

令和元年6月12日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02321

研究課題名(和文)細胞核の力学刺激応答計測を実現するバイオプラットフォーム

研究課題名(英文) Bio-platform to achieve mechanical stimulus to & resopose measurement of cell nucleus

研究代表者

新井 健生 (Tatsuo, Arai)

電気通信大学・その他部局等・客員教授

研究者番号：90301275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,600,000円

研究成果の概要(和文)：局所刺激計測を実現する可搬型マイクロハンドシステム、渦流を用いた非接触マニピュレーション、連続的力学刺激を与えるマイクロ流路、長時間追尾可能な観察システム、並びに蛍光画像と明視野画像を同時に取得できる顕微鏡を実現し、以下の新たな生物学的知見を見出した。細胞と細胞核への力学刺激応答計測により、細胞核は剛性が高く、複数の細胞内骨格の存在が示唆された。核刺激の強弱にともない遺伝子の発現パターンが変化することを見出した。線虫移動時の各部位の曲率を計測し、運動パターンの相違を定量的に明らかにした。連続的な力学刺激を正常細胞とがん細胞に与え、細胞変形能の相違を定量的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実現したマイクロハンドシステムは微小対象物の局所特定部位へ力学刺激を入力をするとともにその応答を精緻に観測することができ、対象の特定局所に高精度でアクセスできるマイクロマニピュレーション法、2)高精度な力学刺激を印加するためのエンドツールの実装法、分化・成長・運動による形状・スケール変化を伴う対象の自動焦点・追跡手法、が確立され、微小領域での計測と制御に関わるマイクロロボティクスの学術領域を大きく底上げした。

細胞と細胞核への多様な力学刺激により遺伝子発現の変化など新たな生物学的知見がみいだされ、今後ストレスと疾病との関連や診断などへの応用を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The project developed portable micro hand system for local stimulation measurement, non-contact manipulation with whirl flow, microchannel for continuous mechanical stimulation, observation system capable of tracking for a long time, and microscope capable of acquiring fluorescence and bright field image simultaneously. The new biological findings are the followings. The measurement of mechanical stimulus responses to cells and cell nuclei suggests that the nucleus is stiffer and the existence of multiple intracellular skeletons is assumed. The expression pattern of genes changes with the strength of nucleus stimulation. We could identify the curvature of each part during nematode movement and clarified the difference in movement pattern quantitatively. Continuous mechanical stimulation was given to normal cells and cancer cells, and differences in cell deformability were clarified quantitatively.

研究分野：ロボティクス

キーワード：マイクロナノデバイス マイクロハンド 微小力センサ 細胞核 発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

マイクロナノスケールを対象とする計測と制御を扱うマイクロロボティクスが世界的に進展し、生命科学への応用が盛んとなり、細胞や組織を対象とする生命現象の定量解析が活発に行われている。特に国内では研究者らのグループが実施した新学術領域「バイオアセンブラ」において、単一細胞から3次元細胞システム（組織）を生体外で構成する研究を世界に先駆けて行ってきた。細胞の特性計測や3次元細胞システム構築、機能発現の解明に取り組んできており、このためのツールとして世界最高速で位置決め精度の極めて高いマイクロハンドを実現し、高精度細胞硬さ計測や、個体発生時の超低周波刺激と力応答計測を実現しており、国内外より高い評価を得ている（Chanh-Nghiem Nguyen, Tatsuo Arai, et.al., High-Speed Focusing and Tracking of Multisized Microbiological Objects, Journal of Robotics and Mechatronics, 25-1, pp. 115-124, 2013. JRM Best Paper Award 受賞, 2014）。このような研究過程において、細胞や組織の分化、増殖、機能発現、発生には、環境との時空間相互作用が大きくかかわることを見出ししてきた。例えばハイデルベルグ大学のグループからはツールへの高い評価と発生生物学応用への高い期待が寄せられ、力刺激と形態変化の応答から発生モデルを構築する連携研究に着手した。このような背景の中、特に、時空間相互作用を解明するには、より精緻な計測と評価が新たな学術的課題となっており、これを実現するためには、多自由度のマイクロハンドや高機能なマイクロ流路を用いて、細胞や組織の特定局所へのより高精度な刺激と応答計測が必要となった。そこで、生命現象の時空間機序に新たな視座を提供するにたる要求精度を満たした、マイクロロボティクスに基づく計測システムの構築と、バイオサイエンスへの応用を両輪として推進する本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

