

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04194

研究課題名(和文)細胞分析デバイスによる細胞外シグナルの計測およびその細胞の未来予測

研究課題名(英文) Measurement of extracellular signals using cell analysis devices and prediction of the future of the cell

研究代表者

中島 義賢 (Nakajima, Yoshikata)

大阪大学・エマージングサイエンスデザインR3センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：40408993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の状態が時々刻々変化していく様子を「電気信号」によって評価することができれば、薬への細胞の感受性、投薬のタイミング、投薬効果の増強、または、副作用の軽減に関する薬学・医学的研究への貢献につながると考える。そこで細胞活動で生じる乳酸産出時に同時に溶液中に放出されるプロトン(H<sup>+</sup>)を細胞外シグナルとし細胞分析デバイスにより検出することが可能かを試みる。ここでNdNiO<sub>3</sub>材料の『プロトン取込量により最大5桁の電気抵抗が変化』する特性を利用し、細胞が時間変化で見せる変化を判定することができるかその基礎実験結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外シグナルが計測できる分析デバイス作製のために、プロトンを取り込むとその抵抗率を変える材料を用いてその評価を行った。動作環境は細胞培養下を想定しているため、材料および分析デバイスには、1)培養液により腐食や融解が起こらないこと、2)使用する材料から細胞へ有害な影響を及ぼさないこと、が求められ、それらを満たすことを確認した。そして、プロトンのNdNiO<sub>3</sub>膜中への取り込みにより材料特性である金属-絶縁体相転移に由来する電流変化が得られた。これらの結果は、プロトン細胞外シグナルとした分析デバイス作製、そして、ラボオンチップの電子デバイス化に向けた足掛かりを示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：If we can evaluate the cellular state, which changes from time to time, using "electrical signals," we expect to contribute to pharmacological and medical research on cellular sensitivity to drugs, timing of drug administration, enhancement of drug efficacy, and reduction of side effects.

In this study, we attempted to determine whether the proton (H<sup>+</sup>) released into the solution during lactate production, which occurs during cellular activity, can be used as an extracellular signal and detected by a cellular analysis device.

Here, we show the results of a basic experiment to see if it is possible to determine the changes that cells show over time by using the property of NdNiO<sub>3</sub> material that the electrical resistance changes by up to five orders of magnitude depending on the amount of proton uptake.

研究分野：バイオエレクトロニクス

キーワード：電気信号 細胞外シグナル 細胞分析デバイス プロトン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スマートウォッチを代表としたウェアラブルデバイスによる生体信号検出の研究・応用は近年急速に発展していて、たとえば、心肺停止のリスクを血中酸素濃度、心電図の日常的監視によるバイタルデータの取得により急変時の早期対応の手助けができ、また、汗に含まれる抗体や酵素などの分泌物を分析することで、利用者へ最適な健康状態を維持するための情報提供ができる所まで来ている。そして、細胞の表面抗原や膜タンパク質などの認識、細胞の活性や分化・増殖に影響を及ぼす環境を含む細胞外シグナルの見識が加われば、fitness/wellness デバイスにとどまらず、在宅で各々による日常的な検診、発症前診断などの予防医療分野への展開が期待できる。

このような背景のもと申請者らは、細胞表面に吸着した生体分子により、対象サンプルの泳動速度が異なることを初めて明らかにし、酵素・蛍光染色・放射性元素などの標識を用いずに反応量を見積ることができる測定手法の提案、対象サンプルの表面特性のパラメータとしてゼータ電位に注目し、加えて、数と大きさの評価を同時にできる電気泳動コールター法を提案し、『電気信号』による血液診断デバイスへの基礎実験を試みた。そして、浮遊腫瘍細胞の生死判定が可能であること、老化細胞の評価へと研究を進めてきた。

ウェアラブルデバイスやシングルセル解析の今後の発展には、「電気信号」による細胞の状態変化の評価ができることが必要になると考える。シングルセル解析のためにはマイクロ流路が有効であると考え、ほとんどが顕微鏡による評価となっているため電子デバイス化(細胞分析デバイス)が必要で、また、細胞外シグナルを理解するためには、より多くの生体材料による評価が必要である。

