

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K14750

研究課題名（和文）細胞を利用した大気中駆動型ワイヤレス微小サイズ力センサの開発

研究課題名（英文）Development of a Cell-Based Atmospheric-Driven Wireless Micro-Size Force Sensor

研究代表者

上杉 薫 (Uesugi, Kaoru)

茨城大学・理工学研究科（工学野）・助教

研究者番号：20737027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類細胞（ラット平滑筋細胞：A7r5）と両生類細胞（繊維芽細胞：XTC）への遺伝子導入条件を明らかにした。また、FRET計測を可能とする顕微鏡観察系を構築した。更に、顕微鏡上で観察しながら、細胞や構造体に引張負荷を与えるための引張試験システムを開発した。そして、FRET機能導入細胞に対して引張刺激を加え、蛍光観察結果からFRET比を導出し、分析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞を利用して、大気中でマイクロニュートンからミリニュートンレベルの力を測定できる微小サイズの力センサという構想は、これまで存在しない、全く新しい挑戦である。これまでFRET技術は細胞内や組織内の力分布を観察するために使用されてきたが、マイクロニュートン、ミリニュートンレベルの計測には利用されていない。また、FRET技術を用いた大気中での力測定も存在しなかった。本研究が実現した暁には、組織、器官、個体レベルにおける、マイクロニュートンからミリニュートンレベルのレンジにおいて、これまで難しいとされていた力計測が可能となり、生物学、医学、工学、化学、更には物理学などの領域の発展に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：We clarified the conditions for gene transfer into mammalian cells (rat smooth muscle cells: A7r5) and amphibian cells (fibroblasts: XTC). And, we constructed a microscopic observation system that could evaluate the FRET ratio. additionally, we developed a tensile test system that could apply tensile loading to the cells and the cell adhering structures while microscopic observation. Then, we applied tensile stimulation to FRET-transfected cells and derived and analyzed the FRET ratios from fluorescence observations.

研究分野：バイオ計測工学

キーワード：FRET 力センサ 細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞は生物の最小単位であり、小型で軽く、様々な形状にアセンブリが可能である。また、化学エネルギーによる駆動が可能で、電源供給の配線が必要ない。更に、生体適合性、親和性が非常に高い。加えて、伸びや収縮といった機械的な負荷にもフレキシブルに対応できる。そして、自己増殖能を持つため安価に大量生産が可能である。また、ボトムアップ的なファブリケーション、自己修復能力、自己改変能力、低環境負荷等の特徴を持つ。このような特徴を持つ細胞を力センサに応用することで、全く新しい力センサとして生物の力学的特性測定に応用できると考えた。

細胞を用いた力測定方法として、我々は Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) に注目した。力測定に蛍光解析を用いるため、ワイヤレスに力情報を取得することが可能である。FRET 技術は細胞内の力学的情報を取り出すことができるため、これまでも細胞内や組織内の力分布を観察するために使用されてきた。しかしながら、マイクロニュートン、ミリニュートンレベルの計測には利用されていない。また、細胞培養環境が必要であるため、大気中での力測定ができなかった。MEMS 技術を応用し、微小構造体と細胞を組み合わせることで、以上の問題が解決できると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞を使用した微小サイズのカセンサを用いて、マイクロニュートンからミリニュートンレンジでの力測定を大気中で行うことである。そのために、FRET 機能導入細胞を力測定に利用できるか確認する。具体的には、FRET 機能を導入した細胞が表面に接着した非生物構造体を、外力を用いて変形させ、変形した際の FRET 比を解析することで、構造体にかかった外力の大きさを評価する。

3. 研究の方法

FRET 機能遺伝子を導入した細胞に引張刺激を加え、ひずみ量に対する FRET 比の変化を確認した。

まず、細胞に対する FRET 機能遺伝子の導入条件を明らかにした。また、FRET 観察を可能とする観察系を構築した。そして、構造体上で FRET 機能導入細胞を培養し、構造体全体にひずみを与えた時の細胞の FRET 比の変化を観察した(図1)。構造体は培地中での細胞培養を目的とし、チャンバ形状をしている。チャンバは生体適合性のあるシリコンゴムである Poly(dimethylsiloxane)(PDMS)から成る。更に、チャンバにひずみを与えながら細胞の共焦点蛍光観察を可能とする引張試験システムの開発も行った。

