

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02091

研究課題名（和文）細胞代謝解析のための機能デバイスを組込んだバイオハイブリッドシステムの構築

研究課題名（英文）Biohybrid system composed of function devices for cell metabolism analysis

研究代表者

小西 聡（Satoshi, Konishi）

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：50288627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、チップ上に培養した細胞に対して、代謝物の回収デバイスや生化学センサ等の機能デバイスを組込んだバイオハイブリッドシステムの構築を進めた。代謝物回収機構や本事業で導入のバイオセンサ装置をディッシュの系に組み込んだシステムを構成し、バイオハイブリッドシステムを実現した。動作検証を実施し、構築したシステムの有用性を確認するとともに、試行実験結果をもとに顕在化した課題の解決に成功した。動作検証の対象とした脂骨格筋細胞への電気刺激評価実験、脂肪細胞に対する薬剤刺激評価実験を通して有効性を確認した。以上のように、構築したバイオハイブリッドシステムの応用展開が期待される成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、チップ上に培養した細胞に対して、代謝物の回収デバイスや生化学センサ等の機能デバイスを組込んだバイオハイブリッドシステムの構築を進めた。薬剤投与や電気刺激等の外的刺激入力制御と出力となる代謝物の定期的な回収分析が可能なシステムを構築し、培養細胞組織の高頻度評価や自動化、さらにはバイオリズムを有する脂肪細胞等の細胞代謝現象の解明研究、さらには機能特性の変容現象の解明研究が可能となる。

研究成果の概要（英文）：This study developed a biohybrid system that incorporates a sampling device and functional devices such as biochemical sensors for cells cultured on chips. We constructed a system that incorporated the sampling device and biosensor devices introduced in this project into the dish system. The biohybrid system was applied to fat cells and skeletal muscle cells with the aim of the operation verification. Electrical stimulation evaluation experiments on skeletal muscle cells as well as the drug stimulation evaluation experiments for fat cells were successfully executed by the constructed system. It is expected that the application development of the biohybrid system constructed in this study is expected with confidence.

研究分野：MEMS

キーワード：マイクロ・ナノデバイス マイクロマシン ナノバイオ

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、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム(以下メタボ)が重要な健康問題として注目される中、本研究は「細胞代謝解析のための機能デバイスを組込んだバイオハイブリッドシステムの構築」を目指す。

生活習慣病の引き金ともいわれるメタボの該当者および予備群者数は合わせて約 1,940 万人にのぼり、これに連動してメタボ関連市場も 3 兆円規模（2010 年）といわれている。2014 年に出版された健康医療戦略では、再生医療、その周辺機器の国内市場規模で、2012 年の 90 億円および 170 億円から、2030 年にはそれぞれ 1 兆円および 5500 億円に成長するとされている。世界ではその 10 倍以上といわれている。再生医療分野の成長は、自動細胞培養装置をはじめ、産業界からの視線も熱い。世界的には、チップ上に臓器やヘテロな臓器群を培養する OoC(Organ on a Chip)、BoC(Body on a Chip)の研究が活発であり、培養細胞と MEMS を融合するバイオハイブリッドの観点から本研究もこの新しい潮流に沿っている。研究代表者が専門とする MEMS(Micro Electromechanical Systems)は、当初の自動車や情報機器分野への応用にとどまらずバイオ応用が盛んであり、 μ TAS(Micro Total Analysis Systems)や LOC(Lab on a chip)と呼ばれる領域で活発に研究開発が進み、上述の OoC、BoC の分野とも融合した展開が進んでいる。

2．研究の目的

今回提案する研究では、細胞の代謝解析のためのバイオハイブリッドシステムの実現を目指した。本研究では、研究代表者らのバイオハイブリッドの研究実績を背景に、pH センサ、乳酸センサといった代謝解析に重要な機能デバイスを組込んだバイオハイブリッドシステムの着想に至った。対象細胞としては、実績のある脂肪細胞に加えて骨格筋細胞への適用にも取り組む。本研究では、代謝物の回収デバイスや生化学センサ等の機能デバイスを組込んだ脂肪細胞等のバイオハイブリッドシステムを構築し、細胞代謝解析への貢献を目指す。薬剤投与や電気刺激等の外的刺激入力制御と出力となる代謝物の定期的な回収分析が可能なシステムを構築することができれば、バイオリズムを有する脂肪細胞等の細胞代謝現象の解明研究、さらには機能特性の変容現象の解明研究が可能となる。