### 2. 研究の目的

細胞分析デバイスと細胞・生体物質が接するバイオ界面での相互作用によりデバイスから出力される「電気信号」の解析結果は予防医療における新たな指標として活用できる可能性を有し、従来の光学顕微鏡による細胞観察との比較により得られた結果は、デバイスによる日常的な検診、発症前診断などへの展開が期待できる。

そこで、細胞分析デバイスによる細胞外シグナル計測によるその細胞の未来予測を行う技術の確立を目的として試みる。

### 3. 研究の方法

#### a) 水素吸蔵体(イットリウム)の水素化による材料特性の変化と制御

イットリウムは、水素の反応・貯蔵の割合により  $\gamma$   $\text{YH}_2$   $\text{YH}_3$  と変化し、光学特性および電気特性が劇的に変化する。一方、それらの状態の制御・維持が困難であった。この材料に Pt を用いることで水素化が容易になることを示し、絶縁体材料を組合せることで、それぞれの状態の制御・維持が可能であることの感触を掴んでいる。この知見を活かし、水素化によるイットリウムの結晶構造、そして電気的特性への影響を調べる。脇道にそれるが、水素・燃料電池素材としても高いポテンシャルを有するため、注意深く評価を進めていく。

a)-2) 細胞外シグナルの「電気信号」による検出  
図 1 内の 3) に示している、くし型電極に水素吸蔵体を用い、電極に接触している細胞から放出される水素イオンを検出できるデバイスの作製を図る。周波数応答アナライザによる電気インピーダンス測定系とくし型電極を組合せ、細胞内外の電気信号を計測できるようにして、投薬後の時間変化での細胞の状態変化の判定を行う。ここから、正常(若い)細胞と老化細胞を実験対象として用いる。

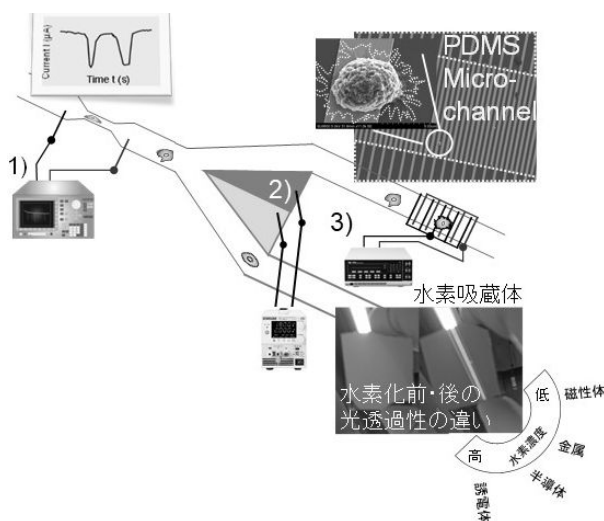


図 1. 細胞分析デバイスの概略図

#### b) 正常細胞と老化細胞の同一環境培養下における正常細胞の老化の計測・判定

図 1 内の 1) にて、細胞表面のゼータ電位測定を行い、2) にて、そのゼータ電位差を利用した細胞の仕分けを行う。3) にて、水素イオンの放出量から 2) で仕分けられた細胞が正常細胞と老化細胞に分類されているかの確認を行う。植え継いだ細胞は一斉に老化細胞になるわけではないため、正常細胞と老化細胞の仕分けが可能であれば、老化細胞から発せられる現象の理解が深められる。

c) SASP のサイトカイン (IL-6,8) への暴露による正常細胞の状態変化の計測・判定  
 SASP の代表的な物質であるサイトカイン (IL-6,8) の暴露による正常細胞のゼータ電位測定、細胞の仕分け、水素イオンの放出量測定を行い、状態変化や老化度の分類を試み、老化細胞を判定するバイオマーカーの探査・提案をしていく。

#### 4. 研究成果

本研究では、細胞の状態が時々刻々変化していく様子を「電気信号」によって調べることができれば、薬への細胞の感受性、投薬のタイミング、投薬効果の増強、または、副作用の軽減に関する薬学・医学的研究への貢献につながると考え、そのためのデバイス作製を試みた。

