

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18869

研究課題名（和文）TFT電極アレイを応用した高時空間分解マルチバイオイメージング法の検証

研究課題名（英文）Investigation of high spatiotemporal resolution multi-biosensing method using TFT electrode array

研究代表者

ティクシェ三田 アニエス（TIXIER-MITA, AGNES）

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：00334368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：神経や心筋細胞以外に、生体内での血糖恒常性維持に重要な役割を果たし、膵臓ランゲルハンス島（膵島）内に存在する膵細胞についても、細胞外でのグルコース濃度が上昇すると活動電位を発生することが知られている。これにより、細胞内Ca²⁺濃度が上昇することで、インスリン分泌を引き起こす。その分泌量は、周期的に変動することで知られる。本研究では、分泌するインスリンが発光するように改良され、細胞塊状態で同調したインスリン分泌能をもつことが知られる発光性ラット膵細胞株iGLを用い、同調的な膵組織の活動電位とインスリン分泌の光応答を同時評価インタフェース技術の開発と高時空間解析手法の提案にしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TFT電極アレイを用いたiGL細胞培養の膜電位のリアルタイム評価と蛍光イメージングを確立しました。本申請研究は、個々の電極のON/OFF状態をTFTアレイでスイッチ制御される大面積透明電極アレイと顕微鏡観察の比較提案デバイスでは遥かに広大な領域を精密観察可能。このセンシング技術は、時空間的に高い結果が得られたことから、今後、創薬や予後予測のためのin vitro生体モデル評価デバイスの開発に活用することができます。

研究成果の概要（英文）：Apart from nerve and cardiomyocytes, pancreatic beta cells, which play an important role in blood glucose homeostasis in vivo and are located within the pancreatic islets of Langerhans (islets), are also known to generate action potentials when the extracellular glucose concentration increases. This causes an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration, which in turn leads to insulin secretion. Its secretion is known to fluctuate cyclically. In this application study, the luminescent rat pancreatic β -cell line iGL, which has been improved so that the secreted insulin emits light and is known to have a synchronised insulin-secreting capacity in the cell mass state, was used to develop a simultaneous evaluation interface technique and propose a high spatiotemporal analysis method for the action potential of the synchronised pancreatic β -cell tissue and the optical response of insulin secretion.

研究分野：BIOMEMS

キーワード：TFT電極アレイ バイオセンシング バイオイメージング BIOMEMS 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らは最近、透明TFT電極アレイ技術を応用して、細胞膜電位の時間分解2次元イメージングディスプレイの開発に取り組んでいる(図3)。ここで用いている基板の特徴は、20~100 μm 角サイズの透明電極を5 μm ピッチで150 \times 150個以上、トランジスタアレイで個別にスイッチ制御可能、高密度にアレイ化しているため、電気的な計測に加えて、光学的な細胞観察も容易である。そこで近年の著しく発展した光学的蛍光イメージング観察を、透明TFT電極アレイの電気的な計測技術と連結させることで、蛍光標識化された細胞内現象イメージと細胞膜電位の2次元画像をリアルタイムで同時評価でき、これにより、個別の従来法では実現困難であった、それぞれの応答現象の関連性や相互作用を評価・解析できる高時空間分解マルチ評価ツールに飛躍できると考えた。これを明確にするために本申請研究では、内分泌系で膵島を構成する膵 β 細胞を対象として、グルコース刺激による膜電位発生とインスリン分泌時の蛍光イメージングのリアルタイム同時評価から、膵 β 組織の動的応答解析手法の確立を目標とした。

2. 研究の目的

生体内の恒常性維持機構には、中枢神経系ネットワークによる多臓器間連携が重要な役割を果たしている。このときの臓器間での情報処理や制御には細胞の膜電位が関与しているため、1個細胞から組織までの膜電位を高時空間的に評価・解析するための計測ツール開発が急務とされている。神経や心筋細胞以外に、生体内での血糖恒常性維持に重要な役割を果たし、膵臓ランゲルハンス島(膵島)内に存在する膵 β 細胞についても、細胞外でのグルコース濃度が上昇すると膜電位を発生することが知られている。これにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することで、インスリン分泌を引き起こす。その分泌量は、周期的に変動することで知られる。しかし、従来の膵 β 細胞の膜電位計測には、1個の細胞を対象にしたパッチクランプ法が用いられているため、細胞間での同調的な相互作用を電気的に評価・解析することが困難である。また、膵 β 細胞の集団的同調機構や細胞間での情報伝播は不明確である。そこで本申請研究では、分泌するインスリンが発光するように改良され、細胞塊状態で同調したインスリン分泌能をもつことが知られる発光性ラット膵 β 細胞株iGLを用い、同調的な膵 β 組織の膜電位応答とインスリン分泌の光応答をリアルタイムで同時評価可能な高時空間ダブルバイオイメージング解析手法の提案に挑戦する。

