

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15152

研究課題名（和文）接着性細胞の接着ダイナミクスに対する力学光学同時計測

研究課題名（英文）Simultaneous mechano-optical measurements for adhesion dynamics of adherent cells

研究代表者

塚越 拓哉（Tsukagoshi, Takuya）

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：90782920

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）：表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance；SPR）によって細胞接着を計測するために、SPRセンサのセットアップを構築した。ガラス基板上に蒸着した金属膜にSPRを励起するのが一般的だが、本研究では後々の力計測を考慮して、シリコンウエハ上に蒸着した金膜を用いた。金膜に培地が触れた状態でSPRを励起させ、SPRを電流により検出しながら、培地に細胞懸濁液を加えた。SPR電流は10分ほどかけて低下し、その後安定した。これは、金膜に細胞が接着し、金膜近傍の実効的屈折率が高くなり、SPR電流が低下したものと推測される。また、MEMS力センサを用いて、細胞の収縮力を計測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の機能や構造については多くの研究が重ねられ、詳細な知見が得られている。特に、蛍光顕微鏡の発達で細胞生物学において果たした役割は計り知れない。本研究は蛍光顕微鏡のような視覚的手段の苦手な部分を補い、細胞接着など、細胞小器官で起こる動的現象を捉えようとするものである。例えば、接着斑のはたらきについての教科書の説明では、細胞と基質が接着している断面図が示されるが、実際には見ることはできない。細胞を蛍光染色すれば接着斑が形成されたことはわかるが、基質に接着したかどうかはわからない。細胞接着のダイナミクスをSPRで定量化できれば、そこに介在する生命の原理や物理現象を知ることができる。

研究成果の概要（英文）：To measure cell adhesion by Surface Plasmon Resonance (SPR), we constructed an SPR sensor setup. Although it is common to excite SPR on a metal film deposited on a glass substrate, in this study, a gold film deposited on a silicon wafer was used in consideration of later force measurement. SPR was excited while the medium was in contact with the gold film, and cell suspensions were added to the medium while the SPR was detected by the current; the SPR current decreased over 10 min and then stabilized. This is assumed to be due to the adhesion of cells to the gold film, which increased the effective refractive index in the vicinity of the gold film, causing the SPR current to decrease. The contraction force of the cells was also measured using a MEMS force sensor.

研究分野：センサ工学

キーワード：MEMSセンサ 表面プラズモン共鳴 接着性細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞の力学的センシング機能が明らかになり、生命活動において重要な役割を果たしていることがわかってきた(メカノバイオロジー)。とりわけ重要な機能として、接着性細胞の力覚があり、多くの細胞が外部環境の「硬さ」をセンシングし、硬さに応じて異なる細胞に分化することが実験的に確かめられている。こうした力覚は個体発生において重要な役割を果たしていると想像されるが、そのメカニズムはわかっていない。細胞の力学的特性を調べるために、トラクション力や弾性係数を実験的に計測する研究が盛んに行われているが、細胞力覚の本質を理解するためには、力学的計測システムの感度と時間分解能を向上することに加えて、細胞のダイナミクスを複合的に計測することが必要となる。

細胞の細胞の機能や構造についてはこれまでに多くの研究者が研究し、極めて詳しい知見が得られている。一方、細胞小器官のスケールで起こるダイナミクスは、観察が難しいため、私たちの知見は必ずしも十分ではない。こうした観察において、蛍光顕微鏡技術の発達は計り知れないほどの恩恵をもたらしたが、その時間・空間に対する分解能には限界がある。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光顕微鏡観察と相互に補完し合う計測技術として、細胞の収縮力と屈折率(変化)の計測を提案するものである。例えば、細胞接着について解説する場合、教科書などでは接着部分の断面図(接着面に垂直な平面)が用いられるが、このような観察は実際にはできない。また、接着班を染色すれば、接着班が形成されたことはわかるが、それが基板に接着しているかどうかはわからない。このように、蛍光観察では手の届かない領域を埋めて、細胞接着のダイナミクスへの理解を深めることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

