

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04735

研究課題名（和文）撃力刺激組合せによる非定常力学刺激への細胞応答の解析

研究課題名（英文）Analysis of cell response to unsteady mechanical stimulation by combination of impulsive stimulation

研究代表者

中川 桂一（Nakagawa, Keiichi）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・講師

研究者番号：00737926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では，HzからkHz（1000分の1秒に相当）の力学刺激を細胞へと負荷するための実験システム，およびMHz（100万分の1秒に相当）からサブGHz（10億分の1秒に相当）の力学刺激を細胞へと負荷するための実験システムの開発を行いました．それぞれのシステムにおいて，細胞応答として細胞内カルシウムイオン濃度を計測することが可能です．開発したシステムにより細胞を刺激し，カルシウムイオン濃度の変化を確認しました．

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体は様々な力学刺激に応答することが知られていますが，非常に短い時間で生じる力学刺激に対してどのような応答を示すのか，調べる方法はありませんでした．本研究では，高速な力学刺激が生体の基本単位である細胞に及ぼす影響を調べるツールを開発しました．これにより，力学刺激を用いた予防医療や再生医療への応用，特に超音波など高い周波数での力学刺激を利用した安全・安心な治療技術の確立に貢献することが期待されます．

研究成果の概要（英文）：For investigating cell response to unsteady mechanical stimulation, the experiments systems which allow us load the mechanical stimulation to cells from Hz to kHz (equivalent to 1/1000 s), and from MHz (equivalent to 1/1,000,000 s) to sub-GHz (1/1,000,000,000 s) have been developed. In each system, intracellular Ca<sup>2+</sup> can be visualized as a cell response. We confirmed that mechanical stimulation by the developed systems invoke the changes of intracellular Ca<sup>2+</sup>.

研究分野：生体医工学

キーワード：メカノバイオロジー メカニカルストレス 可視化 音響波 生物物理 レーザー カルシウムイメージング

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体は様々な機械刺激にさらされている。その中でも応募者は医療応用のポテンシャルの観点から、弾性波による機械刺激に注目している。近年、低出力音波による血管新生や骨形成・治癒といった報告がなされている。これらの再生・活性化は機械刺激による生理応答の結果であると考えられているが、具体的な負荷物理量やセンシング機構は不明である。

(2) 一般にメカノバイオロジー研究では、培養細胞を用いた *in vitro* 実験にて、引張やせん断流・静水圧などの、制御しやすい定常的かつスローな物理量の負荷が行われている。これに対し、弾性波による細胞への刺激は非常に高速（音速： $\sim 1 \mu\text{m}/\text{ns}$ ）かつ複雑（反射や屈折、縦波・横波のモード変換などが混在した作用）であり、既存の機械刺激との間に大きな乖離がある。医療への応用を考慮すると、*in vivo* での機械刺激負荷は必須であり、そのツールとして疎密波は極めて有力である。しかしながら、疎密波による刺激の実用化のためには、生じている非定常現象および細胞応答を明らかにし、その効果や安全性を確固たるものとしなくてはならない。

(3) これまでに、衝撃波の医療応用を目指し、衝撃波発生装置や計測システムの開発、衝撃波で惹起されるメカノトランスダクションの調査などを行い、衝撃波による機械刺激の医療応用へのポテンシャルを示してきた。また、より広い視点から、瞬間的な力（撃力）が細胞に与える影響を探究している。細胞は粘弾性を示すため、高い周波数の機械刺激に対しては微小な変位であっても大きな力学作用を受け得る。一方で、細胞骨格・オルガネラなどから成る不均一な構造から、複雑な周波数依存性を示すことが予想される。これらの検証として、細胞に対し任意の瞬間的な力学作用を負荷できる撃力刺激システムと、 $\text{ns} - \mu\text{s}$  の高速物理現象から  $\text{hour} - \text{day}$  という長い時間スケールでの細胞応答まで広い領域を一連して観察可能なオールインワンのシステムを開発してきた。