3．研究の方法

細胞代謝解析のためのバイオハイブリッドシステムの構築を行う。定期的に培養細胞環境の培地を回収・センシングし、細胞の代謝におけるバイオリズム解析を可能とすることを目指す。システムの構築に向けて、1)細胞培養機構、2)組込みセンサ、3)細胞代謝物回収機構、4)細胞活動制御、に関する研究開発に取り組む。システムのハードウェアについては、研究代表者を中心としたバイオ MEMS の研究者が担当し、1)の細胞培養や4)の情報処理、解析部分について運動生理、生化学が専門の研究分担者が担当する。対象細胞として抗メタボに関連が深い脂肪細胞に加えて骨格筋細胞を取り上げる。システム仮構成、全要素統合の二段階を踏んでシステムの構築を進め、途中試運転結果を反映させながらバイオハイブリッドシステムの完成を目指す。

以下、研究内容の大項目を整理する。

- ・**細胞培養機構**：細胞培養のため、自動培地交換機構、培養環境を整備する。継続して画像観察に関する中項目も設定する。培養機構には、以下の各要素の組込み、集積化を行うことになる。
 - ・**組込みセンサ**：代謝物解析のために、TaO₂ 薄膜パターンを用いた pH センサの開発、酵素固定による乳酸センサへの展開を図る。さらに培養環境への組込み技術を実現する。
 - ・**細胞代謝物回収機構**：定期的に培地中代謝物を回収するため、まずは既製装置による外付けのタイプの回収機構を構築し、最終的には培養環境への集積化を進める。
 - ・**入力刺激機構**：細胞活動制御のため、刺激物質導入、電気刺激等のデバイスを研究開発する。
 - ・**細胞活動制御**：代謝制御のため、取得信号処理、細胞代謝解析、制御の各機能を研究開発する。
- 総合評価については、全員で連携して実施する。

以下、大項目に基づいた実施計画を述べる。

初年度には、細胞培養機構、組込みセンサ、代謝物回収機構、入力刺激機構、の各要素の研究開発を進める計画を立てた。中でも細胞培養機構と代謝物回収機構は、組込みセンサや入力刺激機構の開発に比べて早い実現を見込み、上期から本格化させている。細胞代謝解析バイオハイブリッドシステムについては、細胞代謝解析を優先し、研究開発予定の集積化センサの代わりにセンサの校正用に導入予定の既製の細胞培養用バイオセンサを用いて構成する。併せて、科研挑戦的萌芽(H25-H26)で取り組んだ画像解析技術の適用を図り、システム化の準備を進める。

二年目は、要素技術の統合によるシステム化を開始する計画を立てた。細胞培養機構、組込みセンサ、代謝物回収機構、入力刺激機構、の各要素の統合準備を進める。中でも、細胞培養機構と代謝物回収機構は、比較的早い実現を見込んでいる。細胞代謝解析を優先し、開発予定のセンサの代わりにセンサの校正用に導入予定の既製の細胞培養用バイオセンサおよび科研挑戦的萌芽(H25-H26)で取り組んだ画像解析技術を適用して、細胞代謝解析バイオハイブリッドシステムを仮構成する。進捗に応じて仮構成したシステムの試運転を行い課題の検証を行う。

最終年度は、仮構成したシステムを用いた試運転を継続し、課題が顕在化すれば適宜解決す

る。試運転が順調であれば、種々設定する細胞の代謝解析に関する課題に取り組む。並行して、組込みセンサや入力刺激機構の要素の統合を進め、要素の最終統合を進める。要素の集積化による最終統合により細胞代謝解析バイオハイブリッドシステムが実現できたら、仮構成したシステムで検証した課題に再度適用し、評価を実施する計画である。評価では、様々な条件設定下で細胞を培養し、その挙動を解析する。本研究を通して、制御命令に従って様々な条件設定を行い、定期的に代謝物を分析し解析につなげることが可能となる。特に、定期的な代謝物回収分析機能は、バイオリズムの観点から細胞の代謝解析を行う研究促進が期待される。さらに、成果を通じて、細胞の代謝解析が解決しようとしている抗メタボさらに広く人の代謝に関わる現象の理解の促進への貢献を目指す。