3. 研究の方法

研究目的達成のために、液晶ディスプレイの駆動に利用される透明な薄膜トランジスタ(TFT)電極アレイ技術を応用する。この技術は、透明な20~100 μm 角の電極を5 μm ピッチで高密度に配列させられるため、組織の活動電位を高い空間分解能で計測できるとともに、蛍光イメージング観察も可能となる。本申請研究の検討内容は、①透明TFT電極アレイ基板表面での膵 β 細胞培養法の構築、②膜電位の高感度評価技術の構築、③膜電位と蛍光イメージングのリアルタイム同時評価手法の確立の3点であり、生物化学工学を専門とする小森(近大)、培養工学を専門とする酒井(東大)と分担して2年間で検討する。

① 透明TFT電極アレイ基板表面での膵 β 細胞培養法の構築

細胞組織を構築するために、(i) iGL細胞が安定して接着培養できる基板表面の条件を明確にする。透明TFT電極アレイの電極材料はITOであり、この表面に適切な細胞接着因子(コラーゲンやラミニンなど)を物理吸着または化学結合で固定化させた後、iGL細胞を播種して細胞接着性を確認する。(ii) 生体内の膵

島は3次元構造であるため、2次元の細胞一層構造に加えて、3次元構造の細胞凝集塊の培養条件に関する知見も得る。後者の3次元構造組織については、小森と酒井がこれまでに検討を進めてきているハニカムマイクロウェル基板で、膝島と同じサイズとなる直径100~300 μm の凝集塊を作製して用いる (*Biotechnol. Prog.* (30) 178, 2014など)。

② 膜電位の高感度評価技術の構築

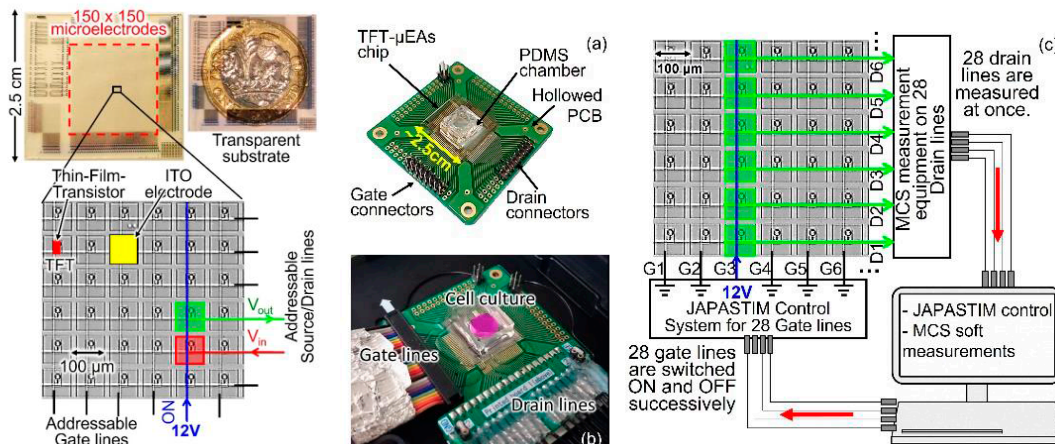
申請者と協力者(東大)が検討している心筋細胞や神経細胞の透明TFT電極アレイ計測システムをベースとして(応募者の研究遂行能力を参照)、膝 β 組織の膜電位計測の最適条件を明確にする。過去の報告より、心筋細胞と比べて、膝 β 細胞の膜電位は約5分の1であり、神経細胞と同程度であることが知られている。このことは、測定環境の電磁ノイズに埋もれてしまう可能性が高い。そこでSN比の高いTFT電極アレイの配置・運用方法を検討する。具体的には、電極アレイを検出電極、参照電極、ガード電極に切り替えるアドレスリング回路を導入することで、SN比の劣化防止を検討する。

