

令和元年6月25日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14496

研究課題名(和文) 接着細胞の垂直面高解像度イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of the high-resolution live imaging method for vertical section of adherent cells

研究代表者

鈴木 宏明 (Suzuki, Hiroaki)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：20372427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞の垂直断面の高解像度ライブイメージングのためのシンプルなマイクロ流体デバイスを開発した。ここでは、マイクロ流路の垂直側壁に付着した上皮細胞を、標準的な共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)によって観察し、1回の走査でそれらの内部構造の高解像度画像を得た。開流路および閉流路型のデバイスを製作し、蛍光微小管像のコントラストにより断面像の解像度を比較した。結果として、個々の微小管の繊維構造は両方のデバイスで明瞭に解像された。最後に、上皮細胞のアピカル側に局在するタイトジャンクション(TJ)のライブイメージングへの適用性を試した。その結果、最小限のぼけでTJの位置を明確に示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光を用いた生細胞イメージングは、細胞の内外部の構造やその動態を研究するために必要不可欠な技術となっている。ここ数十年、超解像顕微鏡法や様々な顕微鏡装置の技術開発により、生細胞イメージングは大きく進歩した。しかし、その実施形態は、主にガラスボトムディッシュ等の底面に平面的に広がった細胞を、二次元的にイメージングする手法に限られており、対物レンズの軸方向(z軸)の空間分解能は水平方向(xy平面)の空間分解能よりも低い。本研究成果は、細胞培養面の縦(垂直)方向の輸送を伴う細胞機能のイメージングを容易にすることで、細胞機能の基礎研究や薬剤スクリーニングへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the use of simple microfluidic device for high resolution live imaging of the vertical section of epithelial cells. Here, Epithelial cells adhered on the vertical sidewall of the microchannel were observed by a standard confocal laser scanning microscopy (CLSM) to obtain high-resolution images of their internal structures with a single scanning. We fabricated and tested open and closed channels and compared the resolution of sectional images by the contrast of fluorescent microtubule images. As a result, the fibrous structure of individual microtubules was clearly resolved in both devices, which could not be attained in the 3D reconstruction from multiple confocal images. Finally, we tested the applicability to the live imaging of tight junctions, which localize on the apical side. The results clearly exhibited the location of tight junction with minimum blurring.

研究分野：バイオチップ

キーワード：上皮細胞 ライブイメージング 縦断面イメージング マイクロ流体デバイス タイトジャンクション 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

蛍光を用いた生細胞イメージングは、細胞の内外部の構造やその動態を研究するために必要不可欠な技術となっている。蛍光タンパク質(FP)や細胞染色を用いることにより、観察対象のタンパク質の局在や動態、機能を解明できる。ここ数十年、超解像顕微鏡法や様々な顕微鏡装置の技術開発により、生細胞イメージングは大きく進歩した。しかし、その実施形態は、主にガラスボトムディッシュ等の底面に平面的に広がった細胞を、二次元的にイメージングする手法に限られている。この手法では、焦点の異方性点広がり関数(PSF)に起因して、対物レンズの軸方向(z軸)の空間分解能は水平方向(xy平面)の空間分解能よりも低い。細胞の3次元、もしくは垂直方向の情報が必要な場合、共焦点顕微鏡を代表として、多数の二次元スライス画像から三次元情報を再構成する手法を用いる。しかしこの手法では、分解能と比例して取得時間が長くなるため、短時間で高解像度の画像を得ることは困難である。これらの問題を解決するためにいくつかの研究が報告されている。光シート蛍光顕微鏡(LSFM)は、高分解能断層像を得るために、対物レンズの軸に直交する二次元光シートで試料を照射する。しかし、この技術は、多細胞生物のような大きなサンプルで一般に使用される。また手島らは、MEMS技術により作製した磁気駆動マイクロフラップ、マイクロプレート上に細胞を接着させ、磁力により回転させることで、垂直断面像を取得する手法を開発した。これらのデバイスは、撮像方向を微調整するには有効であるが、製造法や利用法が複雑であるため、一般的な生物学研究室での利用は困難である。