細胞や組織の局所特定部位へ機械刺激を直接与えると同時に、その応答計測を精密かつ広レンジ、高分解能のタイムスケールで計測するシステムを構築する。これを細胞や組織の分化、増殖、機能発現、発生過程等の解析評価に応用することで、細胞や組織の生命現象の時空間機序解明に取り組む。特に、細胞の機械刺激に対する応答機構を明らかにするという観点から細胞核に注目し、細胞核に機械的な刺激を直接与え、同時に力学的計測を行う手法を確立し、これを実現するシステムの構築を目指している。さらに、細胞やスフェロイド観察に有用な非接触マニピュレーションやマイクロ流路を用いた刺激、細胞やモデル生物の長時間観察と追尾を行うシステムの開発と応用を図っている。これらの手法を適用して、遺伝子発現や発生の原理、並びに発病メカニズムの解明等に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロハンドの小型化

パラレルリンク機構を採用し、高速駆動に適した小型・高剛性マイクロハンドを設計試作し、これを多自由度ステージに搭載することでマルチスケールで対象にアプローチ可能なマニピュレーションシステムの構築を行なった。また、マイクロハンド制御用の機器類も新たに設計し、専用のアナログ・デジタル / デジタル・アナログ変換ボード(AD/DA ボード)を設計開発した。

(2) 非接触マニピュレーション

核に刺激を与える実験では、余計な刺激を与えずに細胞のハンドリングを行う非接触マニピュレーションも重要である。図 3.1 に示す振動系を構成すると、ある一定の振動周波数に対応して針先が円運動をすることが見いだされた。これを液中で駆動すると微小な旋回流を生じ、液中に存在する微小粒子（概ね直径 30-200 μm ）を旋回、あるいはその場で回転させることが可能になることを見出した（図 3.2, 図 3.3）。条件によっては針に沿って粒子が並進移動することも確認された。粒子操作のための周波数や振幅、駆動電圧などの条件を実験により求めた。



図 3.1 振動系の構成

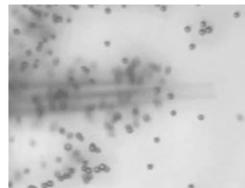


図 3.2 旋回流

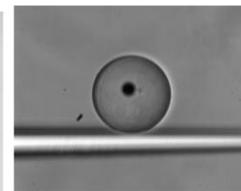


図 3.3 粒子の回転

(3) 長時間観察トラッキングシステム

細胞や組織にストレスを与えた後の長時間観察や、モデル生物、例えば線虫などに刺激を加えその後の運動の様子を観察することを目的に、対象物を常に顕微鏡視野の中心にとらえ、長時間観察できるステージを構築した。倒立式顕微鏡に高速カメラを取り付け、また自動焦点に対応するため対物レンズをピエゾスキャナーで高速に上下動を可能にしている。ステージの駆動は、水平XY方向の並進2自由度と、高さ方向Z軸周りの回転が可能なステップモータが搭載されている。トラッキングシステムは、自動焦点ソフトウェア対象物認識ソフトウェア、対象物追従ソ

フトウェアから構成されている。

(4) エンドツールの開発

①扁平型把持ツールによる細胞のマニピュレーション： 円形状の細胞を安定に把持し解放・プレースするため扁平型把持ツールを作製した。また、細胞把持後の解放動作も安定に行うため、片方の把持ツール扁平面にゲルを塗布し、細胞が接着するツールを特定し、このツールを振動させて解放を行う制御戦略を構築した。