はじめにデバイス計測に用いる計画をしている、正常細胞と老化細胞の間でのグルコース消費と乳酸産出について調べた。今回用いた細胞は、継代回数の少ない正常細胞から継代回数を徐々に増やし、総継代数の異なるいくつかの細胞を作製した。これらの細胞で、継代数の増加に伴い、ミトコンドリアの活性の低下とそれによる嫌氣的解糖により、グルコース消費と乳酸産出が共に徐々に増大していく傾向がみられ、老化細胞の特徴が確認できた。また、乳酸 (イオン) 産出時には、溶液中にプロトン (H<sup>+</sup>) が放出され、培養液の pH が細胞周辺にて変化していることが期待できる。

次の段階として、細胞外シグナルの計測によるその細胞の未来予測ができる分析デバイス作製に向けて、そのプロトンを取り込むとその抵抗率を変える材料の評価を行った。動作環境は細胞培養下を想定しているため、材料および分析デバイスには次の2つのことが求められる。1) 使用する材料が、培養液により腐食や融解が起こらないこと、2) 使用する材料から細胞へ有害な影響を及ぼさないことである。計画当初予定していた材料では細胞培養液下で材料の腐食が生じ、保護膜を検討したが抑えることができなかったため、代替材料の検討が必要となった。その結果として、強相関酸化物である NdNiO<sub>3</sub> (NNO) 薄膜をチャネルとする電界駆動型デバイスの作製とプロトンの NNO ドープに伴う抵抗変調発生機構の解明を行っている、本学産業科学研究所田中秀和教授から NNO 材料を提供していただき実験を行った。

ここで、LaAlO<sub>3</sub> (LAO) 基板上に成膜した NNO 層について、成膜直後と (培養液の代わりに同 pH 値の) pH 標準液に浸漬させ、それぞれのサンプルを TEM と XRD を用いて結晶構造の評価を行った。いずれの測定法においても、pH 標準液による結晶構造の変化がないことを明らかにした。

次に、NNO 材料に対する細胞接着と毒性の確認として、SiO<sub>2</sub> 基板、LAO 基板、NNO/LAO 基板上に well を有する PDMS を貼り付け、その中へ細胞を培養液とともに播種を行った。細胞培養によく用いられる SiO<sub>2</sub> と比較して、NNO 材料表面に接着した細胞数は 2-3 割ほど少なかったが生存率は同等、または、わずかに高く、細胞接着と毒性は従来の環境とほとんど変わらないといえ、NNO 材料を分析デバイスに用いることが可能であることを示した。(図2)

そして、NNO/LAO 基板に電極形成や素子分離の工程を行い、well を有する PDMS を貼り付けて NNO 分析デバイスとした。そして、well 中の溶液からのプロトンの NNO 膜中への取り込み、それによる電流の経時変化を調べた。今回得られた電流変化は、材料特性の金属-絶縁体相転移に由来し、溶液中のプロトンが NNO 膜へ取込まれたことにより生じたと考えている。(図3) 計画当初予定していた材料では細胞培養液下で材料の腐食が生じたため代替材料の検討が必要となり、プロトン取込みによる電気抵抗率の時間応答性や変化量 (感度) が、細胞活動を計測するために十分かについて検討はできていない。また、3. 研究の方法の b)、c) の細胞を用いた実験への展開を行うことが出来なかったがこれらについては引き続き取り組んでいく。ただし、今回の結果は、プロトン細胞外シグナルとし、ラボオンチップの電子デバイス化に向けた足掛かりを示すことができたと考えられる。