2. 研究の目的

本課題では、簡単なマイクロ流路構造を持つマイクロ流体デバイスを用いて細胞の縦断面を高解像度でイメージングする手法を検討した。モデル細胞として、MDCK細胞(イヌ腎臓尿管上皮細胞)を使用した。上皮細胞は、頂端側と基底側に高度な極性を持つため、縦断面のイメージングの対象として適している。マイクロ流路の側壁に接着した細胞を共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)で観察することで、細胞縦断面画像を取得した。マイクロ流体デバイスには、開流路デバイス(OCD: Open Channel Device)と閉流路デバイス(CCD: Closed Channel Device)の2種類を作製した。また開流路デバイスはPDMSで作製したものと硬質シリコン樹脂で作製したものと2種類を作製した。それぞれのデバイスから、細胞縦断面画像を取得し、解像度評価を行った。最終的に、提案手法の応用として、上皮細胞の頂端側に局在しているタイトジャンクション(TJ)の蛍光イメージングを行った。TJを構成するFP融合タンパク質を発現させ、生細胞の蛍光イメージングを行い、マイクロ流体デバイスにより縦断面像を得ることで、TJの頂端側への局在を確認した。

3. 研究の方法

3.1 マイクロデバイスを構成する材料の評価

一般的に、高解像度イメージングに使われる高倍率・高開口数の対物レンズは、作動距離(対物レンズと観察試料の距離)が小さく、カバーガラスを介して観察するように設計されている。我々はマイクロ流体デバイスの材料として使われる透明シリコン樹脂(ポリジメチルシロキサン; PDMS)層の厚さが撮像の解像度に及ぼす影響を調べた。細胞をカバーガラス上および様々な厚さのPDMS層上に播種し、市販のトランスフェクション試薬によりGFP融合チューブリンを発現させ、それをレーザー共焦点顕微鏡により観察した。

また、マイクロ流体デバイスの作製にはPDMSが多く使われるが、その屈折率は1.4程度であり、カバーガラスのそれ(屈折率: 1.50)とは差異があるため、解像度の低下につながる。ここでは、屈折率がカバーガラスに近い硬質シリコン樹脂(屈折率: 1.52)を使用して同様の実験を行った。厚さ約100 μ mの硬質シリコン樹脂とPDMS層の上にそれぞれ細胞を接着させ、細胞平面画像を取得した。

3.2 マイクロ流体デバイスを用いた接着細胞断面のイメージング

本課題では、簡単なマイクロ流路構造を持つ2種類のマイクロ流体デバイスを作製した。凹型の溝構造を持ち上側が開放状態にある開流路デバイス(OCD)(Fig. 1a)、およびマイクロ流路がガラスとPDMSによって閉じられた閉流路デバイス(CCD)(Fig. 1b)である。OCDは上側が開放状態であるため、細胞培養は容易である。しかし構造の作製上、カバーガラスと観察細胞の間にPDMS層が存在し、解像度への影響が考えられる。そのためデバイス材

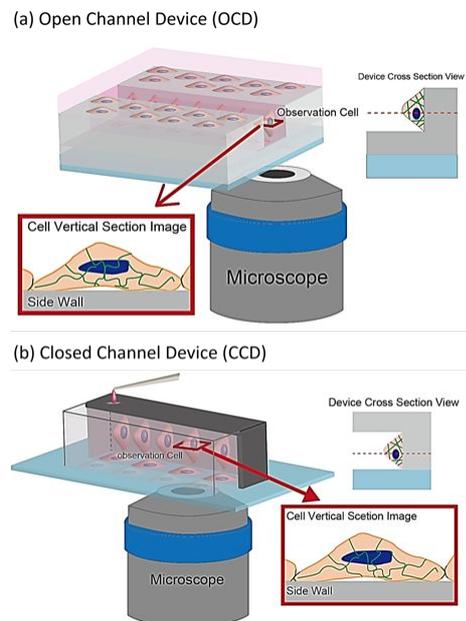


Fig.1 Schematic of the vertical-section live imaging system for adherent cells. (a) Open Channel Device (OCD) and (b) Closed Channel Device (CCD).