③ 膜電位と蛍光イメージングのリアルタイム同時評価手法の確立

透明TFT電極アレイを、現有設備の倒立型蛍光顕微鏡に設置し、膜電位計測と蛍光モニタリングの同時計測技術を確立する。高濃度グルコース存在下での2次元および3次元構造の組織培養時において、得られた電気シグナルと蛍光シグナルのパターンを高時空間分解解析し、膜電位とインスリン分泌の関係性を整理する。また、これまでに報告されている知見との整合性を検証・比較する。ここで得られた生理学的パラメータに加えて、バイオ研究者に広く利用してもらうために、使いやすいデバイス構造や計測システムに向けた問題点を抽出し、計測条件や最適形状の検討にフィードバックする。

4. 研究成果

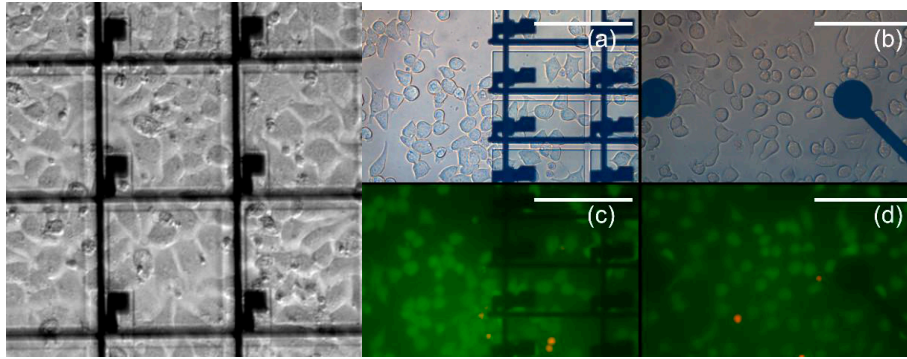
- 透明TFT電極アレイの電極材料は酸化インジウムスズ(ITO) :



TFT の概要と顕微鏡写真。

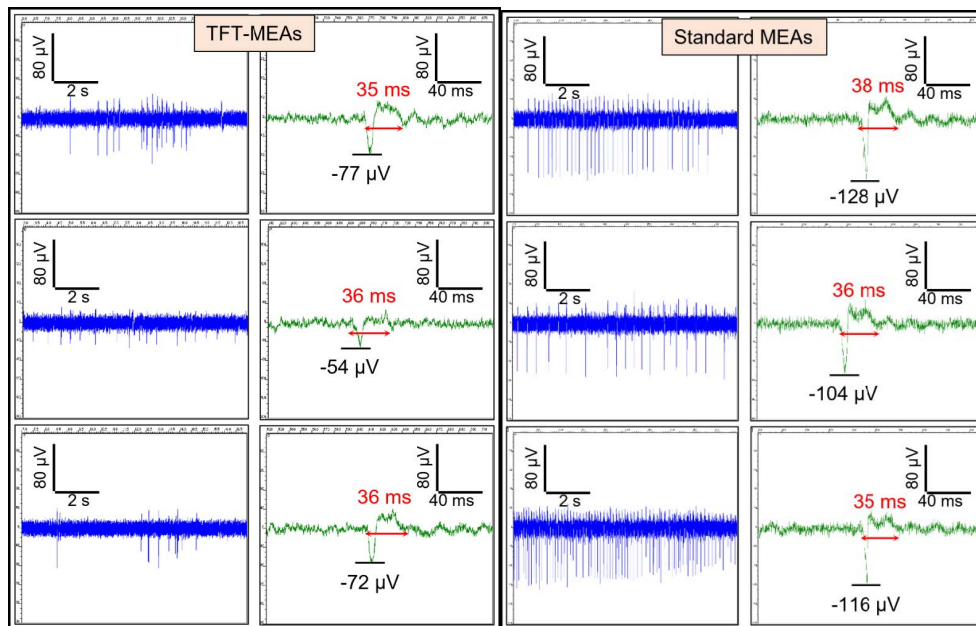
(a) プリント基板に実装した際のデバイス概要; (b) 顕微鏡に取り付けた状態を撮影したもの; (c) TFT を用いた電気生理学的測定のための実験セットアップの模式図。