FRET 解析に際しては、レシオ測定法を用いた。アクセプタの蛍光である mCherry をドナーの蛍光である GFP で割ることで FRET 比を導出した。

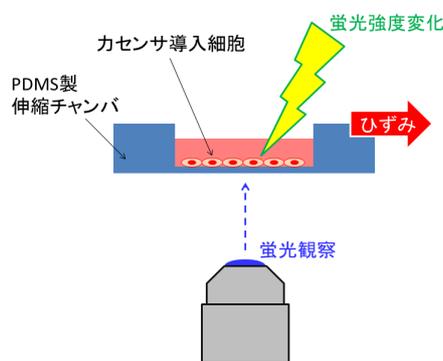


図1 伸縮刺激を与えた細胞の FRET 観察

4. 研究成果

細胞に対する FRET 機能遺伝子導入条件の検討

今回検討した細胞は哺乳類細胞(マウス繊維芽細胞: NIH3T3, ラット平滑筋細胞: A7r5)と両生類細胞(繊維芽細胞: XTC)であった。まず哺乳類細胞に関して、NIH3T3 は報告者によって既に FRET 機能遺伝子の導入条件が明らかになっていたが、接着力やアクチンフィラメントの発達がより良い A7r5 に注目した。また、XTC は温度、pH に対する許容条件が広く、インキュベータ外で駆動する力センサに適している。遺伝子導入方法に関しては、導入効率が高く、オペレーションも簡単なリポフェクション法を用いた。そして、A7r5, XTC に関して効率の良い遺伝子導入条件を明らかにし、FRET 機能遺伝子の導入に成功した。今回使用した FRET はドナーに GFP、アクセプタに mCherry を使用しているが、図2のように GFP、mCherry 共に蛍光が観察された。

XTC は温度や pH の変化に対して寛容という特徴を持つ一方で、増殖スピードが遅く、接着力も弱いという欠点があった。そこで、最終的な引張試験においては、

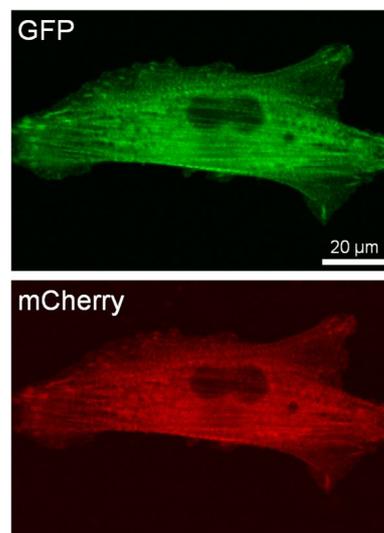


図2 FRET 機能遺伝子を導入された哺乳類細胞(A7r5)

A7r5 を使用した .

FRET 観察系の構築

FRET を観察するためには専用の観察システムが必要となるため、観察系を構築した . 観察系は倒立顕微鏡 (Ti2E, NIKON), 共焦点観察システム (CSU-X1, YOKOGAWA), イメージスプリッタ (W-view gemini, Hamamatu photonics), 及び好感度 CCD カメラ (ORCA-Fusion, Hamamatu photonics), 更に多点でのタイムラプスを可能とする自動ステージ (SCAN IM, NIKON) から成る . 細胞全体を観察画面内に収めるため、及び PDMS チャンバ膜の厚み (200 μm) をカバーしたワーキングディスタンスを得るために 20 倍対物レンズ (Plan Apo 20x/0.75, NIKON) を用いた .

引張試験システムの開発

図 3 に開発したシステムを示す . 本システムは PDMS チャンバを最大 2 つまで装着可能であり位相差観察用コンデンサレンズに干渉しないよう設計されている . 今回は片側のみにリニアアクチュエータを設置しているが、両側にリニアアクチュエータを設置できるようにもネジ穴やスペースが設計されている . 使用しているステージは 1 μm ステップで制御可能であり、モータドライバによってステップ分割することでより滑らかにひずみを与えることが可能である .

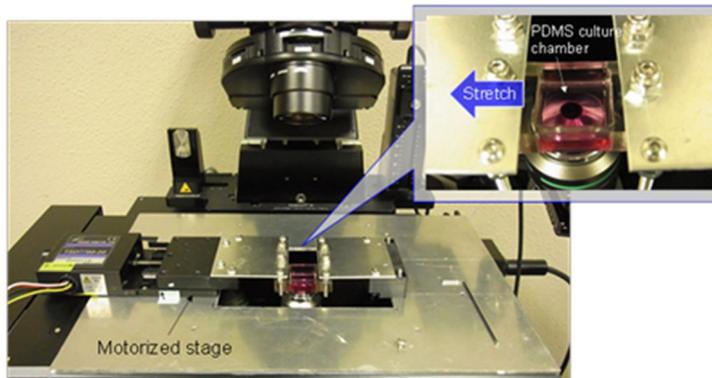
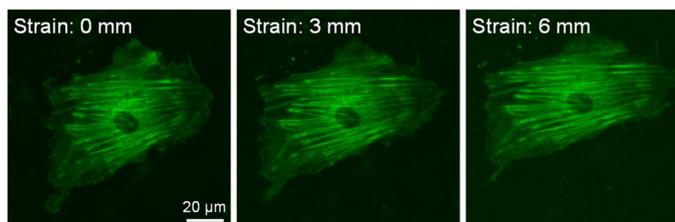