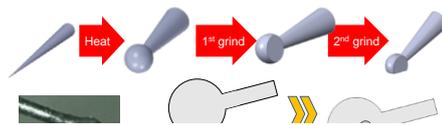


図 3.4 ツールの加工手順

②単一細胞への力刺激応答計測を実現する扁平型把持ツール： 単一細胞を把持可能な扁平型把持ツールの作製を試みた。把持を実現するためには、底面との衝突を防ぐため、扁平面を2面作製する必要がある。そこで、球状のガラスを2段階に削ることで対象物と底面に対して2つの平面を持つエンドエフェクタを作製した。(図 3.4)。作製したエンドエフェクタを利用してマウス線維芽細胞 NIH3T3 の細胞及び細胞核を観察し、力学特性計測を行った。細胞核の形状を正確に観察するために蛍光染色を行い、さらに位相差観察を同時に行うことが可能な光学系を導入することで、細胞核・細胞・エンドエフェクタの同時観察を実現し、計測を行った。

③半導体ひずみゲージ集積型微小力センサ： マイクロハンドのガラス製指先に、センサを集積したカンチレバーデバイスを搭載する方式を採用した。2つの活性層と2つのBOX層を有する、Double-SOI ウェハを適用して高感度センサとした。

④イオン FET 型ナノピペット： 直径 50~100nm サイズのリポソーム粒子内に微量の化学物質や薬剤を充填し、細胞や核内にこれを伝達するため、粒子を正確に射出制御するピペットを開発した。ピペットの原理は、先端内径が 100nm のガラスキャピラリ外面に薄膜電極を形成し、これを溶液と絶縁するために絶縁膜で覆いゲート電極とする。一方、キャピラリ内の溶液にソース電極を浸す。また、キャピラリ外側の溶液にドレイン電極を浸す。この3つの電極により電界効果型トランジスタ (FET) が構成される。ソース・ドレイン間に電圧を印加することによりソース・ドレイン間に電流を生じ、ナノ粒子がキャピラリ内外で移動が可能となる。次にゲートに電圧を印加することにより、キャピラリ内面にイオン層が形成される。このイオン層の厚みがゲート電圧に依存し、これにより粒子の流れを制御することが可能となる。

(5) 微小流路系の応用

①狭窄流路を用いた多数の細胞の同時機械刺激と遺伝子発

現解析： 機械刺激負荷による細胞核の形態の変化による遺伝子発現の変化を解析可能なマイクロ流路デバイスを作製した。RT-PCR などの遺伝子発現解析には多数の細胞標本が必要とされることから、多数細胞の細胞核へ機械刺激負荷と高収量を可能とするマイクロ流路デバイスを設計した。流路狭窄部の構造としては、PDMS(polydimethylsiloxane)に突出構造を持たせ、ガラス基板との間で上下から細胞を押しつぶす形状を考案し(図 3.5)、これを並列化した。狭窄部の幅は 5~7 μ m 程度となるよう作製した。シリンジポンプを用いて細胞を送流し、送流時の細胞の変形は CCD カメラで計測した。

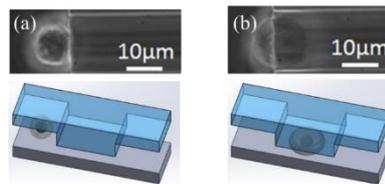


図 3.5 流路形状と細胞が潰れる様子

②直列狭窄流路による連続機械刺激とがん細胞の変形能評価： 正常細胞とがん細胞の変形能を比較するため、微小流路内に狭隘部を設け、これを細胞が通り抜ける時間を比較する細胞の大きさよりも一回り大きめの幅を持つ主流路と、細胞を押しつぶす狭窄流路が多数連なる構造としている。このような多段階の圧縮を繰り返すことにより、つぶされ変形される過程と、変形から元に戻る過程を段階的に観察する。流路は 5 回折り返す 6 列構造とし、始めの 5 列にはそれぞれ 4 つの狭隘部が設けられ、各列で 4 回、全体で計 20 回の圧縮が細胞に掛けられる。最後の列には狭隘部が無く、細胞はこの区間を自由に流れる。

