

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286081

研究課題名(和文) 原子間力顕微鏡を用いた細胞力学伝播関数の時空間定量解析

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of cell mechanical properties and force propagations 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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に働く力は、細胞骨格を介して細胞核に直接働き、細胞機能を調整する役割があると考えられている。従って、細胞骨格構造に起因する細胞力学特性の理解は、細胞の生命現象を解明するために重要である。細胞形状の制御と内部構造の観察が可能なマイクロ加工基板を作製し、細胞間の時空間力学計測が可能な原子間力顕微鏡(AFM)と細胞レオロジー高速計測が可能なAFMを開発した。この細胞内・細胞間に働く力学特性を計測する基礎技術を用いて、単一細胞内の細胞骨格と細胞レオロジーの相関特性、多数細胞間相互作用により生じる細胞弾性率の空間分布、細胞骨格と相互作用する細胞核の運動性、細胞レオロジーの時間発展を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cytoskeletal (CSK) filaments and nuclear scaffolds are discretely connected to each other in response to external forces. The force propagation plays a role in regulating various cell functions. The understanding of cell mechanical properties related to the CSK filamentous structures is essential to elucidate the mechanisms of cell functions. We fabricated micro-fabricated substrate for controlling cell shape and observing intracellular structures with optical microscope. For the investigation of intra-and intercellular mechanical properties associated with CSK filaments, we developed atomic force microscopy (AFM) that allows us to measure the mechanical properties of cell population in an extremely large region and to map rapidly the cell rheological properties. We investigated the correlation between cell rheology and CSK, the emerging spatial distribution of cell modulus in cell population, the motion of cell nucleus related to CSK, and the temporal change in cell rheology.

研究分野：生物物理

キーワード：原子間力顕微鏡 細胞力学 細胞レオロジー 細胞骨格

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の様々な細胞機能と密接に関係している。細胞内に働く力は、3次元ネットワークの構造体である細胞骨格を經由して細胞内を長距離に力伝播することが知られている。特に、伝播した力は細胞核に直接働き、細胞核を変形させ、遺伝子発現を制御している可能性が指摘されている。このように、細胞骨格を直接介した力学伝播特性を理解することは、生命現象の解明の基礎と言える。

細胞骨格の状態は、細胞の弾性率と密接に関係している。従って、細胞弾性率の空間特性を精密に計測することが重要となる。また、細胞骨格と細胞内小器官(細胞核等)との間の相互作用により細胞内小器官の運動性がどのように変動するかは細胞のダイナミクスを理解する上で重要である。本研究では、静的な細胞骨格構造を人工的に制御し、AFMおよび光学顕微鏡計測より、上記の細胞力学特性を調べた。

2. 研究の目的

本研究では以下の研究を目的とした:(1) **AFMを用いた**細胞形状を制御して細胞の細胞力学特性の時空間定量解析。(2)細胞骨格と細胞核との間の力伝播による細胞核運動の解析、(3)正常細胞とがん細胞の細胞骨格構造と細胞力学特性。

3. 研究の方法

各々の実験では、細胞サンプルの実現するために、主にマイクロ加工基板を用いた。倒立型光学顕微鏡に搭載の市販のAFMおよび正立型光学顕微鏡に搭載の自作AFMを用いた。各々実験内容の細部は、研究成果の項目で述べる。

4. 研究成果

細胞力学特性を定量評価するために、細胞レオロジー(細胞弾性率の周波数特性)計測は欠かせない。AFMは細胞レオロジーを最も定量的に計測できる手法の一つではあり、その計測精度を理解することは基本的に重要である。図1に示すようにAFMの網羅計測法を用いて、多数の細胞サンプルの細胞弾性率の普遍性と特異性を調べた。

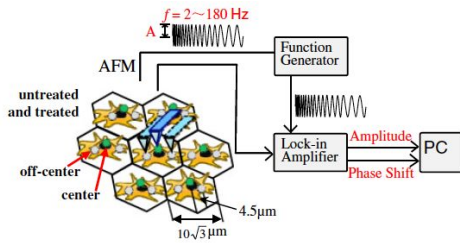


図1 AFMによる単一細胞レオロジーの網羅計測法の概念図。マイクロ加工基板に配列させた細胞(マウス線維芽細胞を利用)の局所弾性率をAFMフォースモジュレーション法により連続的に計測する。細胞内の特定位置の貯蔵弾性率と損失弾性率の周波数特性を計測すること