細胞接着を表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)によって観察するために、SPRのセットアップを構築した(図1)。光源には波長1550 nmの赤外レーザーを用い、レーザー光を偏光ビームスプリッタに通すことによって、SPRを励起可能なp偏光だけをセンサへ照射した。SPRセンサは回路基板、SPRセンサチップ、試料チャンバにより構成され、SPRセンサチップ(シリコンウエハ)には金の薄膜が形成されている(図2)。図には示されていないが、回路基板の中央部には開口が設けられており、開口部分で試料チャンバ内の液体試料と金薄膜が接触するように設計されている。波長1550nmの帯域においてシリコンは透明なので、シリコン側から入射する赤外レーザー光は、金薄膜に到達し、入射角などの条件が合えば金薄膜にSPRが励起される。SPRセンサチップのシリコンと金の境界面には、ショットキー障壁が形成されるように設計されているので、SPRが励起されると障壁を介して微小電流(SPR電流; 100 nA程度)が流れる。この微小電流をソースメータで計測する。SPRの励起条件は金薄膜に接する部分の液体試料の屈折率に依存する。つまり、液体試料の屈折率が変化すると、SPRが励起される入射角が変化する。

従来のSPRのセットアップでは、入射角を走査してSPRが励起される入射角を見つけ、その角度によって屈折率を算出する。しかし、それでは1回の計測に長時間を要してしまい、液体試料の動的変化を捉えることができない。そこで本研究では、計測開始時の液体試料に対してSPRが最もよく励起される(SPR電流が最大である)ように入射角を調整し、液体試料の屈折率変化はSPR電流が低下することにより検出できる。細胞を用いた計測の場合は、培地の状態で計測を開始し、その後細胞懸濁液を注ぐ。細胞が金薄膜の表面に接着し始めると、表面近傍の実効的屈折率が変化(おそらく増大)するため、SPR電流が低下するものと予想される。細胞としては、マウスの筋芽細胞(C2C12)を用いた。

細胞の力計測のためのセットアップを図3に示す。シャーレの底に固定された可動培養基板の上に、ヒトiPS細胞由来の心筋細胞(human iPS cell-derived cardiomyocyte; hiPSCCM)を播種し、3

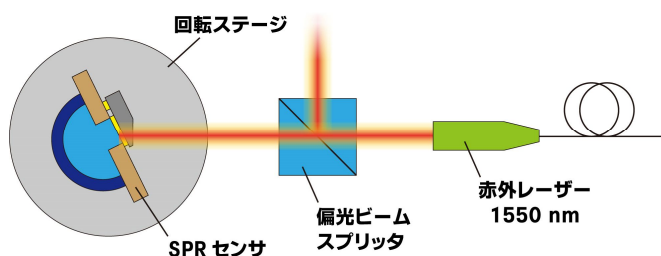


図1 SPR センサの計測セットアップ

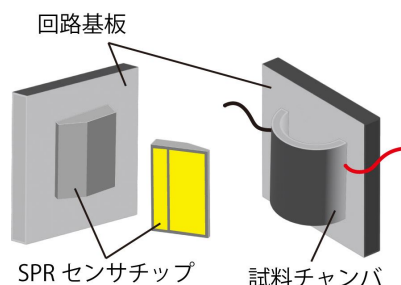


図2 SPR センサ

日間程度培養して、拍動を確認した上で計測を行った。可動培養基板には固定部（厚い部分）と可動部（薄い部分）があり、両者をまたぐように接着したhiPSCCMはその拍動力によって可動部を動かす。可動部の突起に力センサを引っかけることによって、hiPSCCMの拍動力を間接的に計測できるようになっている。力センサはピエゾステージに固定されており、顕微鏡で観察しながら、その先端を突起に接触させる。細胞の活性が失われないように、シャーレをヒーターで温めながら実験を行う。

力センサはピエゾ抵抗効果を利用したものであり、変形による抵抗値変化をブリッジ回路によって電圧信号に変換し、さらにアンプ回路により増幅してデータロガーで検出する。ピエゾステージはFPGAで制御するが、センサ信号をFPGAにフィードバックする構成になっているので、例えば力の強さに応じて細胞に力学的負荷を与えることも可能である。