③高効率細胞捕捉システム： 細胞の特性計測やアッセイ、細胞間インタラクションの実験を効率的に行うために、大量の浮遊細胞を高速に捕捉する流路系を開発した。主流路は上方から左右に折り返しながら下方に向かっており、主流路の長さを大きくとり、できるだけ一度に大量の細胞を収量する。主流路の片側面に補足用のチャンバーを設け、チャンバーからは下方の主流路に向けて補足流路を設ける。補足流路の流れを利用して細胞をこのチャンバーに誘導し捕捉する。

4. 研究成果

(1) マイクロハンドの小型化

新たに試作した小型・高剛性・高精度を実現するマイクロハンドの動作実験を行なった。動作実験においては、微小物体のマニピュレーションを行い評価した。高速駆動に適した高剛性マイクロハンドの特性を生かし、振動を応用したリリース動作を用いた自動マニピュレーションを実装した。本システムを用いて液中において直径 100 μ m のマイクロビーズの自動把持・配置を行った結果、1 サンプル平均 2 秒程度、1 少なくとも 10 回中 10 回の成功率での高速マニピュレーションに成功した(図 4.1)。

(2) 非接触マニピュレーション

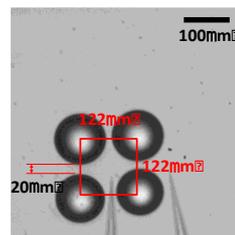


図 4.1 高速マニピュレーション

印加する駆動周波数と駆動電圧を変化させ、振動の様子を観察した。円運動を発生する周波数は 250Hz, 300Hz, 350Hz であることがわかった。図 4.2 は周波数 350Hz 時の駆動電圧と回転速度の関係を示したものである。駆動電圧により回転速度を制御することが可能である。

図 4.3 に示すように直径 100 μm 程度の卵細胞や、図 4.4 に示す 200 μm 程度のスフェロイドの安定した回転が実現された。細胞や組織の液中で非接触マニピュレーションの可能性が示され、細胞や組織の 3 次的観察や、細胞に不要な機械的刺激を与えずにハンドリングができることが明らかになった。

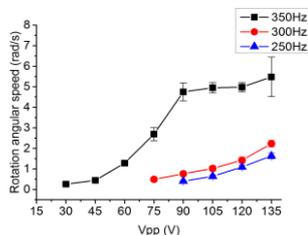


図 4.2 駆動電圧と回転速度の関係

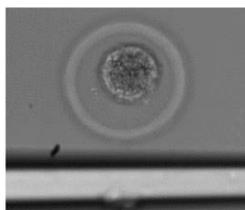


図 4.3 卵細胞の回転

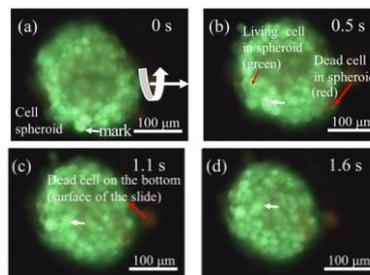


図 4.4 スフェロイドの回転

(3) 長時間観察トラッキングシステム

トラッキングシステムの基本性能を調べた。対象物認識精度は動きが速く形状も変化する線虫の場合で 98% を達成した。また、現状のコンピュータのメモリ容量 (16GB) における最長観察記録時間は 2 時間である。さらに、線虫の各部位の曲率から、頭と尾を識別するアルゴリズムを作成し、認識率 80% を達成した。図 4.5 に 1 時間 45 分間の線虫追従の様子を示す。なお、今回は実験では確認をしていないが、移動や変形の手が早い通常細胞を追従観察することは十分可能と考えられる。