料を屈折率がカバーガラスと近似している硬質シリコン樹脂を用いたデバイス(Hard Silicone Resin OCD)も作製した。CCDは、流路の底面がカバーガラスのため、観察細胞とカバーガラスの間にPDMS層が存在しない。そのため高解像度の細胞画像の取得が期待できる。但し、狭い閉流路内では細胞への培地供給が不十分となり、細胞培養に難が生じる。各デバイスはソフトリソグラフィー(樹脂への鋳型転写技術)によって作製した。

4. 研究成果

4.1 マイクロデバイスを構成する材料の評価

カバーガラス上の細胞は微小管の線維構造が極めて明瞭に確認できた(Fig. 2b)。PDMS層厚さが29, 38, 45 μm (Fig. 1c~e)でも微小管の線維構造が明瞭に確認できた。しかし74 μm (Fig. 2f)になると、微小管がぼやけ始め、114 μm (Fig. 2h)では個々の線維を確認することができなかった。この結果より、PDMS層が厚いほど、解像度が低下することが示された。そのため、マイクロ流体デバイスの作製の際には、デバイスの厚さを薄くする必要があることが分かった。

さらに、硬質シリコン樹脂とPDMSを比べると、硬質シリコン樹脂の方が微小管の線維構造が鮮明であることが分かった(Fig. 3)。そのため、硬質シリコン樹脂を利用することで、屈折率の差異による解像度の影響を減らし、解像度が向上することが分かった。

4.2 マイクロ流体デバイスを用いた接着細胞断面のイメージング

本研究では、PDMS開流路デバイス(PDMS OCD)、硬質シリコン樹脂開流路デバイス(Hard Silicone Resin OCD)、PDMS閉流路デバイス(PDMS CCD)のそれぞれ3つのデバイスを用い、流路側面に接着した細胞を撮影して縦断面画像を取得し、従来の多数のスライスから再構築する三次元断面画像と比較した。また、カバーガラス上に接着した細胞の水平断面像(Horizontal Section, Fig. 4d)および再構成縦断面像(Reconstructed Vertical Section, Fig. 4e)も撮像し、それぞれのデバイスから得られた細胞画像と比較した。この結果から、OCDでは、デバイス材料を硬質シリコン樹脂に変更することで、解像度が向上することを確認した(Fig. 4aとbの比較)。CCDでは、一般的な水平断面像と同様の高解像度で縦断面観察が可能であることを確認した(Fig. 4cとd)。また、全てのデバイスにおいて再構成縦断面像(Fig. 4e)と比較して、解像度の向上が見られた。

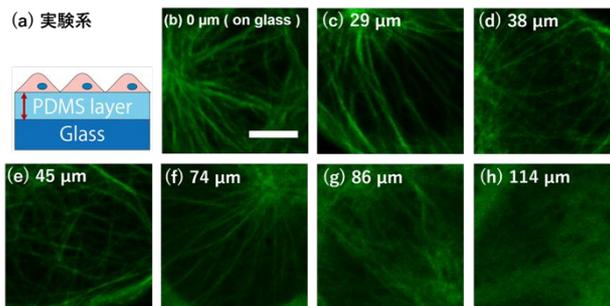


Fig. 2 Preliminary test for evaluation of the material and thickness of the substrate. (a) Schematic of the experimental system. (b)~(h) Fluorescent imaging of microtubules of MDCK cells on a cover glass and on PDMS-coated glasses with various PDMS thickness. Scale Bar = 5 μm .