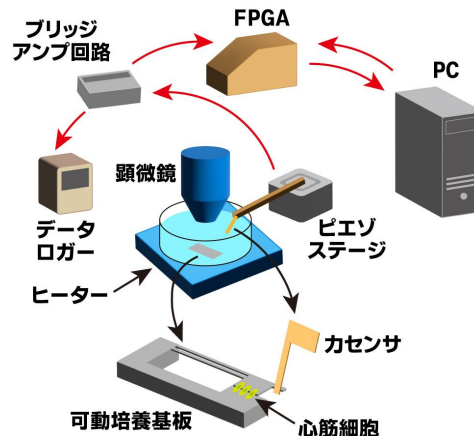


図3 細胞の力計測のセットアップ

4. 研究成果

SPR センサの計測セットアップ（図1）を用いて、細胞接着のプロセスを計測した。SPR センサ（図2）の試料チャンバを純水で満たした状態で、赤外レーザーを照射し、回転ステージを回転させながら、SPR電流を検出した。その結果、所定の入射角においてSPR電流は鋭いピークを示し、SPRが励起されたことがわかった。このときの入射角をSPR角と呼ぶことにする。次に、入射角 = SPR角となるように回転ステージを調整し、SPR電流の値を30分間計測した（図4）。計測開始時に電流値が急増したのは、赤外レーザー光が照射されたことによる。SPR電流の値に大きな変化はなく、一定の値に安定していることがわかる。

次に同じ方法で接着性細胞に対する計測を行った。計測にはマウスの筋芽細胞（C2C12）を用いた。試料チャンバ内に培地を注ぎ、純水のとおり同じように計測を開始した。赤外レーザー光が照射されるタイミングで、チャンバ内の培地にC2C12の懸濁液を加え、SPR電流の計測を続けた。その結果、SPR電流は10分ほどかけて低下し、その後、一定値に安定した。

最初の10分間に電流が低下した真の理由は、追加の計測・観察を要するが、1つの仮説を提起することができる（図5）。入射した赤外レーザー光は培地中ではエバネッセント波となるため、SPRの励起条件は培地全体ではなく、金表面近傍（レーザー光の波長程度）の屈折率によって決まる。したがって、金の表面に培地が触れていた状態から、細胞が接着した状態に変化すれば、金表面の実効的屈折率が変化し、SPR角がシフトする。実際、細胞質や細胞膜の屈折率は水よりもわずかに高いことが知られている。細胞が金の上に存在すれば、SPR角は細胞の屈折率で決まるはずだが、計測データからは電流値が約10分かけて徐々に低下していることがわかる。その理由については、以下のように推察している。細胞が金の上に乗った直後は、両者の間に培地の膜が存在し、SPR角は培地の屈折率によって決まる。その後、C2C12は徐々に接着班を形成させ、金との密着状態を増し、培地を追い出していくのではないかと推察している。このプロセスに約10分という時間が費やされているものと推察している。以上はあくまで仮説の域を出ておらず、実験的に実証する必要がある。本研究ではこの実証までは至らなかったが、細胞の接着プロセスをSPRによって定量化した意義は決して小さくはない。実証のプロセスには、蛍光顕微鏡による動的観察、トリプシンなどによる細胞剥離、非接