(4) エンドツールの開発

①扁平型把持ツールによる細胞のマニピュレーション：
把持ツールによるマイクロビーズ (直径 50 μm) の把持と解放の実験を行った。ビーズの把持動作の成功率は、ゲル塗布の効果により 100% を達成した。次に把持したビーズを所定の位置にプレスする実験を行った。二本指を広げると、ビーズは必ずゲルが塗布された平行メカニズム側の指に付着していることが確認された。ビーズのプレスによる位置決めは、平行メカニズムに一定周波数、一定振幅の振動を与えて、指先に付着したビーズを所定の位置で解放させる戦略を取っている。図 4.6 に各周波数、各振幅と位置決め誤差の例を示している。また HELA 細胞 (直径 20~30 μm) を用いた配列実験も行い、目的の位置決め精度を出すことに成功した。

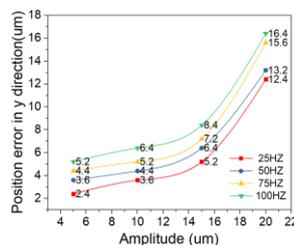


図 4.6 位置決め誤差と細胞描画 “BIT”

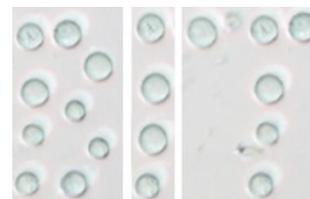


図 4.5 線虫運動の長時間観察

②単一細胞への力刺激応答計測を実現する扁平型把持ツール：
扁平型エンドエフェクタを用いて NIH3T3 細胞及び細胞核を観察し、力学特性計測を行った。細胞核は蛍光染色を行い、細胞核・細胞・エンドエフェクタの同時観察・計測を行った。NIH3T3 の計測の様子を (図 4.7) に示す。力学特性計測の結果から、細胞からの反力と細胞自体の歪みおよび細胞核の歪みとの関係性を評価した。計測結果から、細胞全体の歪みに対して細胞核の歪みが一様に表れている集団と細胞核の歪みがより大きく表れている集団の 2 つの傾向に分けられることが明らかとなった。歪みがより大きく表れている集団では細胞全体の歪みがより小さい段階から反力が増大し始めていた。これは、荷重が細胞質内の細胞骨格などを介してなんらかの経路により細胞核に直接的に伝達された結果だと考えられる。この結果から、細胞核が細胞全体の弾性率を向上させ、細胞の変形を抑える働きがある可能性が示唆された。

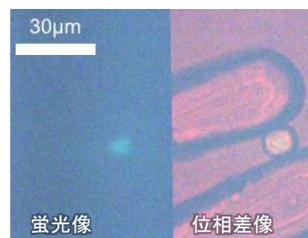


図 4.7 細胞、核、エンドツールの同時観察

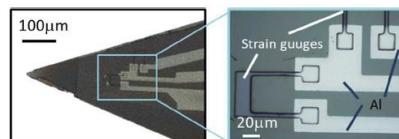


図 4.8 センサ全体の顕微鏡画像と詳細

③半導体ひずみゲージ集積型微小力センサ： 図 4.8 は製作したひずみゲージの顕微鏡画像である。ひずみゲージとアルミ配線の接触を考慮し、ひずみゲージの側壁が傾斜するように加工してある。傾斜構造の目的はひずみゲージの側壁にもアルミが回り込むように接着させることで、導電性を高める狙いがある。ひずみゲージを2つ配置し、互いに直交配置することで歪の生じないゲージを温度補償用として利用することができる。

