

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19367

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網羅解析法の開発

研究課題名(英文)High-throughput analysis of embryo mechanical properties 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・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):受精卵の胚形成のメカニズムの理解には、細胞の力学特性の測定が不可欠である。本研究では、初期発生胚の細胞力学計測が可能な原子間力顕微鏡(AFM)システムを開発した。最初に、初期胚の表面形状による弾性率値を補正する力学解析モデルを提案し、そのモデルの妥当性を実験的に示した。次に、細胞集団系として細胞単層の空間マッピング測定を行い、細胞力学特性が空間的に不均一構造で、長距離の相関を有することが分かった。そして、上記のAFMシステムを用いて、初期発生胚の静的弾性率(ヤング率)および粘性の広範囲測定に成功した。本研究により、様々な発生胚の力学特性の計測に応用できる新しいAFM技術が確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生胚の胚形成メカニズムの理解は基礎生物学および再生医療において極めて重要である。近年、胚形成には細胞の力学特性が密接に関係していることが指摘されているが、胚形成過程における細胞力学特性を追跡する方法が皆無のため、胚発生力学メカニズムは不明な点が多い、本研究では、原子間力顕微鏡を用いて、多数の発生胚の力学特性の計測を行った。本技術は、様々な発生胚の力学メカニズムの理解に貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文): Measuring cell mechanical properties is important to understand the mechanism of not only single cells but also cell population systems such as developing embryo. In this study, I developed a new type of atomic force microscopy (AFM) that allows us to map embryo mechanical properties at the single cell level. I first proposed an AFM method for calibrating the elastic modulus of cells with a large tilt angle. Next, I measured the stiffness of cell monolayer as a cell population system and found that the stiffness has a large spatial correlation in cell monolayer. Furthermore, I succeeded to measure the apparent Young's modulus and cell viscosity of embryo during the developing stages and found that the cell stiffness is associated with actin filaments and myosin in cortical regions. Overall, the AFM developed in this study is useful for investigating cell rheological properties in various types of embryo at the subcellular spatial resolution.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞力学 発生胚 原子間力顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精卵の胚形成において、初期発生胚を構成する細胞の力学特性（メカニクス）が胚形成に重要な役割を果たしていると考えられている。細胞メカニクスの1つに細胞弾性率があるが、計測法の欠如により弾性率の測定は皆無であった。したがって、発生胚のような細胞集団の弾性率測定に特化した計測法の確立が強く望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、初期発生胚全領域の細胞力学計測が可能な原子間力顕微鏡（AFM）システムを開発することを目的とした。具体的には、発生胚のような細胞集団の力学特性を定量的に評価可能な解析手法を確立し、広範囲の発生胚のAFM力学計測を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1)基板の作製、(2)AFM装置、(3)細胞集団の力学特性の定量化法、(4)細胞集団の力学測定、(5)発生胚の力学測定、を行った。以下にその内容を報告する。

4. 研究成果

(1) 基板の作製

フォトリソ材料を用いたマイクロ加工基板を開発した。SUレジストを用いてマイクロ井戸型構造を構築し、底面はガラス基板とした。実験の結果、マイクロ井戸内で発生胚の成長は起こることが分かった。また、サンプルによっては、SUレジストに発生胚が吸着して異常発生が起こることがあることが分かった。現在、SUレジストの表面処理を検討している。

(2) AFM装置

正立型光学顕微鏡と広範囲スキャナーを用いてAFMを自作した。本AFMシステムを用いることにより、細胞サンプル上部から光学顕微鏡観察とAFM測定が可能になる。従って、発生胚のような細胞集団の計測に適している。

(3) 細胞集団の力学特性の定量化法

AFMを用いて初期胚の力学測定をする場合、サンプルの表面形状に弾性率値が影響することが分かった。この問題を解決するために、表面形状に依存した力学解析モデルを提案し、そのモデルの妥当性を実験的に示した。これにより、初期発生胚の弾性率の絶対値を評価することが可能になった。

