

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656055

研究課題名（和文）原子間力顕微鏡を用いたがん細胞力学診断技術の開発

研究課題名（英文）Development of cancer cell diagnostic technique using 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・准教授

研究者番号：70280998

研究成果の概要（和文）：

単一細胞のがん化を診断する技術は、究極のがん早期発見技術と言っても過言ではない。本研究では、低侵襲かつ精密な力学計測が可能な原子間力顕微鏡(AFM)技術を用いて、単一細胞の力学特性から、正常細胞とがん細胞とを区別する手法を開発することを目的とした。(1) AFM 細胞診断装置の開発、および(2)正常とがん細胞の力学特性を統計解析する技術の開発を行うことを目指した。23年度は、正立型光学顕微鏡を用いた細胞計測に特化した新しい AFM 装置の試作を行った。24年度は、様々ながん細胞に適用できる汎用の細胞マイクロパターン基板の開発を行った。本計測により、細胞弾性率、細胞流動性、およびニュートン粘性係数の細胞数分布を独立に評価できることが可能になった。また、正常細胞とがん細胞の細胞レオロジー変数の細胞数標準偏差は大きく異なり、周波数依存性をもつことが分かった。AFM 装置の自動化のための FPGA プログラム開発を行った。イオンコンダクタンス顕微鏡による細胞表面の動的計測に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Detecting cancer cells in their early stages is one of the most important techniques for diagnosing whether cells are normal or cancer. The atomic force microscopy (AFM) is a promising tool for measuring mechanical properties of cells at nano-scale. The goal of this project is to develop the cancer diagnostic tool, which is based on the measurements of cell mechanics using AFM. Micro-fabrication techniques were also employed to arrange and culture the cells on micro-patterned substrates. Two main studies in this project were (1) the development of an AFM apparatus and (2) the development of measuring and analyzing the statistical features of normal and cancer cells. We found that those micro-patterned substrates were useful for several types of normal and cancer cells. Moreover, the AFM measurements showed that the rheological properties of normal and cancer cells were largely different, i.e., the magnitude of cell modulus was lower and the number distribution of the modulus was sharper in the cancer cells. Interestingly, those exhibited a clear frequency-dependent. To control automatically the AFM system, the program based on FPGA was developed. We found that scanning ion conductance microscopy was useful for measuring the dynamic properties of cell membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物理学一般

キーワード：原子間力顕微鏡、細胞診断、細胞レオロジー、がん細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞の力学特性は、細胞運動や細胞分裂等の様々な細胞機能と密接に関係している。近年、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた細胞力学測定によって、正常細胞とがん細胞とを識別できることが指摘され (Cross et al. Nature Nanotech.(2007))、細胞力学が、がん細胞診断の重要なマーカーであると考えられるようになった。しかし、過去の AFM による細胞測定は、細胞の弾性のみに着目されており、測定される細胞数も 10 個程度と少数であった。最近、申請代表者等は、生細胞を配列・培養する技術を開発し、AFM を用いて従来よりも多数の細胞の粘弾性 (レオロジー) を精密に計測することに成功した (S. Hiratsuka et al., Ultramicroscopy(2009))。そして、本手法を拡張することにより、正常細胞とがん細胞の細胞レオロジー計測に基づく細胞診断装置を開発できるという着想に至った。

細胞のレオロジーは、アクチン繊維等の細胞骨格構造と密接に関係していると考えられている。本研究によって、細胞骨格構造が細胞のがん化とどのような関係しているかを、力学測定の立場から議論することが可能にあると考えられる。また、単一細胞レベルのがん化のダイナミクスや速度論といった、従来の細胞生物学的な細胞研究では決して得られない細胞疾患の物理的描像が得られる。

2. 研究の目的

単一細胞のがん化を診断する技術は、究極のがん早期発見技術と言っても過言ではない。原子間力顕微鏡 (AFM) は、低侵襲、かつ精密に細胞力学を計測することが可能である。本研究では、本計測法を発展させることにより、がん細胞の基礎研究分野や臨床試験に適した AFM 細胞診断装置を試作する。そして、正常とがん細胞の力学特性を統計解析する技術の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

AFM 細胞診断装置の開発として、細胞力学計測に特化した AFM 装置の試作を行う。カンチレバー用の光てこ光学系には、正立型光学顕微鏡の光軸を用いた。対物レンズによりカンチレバーにレーザー光を照射し、その反射光を同じ対物レンズで受光することにより、簡便かつ汎用性の高い AFM システムを開発する。また、種々の細胞サンプルの測定を可能にするために、広範囲・高精度で走査が可能な、スキャナーシステムの設計と作製を行う。次に、正常とがん細胞の力学特性を統計解析する技術の開発を行う。細胞アレイの設計と作製、および細胞サンプルの調製の要素技術を開発し、光学顕微鏡と一体化した AFM

細胞診断装置を構築する。開発した AFM 装置を用いて、「正常細胞と異常細胞の細胞診断計測」および「AFM 細胞診断装置の改良」を行う。モデル細胞系および生体内細胞系の正常細胞とがん細胞を用いた細胞レオロジー測定を行う。AFM 操作の煩雑さの根源である種々の操作と細胞力学診断の統計解析分析法を自動化し、容易に利用可能な細胞力学診断装置を開発する。

