

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01787

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡による1細胞診断技術の高速化

研究課題名(英文)High-speed single cell diagnosis 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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、接着状態のがん細胞の進行度を1細胞単位で定量、且つ高速に同定する新手法を開発した。細胞レオロジー計測の高速化技術とボルツマンの重畳原理に基づく細胞レオロジー解析法の基礎技術および概念を利用し、高速な1細胞レオロジー診断技術を開発した。また、がん細胞以外の疾患細胞や多細胞集団系への適用を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞を1細胞単位で診断する技術は、究極のがん早期発見技術と言っても過言ではない。近年、がん細胞の進行度と力学特性との関係性が指摘されている。本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、接着状態のがん細胞の進行度を1細胞単位で定量、且つ高速に同定する新手法を開発した。細胞レオロジー計測の高速化技術とボルツマンの重畳原理に基づく細胞レオロジー解析法の基礎技術および概念を利用し、高速な1細胞レオロジー診断技術を開発した。また、がん細胞以外の疾患細胞や多細胞集団系への適用を検討した。

研究成果の概要(英文)：Atomic force microscopy (AFM)-methods have been studied to quantify and rapidly identify the progression of adherent cancer cells at the single-cell level. The high-speed single-cell rheology diagnosis technique has been developed by using AFM-cell rheology analysis and the Boltzmann's superposition principle. We also investigated application to disease cells other than cancer cells and multicellular population systems.

研究分野：生物物理学

キーワード：原子間力顕微鏡 細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、体内で長期間にわたり徐々に蓄積し、がん遺伝子およびがん抑制遺伝子にいくつかの変異が少しずつ入ることによって発症すると考えられている。細胞の力学特性が、細胞疾患の進行度に依存して変化し、この細胞の力学特性の変化がマクロな症状として現れる。原子間力顕微鏡法 (atomic force microscopy, AFM) は、接着性細胞の力学特性を低侵襲で計測することができる計測技術である。また、その時間分解能はサブミリ秒からマイクロ秒レベルであり、空間分解能もサブマイクロメートルからナノスケールであり、AFMの精度は、他の力学計測技術と比べても極めて高い。本研究では、接着状態の細胞のレオロジー物性の細胞内空間分布を短時間で計測し、力学的に細胞診断を可能とするAFM技術を開発することを目的としている。

2. 研究の目的

本研究では、AFM技術を駆使して、接着状態における1細胞のレオロジー空間分布を測定でき、短時間で細胞診断を可能とする技術の開発を目的とした。1年目は、細胞レオロジー空間分布を計測可能なAFM技術を開発した。2年目は、前年度に開発した細胞レオロジー空間分布を計測可能なAFM技術を用いて、正常細胞と前がん細胞の力学特性の判別能を精密に評価した。3年目は、AFM技術を、がん細胞に加えて、他の細胞疾患へ適用可能性を調べた。さらに、AFM技術を、多細胞系の弾性率だけでなく、張力測定への適用可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

研究計画当初は、応力緩和測定やフォースモジュレーション測定のような時間周波数領域の計測方法を拡張することを考えていたが、研究の過程で、フォースカーブ測定から細胞のレオロジーを精密に評価できることが分かった。そのため、時間周波数領域の計測方法に加えて、フォースカーブに1細胞のべき指数レオロジー特性を用いた解析を施すことで、細胞レオロジー変数を決定する解析法を構築した。また、これを実現するために、多数のパターン細胞を測定可能な広範囲AFM装置を正立型光学顕微鏡に実装した。本AFMシステムは、光学顕微鏡像から、パターン化した1細胞の位置を同定し、その画像を解析することにより、自動的に個々の細胞のレオロジーを計測することが可能になる。これらの開発により、高速な1細胞力学診断が可能になる。

4. 研究成果

(1) 研究成果の概要

細胞弾性率と細胞形状がこれらの細胞の判定にどの程度有効であるかを調べた(図1)。その結果、AFMで計測した、細胞の弾性率および細胞形状の2つの計測データは、細胞診断に有効であることが分かった、また、異なる細胞内測定位置のデータを適切に組み合わせることにより判別能が有意に向上することが分かった(論文投稿中)。このような細胞診断は、AFMとマイクロパターン基板との併用により初めて達成できた。さらに、細胞力学計測をレオロジー物性へ展開することによる細胞診断能を評価した。その結果、細胞診断能が、細胞パターン形状にも強く依存することが分かった(論文投稿準備中)。さらに、本研究で開発したAFMシステムは、1細胞だけでなく多細胞系への適用できることが分かった。