④イオン FET 型ナノピペット：

リポソームの吐出実験を行った。図 4.9 は S-D 間電流とゲート電圧との関係を示し、ゲート電圧が負でキャピラリ内面にイオン層が形成され S-D 間電流が小さくなる。これによりリポソームの吐出が抑制される図 4.10 は粒子が通過する際の電流を詳細に示したものである。粒子が通過する際に電流が下がり、この時の電流変化の大きさが

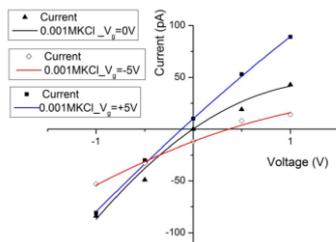


図 4.9 ゲート電圧による開閉制御

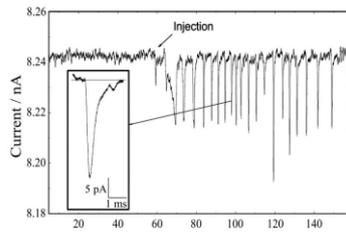


図 4.10 粒子通過のモニタリング

粒子の大きさに比例し、そのサイズを特定できる。パルス幅は粒子の通過時間であり、その通過速度を示している。イオン FET 型ナノピペットは 100nm 以下のナノ粒子の吐出を制御でき、通過する粒子のサイズと速度の同時計測が可能である。

(5) 微小流路系の応用

①狭窄流路を用いた多数の細胞の同時機械刺激と

遺伝子発現解析： マウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いた細胞送流実験の結果を示す。細胞および細胞核の狭窄部内変形を確認し、画像から細胞の径を計測することで変形量を調べた。細胞と細胞核の画像は同期して撮影可能な系により得ており (図 4.11(a)(b))、個々の細胞と細胞核の変形を計測でき、両者の変形が確認できた。細胞回収は最大で 2.5×10^5 個が可能であり、遺伝子発現解析に十分な回収量である。弱い機械刺激刺激 (流路高さ 9-10 μm) と強い機械刺激刺激 (流路高さ 5-6 μm) を与えた細胞、刺激を与えない細胞の3種類を準備し、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子解析を行った。弱い機械刺激刺激と強い機械刺激刺激を比較すると、細胞死に関わる遺伝子の発現量に変化があることが明らかとなった。

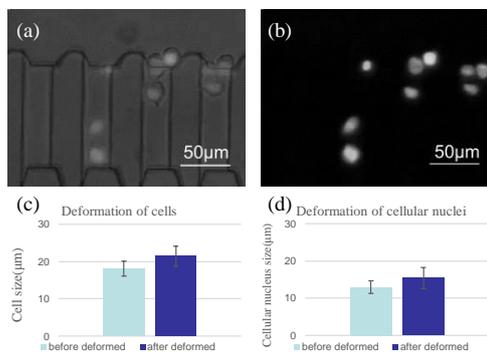


図 4.11 流路内の細胞と細胞核の変形量の計測結果。(a) 位相差像, (b) 染色した細胞核の蛍光像, (c) 細胞の変形量の計測結果, (d)細胞核の変形量の計測結果

②直列狭窄流路による連続機械刺激とがん細胞の

変形能評価： がん細胞 (HELA) と正常細胞 (NIH3T3) を用いて流路内の通過時間を調べた。狭窄部がある5つの列の通過時間と、自由に流れる区間の通過時間を計測することにより、各列の速度を得る。自由流路での速度を用いて各列の流速を正規化したものを通過効率 (passing efficiency) とした。それぞれの細胞の各列通過効率を比較したものが図 4.12 である。がん細胞は通過効率の増加割合が正常細胞より大きい。通過時間は細胞の狭窄部への侵入時間に依存していると考えられる。侵入時間は細胞の粘弾性に大きく依存し、がん細胞ではこの粘弾性が正常細胞よりも小さいことがわかる。

