアンである。微小ひずみの弾性体近似の極限では、体積弾性係数 κ 、せん断弾性係数 μ は以下の関係がある。

$$\kappa = 2D_1^{-1}, \mu = 2(C_{01} + C_{10}) = E(1 + \nu)^{-1}$$

ここで、 E は試料の弾性率、 ν は試料のポアソン比である。本研究で扱った細胞は非圧縮性 $\nu = 0.49$ 、で、歪み応答の比 $C_{10}/C_{01} = 0.2$ として取り扱った。実施したFEMシミュレーションからさまざまな弾性率 E に対するIZ曲線の傾き S を計算し、これらに関係づける表式を以下のように推定した。

$$S_{\text{SUB}}/S - 1 = A(E/p_0)^\beta \quad (1)$$

ここで、 S_{SUB} は変形しない表面に対するIZ曲線の傾きで、細胞がのっている基板に対する測定から得られる。 A はナノピペット先端形状(内径、外径、円錐角、ガラス肉厚など)に依存する形状因子で、上述したようにTEMによるナノピペット先端形状を計測して実験的に決定する。上記の表式は、過去の研究において報告があるが、これまで指数 β の値は A にのみ依存し、 E に対する依存性はないとされていた。しかし、本研究において超弾性体モデルによって非常に柔らかい試料の変形の領域を取り扱った結果、指数 β の E 依存性を見出した。これは、本研究のモデルを使用することで、SICMの弾性率計測の範囲が拡張できることを意味する。

次に、SICMによる弾性率計測の時間分解能について考察する。FEMシミュレーションから得られたナノピペット先端付近の流速は、本研究のセットアップでは最大で650 nm/ms程度である。ナノピペットの落下近接速度は本研究のセットアップでは100 nm/msであり、この値は、ナノピペット先端付近の流れよりも小さく、時間非依存条件下(非平衡定常状態)で計算したFEMシミュレーションの結果を適用することができた。逆に、大雑把に言えば、ナノピペットの落下近接速度が650 nm/msを超える場合は、式(1)により得られる結果を適応できないと思われる。これがSICMの弾性率計測の時間分解能に制限を与える。ただし、ナノピペット先端の流速は p_0 に依存する。また、 p_0 が一定でも、先端開口径が小さくなれば流速は増加する、ナノピペット形状に依存する量になっている。

以下、研究成果に関する大部分の具体的な内容の公表を差し控える。

4. 研究成果

本研究では、走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)により細胞表層のナノ形状および弾性率を時空間マッピングする技術を開発した。系統的に悪性度を変化させた8種類のがん細胞に対して開発した技術を適応し、表面粗さ、易動度、弾性率といったSICM計測データを用いて、8種類のがん細胞がよく分類できることを示した。さらに、3次元培養したオルガノイドを長時間にわたってSICMで計測できる系を構築し、オルガノイド中の単一細胞の形状および弾性率の時間変化を追跡することにも成功した。

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 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yurtsever Ayhan, Sun Linhao, Hirata Kaito, Fukuma Takeshi, Rath Siddharth, Zareie Hadi, Watanabe Shinji, Sarikaya Mehmet	4. 巻 17 (8)
2. 論文標題 Molecular Scale Structure and Kinetics of Layer-by-Layer Peptide Self-Organization at Atomically Flat Solid Surfaces	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 7311 ~ 7325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.2c10673	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 Wang Dong, Nguyen Han Gia, Nakayama Mizuho, Oshima Hiroko, Sun Linhao, Oshima Masanobu, Watanabe Shinji	4. 巻 19
2. 論文標題 Mapping Nanomechanical Properties of Basal Surfaces in Metastatic Intestinal 3D Living Organoids with High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 2206213 ~ 2206213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202206213	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 Kenry, Sun Linhao, Yeo Trifanny, Middha Eshu, Gao Yuji, Lim Chwee Teck, Watanabe Shinji, Liu Bin	4. 巻 18
2. 論文標題 In Situ Visualization of Dynamic Cellular Effects of Phospholipid Nanoparticles via High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 2203285 ~ 2203285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202203285	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 該当する
1. 著者名 Wang Dong, Sun Linhao, Okuda Satoru, Yamamoto Daisuke, Nakayama Mizuho, Oshima Hiroko, Saito Hideyuki, Kouyama Yuta, Mimori Koshi, Ando Toshio, Watanabe Shinji, Oshima Masanobu	4. 巻 280
2. 論文標題 Nano-scale physical properties characteristic to metastatic intestinal cancer cells identified by high-speed scanning ion conductance microscope	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 121256 ~ 121256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2021.121256	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 該当する