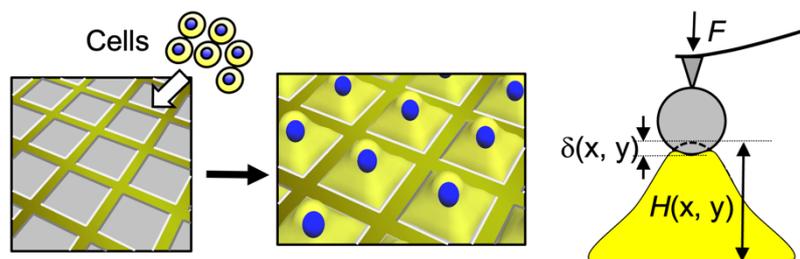


図1 AFMによる1細胞診断測定概念図。

AFMフォースモジュレーション法を駆使して、循環器系疾患細胞のレオロジー計測に適用可能であることを分かった(論文掲載)。これらの研究は、AFM細胞計測技術が、がん細胞だけでなく、様々な細胞疾患の診断に利用できる可能性を示唆した。さらに、AFM技術を用いて、3次元の構造を有する上皮単層細胞の力学計測への適用を試みた。パターン基板上に内腔構造を有する上皮細胞シートを用いて、上皮細胞シートに働く平均の張力の大きさは既知であったが、細胞レベルの張力分布は不明であったため、AFMマッピング測定を行った。

その結果、上皮細胞の弾性率と一緒に、上皮細胞間に働く張力を定量計測できることを明らかにした(論文掲載)。そして、その力学特性を1細胞レベルで明らかにすることができた。これらの研究は、本研究で用いたAFM技術は、単離した1細胞だけでなく、組織様の多細胞サンプルや組織の力学計測に適用できる可能性を示唆した。

本AFM計測技術は、がん患者から採取したがん周辺細胞の力学物性計測にも適用した。がん関連線維芽細胞の力学物性を評価した。がん関連線維芽細胞は、臓器の内側と外側の線維芽細胞

に変化が生じることが示唆されていたが、AFM 計測の結果、そのレオロジー特性に有意な違いが存在することが分かった（論文投稿準備中）。このような線維芽細胞間の違いは、細胞の細胞骨格構造や並進運動性にも見られることが分かった。

また、本 AFM 計測技術を、発生胚のような多細胞計測にも応用した。その結果、初期発生過程の細胞のレオロジーは、1 細胞レベルで変動することが分かった。その変動は、細胞分裂により生じるだけでなく、非細胞分裂時でも特定の細胞で生じることが分かった。そして、AFM により、そのレオロジー変化を、1 細胞内分解能で捉えることができた。1 細胞診断の高速化を行うために、AFM それ自身の高速化が不可欠であるが、同時にソフト的な高速化の可能性についても検討した。その実現に向けて、圧縮センシング法を用いて、短時間でマッピング測定データを得る方法を検討した（論文掲載）。

（2）結論

原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、1細胞診断技術の高速化に関する研究を行った。応力緩和測定やフォースモジュレーション測定のような時間周波数領域の計測方法に加えて、フォースカーブから細胞レオロジー変数を決定する解析法を構築した。多数のパターン細胞を測定可能な広範囲 AFM 装置を正立型光学顕微鏡と一体化し、光学顕微鏡像からパターン化した 1 細胞の位置を同定し、その画像を解析することにより、自動的に個々の細胞のレオロジーを計測することを可能にした。細胞の弾性率および細胞形状の 2 つの計測データを適切に組み合わせることにより判別能が有意に向上することが分かった。また、細胞力学計測をレオロジー物性へ展開することによる細胞診断能を評価した。その結果、細胞診断能が、細胞パターン形状にも強く依存することが分かった。そして、AFM 法が循環器系疾患細胞やがん患者から採取したがん周辺細胞の力学物性計測にも適用可能であることが分かった。これらの研究は、AFM 細胞計測技術が、がん細胞だけでなく、様々な細胞疾患の診断に利用できる可能性を示唆した。さらに、内腔構造を有する上皮細胞シートや発生胚を用いて、AFM 計測技術が多細胞系への適用できることが分かった。これらの結果は、多細胞系の高速診断技術への可能性を示唆した。今後は、ビデオレートでナノスケールのイメージングが可能な高速 AFM 技術のメカニクス計測への展開が課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuki Matsumoto, Hirofumi Tsuru, Hidehiro Suginobe, Jun Narita, Ryo Ishii, Masaki Hirose, Kazuhisa Hashimoto, Renjie Wang, Chika Yoshihara, Atsuko Ueyama, Ryosuke Tanaka, Keiichi Ozono, Takaharu Okajima, Hidekazu Ishida	4. 巻 17
2. 論文標題 Atomic force microscopy identifies the alteration of rheological properties of the cardiac fibroblasts in idiopathic restrictive cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0275296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0275296	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 Shinichi Katsuragi, Nao Tatsumi, Mizuki Matsumoto, Jun Narita, Ryo Ishii, Hidehiro Suginobe, Hirofumi Tsuru, Renjie Wang, Shigetoyo Kogaki, Ryosuke Tanaka, Keiichi Ozono, Takaharu Okajima, Hidekazu Ishida	4. 巻 12
2. 論文標題 Pharmacological alteration of cellular mechanical properties in pulmonary arterial smooth muscle cells of idiopathic pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardiology Research	6. 最初と最後の頁 231-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14740/cr1282	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 -

