

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13393

研究課題名(和文) 多重周波数フォースモジュレーション顕微鏡の開発：細胞レオロジー変数のイメージング

研究課題名(英文) Multi-frequency force modulation AFM: Mapping single cell rheological parameters

研究代表者

岡嶋 孝治 (OKAJIMA, TAKAHARU)

北海道大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：70280998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多重周波数フォースモジュレーション法を開発し、動物細胞の定量レオロジーマッピング技術の実現を目的とする。その結果、(1)周波数領域の細胞レオロジーのマッピングに成功した。そして、本手法も用いて、(2)細胞レオロジーと細胞骨格構造との関係、(2)正常細胞とがん細胞の力学診断、および(3)細胞レオロジーの外場依存性に関する研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed multi-frequency force modulation atomic force microscopy (AFM) which enable mapping rheological properties of living cells in their physiological conditions. The AFM method was applied to investigate (1) the relationship between cell rheology and cell cytoskeleton at the single cell level, (2) single cancer cell mechanical diagnostics, and (3) ensemble and temporal variations of single cell rheology.

研究分野：応用物理学

キーワード：原子間力顕微鏡 細胞レオロジー

1. 研究開始当初の背景

生細胞の力学特性は、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している。よって、細胞の力学計測は、細胞の生命現象を理解する基礎と言っても過言ではない。細胞は弾性と粘性とを併せ持つ粘弾性体であり、細胞力学量として細胞レオロジー（複素弾性率の周波数特性）の精密計測が不可欠である。しかし、既存技術の限界により、細胞レオロジーのイメージングは実現しておらず、細胞レオロジーの時空間特性は未知である。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 多重周波数フォースモジュレーション法を開発し、(2) 細胞レオロジーの定量マッピング技術の開発を目的とする。そして、(3) マイクロ加工技術を用いにより細胞骨格構造を制御した細胞レオロジー計測による細胞疾患の定量比較を行う。

3. 研究の方法

図1に、開発した多重周波数フォースモジュレーション AFM 法の模式図を示す。多数の周波数を重畳した信号を用いてカンチレバーを励振し、細胞からの応答を多重ロックインアンプを用いて分解することにより、短時間で細胞の複素弾性率の周波数特性を測定することができる。

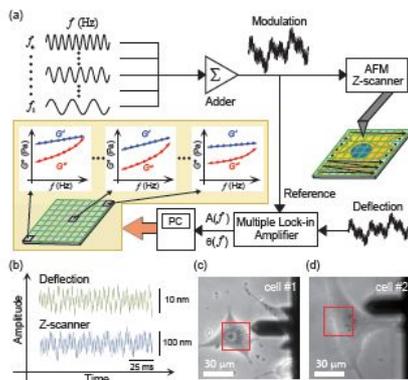


図1 多重周波数フォースモジュレーション法の模式図。

4. 研究成果

細胞の貯蔵弾性率 G' は、 f に対して、 $G' \sim G_0 f^{\alpha}$ で示され、高周波数領域側で、損失弾性率 G'' は、 $G'' \sim \eta f$ で表される。したがって、細胞の複素弾性率は、 G_0 、 α 、 η の3つのレオロジー変数で一意に決定できる。多重周波数フォースモジュレーション AFM 法によりレオロジー変数のマッピング測定結果を図2に示す。ここでは、2つの細胞 (cell #1 と cell #2 と定義する)。興味深いことに、3つのレオロジー変数のマッピング画像は大きく異なる

ことが分かった。特に、cell#1 のべき指数のマッピング画像は、細胞核構造と密接に関係していることが分かった。このことは、細胞レオロジー変数マッピング画像は、細胞内構造の情報を強く反映することを示唆する。

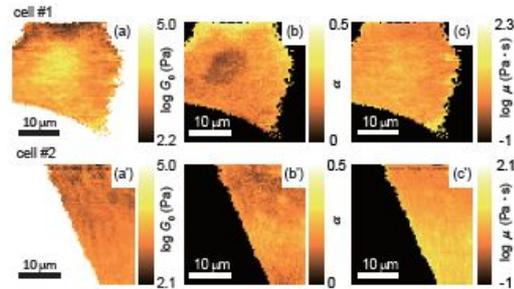


図2 2つの細胞(上段 cell#1、下段 cell#2)のレオロジー変数 (G_0 (左)、 α (中)、 A_0 (右))のマッピング画像

図3は、細胞内の局所平均した貯蔵弾性率と損失弾性率の周波数特性およびレオロジー変数の関係性を示している。本結果から、細胞内において、レオロジー変数の局所平均は異なり、細胞レオロジー特性は空間的に強く不均一であることが分かった。この結果から、高い分解能で細胞レオロジーマッピングを行うことが重要であることが分かった。

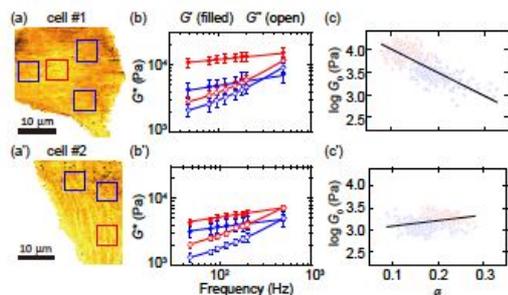


図3 細胞(左)のレオロジー特性のレオロジー局所平均。

周波数領域および時間領域における細胞レオロジー測定法の比較を行った(図4)。その結果、本研究で開発した多重周波数フォースモジュレーション法の精度は、時間領域測定法である応力緩和測定法と比べて高精度でレオロジー変数を計測できることが分かった。

