

令和元年6月7日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04169

研究課題名(和文)パターン化単一筋管細胞の拍動に伴う代謝活性評価法の開発

研究課題名(英文) Estimation of metabolism activity for contractile single myotubes with pattern on the substrate

研究代表者

安川 智之 (YASUKAWA, TOMOYUKI)

兵庫県立大学・物質理学研究科・教授

研究者番号：40361167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学顕微鏡を用いて、拍動する筋管細胞の酸素消費速度を測定することができた。電極を筋管細胞近傍で走査し、酸素の還元電流分布を得た。理論曲線とのフィッティングから単一筋管細胞の酸素消費速度を評価できた。ニードル型のマイクロ電極を用いた個々の細胞の操作技術を開発し、細胞パターンの作製に応用展開した。電極と細胞間にポーラス薄膜を設置し、正の誘電移動により細胞を薄膜下面に誘導してパターン配列体を作製した。局所的に異なる酵素を固定化したデュアルマイクロ酵素センサの作製した。これらの電極を用いると、それぞれ選択的にグルコースおよび乳酸に反応した。パターン化細胞の酸素およびグルコース消費量計測を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まず、個々の筋管細胞の拍動時の酸素消費速度を決定できる。これを指標とし、筋細胞の運動と呼吸代謝活性の関連調査、インシュリン応答性等の筋細胞の機能評価を可能とするところに大きな意義がある。この培養系は、電気パルス刺激により細胞の拍動リズムを制御できるところに大きな優位性を有する。培養細胞を用いる薬剤スクリーニングや化学物質の毒性試験は、動物実験の代替技術として期待されており、代謝活性を指標とした2型糖尿病の治療薬(糖尿病治療薬、代謝能改善薬等)のハイスループット探索ツールとして発展する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The consumption rate of oxygen for myotubes can be detected by using the electrochemical microscopy. The distribution of oxygen reduction currents was obtained by scanning the microelectrodes along the z direction. The consumption rate of oxygen for single myotubes was estimated by the fitting to the theoretical curves. We have developed manipulation techniques to capture and retrieve single cells based on the dielectrophoresis with needle type of microelectrodes and applied them to form the cellular patterns on the bottom surface of porous membranes. Dual microsensors that two different types of enzymes were immobilized on two microelectrodes in the single needle, respectively were developed. The currents obtained with the electrodes for glucose and lactate increased selectively by adding each corresponded substrate.

研究分野：電気分析化学

キーワード：電気化学顕微鏡 単一細胞 酸素消費 酵素センサ グルコース

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウス筋芽細胞株 C2C12 は培養過程における相互融合により多核の筋管へと分化し、さらに、その筋管細胞は電気パルス印加により収縮と弛緩を繰り返す拍動能力を獲得する。この筋管細胞は、拍動に伴い、エネルギー代謝の亢進、グルコース取り込みの亢進およびインスリン反応性糖輸送担体 (GLUT4) のトランスロケーション (膜移行) の改善が示され、極めて生体に類似した骨格筋のモデル培養細胞として確立された。これまで、運動や薬剤投与による筋代謝能を評価するためには、トレッドミルで無理矢理走らせたり、長時間泳がせたりした小動物から採取した筋組織が用いられてきたが、高スループットスクリーニングや倫理面において問題があった。よって、培養系で電気パルス印加により「筋肉 (筋細胞) の運動 (拍動) を制御」できることは、筋肉の生理、病理、機能を解明する上で極めて貴重である。

これまで、「マイクロ電極をプローブとして利用した電気化学顕微鏡 (SECM) による細胞解析」に関する研究を遂行してきた。SECM を用いると単一細胞の呼吸による酸素消費速度を定量することが可能である。これは、単一細胞レベルでの細胞の代謝活性を指標とした電気化学的細胞センサの先駆けに位置づけられている。さらに、誘電泳動により高度に配列化した細胞を対象とした抗がん剤スクリーニング、レポーター遺伝子アッセイへと応用展開している。現在は、収縮および弛緩を繰り返して拍動する筋細胞 (C2C12 筋管細胞) の呼吸による代謝活性測定に着手し、電気パルス印加に伴う筋管細胞の拍動により筋管細胞近傍の酸素濃度計測を行っている。プローブを z 方向に走査することにより、細胞上方の酸素濃度分布を取得することができ、そこから、拍動時における単一筋管細胞の酸素消費速度を定量することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ電極を探針とした電気化学顕微鏡 (SECM) を用い、単一細胞レベルで非侵襲的に「筋細胞の運動」と「エネルギー代謝 (呼吸による酸素消費)、グルコース取り込み」の連関を調査することを目的とする。