ができる。

その結果、貯蔵弾性率の絶対値がサンプルにより大きく変動するのに対して、周波数に対数的な依存性を示す貯蔵弾性率の空間特性は、細胞サンプルに対して普遍であることが分かった(図2)。このことは、周波数に対数的な依存性を示す貯蔵弾性率が、細胞力学物性の指標になることを強く示唆した。

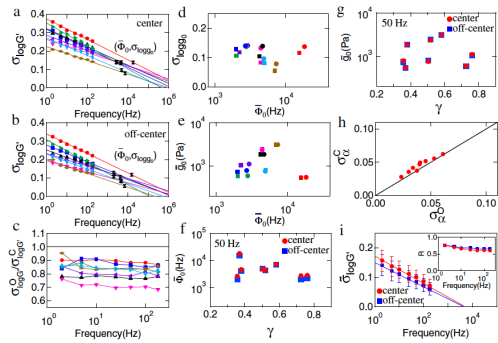


図2 貯蔵弾性率の標準偏差の周波数特性(a:細胞中心部、b:細胞非中心部)、(c)細胞中心部と細胞非中心部の標準偏差の比。他の特性(ここで、細胞骨格構造に依存せずに弾性率が不変な弾性率  $G_0$  である周波数  $\omega_0$ )は細胞サンプルに寄って大きく変化する(d-h)。また、細胞中心部と細胞非中心部の標準偏差の周波数依存性が保存される(詳細は文献3)。

次に、細胞間の力伝播が細胞力学物性に及ぼす影響を調べるために、細胞間接着の有無による細胞レオロジー計測を行った。これは、図3に示すように、個々の細胞を孤立させることが可能なマイクロ加工基板を用いた。

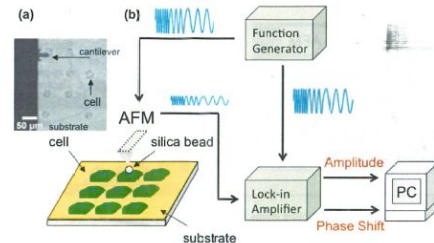
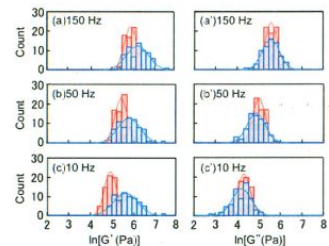


図3 (a)細胞単位で孤立してパターン化した細胞サンプルの光学顕微鏡像。(b)個々の細胞を計測するAFMフォースモジュレーション法の概念図。

強固な細胞間接着が存在しないう線維芽細胞において、パターン化した細胞とそのアクチン細胞骨格を脱重合した細胞の貯蔵弾性率と損失弾性率(図4)の周波数特性は、細胞間接着の有無に大きな違いはないことが分かった。一方で、弾性率の絶対値は細胞接着様式により大きく変化することが分かった。

図4 各周波数の貯蔵弾性率(左)と損失弾性率(右)の細胞数分布。



さらに、細胞レオロジーの空間特性を明らかにするために細胞レオロジーのマッピング測定を行う手法を開発した(図5)。

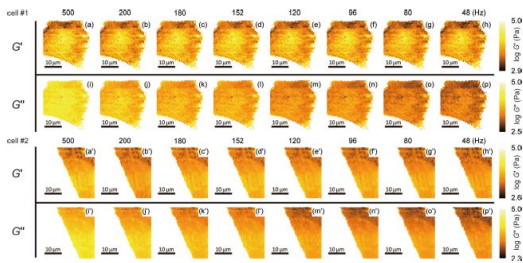


図5 異なる周波数の細胞の貯蔵弾性率と損失弾性率の空間マッピングの測定例(上段と下段の2つの細胞)。

そして、本手法を用いて、細胞内レオロジーの空間分布の詳細と時間分布の詳細とを明らかにした(論文投稿準備中)。

次に、細胞骨格と細胞核との間の相互作用が細胞核の運動性に及ぼす影響を調べるために、個々の細胞を孤立させてパターン化することにより、細胞自体の並進運動は抑制した状態の細胞核の並進運動と回転運動を解析した(図6)。その結果、細胞骨格の脱重合前後で細胞核の運動性が大きく変化することを見つけた。このことは、細胞骨格の静的構造は一樣であっても、そのダイナミクスは細胞核の運動性に強く影響を及ぼしていることを示唆した(論文投稿準備中)。