また、多重周波数フォースモジュレーション法を用いてマイクロパターン上に播種した単一細胞のマッピング測定が可能であることが示した。次に、本手法を用いて、正常細胞とがん細胞の力学診断に関する実験を行った。その結果、細胞内の測定位置を制御し、レオロジー多変数による解析を行うことにより、正常細胞とがん細胞の識別能が向上することがわかった。さらに、細胞レオロジーの個性(標準偏差)が外力の印加時間に

強く依存することを発見した。

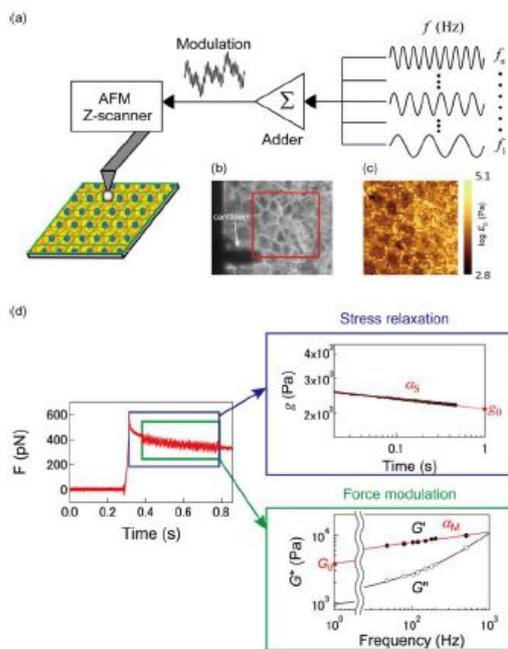


図4 (a)多重周波数フォースモジュレーション AFM 法と(b)そのフォースカーブから周波数特性と時間特性を解析する方法。

以上のように、多重周波数フォースモジュレーション法を開発し、動物細胞の周波数領域の細胞レオロジーの空間マッピングに初めて成功した。また、本手法を用いて、(1)細胞レオロジーと細胞骨格との関係、(2)がん細胞力学診断、および(3)細胞レオロジーの外場依存性、に関する研究を行った。本手法は、柔らかい動物細胞の力学計測の強力な手法になると期待される。

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2件)

- (1) R. Takahashi, T. Okajima*, Comparison between power-law rheological parameters of living cells in frequency and time domains measured by atomic force microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics* 55, 08NB22 (2016).
- (2) R. Takahashi, T. Okajima*, Mapping power-law rheology of living cells using multi-frequency force modulation atomic force microscopy, *Applied Physics Letters* 107, 173702 (2015).

〔学会発表〕(計8件)

- (1) M. Sawano*, K. Aoki, R. Tanaka, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K.

Sueoka, N.J. Cho, T. Okajima, Diagnosing single cell diseases by SPM (24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM24), Hawaii, Dec 14-16, 2016)

- (2) M. Sawano, R. Tanaka, R. Takahashi, K. Kurubayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima*, Mapping cell-to-cell variations in power-law rheology investigated by multifrequency force modulation atomic force microscopy (2016 ASCB Annual Meeting, San Francisco, Dec 3-7, 2016)
- (3) 澤野麻紀*, 田中良典、繁富(栗林)香織、スパギョ アグス、末岡和久、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による1細胞力学診断：細胞レオロジー特性のばらつき の定量評価 (第77回応用物理学会秋期学術講演会、2016年9月13日～16日、新潟)
- (4) 青木鉄馬*, 田中良昌、Nam-Joon Cho、岡嶋孝治、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡による細胞膜揺らぎの2次元マッピング測定 (第77回応用物理学会秋期学術講演会、2016年9月13日～16日、新潟)
- (5) Y. Fujii*, T. Okajima, Spatial mechanical heterogeneity in epithelial cell sheet : an atomic force microscopy study (Mechanobiology of Disease, Singapore, Sep. 27-30, 2016)
- (6) Takaharu Okajima, Mapping elastic modulus of single cells and tissue in stable state and morphogenesis by atomic force microscopy, 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop, Oct 3 - 6, 2016, Kanazawa, Japan
- (7) 岡嶋孝治、多重周波数フォースモジュレーション法：細胞レオロジーの定量マッピング (顕微鏡学会第72回学術講演会、原子間力顕微鏡の最前線：細胞生物学へ再挑戦、2016年6月14日～16日、仙台)

〔図書〕(計2件)

- (1) T. Okajima, Atomic Force Microscopy: Imaging and Rheology of Living Cells (Nano/Micro Science and Technology in Biorheology: Principles, Methods, and Applications Chapter 15 (387-414), Springer, 2015)
- (2) 岡嶋孝治、高橋亮輔, 原子間力顕微鏡を用いた細胞の力学特性計測 (第1章・第3節)、細胞の特性計測・操作と応用 (組織工学ライブラリ - マイクロロボティクスとバイオの融合 - 1) (コロナ社) (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：原子間力顕微鏡による単一細胞の力学的診断方法と診断装置
発明者：岡嶋孝治、高橋亮輔
権利者：岡嶋孝治、高橋亮輔
種類：特許
番号：特願 2017-55414
出願年月日：2017年3月22日
国内外の別：国内

○取得状況（計 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

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・教授
研究者番号：70280998

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

末岡和久 (SUEOKA KAZUHISA)
北海道大学・情報科学研究科・教授
研究者番号：60250479