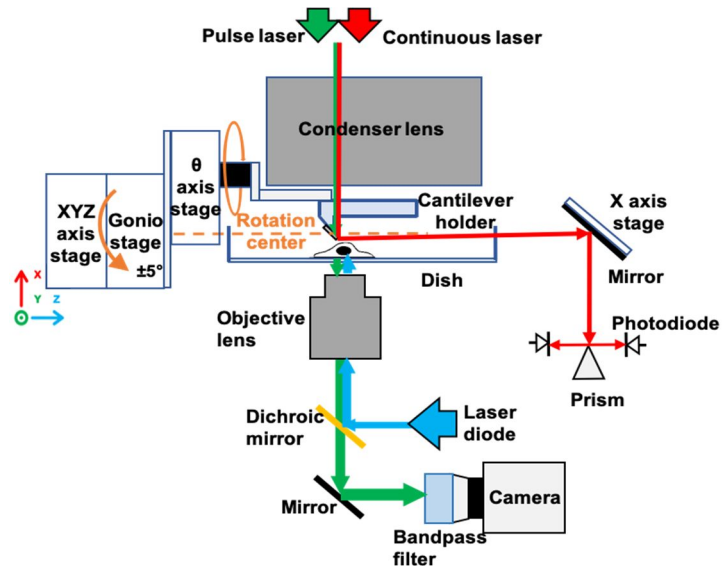
### 2. 研究の目的

本研究では、瞬間的な力学刺激を様々な周波数の刺激の組み合わせとして捉え、それぞれの周波数成分に対する細胞応答を調査可能とする刺激負荷装置、物理量計測システム、そして細胞応答の観察システムを組み込んだ実験系を開発し、その応答を捉えることを目的とする。

### 3. 研究の方法

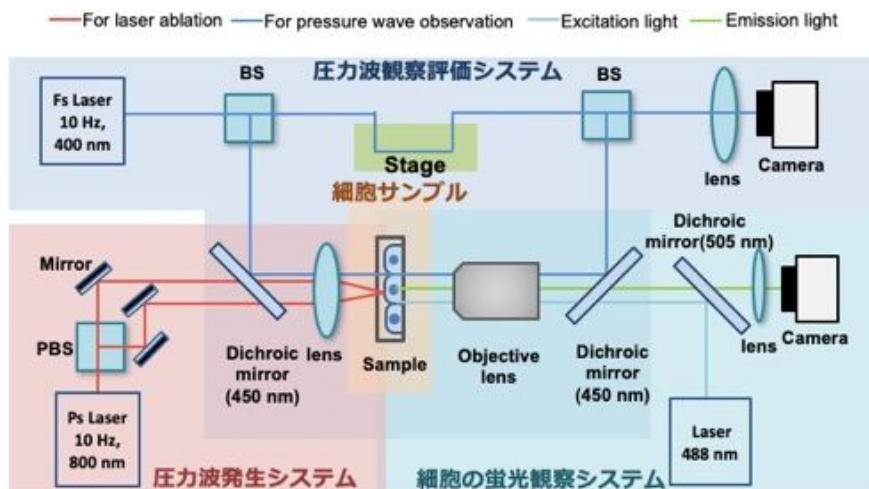
(1) 本研究では、 $\text{Hz} - \text{kHz}$  の周波数帯の力学刺激を負荷する実験系と、 $\text{MHz} - \text{サブ GHz}$  帯の力学刺激を負荷する実験系の2つを構築した。

(2)  $\text{Hz} - \text{kHz}$  の周波数帯の力学刺激を負荷する実験系では、カンチレバーをレーザーパルスで駆動する原理を採用した。このシステムでは、カンチレバーという方持ちばりの根元にナノ秒パルスレーザーを照射し、一時的な熱エネルギーを与えることで、振動を起こし、それを細胞に駆動することにより、高周波刺激を実現している。またカンチレバーは共振周波数で振動し、その挙動を光でこより検出している。さらに細胞応答が観察できるシステムを構築された。これは細胞が応答すると、細胞内のカルシウムイオンが増加することを利用して、カルシウムイオン濃度を検出できる蛍光ポロープを用い、イメージングすることで観察が可能になった。加えて、細胞に対する力学刺激の方向依存性を調べるために、カンチレバーの角度を10度から45度に変更可能な実験系を開発した。



