

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05352

研究課題名（和文）撃力刺激に対する細胞応答の超広時間スケールダイナミクス解析

研究課題名（英文）Analysis of multi time-scale dynamics in mechanobiological stimulation by impulsive force

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）・助教

研究者番号：00737926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年、生体への機械的作用を明らかにし、疾患の理解や医療への応用を目指す研究が盛んになされています。本研究では、瞬間的な力学刺激が細胞に対してどのような影響を与えるのかを調査するため、撃力負荷システムを開発しました。細胞は、ナノ秒レーザーにて加速されたカンチレバーによって、ナノメートル・マイクロ秒のスケールの変位を与えられます。また細胞応答を、カルシウムイメージングにて観察可能な系を実現しました。

研究成果の概要（英文）：In recent years, studies that clarify the mechanical action on the living body and aim at understanding diseases and applying them to medical treatment are actively conducted. In this study, we developed an impulsive force loading system to investigate how the instantaneous mechanical stimulus affects cells. Cells are given nanometer and microsecond scale displacement by a cantilever accelerated by nanosecond laser. We also achieved observation of a cell response with calcium imaging.

研究分野：医用工学，光工学，精密工学

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

### 1. 研究開始当初の背景

近年、特に再生医療の観点から生体細胞への機械的刺激（メカニカルストレス）が注目されている。例えば我々の体が何かにぶつかったとき、生体内にその機械的作用が伝わる。音に関して言えば、一般的な細胞であれば  $1.5 \mu\text{m}/\text{ns}$  という速度で音が駆け抜けることとなる。このように生物はあらゆる機械的刺激にさらされており、力学作用に起因する骨梁の形成や血管内皮細胞の調節機能など、これらの刺激に生体組織が応答することは古くから知られている。最近では機械的刺激による幹細胞の分化誘導の研究が盛んに行われている。

これまで、引張りやせん断流、静水圧などの機械的刺激による細胞の応答が調べられてきた。他にも機械的刺激にはダイナミックな作用も多く存在する。しかしながら、これらの機械的作用のメカニズムは未だ明らかになっていない。なぜなら、細胞は複雑な構造体であるため、初期の物理ダイナミクスだけでもすべてを把握するのが困難だからである。加えて、現象が高速であるため、それらをうまくモニタリングする技術が存在しない。もしこれらのメカニズムが解明できれば、基礎研究では分化制御の実現の可能性を見極めることができ、臨床でも機械的作用による血管新生や骨成長の治療効果向上や新しい医療の創出につながる事が期待される。

現在まで、細胞に力学刺激を及ぼす装置は開発されてきた。例えばピエゾ素子を用いた刺激、光ピンセットを用いた刺激、磁気ビーズを用いた刺激などが用いられてきた。しかしながらこれらの手法は高速性が欠落しており、本研究が対象とするマイクロ秒スケールの刺激ができない。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞に瞬間的な力学刺激を発生させる撃力刺激システムを開発し、その細胞応答を解析することである。撃力刺激はこれまでの機器の限界である  $10 \text{ kHz}$  ( $100 \mu\text{s}$ ) の刺激を上回る時間幅での力学刺激を目標とした。また、撃力刺激は瞬間的であるため、ナノ秒の時間分解能を持つ計測システムを組み込み、かつ細胞応答をモニタリングするために秒スケールのイメージング系にてそれぞれの時間スケールにおけるダイ

ナミクスを計測するシステムを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 撃力刺激システム

撃力はカンチレバーに Q スイッチナノ秒パルスレーザを集光させることで発生させた。カンチレバーの根元に集光されたパルスにより瞬間的にひずみが生じ、先端で変位が発生する。パルスレーザのパルス幅は  $5 \text{ ns}$  秒であり、加えるエネルギーを変化させることで与える変位を制御できる。また、カンチレバーの長さを変えることで、撃力の時間幅を調整することができる。

細胞とカンチレバーの位置決めは細胞の明視野像を見ながら行う。細胞の高さ方向にはピエゾステージが組み込まれており、細胞とカンチレバーの間隔をナノメートルのスケールで制御することが可能である。

#### (2) マルチスケール測定システム

細胞へ力を与えるカンチレバーのモニタリングは、光でこの原理を用いて行った。カンチレバーの先端にヘリウムネオンレーザを集束させ、反射した光の振れからカンチレバー先端の変位をナノメートルの分解能で計測可能とした。この変化はマイクロ秒の時間スケールで起こるため、高速フォトダイオードにて検出した。

また、ミリ秒から秒スケールの細胞応答をモニタリングするためにカルシウムイメージングを行うシステムを組み込んだ。白色光源から光学フィルタを用いて励起光を取り出し、ダイクロイックミラーを通して細胞へと導光した。細胞からの傾向はダイクロイックミラーを通り、光学フィルタを経て高感度カメラにて画像が取得される。

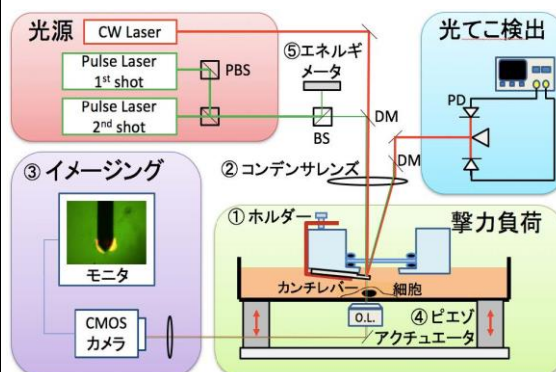


図1 システム全体図

また、本システムは明視野観察、蛍光観察ともにさらに長い時間スケールのタイムラプスイメージングも行うことが可能である。これらの全体図を図1に示す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 撃力負荷システムの評価