また、単一筋管細胞近傍の酸素濃度とグルコース濃度を同時計測可能なプローブ (ニードル型酵素修飾マイクロ電極) を作製するために、誘電泳動法または泳動電着法を利用した手法を開発する。この手法を用い、1本のニードルの中に2本の作用極を有するデュアルマイクロ電極の片側の電極表面のみ酵素修飾を可能とする。このプローブの電気化学的な評価を行い、細胞近傍の酸素濃度およびグルコース濃度を同時に計測することを目的とする。

培養皿状にランダムに分化誘導された筋管細胞では、近接する細胞の酸素消費およびグルコース取り込みが対象細胞に影響を及ぼす。よって、分化して融合する細胞数を規定して単一筋管細胞アレイを作製し、その酸素消費およびグルコース取り込みを調査する必要がある。単一筋管細胞アレイを迅速に作製するために、サイズを規定した PDMS 製ステンシルシートの中に誘電泳動を用いて細胞を誘導する。

3. 研究の方法

(1) 筋管細胞近傍の酸素還元電流応答をモニタリングし、筋管細胞の酸素消費量計測を行った。2本の Au ワイヤ (直径 1 mm, 長さ 40 mm) を 40 mm 離して培養液内に設置し、矩形波直流パルス電圧 (28 V, 1 Hz, 2 ms) を印加して拍動を誘発した。拍動する筋管細胞の 10 μm 上方に Pt マイクロ電極 (10 μm) を設置し、電極電位を -0.4 V vs. Ag/AgCl に設定して酸素還元電流の経時変化を計測した (Fig. 1)。さらに、電極を細胞近傍から z 軸方向に移動させ (10 $\mu\text{m}/\text{s}$) の酸素還元電流を測定し酸素濃度のマッピングを行った。

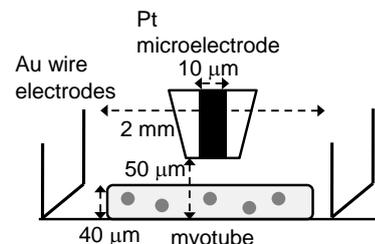


Fig. 1 Measurement of the reduction current by SECM.

(2) ニードル型のマイクロ電極を用いて個々の細胞の操作および多孔質膜上への細胞パターンの作製を行った。先端に微小孔 (深さ 10 μm) を有するマイクロ電極 (直径 10 μm) を xyz マニピュレータに設置し、マウスミエローマ細胞近傍に設置した。ミエローマ細胞は、グラウンドに接続した ITO 電極上にランダムに配置した。マイクロ電極に p-DEP の作用する周波数領域である 10 MHz の交流電圧を印加し細胞を電極先端に捕捉した。xyz マニピュレータによりマイクロ電極を目的位置に移動させ、n-DEP の作用する周波数領域である 1.0 kHz を印加して捕捉した細胞を排出した。また、電極と細胞間にポラス薄膜を設置し、p-DEP により薄膜下面に誘導した。マイクロ電極を水平方向に移動させ、細胞の配列体を作製した (Fig. 2)。

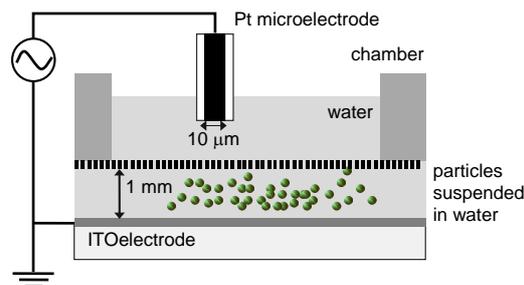


Fig. 2 Structure of the DEP device consisting of a chamber with a microhole array, an ITO electrode and a needle-type Pt microdisk electrode.

(3) グルコースと乳酸を同時に計測可能なデュ

アルマイクロ酵素センサの開発を行った。θ型ガラスキャピラリーに白金ワイヤを挿入、封入してデュアルマイクロ電極を作製した。先端の白金を電気化学エッチングして電極先端に細孔を形成した。作製した細孔内に、泳動電着法または誘電泳動法を用いてグルコース酸化酵素 (GOx) を固定化した粒子 (直径 200 nm) を誘導し固定化した。ITO 電極を底面としたチャンパー内に、GOx 修飾微粒子の懸濁液を添加し、ITO 電極表面上から 10 μm の位置にマイクロ電極を設置した。ITO 電極を接地し、マイクロ電極に +1.5 V の直流電圧を 20 分間印加して GOx 修飾微粒子を細孔内に集積化した。デュアルマイクロ電極のもう片方の白金先端に、同様の方法を用いて乳酸酸化酵素 (LOx) を修飾した微粒子を導入し、異なる酵素で修飾された微粒子を固定化したデュアルマイクロ酵素電極を作製した。異なる濃度のグルコースと乳酸を添加した際の酸化電流の両電極の時間変化を同時にリアルタイムで評価した。