1. 著者名 OKAJIMA Takaharu, KURIBAYASHI-SHIGETOMI Kaori	4. 巻 18
2. 論文標題 Atomic force microscopy for investigating cell and tissue mechanics as heterogeneous and hierarchical materials	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 00339-00339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.23-00339	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 -

1. 著者名 Tsuru Hirofumi, Yoshihara Chika, Suginobe Hidehiro, Matsumoto Mizuki, Ishii Yoichiro, Narita Jun, Ishii Ryo, Wang Renjie, Ueyama Atsuko, Ueda Kazutoshi, Hirose Masaki, Hashimoto Kazuhisa, Nagano Hiroki, Tanaka Ryosuke, Okajima Takaharu, Ozono Keiichi, Ishida Hidekazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathogenic Roles of Cardiac Fibroblasts in Pediatric Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e029676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.123.029676	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 -

1. 著者名 Shigenura Kenta, Kuribayashi-Shigetomi Kaori, Tanaka Ryosuke, Yamasaki Haruka, Okajima Takaharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanical properties of epithelial cells in domes investigated using atomic force microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1245296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1245296	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 Miyata Yuki, Chan Feng-Yueh, Uchihashi Takayuki, OKAJIMA Takaharu	4. 巻 63
2. 論文標題 Compressed sensing reconstruction of cell mechanical images obtained from atomic force microscopy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 04SP46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ad34de	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 -

1. 著者名 Kotani Takahiro, Miyata Yuki, Tsuboyama Yosuke, Fujii Yuki, Okajima Takaharu	4. 巻 63
2. 論文標題 Local intracellular stiffening of ascidian embryo in cleavage developmental stage observed by atomic force microscopy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 04SP64 ~ 04SP64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ad3760	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 -

1. 著者名 M. Matsumoto, H. Tsuru, H. Sugimoto, J. Narita, R. Ishii, M. Hirose, K. Hashimoto, R. Wang, C. Yoshihara, A. Ueyama, R. Tanaka, K. Ozono, T. Okajima, H. Ishida	4. 巻 17
2. 論文標題 Atomic force microscopy identifies the alteration of rheological properties of the cardiac fibroblasts in idiopathic restrictive cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0275296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0275296	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

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回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野実央, 小川美優, 永野真亮, 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

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, Experimental and Computational Analysis of the Nano-Bio Interface for Sustainable Nanotechnology (招待講演) (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
3. 学会等名 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29)
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 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29)
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 Mataka Nagano, Miyu Ogawa, Yuki Fujii, Takaharu Okajima
2. 発表標題 Observations of structural change in epithelial dome under constant electric field
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 山崎遼、繁富（栗林）香織、岡嶋孝治
2. 発表標題 大腸がん微小環境における線維芽細胞の物理測定
3. 学会等名 日本顕微鏡学会・SPM研究会2023
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 H.Yamasaki, K.Kuribayashi-Shigetomi, M.Kojima, T.Okajima
2. 発表標題 Rheological properties of Submucosal and subperitoneal fibroblasts measured by atomic force microscopy
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Miyata, T. Kotani, Y. Tsuboyama, T. Matsuo, T. Okajima
2. 発表標題 Atomic force microscopy reveals a relationship between rheological properties of cells and cell fates in the early developmental stages
3. 学会等名 31st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Kotani, Y. Miyata, Y. Tsuboyama, T. Matsuo, M. Yokobori, Y. Fujii, T. Okajima
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of single-cell rheology in developing embryos observed by atomic force microscopy
3. 学会等名 31st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Okajima
2. 発表標題 Embryo mechanics probed by atomic force microscopy
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------