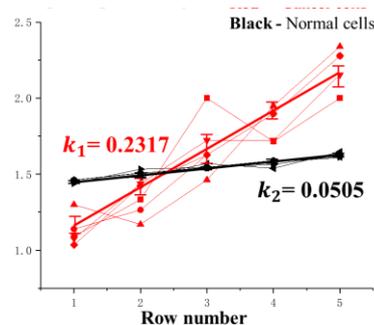


図 4.12 NIH3T3 と HELA の通過効率の比較

③高効率細胞捕捉システムと細胞間インタラクション評価：

細胞の1個捕捉, 2個捕捉, 3個捕捉の3種類の流路系を作製した。捕捉の効率性の確認と最適化を図るため、主流路幅を変えて捕捉率 (目標の細胞数が捕捉されたチャンバーの割合) を確認した。図 4.13 は主流路幅を変えた時の捕捉の様子と成功率を示したものである。主流路幅が 100 μm の時に最も捕捉成功率が上がった (97%)。図 4.14 は2個捕捉最適流路とその成功率である。

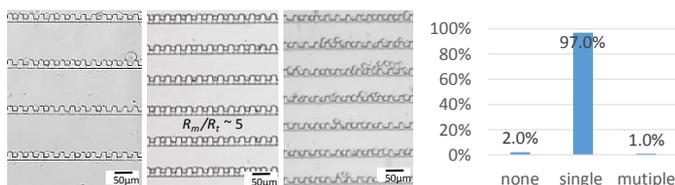


図 4.13 1個捕捉の流路比較と成功率

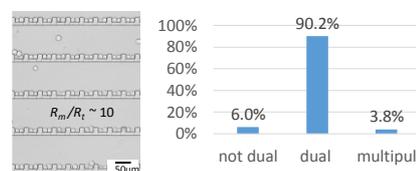


図 4.14 2個捕捉の流路と成功率

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】

1. Xiaoming Liu, Qing Shi, Yuqing Lin, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Toshio Fukuda, Qiang Huang and Tatsuo Arai, Multifunctional Noncontact Micromanipulation Using Whirling Flow Generated by Vibrating a Single Piezo Actuator, Small, DOI:10.1002/sml1.201804421R1, 2018. (IF: 9.598)
2. Kenichi Ohara, Shota Takagi, Masaru Kojima, Mitsuhiro Horade, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae and Tatsuo Arai, Real-time 3D measurement system for micro-manipulation, IJMA, Vol.6, No.4, pp.183-189, 2018.
3. Xiaoming Liu, Qing Shi, Yuqing Lin, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Qiang Huang, Toshio Fukuda and Tatsuo Arai, Hydrodynamic Tweezers, Trapping and Transportation in Microscale Using Vortex Induced by Oscillation of a Single Piezoelectric Actuator, Sensors, Vol.18, 2002; doi:10.3390/s18072002, 2018.
(他 10 編)

【査読付き国際会議発表論文】

1. Masaru Kojima, Taisei Tanaka, Yasushi Mae, Toshihiko Ogura and Tatsuo Arai, Cell Stiffness Measurement by Two-fingered Micro-hand System with Plate Shaped End Effector, MHS2018, Nagoya, 2018.
2. Kazuma Koshiede, Masaru Kojima, Yasushi Mae and Tatsuo Arai, Implementation of Local Environmental Control System on the Microhand, MHS2018, Nagoya, 2018.
3. Xiaoming Liu, Junnan Chen, Yuqing Lin, Masaru Kojima, Qing Shi, Qiang Huang, Toshio Fukuda and Tatsuo Arai, Strategy for Stable Grasp and Accurate Release for Dual-finger Micromanipulator, MHS2018, Nagoya, 2018.
(他 23 編)

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

〔学会発表〕 (計 47 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 小嶋 勝

ローマ字氏名： **Kojima, Masaru**

所属研究機関名： 大阪大学

部局名： 基礎工学研究科

職名： 助教

研究者番号 (8 桁)： 00533647

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 小椋 利彦

ローマ字氏名： **Ogura, Toshihiko**

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。