カンチレバーを用い、水中での撃力負荷実験を行った。なお、カンチレバーの光でこと実際の変位のキャリブレーションは、ピエゾステージの駆動における光でこのシグナルの変化から行った。

図2は長さ 130  $\mu\text{m}$  のカンチレバーの変位の時間変化と、それをフーリエ変換したものである。計測結果より、2.7 マイクロ秒の時間にて、58 nm の変位を発生させることに成功した。これは周波数としては 366 kHz に相当し、既存のデバイスの時間スケールを更新した。また、例えば 350  $\mu\text{m}$  のカンチレバーを用いると、22.8 マイクロ秒の時間幅にて変位を与えることが可能であり、様々な時間幅での刺激が可能であることを示した。一方、残留振動が低い周波数成分として残っており、現在 2 発のパルスレーザを用いて打ち消す方法を開発中である。

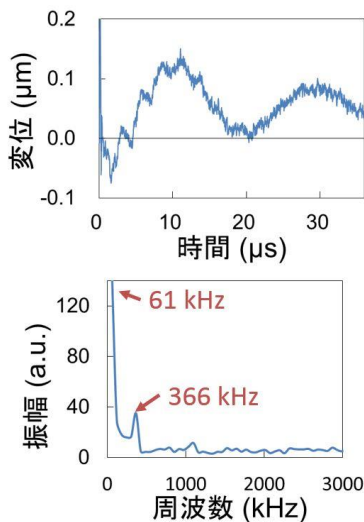


図2 長さ 130  $\mu\text{m}$  のカンチレバーを用いた撃力負荷結果

##### (2) 細胞に対する撃力負荷実験

撃力刺激に対する細胞応答を解析するために、開発したシステムを用いて培養細胞を用いた刺激実験を行った。細胞にはヒト由来のがん細胞 HeLa を用いた。カルシウムイメージ

ングのために Fluo4-AM を用いた。カンチレバーで負荷した変位は 312 nm、時間幅は 2.3 マイクロ秒である。また、カルシウムイメージングの撮影速度は 2 fps とした。

カンチレバーと細胞の位置合わせは明視野観察にて行った (図3)。観察像から、細胞にカンチレバーが触れているか否かを判断し、わずかに触れた高さを撃力刺激の開始点とした。

図4にカルシウムイメージングの結果を示す。撃力が負荷された瞬間に細胞内カルシウムイオンの濃度上昇を確認することができた。これは一般的に観察される、機械刺激による細胞応答と同様の現象である。一方で、カルシウムシグナルの減少がその後見られた。これは現在も解析中であるが、加えた撃力刺激により膜にわずかな損傷が生じたことが要因の一つとして考えられ、細胞膜不透過性の蛍光分子を用いた検証を進めてゆく予定である。

このように本研究では、細胞に対する撃力刺激を負荷するシステムを開発し、マイクロ秒の時間スケールで数十ナノメートルオーダーの制御された変位を細胞に負荷することができることを示した。この成果は音波による生体作用など瞬間的な細胞刺激を検証し、メカニズムを理解する重要なマイルストーンに位置づけされる。

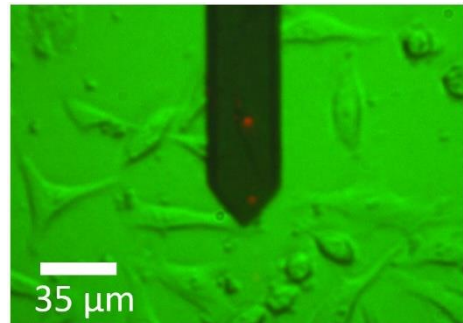


図3 カンチレバーによる細胞刺激

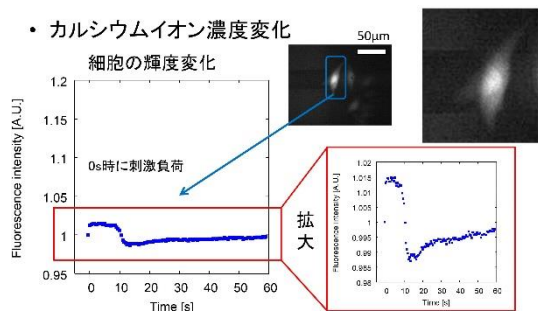


図4 撃力刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の変化

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 3件)

- ① 加藤拓真, 中川桂一, 芦葉裕, 小林英津子, 塚本哲, 佐久間一郎, 瞬間的力学刺激に対する細胞のカルシウムシグナリングの動的観察および解析, 第56回生体医工学会大会, 2017年5月3日-5月5日, 東北大学(宮城県・仙台市)
- ② 芦葉裕, 中川桂一, 加藤拓真, 小林英津子, 塚本哲, 佐久間一郎, 極微の衝撃に対する細胞応答の解析を目的とした刺激負荷システムの開発, 平成28年度衝撃波シンポジウム, 2017年3月8日-10日, ヴェルクよこすか(神奈川県・横須賀市)
- ③ 芦葉裕, 中川桂一, 塚本哲, 小林英津子, 佐久間一郎, 細胞に対する撃力刺激負荷システムの開発, 第55回生体医工学会大会, 2016年4月26日-28日, 富山国際会議場(富山県・富山市) [日本生体工学会 平成28年度研究奨励賞・阿部賞受賞]

[その他]

ホームページ等

<http://www.bmpe.t.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 桂一 (NAKAGAWA Keiichi)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号: 00737926