(3)  $\text{MHz} - \text{サブ GHz}$  帯の力学刺激を負荷する実験系では、レーザー干渉技術を用いて圧力波を発生させ、細胞応答時のカルシウムイオン濃度変化をイメージングする実験系を構築した。設計した光学システムは圧力波発生システム、圧力波観察評価システム、細胞サンプルと細胞の蛍光観察システムの4部分からなる。圧力波発生システムでは、光の干渉現象を応用して、レーザー光をビームスプリッターで二つに分け、同じ光路長に保たれた二つのビームをスポットが重なるように

集光させ、干渉縞模様のレーザアプレーションを起こし、圧力波を生成させる。圧力波の波長 $\lambda$ は、二つのビームがなす角度 $\theta$ によって制御できる。また、干渉計測を用いることで、圧力波を可視化し評価することが可能である。



#### 4. 研究成果

(1) カンチレバーの実験系について、基礎的な評価を行った。まずカンチレバーを45度に設定した際の角度を計測し、その誤差を評価した。カンチレバーに製作誤差が存在していることから、カンチレバーが水平になっているときのイメージング画像を基準にし、固定されたカンチレバーのイメージング画像上の長さとの比を用いることとした。角度の実測値は  $43.1^\circ \pm 0.98^\circ$  となった。実測値が  $45^\circ$  より若干小さい理由として、固定治具の製作誤差や画像処理による誤差などが考えられる。

(2) また、蛍光シグナル観察の評価実験を行った。細胞死によりカルシウムイオン濃度が上昇することを利用して、故意にカンチレバーで細胞死を起こし、イメージング系の蛍光シグナル上昇を確認した。細胞には HeLa 細胞株を、蛍光プローブには Fluo4-am (励起光波長 495 nm) を用いた。任意の細胞を ROI として選定し、この ROI 領域内の時系列輝度平均値を全てとり、またそれらを  $t=0$  のときの輝度平均値を基準に正規化した。最大 1.47 倍の蛍光強度変化が得られた。細胞にスクラッチを入れることで、蛍光強度が増すことが確認できたため、本システムでは細胞応答時のカルシウムイオン濃度変化が観察可能であることが確認できた。

(3) 構築したカンチレバーでの細胞刺激システムを用い、細胞応答の計測を行った。複数の条件にて細胞応答の調査を行い、およそ 5% の細胞に応答がみられることを確認した。

(4) レーザ誘起圧力波による細胞応答の検証を行った。まず、細胞を封入する高さ  $5.5\mu\text{m}$  の細胞コンテナを作製した。コンテナ中に細胞を播種し、蛍光シグナルを計測するための蛍光分子、および光吸収体として働くカーボンコロイドを封入した。細胞がない部位にてレーザパルスを集光させることで、圧力波の平面波を形成することが可能である。実験には NIH3T3 細胞株を用い、細胞応答としてカルシウムイオン濃度変化を計測した。圧力波の負荷の結果、およそ 10% の細胞で応答がみられた。細胞内カルシウムイオン濃度は、一過性に上昇する細胞もあれば、振動を繰り返す細胞も見られた。

(5) レーザ干渉を利用し、圧力波の波長、すなわち力学刺激の周波数を可変制御可能であることを検証した。可視化には干渉計測およびシャドウグラフ法を用いた。干渉の角度を変化させた実験の結果、波長約  $2.4\mu\text{m}$  および約  $11.1\mu\text{m}$  の圧力波が形成されたことを確認した。これにより、本研究の目的である、圧力波の波長と細胞応答の関係性を調査するため、異なる波長を持つ圧力波の負荷を可能とするシステム開発が達成された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高鶴蒙, 中川桂一, 柳生右京, 水野隼人, 塚本哲, 佐久間一郎
2. 発表標題 方向依存性を考慮した瞬間的刺激に対する細胞応答の調査
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川桂一
2. 発表標題 細胞と音波の超高速インタラクション可視化への挑戦
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高鶴蒙, 石島歩, 佐伯峻生, 塚本哲, 中川桂一, 佐久間一郎
2. 発表標題 細胞応答の圧力波波長依存性を調査するレーザー干渉圧力波発生システムの開発
3. 学会等名 2019年度衝撃波シンポジウム
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----