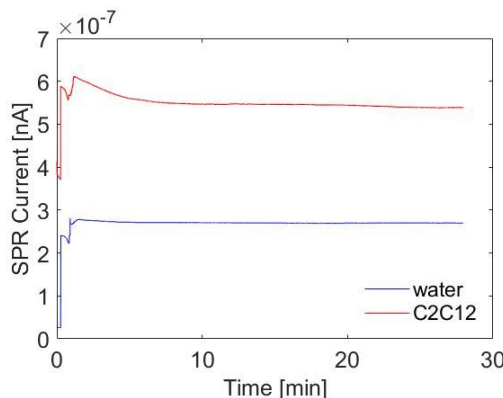


図4 SPRによる細胞接着の計測

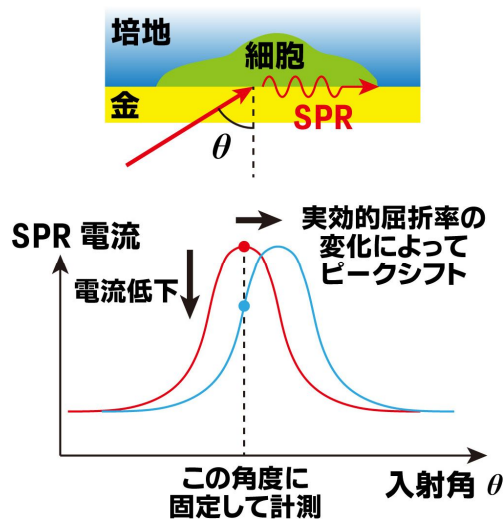


図5 電流値低下の理由

着性細胞との比較、などの方法が効果的だと考えている。あるいは、本研究の SPR 計測との併用も有効であろう。

細胞の拍動力を計測した結果を図 6 に示す。計測には図 3 のセットアップを利用し、細胞は hiPSCCM を用いた。可動培養基板上に播種し、数日間培養して拍動するようになってから、計測を行った。図 6 からわかるように、hiPSCCM は規則正しく拍動しており、その拍動の様子が力センサによって捉えられている。拍動周波数は温度によって変化し、低温になるほど周波数が低下した。温度と拍動周波数との間には、きれいな線形性があり、直線でもかなりよくフィッティングすることができた。直線の傾き(温度係数)は細胞群ごとに大きくばらつきがある一方で、温度軸切片、つまり拍動が停止する温度は概ね一定であった(20.7 ± 2.7)。ヒトをはじめとする哺乳動物(ただし、クマなどの冬眠する種を除く)の心臓は 20 前後で停止することが知られているが、同様の性質が心筋細胞レベルでも見られることがわかった。臓器としての心臓の場合、洞結節などの神経活動が関わっていると言われるが、そのような器官をもたない細胞群でも 20 前後で拍動停止することは興味深い。

SPR を電流として検出するセンサシステムを構築する中で、多くの発見やアイデアが生まれた。SPR による物質の定量化において、リアルタイム性をもたせるためには、入射角走査をやめ、入射角を固定して電流値によって試料の濃度等を推定する方法が有効である。しかし、その場合、計測したい濃度範囲(ダイナミックレンジ)にわたって、SPR のピーク(図 5)が重なり続ける必要がある。つまり、ダイナミックレンジを広くするためには、SPR ピークの幅を広げる必要がある。一方で、SPR ピークの幅が狭いほど(ピークが鋭いほど)濃度などの検出感度が高い。そもそも、ピークが鋭いので検出感度が高いというのが、SPR の特徴である。したがって、入射角固定の SPR 計測では、ダイナミックレンジと検出感度とがトレードオフの関係にある。私たちはこのトレードオフを克服するために、ピーク幅を制御する技術、ピーク位置をフィードバック制御する技術、などを開発し、実際に機能することを実証した。

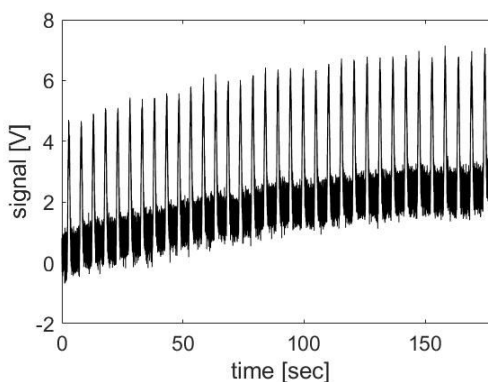


図 6 心筋細胞の拍動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryota Ikegami, Takuya Tsukagoshi, Kenei Matsudaira, Kayoko Hirayama Shoji, Hidetoshi Takahashi, Thanh-Vinh Nguyen, Takumi Tamamoto, Kentaro Noda, Ken'ichi Koyanagi, Toru Oshima, and Isao Shimoyama	4. 巻 23
2. 論文標題 Temperature Dependence of the Beating Frequency of hiPSC-CMs Using a MEMS Force Sensor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 3370 ~ 3370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s23073370	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤拓海
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴センサにおける検出感度とダイナミックレンジの両立
3. 学会等名 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚越拓哉
2. 発表標題 ショットキー障壁を用いた表面プラズモン共鳴の電氣的検出
3. 学会等名 電子情報通信学会 電子デバイス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上怜汰
2. 発表標題 MEMS力センサを用いた心筋細胞の拍動計測
3. 学会等名 電子情報通信学会 電子デバイス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池上 怜汰
2. 発表標題 MEMS力センサを用いたヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動計測
3. 学会等名 ライフサポート学会 第32回フロンティア講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://isd.pu-toyama.ac.jp/~kentaronoda>

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