4. 研究成果

メタボリックシンドロームは生活習慣病との関連が深く健康診断でも重視されており、培養組織を用いた代謝解析の重要性も高まっている。細胞工学を駆使して生体組織をチップ上につくる研究も活発に進められており、本研究では、代謝物の回収デバイスや生化学センサ等の機能デバイスを組んだバイオハイブリッドシステムの構築を進めた。

細胞培養機構、組込みセンサ、代謝物回収機構、入力刺激機構、の各要素の研究開発に取り組み、当初計画に基づき要素技術研究に関して着実に成果をあげることができた。本研究では、独自開発を目指しているバイオハイブリッドシステムとその要素技術の研究開発過程においては、なるべく従来の系と併用し、比較をしながら進めていくことにした。

細胞培養機構に関しては、従来のディッシュの系に対し、培地交換機構、薬剤刺激機構といった流路を有したチップを設計、製作し、PCにより制御可能な系を実現した。システムとしての構成を念頭に、汎用性の高い培養ディッシュとの整合性の高い系の設計、構築にも重点を置いて研究を進めた。ディッシュの系に代謝物回収機構や導入済みのバイオセンサ装置を組み合わせたシステムを仮構成し試運転を可能にした。代謝物回収機構については、組み込み可能な流路チップタイプのものと同外付けタイプのを並行して開発し、前者の成果は学会で発表している。チップ上に形成した疎水性のマイクロ流路を用いて主流路から分岐する流路に段階的に大きくなるように圧力障壁を配置した設計を行った。マイクロ流路内に大きさの異なる圧力障壁を設置することにより、圧力障壁が小さい流路へ液が流れるように操作が可能である。製作したデバイス(図1)に送液実験を行ったところ、圧力障壁が最も小さい流路から順に液が流入することを確認した(図2)。よって、本デバイスは流路スイッチング機能として有効である。また、マイクロ流体デバイスのため、高密度集積化が可能であり、高頻度なサンプリングの実現が期待できる。

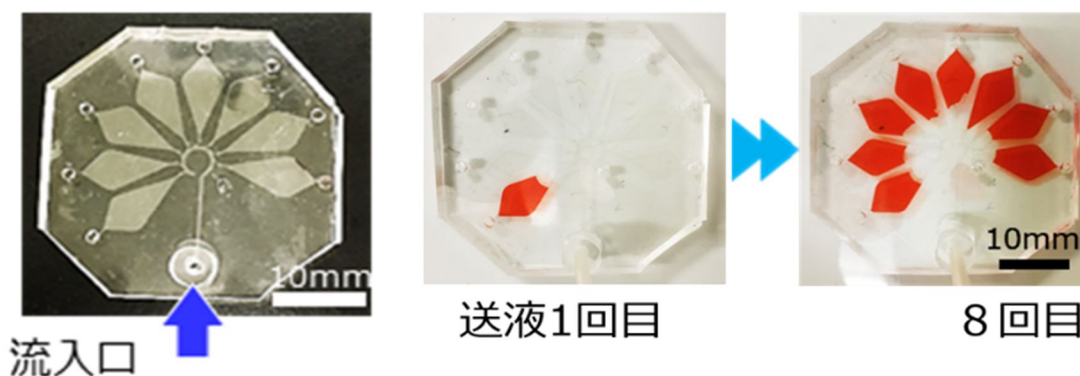


図1 回収サンプリング流路チップ 図2 流路チップによる送液自動分注実験結果

外付け用タイプ代謝物回収機構については、既製のポンプやバルブを組み合わせ、PCにより制御可能な系の実現に取り組んだ。本事業で導入したバイオセンサ装置を用いて同じサンプルを分析することにも取り組み、それぞれの機能の有用性を確認した。