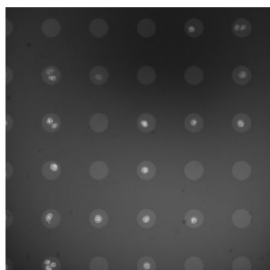


図6 円形にパターン化した細胞の細胞核を蛍光観察した図。図中の輝点が細胞核を表す。細胞核の輝点の重心位置を計測することにより並進運動を解析した。

正常細胞とがん細胞のレオロジー計測から、それらの力学的相違点を明らかにした(文献4)。特に、上皮細胞様細胞株(MDCK)の正常細胞とRas強制発現のがん細胞とは、弾性率、周波数特性、および粘性係数、すべてにおいて有意な差があることが分かった。さらに、正常細胞とがん細胞の個々の細胞の個性を評価し、その統計性を明らかにした(論文投稿準備中)。

## 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5件)

(1) 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). 査読有り

(2) A. Tanaka\*, R. Tanaka, N. Kasai, S. Tsukada, T. Okajima, K. Sumitomo, Time-lapse imaging of morphological changes in a single neuron during the early stages of apoptosis using scanning ion conductance microscopy, Journal of Structural Biology 191, 32–38 (2015). 査読有り

(3) P.G. Cai, T. Okajima\*, Precision of cell-to-cell variation in power-law rheology characterized by atomic force microscopy, Japanese Journal of Applied Physics 54, 037001(2015) 査読有り

(4) M. Kajita, K. Sugimura, A. Ohoka, J. Burden, H. Saganuma, M. Ikegawa, T. Shimada, T. Kitamura, M. Shindoh, S. Ishikawa, S. Yamamoto, S. Saitoh, Y. Yako, R. Takahashi, T. Okajima, J. Kikuta, Y. Maijima, M. Ishii, M. Tada, and Y. Fujita\*, Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells, Nature Communications 5, 4428(2014). 査読有り

(5) R. Takahashi, S. Ichikawa, A. Subagyo, K. Sueoka, and T. Okajima\*, Atomic force microscopy measurements of mechanical properties of single cells patterned by microcontact printing, Advanced Robotics 28, 449-455(2014). 査読有り

[学会発表](計25件)

(1) Y. Fujii\*, W. Koizumi, K. Hotta, K. Oka, T. Okajima, Quantifying local elastic modulus of living embryo by atomic force microscopy(23rd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM23), Dec. 10, 2015, Niseko)

(2) R. Takahashi\*, T. Okajima, Multi-frequency force modulation atomic force microscopy: Simultaneous measurements of living cells in frequency and time domains (23rd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM23), Dec. 10, 2015, Niseko)

(3) Ryosuke Tanaka\*, Takaharu Okajima, Mechanical Measurements of in vitro Tissue by Atomic Force Microscopy (26th 2015 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nov.24, 2015 Nagoya)

(4) 藤井裕紀\*, 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ホヤ初期発生胚の弾性率の時空間測定 (第53回生物物理学会、2015年9月15日、金沢)

(5) 澤野麻紀\*、繁富(栗林)香織、朱鑫峰、高橋亮輔、スバギョ・アグス、末岡和久、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による力学的単一細胞診断：細胞力学量のばらつきの空間依存性

(第53回生物物理学会、2015年9月15日、金沢)

(6) Yuki Fujii\*, Wataru Koizumi, Koji Hotta and Takaharu Okajima, Spatial-Temporal Oscillation in Elastic Modulus of Embryo during the Early Development, International Symposium on Fluctuation and Structure Out of Equilibrium 2015 (SFS2015) (H25.8.22, Kyoto)

(7) 大西恒太\*, 土屋雅博, 岡嶋孝治, 細胞シートの延伸による細胞核の形状変化 (第67回細胞生物学会、2015年7月2日、船堀)

(8) 藤井裕紀\*, 越智勇貴, 梶田美穂子, 藤田恭之, 岡嶋孝治, 単層上皮細胞における細胞弾性率の空間不均一構造 (第67回細胞生物学会、2015年6月30日、船堀)

(9) 澤野麻紀\*, 繁富香織, 朱キン峰, 高橋亮輔, スバギョアグス, 末岡和久, 田中良昌, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による力学的単一細胞診断法の開発: 細胞力学と細胞骨格構造の相関 (第67回細胞生物学会、2015年6月30日、船堀)

(10) 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡: 細胞力学特性の個性を測る (第53回生物物理学会 (細胞を診て操作する生物物理的アプローチ)、2015年9月15日、金沢)

