

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18886

研究課題名（和文）原子間力顕微鏡を用いた発生胚メカニクスの包括的マッピング計測技術の開発

研究課題名（英文）Comprehensive mechanical mapping of developing embryo by atomic force microscopy

研究代表者

岡嶋 孝治（Okajima, Takaharu）

北海道大学・情報科学研究院・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）：原子間力顕微鏡（AFM）を用いて発生胚の弾性率と張力を分離する技術を開発することを目的とした。ボルツマンの重畳原理に基づく接触理論を考慮して、非線形力応答曲線を解析することにより胚細胞の弾性と粘性の分離する技術を構築した。本手法を用いて、初期発生胚、および神経胚のレオロジー特性の時空間挙動の計測に適用した。初期胚の動物極側と植物極側の細胞分裂期の粘弾性挙動（レオロジー）は類似の挙動をすることが分かった。発生胚系の弾性率と張力の測定を分離して決定する手法を利用し、神経胚形成過程における弾性率と張力の時空間挙動を評価することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生胚の形成メカニズムを理解することは、基礎生物学的および再生医工学的に重要である。発生胚の時空間的な構造変化は、力学的な相互作用により制御されているが、その1細胞レベルの挙動は計測法の欠如により、未知な点が多い。本研究では、胚形成過程の細胞の弾性率や張力、および粘弾性（レオロジー）を1細胞レベルで計測可能な原子間力顕微鏡（AFM）技術を開発した。そして、初期胚および神経胚のメカニクスの計測に成功した。したがって、本研究で開発したAFMは、今後の胚形成過程の研究において極めて有用な手法を提案すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I developed an atomic force microscopy technique allowing elastic modulus and tension of developing embryos. The AFM relied on the measurement of nonlinear force curves, which were analyzed with Boltzmann's superposition principle. Using the AFM technique, I investigated the spatiotemporal dynamics of the mechanical properties of embryonic cells in the early cleavage and neurula stages. I found that the rheological properties of cells during cell division were similar in the animal and vegetal hemispheres. Furthermore, I estimated embryonic cells' elastic modulus and tension during the neurula stage.

研究分野：生物物理学

キーワード：発生胚 原子間力顕微鏡 メカニクス

1. 研究開始当初の背景

1 細胞の弾性や粘性は、細胞運動、細胞分裂等の様々な細胞機能に関係している。生物個体を形成する細胞集団においても、細胞の力学物性が形態形成に重要な役割をしていると考えられている。しかし、細胞集団の力学計測手法は発展途上にあり、細胞集団の弾性率は不明な点が多い。申請者は、広範囲測定が可能な AFM に動的弾性率計測技術を導入することにより、発生胚の弾性率と張力とを分離する技術を構築できるという着想に至った。

2. 研究の目的

原子間力顕微鏡 (AFM) は、生理的条件下で細胞や組織の表面構造や力学特性を高い時間空間分解能で計測することができる。1 細胞の粘弾性計測技術が確立しつつある。一方で、組織や発生胚のような多細胞系の弾性と粘性を区別する技術は発展途上である。また、多細胞系の形態形成は、個々の細胞自体の弾性率だけでなく、細胞間の張力が重要な役割をしているが、細胞の弾性率と張力を分離する技術は確立していない。本研究では、AFM を用いて発生胚の弾性・粘性を定量化し、弾性率と張力を分離する技術を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

正立型光学顕微鏡をベースにした広範囲走査が可能な原子間力顕微鏡 (AFM) を構築し、それを拡張することで、短期間で研究目的の達成を目指した。この AFM は、対物レンズを通じてレーザー光をカンチレバー背面に照射し、その反射光をフォトディテクターで検出する光てこ法を採用している。サンプルの全体の状態は、光学顕微鏡観察により行うことで、発生過程の AFM 測定を安定して行うことができる。本研究では、ピエゾスキャナー制御により広範囲のフォースマッピング測定を行い、その高速化を行った。また、その他の新規マッピング方法を提案した。発生胚の表面の凹凸は大きいため、通常のカンチレバー探針では、広範囲をマッピングすることは難しい。そこで、探針に、数マイクロメートルのガラスビーズを直列に複数個装着した、マルチコロイドカンチレバーを用いた。これにより、初期発生胚の卵割期から原腸陥入期、そして神経胚期のマッピング測定を行うことが可能になった。そして、発生胚の力学特性を 1 細胞レベルで解析した。