- 「(1) 透明TFT電極アレイ基板表面での膝 β 細胞培養法の構築」では、発光性ラット膝 β 細胞株 iGL が安定して接着培養できる基板表面の条件を明確にしました。透明TFT電極アレイの電極材料は酸化インジウムスズ(ITO)であり、この表面を適切に処理することで、細胞接着因子(コラーゲンやラミニンなど)を物理的または化学的に固定化させた後、iGL細胞を播種して接着性を確認しました。



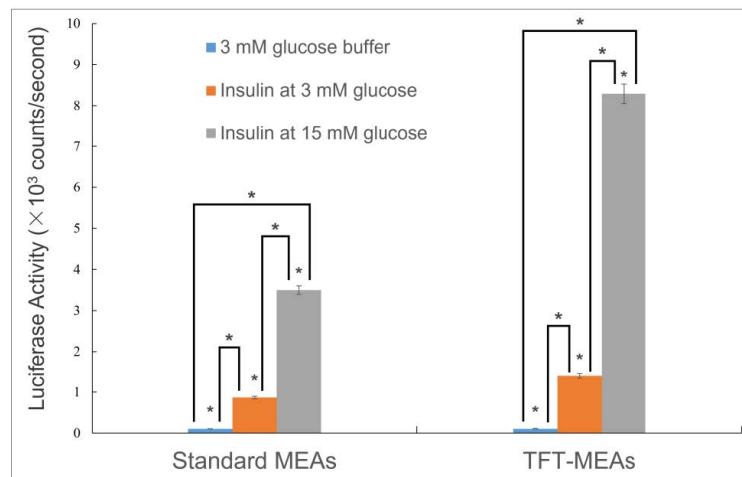
TFT に iGL 細胞の明視野画像	(a) および (b) : TFT および従来の MEA 上の iGL 細胞の明視野画像 ; (c) および (d) : TFT および従来の MEA 上の iGL 細胞の蛍光画像 ; $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$. スケールバー : $100 \mu\text{m}$.
--------------------	---

- 「(2) 膜電位の高感度評価技術の構築」では、これまでに検討してきた心筋細胞や神経細胞の透明 TFT 電極アレイ計測システムをベースとして、iGL 細胞の膜電位計測の最適条件を明確にしました。これと並行して、心筋や神経細胞の膜電位計測で広く利用されている微小電極アレイで iGL 細胞の膜電位変化応答を計測することで、TFT 電極アレイでの応答と比較しました。2 年目 (2022 年度) には、「(3) 膜電位と蛍光イメージングのリアルタイム評価の確立」を実現しました。透明 TFT 電極アレイを倒立型蛍光顕微鏡に設置し、高グルコース条件下でのインスリン放出による膜電位と蛍光の発光を同時に測定する技術を開発しました。

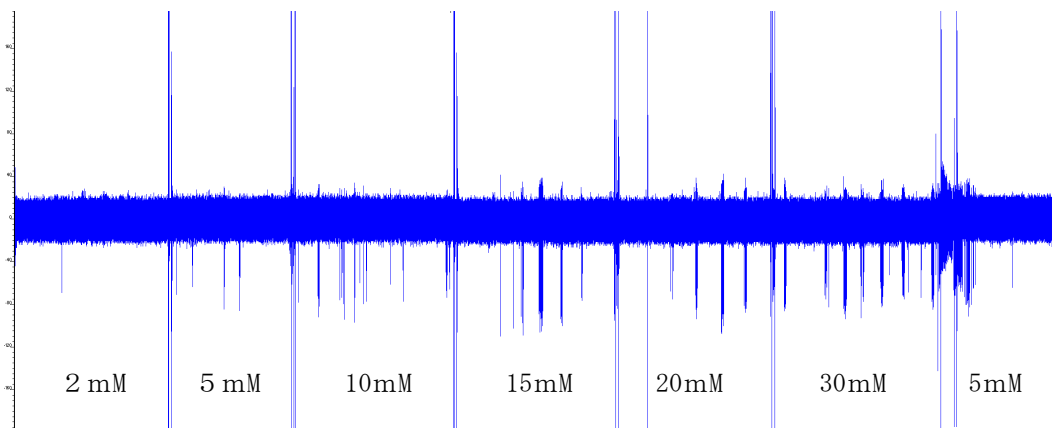


<p>トップレーン iGL 細胞を含まない 15mM グルコース含有 HBSS 中の従来の MEA と TFT の表面で測定した電圧。ボトムレーン : iGL 細胞 (4 日目) の細胞外電圧を、15mM グルコースを含む HBSS 中で、各従来型 MEA および (d) TFT 上の 3 つの隣接する電極で測定。</p>
--