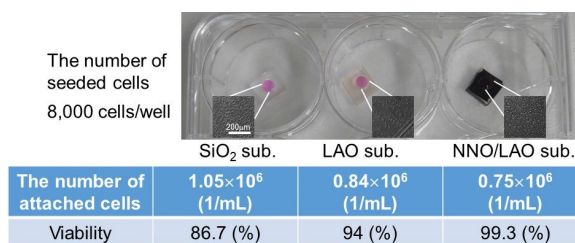


図2. SiO<sub>2</sub>, LAO, NNO/LAO 基板による細胞接着と毒性

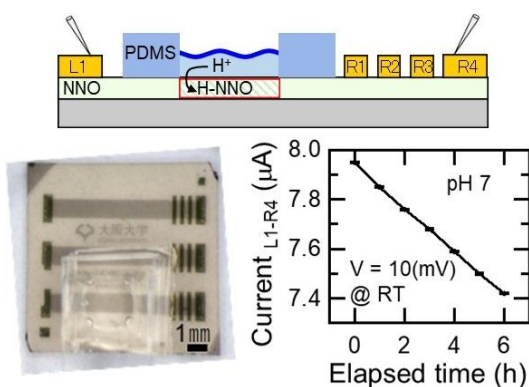


図3. NNO 分析デバイスを用いたプロトンの取り込みによる電気抵抗変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 中島 義賢	4. 巻 57
2. 論文標題 オンラインTEMトレーニング簡易システム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 86 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.57.2_86	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keswani Neeti, Lopes Ricardo J. C., Nakajima Yoshikata, Singh Ranveer, Chauhan Neha, Som Tapobrata, Kumar D. Sakthi, Pereira Afranio R., Das Pintu	4. 巻 11
2. 論文標題 Controlled creation and annihilation of isolated robust emergent magnetic monopole like charged vertices in square artificial spin ice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92877-7	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 該当する
1. 著者名 Nakanishi Yudai, Hayashi Yusuke, Hamachi Takeaki, Tohei Tetsuya, Nakajima Yoshikata, Xiao Shiyu, Shojiki Kanako, Miyake Hideto, Sakai Akira	4. 巻 52
2. 論文標題 Micro- and Nanostructure Analysis of Vapor-Phase-Grown AlN on Face-to-Face Annealed Sputtered AlN/Nanopatterned Sapphire Substrate Templates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 5099 ~ 5108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11664-023-10348-3	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 Sato Kaname, Takahashi Yutaro, Akisato Shujiro, Mikami Ryota, Suganuma Nao, Ashizawa Yugo, Kawaguchi Hayate, Nakajima Yoshikata, Ukai Tomofumi, Fuji Yasuhiko, Hanajiri Tatsuro, Kaneko Junya, Nakamura Osamu, Van Thach Pham, Awano Hiroyuki, Hasegawa Shigehiko, Sakai Masamichi	4. 巻 98
2. 論文標題 Spin-charge-coupled transverse resistance in an ambipolar conductor YH <sub>2</sub> -based Hall-bar structure with perpendicularly magnetized current-injection electrodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physica Scripta	6. 最初と最後の頁 045912 ~ 045912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1402-4896/acc4f2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatebayashi Jun, Nishimura Kazuto, Ichikawa Shuhei, Yamada Shinya, Nakajima Yoshikata, Sato Kazuhisa, Hamaya Kohei, Fujiwara Yasufumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Red Electroluminescence from Light Emitting Diodes Based on Eu-Doped ZnO Embedded in p-GaN/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /n-ZnO Heterostructures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ECS Journal of Solid State Science and Technology	6. 最初と最後の頁 076017 ~ 076017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1149/2162-8777/ace655	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 齋藤里花子、加治佐平、モハメッド シェイク モハメッド、矢野隆章、中島義賢、前川透、水木徹
2. 発表標題 希少糖脂質ミセル形成がおよぼす 細胞毒性についての定量的解析
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Mizuki, Rikako Saito, Keisuke Hirata, Sheikh Mohamed Mohamed, Yoshikata Nakajima, Toru Maekawa
2. 発表標題 Chemical Synthesis and Cytotoxicity Analysis of Rare Sugar Glycolipids
3. 学会等名 NZIC Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rikako Saito, Sheikh Mohamed Mohamed, Taira Kajisa, Yoshikata Nakajima, Toru Maekawa, Toru Mizuki
2. 発表標題 Cytotoxicity Effects of Rare-sugar Lipids on Human Cells
3. 学会等名 NZIC Conference 2022 (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
研究 分担者	酒井 政道  (Sakai Masamichi)  (40192588)	埼玉大学・理工学研究科・教授   (12401)	
研究 分担者	水木 徹  (Mizuki Toru)  (80408997)	東洋大学・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター・研究助手   (32663)	

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
---------	---------