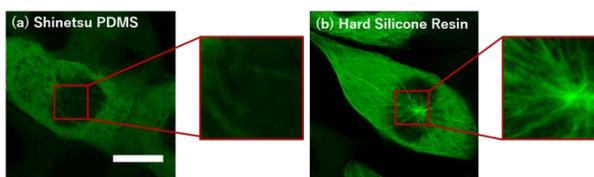


Fig. 3 Fluorescent imaging of microtubules of MDCK cells on PDMS-coated glasses (a) and hard silicone resin-coated glasses (b). Scale Bar = 15 μm .

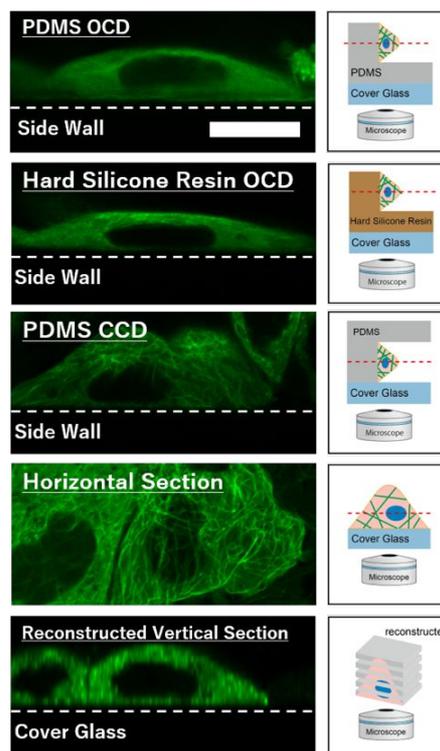


Fig. 4 Imaging of GFP-tagged microtubules in each 5 methods. (a) PDMS OCD, (b) Hard Silicone Resin OCD, (c) PDMS CCD, (d) Horizontal section, (e) Reconstructed vertical section. Scale Bar = 15 μm

最後に、提案手法の応用例として、タイトジャンクション(TJ)の蛍光イメージングを行った。動物の表皮や胃腸管を構成する上皮細胞の細胞間には、TJと呼ばれる、複数のタンパク質から成る強い結合装置が存在し、体内への物質の侵入や漏出を防止、制御している。TJは上皮細胞の頂端側に局在している。本実験では、提案手法により、TJの局在を高解像度でライブイメージングできるかを検証した。GFPを融合させた claudin4 を恒常発現した MDCK 細胞株を作製し、その断面のライブイメージングをOCDおよびCCDでそれぞれ行った(Fig.5)。OCDでは(Fig.5a)、上皮細胞がマイクロ流路の側壁にシート状に整列している様子を確認した。CCDでは(Fig.5b)、細胞上部に強い蛍光を発する領域があり、claudin 4 が細胞上部に多く局在していることが確認できた。以上の結果から、本提案手法により、TJの頂端側への局在を、一般的な水平方向スキャンよりも高い解像度で確認することに成功した。

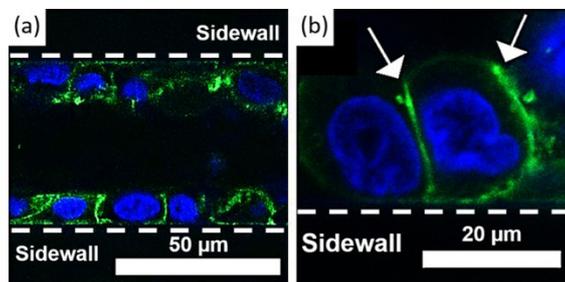


Fig.5 (a) Live-cell imaging of GFP-tagged claudin 4 (a component of tight junction) in OCD. (b) Observation of tight junctions of confluent epithelial sheet in OCD. Localized green spot near the apical side can be observed.