(4) 細胞集団の力学測定

細胞集団系として細胞単層を用いてAFM力学マッピング測定を行った。その結果、細胞力学特性の不均一性の存在を明らかにした。この細胞力学特性の不均一性は、隣接した細胞間相互作用に起因しており、隣接細胞間を超える相関距離を有すること、そして、この細胞力学相関距離は、アクチン線維構造や細胞間接着タンパク質構造と密接に関係していることが分かった。

(5) 発生胚の力学測定

初期発生胚の静的弾性率（ヤング率）の広範囲測定に成功し、動物極と植物極の力学特性の違いを詳細に明らかにした。1細胞期から112細胞期までの一連の細胞期の静的弾性率を1細胞レベルで追跡した。そして、先行研究の細胞骨格構造との関係を調べた。その結果、静的弾性率の時間発展の再現性の存在を詳細に確認した。そして、先行研究との比較から、静的弾性率の変化が細胞骨格構造の変化と密接に関係していることが示唆された。特に、アクチン線維、微小管、ミオシンと弾性率との関係を調べた。その結果、初期発生過程における発生胚の弾性率変化はアクチン線維とミオシン（アクトミオシンの形成）に密接に関係していることが分かった。

細胞は弾性と粘性とを合わせ持つ粘弾性体である。初期発生胚においても粘性のダイナミクスを理解することは重要であるが、その計測法は確立していない。また、1細胞レベルで発生胚の粘性を計測した研究は皆無である。そこで、本研究で開発したAFM装置を改良して発生胚の粘性を測定するシステムを開発した。本改良AFM装置は、発生胚のような大きなサンプルの応力緩和特性を1細胞レベルの空間分解能で計測することができる。実際、卵割過程の初期発生胚の応力緩和特性のマッピング測定に成功し、卵割過程において、弾性だけでなく粘性も顕著に変化していることを見つけた。

このように本研究において、生きた発生胚の粘弾性の時空間分布を1細胞レベルで計測することに成功した。さらに、本研究では、弾性と粘性の力学量を定量化することにも成功した。従って、本研究により、様々な発生胚の力学特性の計測に応用できる新しいAFM技術が確立した。また、物理的および科学的な入力に対する力学応答を調べることも可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

- (1) Y. Fujii, Y. Ochi, M. Tsuchiya, M. Kajita, Y. Fujita, Y. Ishimoto, T. Okajima, Spontaneous spatial correlation of elastic modulus in jammed epithelial monolayers observed by AFM, Biophysical Journal 116, 1152-1158 (2019).
- (2) Y. Fujii, T. Okajima, Calibrating the Young's modulus of soft materials with surface tilt angle measured by atomic force microscopy, AIP Advances 9, 015028 (2019).

〔学会発表〕(計 5件)

- (3) Y. Fujii*, T. Okajima, Mapping cell stiffness of living embryo during the developmental process by atomic force microscopy (ACSIN-14&ICSPM26, 2018 年
- (4) 藤井裕紀*, 今井太一, 小泉航, 堀田耕司, 岡浩太郎, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による発生胚の弾性率のタイムラプス測定 (第79回応用物理学会秋季学術講演会, 2018 年
- (5) Y. Fujii, T. Imai, W. Koizumi, K. Hotta, K. Oka, and T. Okajima, Spatiotemporal change in cell stiffness during early embryogenesis investigated by atomic force microscopy, 62nd Annual Meeting Biophysical Society 2018 年
- (6) Y. Fujii and T. Okajima, Quantifying elastic modulus of soft samples with tilting angle by atomic force microscopy, 25th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy(国際学会) 2017 年
- (7) 藤井 裕紀, 今井 太一, 小泉 航, 堀田 耕司, 岡 浩太郎, 岡嶋 孝治, 初期胚発生過程における細胞弾性率と細胞骨格構造の時空間変動, 第55回日本生物物理学会大会 2017 年

〔図書〕(計 1件)

浅川雅, 岡嶋孝治, 大西洋, 走査型プローブ顕微鏡 (日本分析化学会編, 分析化学実技シリーズ機器分析編 15) 総ページ数: 107 ページ (2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年:
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。