4. 研究成果

正立型光学顕微鏡 (ニコン社製) をベースとして、細胞力学計測に特化した AFM 装置を試作した。蛍光顕微鏡用の光路を用いて、カンチレバー背面へのレーザー集光、およびレーザー反射光の取得を行った。また、対物レンズには、パッチクランプ測定等に用いられる水浸対物レンズを用いることにより、気液界面のノイズの影響を軽減した。また、対物レンズの倍率は 10-20 倍が最も SN が良いことが分かった。この倍率で、一般的なサイズから微小形状のカンチレバーに対応することが可能である。この AFM 光学系に走査部を装着した。走査部と AFM カンチレバー変位部との制御を行うソフトウェア

(LabVIEW) を開発した。以上は、平成 23 年度に行った。

平成 24 年度の技術開発において、様々ながん細胞に適用できる汎用の細胞マイクロパターン基板の開発を行った。マイクロコンタクトプリント法を用いて、金基板上に接着タンパク質を塗布し、パターン化する作製方法と、金蒸着膜自体を加工し、パターンする方法を用いた。幾つかの種類のがん細胞を用いて、安定に接着させ、培養できることが分かった。規則的に配置した正常細胞とがん細胞を用いて、それらの細胞レオロジー計測を行った結果、細胞弾性率、細胞流動性、およびニュートン粘性係数を独立に評価することが初めて可能になった。また、正常細胞とがん細胞において、細胞レオロジー変数の細胞数標準偏差が異なり、周波数依存性を有することが分かった。AFM 装置・細胞計測の自動化を行うために FPGA によるプログラム開発を行った。また、正常細胞とがん細胞とでは、その運動性が大きく異なることから、細胞膜表面のダイナミクスに関する知見を探索した。その過程において、イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた細胞膜揺らぎ計測法に関する予備実験を行い、その有効性を示した。

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 3 件)

1. Y. Mizutani, M.-H. Choi, S.-J. Cho, and T. Okajima, Nanoscale fluctuations on epithelial cell surfaces investigated by scanning ion conductance microscopy, Applied Physics Letters 102 (2013) 173703 (4pages) (査読有)
2. 岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による細胞レオロジー測定、膜、38(2013)76-81 (査読無)
3. 岡嶋孝治、水谷祐輔、1細胞レオロジー測定 :原子間力顕微鏡による細胞レオロジー計測の新技术、生物物理、52(2012)230-233 (査読無)
4. 岡嶋孝治、水谷祐輔、細胞力学計測のためのマイクロ加工基板を用いた原子間力顕微鏡法、表面科学、33(2012)461-466 (査読無)

[学会発表] (計 12 件)

1. 市川諭、高橋亮輔、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による単細胞レオロジーの定量マッピング測定、第60回応用物理学会春季学術講演会、2013.3.27-30、神奈川工科大(神奈川)
2. 水谷祐輔、石倉禪、Myung-Hoon Choi、Sang-Joon Cho、岡嶋孝治、イオンコンダクタンス顕微鏡による細胞膜揺らぎの定量評価、第60回応用物理学会春季学術講演会、2013.3.27-30、神奈川工科大(神奈川)
3. Y. Mizutani, Z. Ishikura, M.-H. Choi, S.-J. Cho, T. Okajima、Nanoscale cell membrane fluctuations measured by scanning ion conductance microscopy、Biophysical Society 57th Annual Meeting、2013.2.1-7、フィラデルフィア、コンベンションセンター(アメリカ)
4. R. Mizuto, Y. Sakai, R. Takahashi, T. Okajima、Cell cycle dependence of cell mechanics investigated by traction force microscopy、25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2012)、2012.11.27-30、名古屋国際会議場(愛知)
5. Takaharu Okajima、Fluctuations of single cells measured by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy、3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop (招待講演)、2012. 11.5-8、金沢 KKR ホテル(石川)
6. 水谷祐輔、市川諭、石倉禪、岡嶋孝治、イオンコンダクタンス顕微鏡による細胞膜揺らぎの測定、第50回日本生物物理学会年会、2012.9.22-24、名古屋大学(愛知)
7. 土屋雅博、水谷祐輔、岡嶋孝治、細胞シート1軸延伸測定法による時間依存力学

測定、第50回日本生物物理学会年会、2012.9.22-24、名古屋大学(愛知)

8. 高橋亮輔、市川諭、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡を用いた単細胞レオロジーの高速・精密測定法の開発、第50回日本生物物理学会年会、2012.9.22-24、名古屋大学(愛知)
9. 岡嶋孝治、原子間力顕微鏡を用いた細胞力学計測、日本ロボット学会第30回記念学術講演会、バイオマニピュレーション(招待講演)2012年9月17-19日、札幌コンベンションセンター(北海道)
10. P.G. Cai, Y. Mizutani, K. Kawahara and T. Okajima、Temporal Variation of Single Cell Rheology Investigated by Atomic Force Microscopy、19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy、2011.12.19、洞爺湖万世閣(北海道)
11. Y. Usuki, Y. Mizutani, M. Tsuchiya and T. Okajima、Cell Cycle Dependence of Single Cell Rheology Investigated by AFM、19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy、2011.12.19、洞爺湖万世閣(北海道)
12. R. Takahashi, Y. Mizutani, K. Kawahara and T. Okajima、Power-law rheology of normal and cancer cells investigated by atomic force microscopy、19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy、2011.12.19、洞爺湖万世閣(北海道)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 単一細胞の力学特性の計測方法および計測装置

発明者: 岡嶋孝治、蔡萍根、水谷祐輔、土屋雅博

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-184403

出願年月日: 2011. 8. 26

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://labs.ist.hokudai.ac.jp/cell/>

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・准教授

研究者番号: 70280998

(3)連携研究者

菅沼 雅美 (SUGANUMA MASAMI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所

研究者番号：20196695