4. 研究成果

ボルツマンの重畳原理に基づく接触理論を基に、非線形力応答曲線を解析する手法を構築した。非線形力応答曲線を取得する際の変化速度を変化させて、その計測値の定量性を評価した結果、サンプルの粘弾性を一意に決定できることを示した。さらに、多細胞系として上皮細胞ドームを利用して、弾性率と張力の測定を分離して決定する手法を提案した。本手法で解析した結果は、先行研究の数値計算結果とも良い一致をしたことから、半定量的な解析が可能であることが分かった。次に、上記 AFM 技術を、初期発生胚、および神経胚の粘弾性挙動 (レオロジー) の時空間挙動の計測に適用した。1 細胞のレオロジーは、バネダッシュポット要素に代表される線形粘弾性モデルとスケールフリーのガラスレオロジーモデルに大別される。多細胞系のレオロジーがどのようなレオロジーモデルで表現できるかは未明な点も多く、さらに発生胚のレオロジーモデルは不明であった。本実験の結果、初期発生胚の細胞の粘弾性 (レオロジー) 特性は、べき指数関数的な挙動を示すことが分かった。また、初期胚の動物極側と植物極側において、細胞分裂期のレオロジーは類似の挙動を示すことが分かった。また、植物極側と動物極側において、レオロジー変数の相関性は異なる挙動を示すことが分かった。さらに、神経胚形成過程における弾性率と張力の時空間挙動を評価した。これらの研究の結果、1 細胞レベルで、細胞の力学特性の変化を追跡できることが分かった。従来の発生胚の力学測定では、発生過程の力学特性の変化を追跡することはほとんど例がなく、さらに 1 細胞レベルの計測は本申請者の AFM 計測以外にない。

組織形成メカニズムを理解することは、基礎生物学的に重要である。また、個々の細胞がどのような時空間挙動で分裂し、また分化し、それが力学特性と関係しているかを理解することは、再生医工学においても基本的に重要である。特に発生胚形成の時空間的な構造変化は、力学的な相互作用により制御されているが、その 1 細胞レベルの挙動は計測法の欠如により、未知な点が多い。本研究では、胚形成過程の細胞の弾性率や張力、および粘弾性 (レオロジー) を 1 細胞レベルで計測可能な原子間力顕微鏡 (AFM) 技術を開発した。そして、初期胚および神経胚のメカニクス計測に成功した。したがって、本研究で開発した AFM は、

今後の胚形成過程の研究において極めて有用な手法を提案すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 T. Okajima
2. 発表標題 Nanomechanics of single cells and tissues revealed by atomic force microscopy
3. 学会等名 Pacifichem 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Okajima
2. 発表標題 Measuring mechanical properties of developing embryo with AFM
3. 学会等名 MRS Fall meeting 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 発生胚のAFM計測：現状と課題
3. 学会等名 第17回バイオオプティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 AFMによる受精卵の発生過程の力学計測
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Tsuboyama, M. Yokobori, T. Matsubo, Y. Fujii and T. Okajima
2. 発表標題 Stress relaxation behavior of developing embryo measured by atomic force microscopy
3. 学会等名 9th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Shigemura, K.K. Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka and T. Okajima
2. 発表標題 Quantifying mechanical property of epithelial cell dome by atomic force microscopy (29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29))
3. 学会等名 9th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Nakada and T. Okajima
2. 発表標題 A numerical simulation of stress relaxation atomic force microscopy
3. 学会等名 9th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪山洋介、松尾智大、岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡によるホヤ神経期胚の力学マッピング
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂村研太、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上皮ドームの力学解析
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾智大、坪山洋介、横堀 恵美、藤井 裕紀、岡嶋 孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡の往復フォースカーブを用いた初期発生胚のレオロジーマッピング
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪山洋介、横堀恵美、松尾智大、藤井裕紀、岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡の応力緩和測定による初期発生胚レオロジーの定量化
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 松尾智大、藤井裕紀、岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡の往復フォースカーブを用いた初期発生胚のレオロジー解析
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 T. Okajima
2. 発表標題 Mapping mechanical properties of single cells during embryogenesis using atomic force microscopy
3. 学会等名 AFM BioMED conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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発生胚の力学動態の計測
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 発生胚表面のメカニクス：原子間力顕微鏡測定
3. 学会等名 日本膜学会の第44回年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡嶋孝治
2. 発表標題 多細胞メカニクスの時空間マッピング測定
3. 学会等名 ナノプロブテクノロジー第167委員会 第103回研究 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪山洋介、宮田悠生、岡嶋孝治
2. 発表標題 原子間力顕微鏡による神経管閉鎖中のホヤ胚の1細胞力学特性の測定
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 小野実央, 小川美優, 永野真堯, 岡嶋孝治
2. 発表標題 単層構造・3D構造を有する上皮細胞の走電性の観察
3. 学会等名 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 垣内琢規, 土生飛翔, 岡嶋孝治
2. 発表標題 パルスフォース原子間力顕微鏡による上皮細胞シートの力学特性の測定
3. 学会等名 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 K. Shigemura, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka and T. Okajima
2. 発表標題 Quantifying tension and elastic modulus of epithelial cells in 3D dome by atomic force microscopy
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Nakada, Y. Tsuboyama, and T. Okajima
2. 発表標題 Simulating stress relaxation curves of soft materials obtained in atomic force microscopy experiments
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress (IVC-22) (国際学会)
4. 発表年 2022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