図 3 FRET 観察用引張試験システム

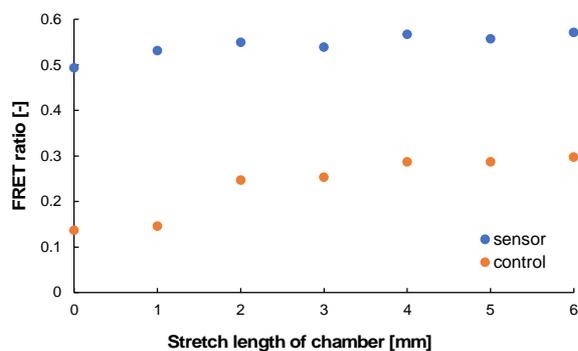
FRET 機能導入細胞に対する引張刺激

PDMS チャンバ内で培養した A7r5 細胞に引張試験システムを用いてひずみを与え、この時の細胞の蛍光観察を行った . 実験は、FRET 機能が組み込まれたセンサ細胞、蛍光分子が組み込まれていないコントロール細胞の両者に対して行った . チャンバに対して 1 mm ずつひずみを与え、6 mm まで引っ張った . この時、細胞内の粘弾性の影響を抑えるために引張速度は 0.02 mm/s とした .

図 4a にひずみを与えた際の細胞を示す . チャンバに与えたひずみに応じて細胞も歪んでいることが確認できた . 図 4b にセンサ、コントロールそれぞれの細胞における FRET 比を示す . センサ、コントロール共に引張刺激によって FRET 比が上昇していることが確認された . これは、FRET の挙動としては不自然である . そこで、長時間観察における蛍光強度の変化を観察し退色の影響を確認したところ、センサ、コントロールいずれも大きな FRET 比の変化は見られず、本結果が退色の影響によるものでないことが考えられる . このことから、今回は FRET によるひずみ量評価は行えなかったものの、FRET 以外の効果によっても細胞や構造体のひずみを蛍光観察によって評価できる可能性が示唆された .



(a)



(b)

図 4 哺乳類細胞 (A7r5) に対する引張刺激(a), 及びその FRET 比 (青 : センサ, 赤 : コントロール)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 K. Uesugi, K. Nishiyama, K. Hirai, H. Inoue, Y. Sakurai, Y. Yamada, T. Taniguchi, K. Morishima	4. 巻 11
2. 論文標題 Survival Rate of Cells Sent by a Low Mechanical Load Tube Pump: the “Ring Pump”	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 micromachines	6. 最初と最後の頁 447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11040447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 S. Romanazzo, K. Uesugi, A. Taniguchia, G. Forte, K. Morishima	4. 巻 15
2. 論文標題 Measurement of the bio-mechanical properties of two different feeder layer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Open Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 12-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1874070702115010012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 上杉薫, 佐藤賢也, 長山和亮	4. 巻 21
2. 論文標題 細胞への静水圧刺激負荷による紫外線誘導DNA損傷の抑制効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験力学	6. 最初と最後の頁 208-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11395/jjsem.21.208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 喜多則文, 武藤潤, 長山和亮, 上杉薫
2. 発表標題 再生皮膚組織の機械的特性評価に適した引張試験システムの開発
3. 学会等名 関東学生会第60回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝口裕也, 長山和亮, 上杉薫
2. 発表標題 聴覚を用いた細胞情報評価方法の提案
3. 学会等名 関東学生会第60回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多則文, 武藤潤, 長山和亮, 上杉薫
2. 発表標題 組織工学的に構築された皮膚組織の機械的特性評価システムの開発
3. 学会等名 日本機械学会 2020年茨城講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝口裕也, 長山和亮, 上杉薫
2. 発表標題 “耳”を用いた細胞情報評価への挑戦 ~細胞の声を聞く~
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会13.0
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上杉薫, 小幡祥太, 長山和亮
2. 発表標題 顕微鏡下マイクロ引張試験機による単一細胞の機械的特性・及び接着力の同時評価 ~微小管重合阻害した子宮頸癌由来HeLa細胞の力学的特性変化~
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Uesugi
2. 発表標題 Measurement and Evaluation of Mechanical Properties of Living Things by Developing Force Measurement Systems and Fixtures
3. 学会等名 International Workshop on Molecular Cybernetics: Toward Chemical AI (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------