組込みセンサについては、pHセンサを手始めに取り組みを開始し、TaO₂電極をパターンニングしたpHセンサを製作することに成功した。センサ電極薄膜材料(Ta₂O₅およびTiO₂)のスパッタ成膜条件を改良し、pH感応電極の感度を向上した。

入力刺激機構については、本研究が取り上げている脂肪細胞と骨格筋細胞のための機能拡充を図った。具体的には、脂肪細胞については薬剤刺激、骨格筋細胞については電気刺激画像処理できるようにした。薬剤刺激については、前述の回収サンプリング機構と同じ技術を適用することにより実現している。一方、培養骨格筋細胞の電気刺激制御システムについては、一般的な細胞培養に用いられている10 cmセルカルチャーディッシュに適用可能な構成を設計し、汎用性の向上を図った(図3)。本システムを用いた電気刺激実験により、骨格筋細胞の収縮を確認した。本システムは刺激波形や時間、強度が制御可能であり、任意の刺激条件評価が可能となる。



図3 電気刺激実験システム

脂肪細胞については、脂肪滴の形成に影響をもつ因子の入力をコンピュータ制御し、脂肪滴の形成状況を画像処理技術でもモニタリング、さらに画像処理結果を入力制御にフィードバックすることに成功した。骨格筋細胞の電気刺激実験における収縮計測において計測エラーがみられ課題が顕在化した。画像処理における計算手法の改良により、計測エラーを低減することにも成功し、その成果は学会報告している。

以上の要素技術の研究開発成果は、本研究が構築したバイオハイブリッドシステムの展開が薬剤投与や電気刺激等の外的刺激入力制御と出力となる代謝物の定期的な回収分析による細胞代謝解析へ応用できることを示唆している。

今後の応用展開を念頭に、脂肪細胞と骨格筋細胞を対象として動作検証を進め、性能の有効性を確かめた。

骨格筋細胞に関しては、システム上で培養した骨格筋細胞に物理的な刺激である電気刺激を加えた際の炎症マーカーの発現の評価を行った。システムにより印加電圧・周波数を調整することにより、炎症マーカーの発現を評価した。電気刺激後に細胞内における炎症マーカー量を確認したところ減少がみられ、刺激後にみられた炎症マーカーは細胞内において刺激時に生成されていると考えられる。また、電気刺激電極に対する細胞存在面積を変化させることにより炎症マーカーの発現量が変化することもわかってきた。さらには、電気刺激実験時における培養環境（温度）も炎症マーカー発現に影響することもわかってきた。本研究で整備してきた画像処理による評価技術との相関についても今後の検証が期待される。さらに、電気刺激実験において、栄養状態を変化させた際の筋合成関連タンパク質発現の解析も実施し、栄養状態の違いの影響を確認することができている。

脂肪細胞については、脂肪滴の形成状況（特に大きさの変化）を画像処理で評価する技術の改良を進めてきた。画像フレーム内外へ移動する細胞により面積測定の精度が悪くなるという課題について取り組み、テンプレートマッチングや細胞判別領域を利用して解決に取り組み成果を挙げた。

以上のように、構築してきたバイオハイブリッドシステムを具体的な動作検証事例に基づいて実践的に改良を進めることができ、本研究で構想中のバイオハイブリッドシステムの実現において重要な研究成果を得ることができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 中 淵 翼、 小 西 聡
2 . 発表標題 培養骨格筋細胞の電気刺激応答解析への画像処理技術の適用検討
3 . 学会等名 ViEW2018（ビジョン技術の実利用ワークショップ）
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 中 淵 翼、 小 西 聡
2 . 発表標題 共通流路分岐点を特徴とする分注流路選抜デバイス
3 . 学会等名 電気学会 センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム
4 . 発表年 2017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	小林 大造 (Taizo Kobayashi) (20557433)	立命館大学・理工学部・准教授 (34315)	
研究 分 担 者	橋本 健志 (Takeshi Hashimoto) (70511608)	立命館大学・スポーツ健康科学部・教授 (34315)	

6．研究組織（つづき）

	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	服部 浩二	立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・ 准教授	削除：平成29年11月27日
	(Koji Hattori)		
	(60409670)	(34315)	

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