(11) P.G. Cai\*, T. Okajima, Origin of cell-to-cell mechanical variation investigated by atomic force microscopy (22nd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM22), Dec.11-,2014 Atagawa)

(12) R. Tanaka\*, J. Kikkawa, Y. Fujii, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima, Atomic force microscopy for mapping mechanical property of whole cell assembly (25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nov.11,2014, Nagoya)

(13) R. Takahashi\*, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima, Quantitative rheological measurements of confluent cell using atomic force microscopy (25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nov.11, 2014, Nagoya)

(14) P.G. Cai\*, R. Takahashi, K. Kuribayashi-Shigetomi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima, Temporal and Spatial Variations of Single Cell Rheology Investigated by Atomic Force Microscopy (25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nov. 11,2014, Nagoya)

(15) 高橋亮輔\*, 繁富(栗林)香織, スバギョ・アグス, 末岡和久, 岡嶋孝治, 多重周波数モジュレーション原子間力顕微鏡: 単一細胞レオロジーの高速測定 (第52回日本生物物理学会年会, 2014.9.27, 札幌)

(16) 藤井裕紀\*, 越智勇貴, 岡嶋孝治, 単層上皮細胞シートの複素弾性率の空間分布: 原

子間力顕微鏡測定 (第52回日本生物物理学会年会, 2014.9.26, 札幌)

(17) 大西恒太\*, 土屋雅博, 岡嶋孝治, 細胞シート延伸における細胞核変形量の測定 (第52回日本生物物理学会年会, 2014.9.27, 札幌)

(18) 朱鑫峰\*, 繁富(栗林)香織, 蔡萍根, スバギョ・アグス, 末岡和久, 岡嶋孝治, マイクロパターン上に培養した単一細胞の細胞核の動態, (第52回日本生物物理学会年会, 2014.9.27, 札幌)

(19) 石倉禪\*, 水谷祐輔, 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コンフルエント上皮細胞の膜揺らぎの定量化 (第52回日本生物物理学会年会, 2014.9.27, 札幌)

(20) 武蔵湧貴\*, 土屋雅博, 坂井謙, 朱鑫峰, 岡嶋孝治, 細胞接着基板延伸装置を用いた細胞動態のタイムラプス測定 (第75回応用物理学会秋期学術講演会, 2014.9.18, 札幌)

(21) 坂井謙\*, 武蔵湧貴, 朱鑫峰, 土屋雅博, 岡嶋孝治, 細胞蛍光顕微鏡観察が可能な牽引力の評価 (第75回応用物理学会秋期学術講演会, 2014.9.18, 札幌)

(22) 藤井裕紀\*, 越智勇貴, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による単層上皮細胞の粘弾性の空間不均一性 (第66回日本細胞生物学会, 2014年6月11日, 奈良)

(23) 岡嶋孝治, 蔡萍根, 高橋亮輔, 繁富(栗林)香織, 細胞レオロジーの時間変動と空間分布: 原子間力顕微鏡測定 (バイオオプティクス研究会, 2014年12月5日, 大阪)

(24) 岡嶋孝治, 細胞の物理学: 走査プローブ顕微鏡によるアプローチ, 表面科学会東北北海道支部学術研究会 (2015.3.10, 札幌)

(25) 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による細胞レオロジー測定 (第34回表面科学学術講演会, 2014年11月7日, 島根)

〔図書〕(計7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) K. Kuribayashi-Shigetomi, R. Takahashi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima, High-throughput measurements of single cell rheology by atomic force microscopy (Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Chapter 4 (57-67), Springer, 2015)

(3) 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡を用いた細胞レオロジー特性の計測 (第1章・第3節)、三次元ティッシュエンジニアリング~細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで~ (株式会社 NTS) (2015)

(4) 高橋亮輔, 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による超高速細胞メカニクス計測技術、ケミカルエンジニアリング (先端計測技術開発の展望: 9月号) (2015)

(5) 岡嶋孝治, 細胞の物理学: SPMによる  
定量計測、表面科学 35, 544-544(2014)

(6) 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による細胞力  
学の定量計測(解説)、検査技術 4,2-6(2014)

(7) 岡嶋孝治, 走査プローブ顕微鏡による細  
胞物性測定: 原子間力顕微鏡とイオンコンダ  
クタンス顕微鏡(総説)、化学工業 64(8),  
612-617(2013)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 細胞の複素弾性率の計測方法および計  
測システム

発明者: 岡嶋孝治、高橋亮輔

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-136721

出願年月日: 2014年7月2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