1. 著者名 Zhou Yuanshu, Sun Linhao, Watanabe Shinji, Ando Toshio	4. 巻 94
2. 論文標題 Recent Advances in the Glass Pipet: from Fundament to Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 324 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c04462	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

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 亀井 翔天, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 高速SICMのための超低雑音広帯域トランスインピーダンスアンプの開発
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮下 和己, 金田 駿哉, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 モデル誤差補償器による高速制御のためのスキャナ制御の検討
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nguyen Gia Han, Linhao Sun, Shinya Kumagai, Shinji Watanabe
2. 発表標題 Investigation of plasma effect on cell surface morphology using scanning probe microscopy
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊信嗣
2. 発表標題 高速走査型イオン伝導顕微鏡の開発とその応用
3. 学会等名 日本顕微鏡学会バイオSPM研究会2022（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊信嗣
2. 発表標題 高速走査型イオン伝導顕微鏡による 生細胞表層ナノ力学動態の可視化
3. 学会等名 ナノ科学シンポジウム2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊信嗣
2. 発表標題 SICMを用いたがん細胞の評価
3. 学会等名 ナノプロブテクノロジー第167委員会、第104回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Linhao Sun, Dong Wang, Satoru Okuda, Han G. Ngyue, Daisuke Yamamoto, Mizuho Nakayama, Hiroko Oshima, Hideyuki Saito, Yuta Kouyama, Koshi Mimori, Toshio Ando, Shinji Watanabe, Masanobu Oshima
2. 発表標題 High-speed ion conductance microscope to reveal the nanoscale physical properties of metastatic intestinal cancer cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Linhao Sun, Dong Wang, Satoru Okuda, Han G. Ngyue, Daisuke Yamamoto, Mizuho Nakayama, Hiroko Oshima, Hideyuki Saito, Yuta Kouyama, Koshi Mimori, Toshio Ando, Shinji Watanabe, Masanobu Oshima
2. 発表標題 High-speed ion conductance microscope to reveal the nanoscale physical properties of metastatic intestinal cancer cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen Han Gia, Sun Linhao, Kitazaki Tatsuya, Kumagai Shinya, Watanabe Shinji
2. 発表標題 Nanoscale visualization of cell membrane exposed to non-thermal atmospheric pressure plasma
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen Gia Han, Linhao Sun, Tatsuya Kitazaki, Shinya Kumagai, Shinji Watanabe
2. 発表標題 Nanoscale imaging of plasma-exposed cell membrane using scanning probe microscopy
3. 学会等名 The 83rd JSAP Autumn Meeting 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰田 貴哉, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 特徴空間フィルタによる走査型プローブ顕微鏡計測の信号雑音比の改善
3. 学会等名 2022年第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金田 駿哉, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 帯域増幅機構を用いた逆伝達補償法によるスキャナ応答の改善
3. 学会等名 2022年第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田岡 東, 菊池 洋輔, Sun Linhao, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 高速走査プローブ顕微鏡による生きた細菌表層の局所物性イメージング
3. 学会等名 第18回大腸菌研究会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 信嗣, Sun Linhao, 菊池 洋輔, 田岡 東
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡による生きた細菌表層のナノスケール物性およびその動態の観察
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen Gia Han, Linhao Sun, Tatsuya Kitazaki, Shinya Kumagai, Shinji Watanabe
2. 発表標題 Elucidation of cell surface topography with plasma irradiation by scanning probe microscopy
3. 学会等名 2022年第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Watanabe
2. 発表標題 Quantitative measurements of the spatial profile of elastic modulus of living cell surface and their dynamics
3. 学会等名 Phys2BioMed winter workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiya Tatsuda, Shinji Watanabe
2. 発表標題 Real-time noise filtering utilized feature space in scanning ion conductance microscopy measurements
3. 学会等名 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunya Kaneda, Shinji Watanabe
2. 発表標題 Improvement in Dynamic Motion in a Hopping-Mode Scanning Ion Conductance Microscopy by a Feedforward- Multiple-Pulse Sequence
3. 学会等名 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riku Yajima, Shinji Watanabe
2. 発表標題 Fine Control of Tip Geometries by Asymmetric Wet Etching for Scanning Ion Conductance Microscopy
3. 学会等名 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金田 駿哉, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 複数遅延半波制御による高速スキャン制御の開発
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辰田 貴哉, 渡邊 信嗣
2. 発表標題 走査型プローブ顕微鏡への機械学習を用いた信号処理アルゴリズムの導入
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢島 陸, 渡辺 信嗣
2. 発表標題 水酸化カリウムウェットエッチングによるSiCM探針の性能改善
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ガラスピベット及びその製造方法	発明者 矢島陸, 渡邊信嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-086767	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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			
米国	Harvard University			
シンガポール	National University of Singapore			