- 透明 TFT 電極アレイを倒立型蛍光顕微鏡に設置し、高グルコース条件下でのインスリン放出による膜電位と蛍光の発光を同時に測定する技術を開発しました。細胞活性がグルコース濃度に依存することが実証されました。

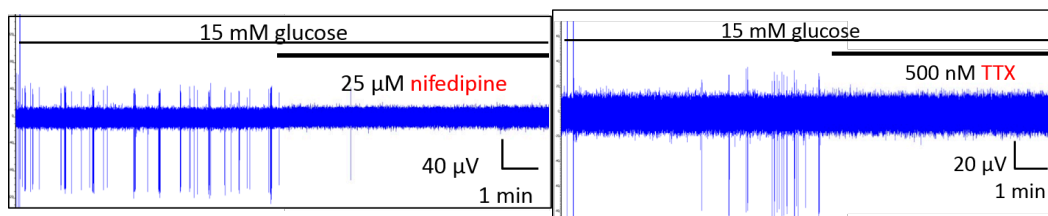


TFT および標準 MEA 上の iGL 細胞のグルコース誘導性インスリン分泌量。



活動電位に及ぼすグルコース濃度の影響。(未発表)

- また、イオンチャネル遮断剤 (ニフェジピン、テトラエチルアンモニウムクロライド) を用いた追加実験も行い、活性の変化を示しました



イオンチャネル調節剤の影響を受けた活動電位。ニフェジピン:Ca²⁺チャネルブロッカー。活性を低下させる。TTX(テトロドトキシン) Na²⁺チャネルブロッカー。活性を低下させる。(未発表)

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 [1]Dongchen Zhu, Anne-Claire Eiler, Satoshi Ihida, Yasuyuki Sakai, Hiroshi Toshiyoshi, Agnes Tixier-Mita, and Kikuo Komori	4. 巻 142(10)
2. 論文標題 Real-time High-resolution Measurement of Pancreatic Cell Electrophysiology Based on Transparent Thin-Film-Transistor Microelectrode Arrays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 266-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.142.266	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 該当する

〔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 Dongchen Zhu, Anne-Claire Eiler, Satoshi Ihida, Yasuyuki Sakai, Hiroshi Toshiyoshi, Agnes Tixier-Mita, Kikuo Komori
2. 発表標題 In-vitro Electrophysiology Evaluation of Pancreatic Beta-cells based on Thin Film Transistor Microelectrode Array
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments（日本動物実験代替法学会 第35回大会） JSAAE'2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuo Komori, Dongchen Zhu, Ayano Takenouchi, Yuma Horii, Satoshi Ihida, Yasuyuki Sakai, Hiroshi Toshiyoshi, Hiroshi Kimura and Agnes Tixier-Mita
2. 発表標題 Towards the Development of Qualitative and Quantitative Analytical Devices for On-site Rapid Evaluation of Biomacromolecules in Cell-based Bioassays
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments（日本動物実験代替法学会 第35回大会） JSAAE'2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Agnes Tixier-Mita, Ihida Satoshi, Dongchen Zhu, Pierre-Marie Faure, Yasuyuki Sakai, Timothee Levi, and Hiroshi Toshiyoshi
2. 発表標題 Cell Culture Multimodal Electrical Analyses with Thin-Film-Transistor Sensing Platform
3. 学会等名 128th annual meeting of the japanese association of anatomists（第128回日本解剖学会総会・全国学術集会）（招待講演）
4. 発表年 2023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	小森 喜久夫 (Komori Kikuo) (60431813)	近畿大学・工学部・准教授 (34419)	
研究 分担者	酒井 康行 (Sakai Yasuyuki) (00235128)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	

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