4. 研究成果

(1) パルス電圧を 2.5 時間印加すると筋管細胞は拍動し、その拍動は 0.017 Hz (1 min^{-1})–5.0 Hz の周波数領域において印加パルス電圧と同期した。この筋管細胞近傍にマイクロ電極を設置し、1.0 Hz のパルス電圧を印加して拍動させると、酸素還元電流は徐々に減少し 30 秒後にほぼ定常に達した。拍動を停止すると電流はほぼ初期レベルに戻った。この時の拍動による電流減少量は約 60 pA であった。なお、細胞非存在下では電流減少は観測されなかった。これより、この電流減少は筋管細胞の拍動により細胞の近傍の酸素濃度が減少した、すなわち、細胞の酸素消費量が増加したことを示している。一方、0.5 Hz のパルス電圧を印加すると、電流減少量は約 30 pA に半減した。これは 1 回の拍動現象により消費する酸素量が一定であることを示唆している。次に、電極を細胞近傍から z 軸方向に移動させると、拍動誘発させた筋管細胞近傍における酸素還元電流の減少は、拍動誘発していない筋管細胞、筋芽細胞と比較して明らかに大きく、酸素消費量が増加していた。z 方向の酸素濃度プロファイルから長さ 300 μm の筋管細胞の酸素消費速度は、約 10 fmol/s と見積もられた (Fig. 3)。

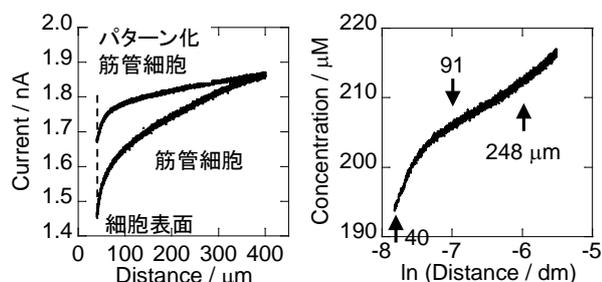


Fig. 3 Distribution of the reduction current and concentration of oxygen along z direction above a myotube.

(2) 電極を対象細胞の 10 μm 右側に設置し交流電圧 (10 MHz, 10 V_{pp}) を印加すると、細胞は電極先端に向かって移動し電極先端の微小孔内に導入された。細胞は p-DEP により電場が相対的に高い微小孔内に捕捉された。細胞が捕捉される際、最初はゆっくりと電極方向に移動するが、細胞-電極間距離の減少とともにその移動速度は急激に増加する。細胞が電極に捕捉される直前は、600 μm s⁻¹ に達した。電極に印加する電圧が増加するに応じて移動速度は増加し、捕捉に必要とする時間が減少した。目的位置に細胞を移動させ、n-DEP の斥力を利用して微小孔内の捕捉細胞を排出した。交流電圧 (1.0 kHz, 2.0 V_{pp}) を印加すると、捕捉された細胞は徐々に微小孔内から放出され、20 秒後に電極先端の ITO 表面へと移動した。これは、n-DEP による斥力が細胞に作用したためである。印加電圧を増加させると、電圧印加とともに細胞は急激に排出され、電極先端から 10 μm 以上離れた位置まで移動する。よって、n-DEP による細胞の排出には、2.0 V_{pp} が適していた。この操作を繰り返すことにより、個々の細胞を目的位置に配置してパターンを作製できた。この技術を応用すると、ポラス薄膜の下面に細胞を誘導し細胞配列体を作製した (Fig. 4)。



Fig. 4 Image of the line pattern of cells arranged on the porous membrane.

(3) 作製した電極をグルコース溶液中に挿入しアンペロメトリーを行った。電極電位を +0.7 V にステップすると、酸化電流が観測された。これは、グルコースの酸化に伴う酸素の還元反応で生成した過酸化水素の電極での酸化に起因する。この酸化電流はグルコース濃度の増加に伴い増加し、グルコース濃度 50 mM 以上で飽和した。作製した GOx 修飾電極を用いると 5~50 mM の範囲でグルコース計測が可能であった。

デュアルマイクロ電極の先端に、選択的に酵素修飾微粒子の固定化を行った。作製した酵素電極をリン酸緩衝液中に挿入し、両電極に +0.7 V の電圧を印加した。Fig. 5 に、両電極のアンペログラムを示す。5 mM グルコースを添加すると W2 で酸化電流応答の急激な増加が観測され、W1 ではほとんど応答しなかった。これは、W2 に固定化した GOx の酵素反応により過酸化水素が生成したため

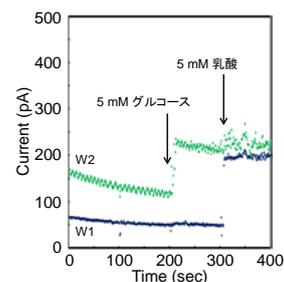


Fig. 5 Oxidation currents of hydrogen peroxide obtained from both electrodes.