以上に述べた通り、本研究課題では、簡単なマイクロ流路構造を持つマイクロ流体デバイスを用いて細胞の縦断面を高解像度でイメージングする手法を検証した。細胞の縦断面画像の解像度評価実験では、各デバイスにおいて、再構成縦断面像よりも解像度が向上した縦断面像を1スキャンで取得することに成功した。開流路デバイスは、デバイス材料を硬質シリコン樹脂に変更することで、更に解像度が向上することを確認した。閉流路デバイスは、ガラス上細胞の水平断面像と同様の高解像度で縦断面観察が可能であることを確認した。タイトジャンクションの蛍光イメージングでは、マイクロ流体デバイスを用いることで、TJの高解像度のライブイメージングを可能にし、頂端側への局在を確認することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

H. Suzuki, K. Mitsuno, K. Shiroguchi, M. Tsugane, T. Okano, T. Dohi, T. Tsuji, "One-step micromolding of complex 3D microchambers for single-cell analysis," Lab Chip, 17, 647-652, 2017.

〔学会発表〕(計 16件)

M. Nakano, S. Araki, M. Tsugane, F. Sunaga, H. Suzuki, "High-resolution imaging of the vertical section of adherent cells using a microfluidic device," Proc. μ TAS 2018, 928-929, 2018.

中野正義, 荒木誠吾, 津金麻実子, 須永史子, 鈴木宏明, 「マイクロ流体デバイスを用いた上皮細胞縦断面の高解像度イメージング」, 化学とマイクロナノシステム第 38 回研究会, 2018.

中野正義, 津金麻実子, 鈴木宏明 「マイクロ流体デバイスを用いた上皮細胞縦断面の高解像度ライブイメージング」, 第 46 回可視化情報シンポジウム, 2018.

鈴木宏明, 「上皮細胞の縦断面イメージング用マイクロデバイスの開発」, 第 8 回生体界面研究会, 2018.

荒木誠吾, 津金麻実子, 鈴木宏明, 「マイクロ流体デバイスを用いた接着性培養細胞縦断面の高解像度ライブイメージング」, 第 36 回化学とマイクロナノシステム学会, 2017.

中野正義, 荒木誠吾, 津金麻実子, 鈴木宏明, 「細胞高解像度イメージングのための硬質シリコン樹脂マイクロ構造」, 細胞を創る研究会 10.0, 2017.

津金麻実子, 鈴木宏明, 「接着細胞のトランスポーター輸送活性測定デバイスの開発」, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2017.

鈴木宏明, 「人工細胞膜システムの細胞らしい挙動」, 生体界面研究会, 2017.

鈴木宏明, 「人工細胞膜システムの細胞らしい挙動」, 東京理科大学研究推進機構総合研究院 イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 2016.

鈴木宏明, 「細胞の界面をつくる・制御する」, 日本表面化学会関東支部第 5 回セミナー 東京理科大学ウォーターフロンティアサイエンスシンポジウム, 2016.

S. Araki, M. Tsugane, H. Suzuki, "High-resolution live imaging of the vertical section of adherent cell culture using microfluidic device," Int. Conf. Single Cell Research, 2016.

鈴木宏明, 「機械(メカ)屋からみた細胞~細胞はつくれるか?~」, ナノ茶論, 2016.

鈴木宏明, 「人工細胞系構築の試み」, 生体界面研究会, 2016.

荒木誠吾, 津金麻実子, 岡田祐治, 鈴木宏明, 「マイクロ流路デバイスを用いた接着性培養細胞の縦断面ライブイメージング法の開発」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会, 2015.

岡田祐治, 津金麻実子, 鈴木宏明, 「接着細胞の膜輸送活性計測のためのマイクロウェル

構造の検討」, 日本機械学会第7回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2015 .
M. Tsugane, H. Suzuki, "Detection of transport activity of culture cells using microchamber device," The 19th Int. Conf. Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2015.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: 細胞縦断面観察用の顕微鏡観察用部材及び細胞観察方法

発明者: 津金麻実子, 鈴木宏明

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2016-131500

出願年: 2016

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 津金 麻実子

ローマ字氏名: Mamiko Tsugane

研究協力者氏名: 荒木 誠吾

ローマ字氏名: Seigo Araki

研究協力者氏名: 中野 正義

ローマ字氏名: Masayoshi Nakano

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。