ある。一方、5 mM 乳酸を添加すると W1 で急激な酸化電流の増加が観測され、W2 ではほとんど応答しなかった。よって、電極に固定化したそれぞれの酵素に対応する基質を同時にリアルタイムで検出できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 11 件)

- ① Tomoyuki Yasukawa, Takuma Gotoh, Takashi Yasuda, Masato Suzuki, and Fumio Mizutani, Particle Patterning Based on Positive Dielectrophoresis Using a Scanning Microelectrode, *Sensors and Materials*, 2019, 31(1), 23-32.
doi.org/10.18494/SAM.2019.2038
- ② Takatomo Sugano, Yui Sasaki, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Simple Formation of Cell Arrays Embedded in Hydrogel Sheets and Cubes, *Anal. Sci.*, 2018, 34(2), 127-130.
DOI: 10.2116/analsci.33.531
- ③ Kohei Tominaga, Satoshi Arimoto, Ken Shimono, Toshihiko Yoshioka, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Quantitative and single-step enzyme immunosensing based on an electrochemical detection coupled with lateral-flow system, *Anal. Sci.*, 2017, 33(4), 531-536.
DOI: 10.2116/analsci.33.531-536.
- ④ Toshiki Hokuto, Tomoyuki Yasukawa, Ryota Kunikata, Atsushi Suda, Kumi Y. Inoue, Kosuke Ino, Tomokazu Matsue, Fumio Mizutani, Imaging of enzyme activity using bio-LSI system enables simultaneous immunosensing of different analytes in multiple specimens, *Biotechnol. J.*, 2016, 11(6), 838-842.
DOI: 10.1002/biot.201500559
- ⑤ Taishu Tanaka, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Dielectrophoretic Tweezers for Pickup and Relocation of Individual Cells Using Microdisk Electrodes with a Microcavity, *Electrochemistry*, 2016, 84(5), 361-363.
http://dx.doi.org/10.5796/electrochemistry.84.361
- ⑥ Satoshi Arimoto, Ken Shimono, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Toshihiko Yoshioka, Improvement of Electrochemical Response of Cocaine Sensors Based on DNA Aptamer by Heat Treatment, *Anal. Sci.*, 2016, 32(4), 469-472.
http://doi.org/10.2116/analsci.32.469

〔学会発表〕 (計 78 件)

- ① Tomoyuki Yasukawa, Masato Suzuki, Fumio Mizutani. Rapid formation of single-cell pairs for producing hybridomas, 17th International Meeting on Chemical Sensors, University of Vienna, Austria, July 15–19, 2018
- ② 安川智之, 迅速で簡便な細胞操作法の「創る」と「測る」への応用, 静電気学会 2017 年度シンポジウム—静電気工学が拓くナノバイオテクノロジー: 細胞・分子操作の最新動向—, 東工大蔵前会館ロイヤルブルーホール (目黒区), 2017 年 11 月 20 日
- ③ 安川智之, 水谷文雄, 動く小動物を対象とした電気化学, 第 77 回分析化学討論会, 龍谷大学 (京都市), 2017 年 5 月 27–28 日
- ④ Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Rapid Formation of Single-Cell Pairs for Hybrid Cells, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science, Hawaii Convention Center & Hilton Hawaiian Village (Honolulu, Hawaii, USA), October 2–7, 2016.
- ⑤ Tomoyuki Yasukawa, Simple and rapid biosensing system based on manipulation techniques of particles and cells, The 16th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2016), Ramada Plaza Jeju, Juju Island, Korea, July 10–13, 2016.

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 安川智之, 誘電泳動による操作, 細胞の特性計測・操作と応用, 第 1 編第 2 章第 4 節, 147-159, コロナ社, 2016.

- ② 安川智之, 電場を利用した細胞分離, 細胞の特性計測・操作と応用, 第1編第3章第5節, 237-248, コロナ社, 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: アプタマーを利用する標的物質の定量方法

発明者: 安川智之, 岡崎 仁

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-69360

出願年: 2018年

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.html

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。