

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12751

研究課題名(和文) ダイナミック細胞応答を観測可能な統合化インビトロシステム構築

研究課題名(英文) Development of integrated in vitro monitoring systems for dynamic cell responses

研究代表者

小森 喜久夫 (Komori, Kikuo)

近畿大学・工学部・准教授

研究者番号：60431813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト応答予測の向上を目指し、酸素非依存性の電気化学バイオセンサでのモニタリングを利用することで、細胞応答を非侵襲で評価するためのシステム開発を検討した。肝細胞については、電気化学グルコースセンサに好氣的培養手法を組み合わせることで、生体内の門脈近傍の肝組織と同質の糖代謝・糖新生の現象を電流応答で記述できた。この他にも、アレルギー研究で広く利用される好塩基球様細胞株RBL-2H3が免疫刺激によって遊離するヒスタミンの電気化学モニタリングにも成功している。この手法は、細胞アッセイの予測精度向上に繋がるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物実験に代わる薬剤や化学物質の有害性や安全性の評価として、ヒト培養細胞を利用したアッセイ法の利用が期待されている。最近の細胞培養手法の高度化により、薬剤に対して生体と同質の応答が得られるようになりつつあるものの、依然として予測精度は低い。この問題解決の1つとして本研究では、好氣的な細胞環境条件に加えて、従来の終点計測ではなく、連続計測を組み合わせることで、予測精度の向上を図った。

研究成果の概要(英文)：We investigated towards the development of label-free cell-based bioassay systems with oxygen-independent electrochemical biosensors. Based on the electrochemical responses obtained here, hepatocytes cultured under an aerobic culture method showed physiologically relevant behaviors of glucose metabolism and gluconeogenesis in the periportal region of liver tissues. In addition, released histamine from a basophilic leukemia cell line, RBL-2H3, was successfully monitored after immunostimulation. The present systems will enable to improve the prediction of human responses.

研究分野：生物工学

キーワード：電気化学センサ 細胞アッセイ カーボンナノ材料 生体模倣システム

1. 研究開始当初の背景

生体内環境の恒常性維持など複雑で巧妙な生命システムは、細胞内・細胞間・臓器間での情報伝達、物質交換、エネルギー変換によって支えられているものの、その仕組みは現在も不明確である。動物実験などのインビボ系では通常、多種多様な細胞や臓器が関与するため、得られる応答が複雑になる。一方で培養細胞を用いたインビトロ系では、特定の臓器モデルを選択できるため、得られる応答を簡素化できる。このことから、応答の解明・理解が容易になる。しかしながら従来のプラスチック製培養皿で細胞を取り扱うインビトロ系では一般的に、生理学性が低い問題がある。このことから近年、細胞組織の生理学性を高める新たな培養手法の研究が盛んである。血流を模倣してせん断応力を細胞に負荷できる、マイクロ流体デバイスを基盤とする培養手法や、従来の培養基材では嫌気的環境であるものの、細胞接着基板に酸素透過性材料を用いることで、細胞への直接的な酸素供給を改善させた、好氣的培養手法などが提案されている。実際に我々は、肝細胞などの酸素消費量が高い細胞について、好氣的細胞培養手法を利用することで、肝細胞のエネルギー代謝や薬物代謝などの生理機能が向上することを明らかにしてきている。

一方で、細胞応答の評価には大きく2種類があり、1つ目は、蛍光色素などによる標識化法や染色法による画像解析、2つ目は、定期的または終点で回収した培養液の機器分析である。前者の場合、連続的に計測することは原理的には可能であるものの、細胞侵襲性の問題があるため、正確な応答を計測できているのか疑問が残る。後者では、離散的な応答であるため、ダイナミックな細胞応答の理解が困難となる場合が多い。

このように、培養手法は著しく改善しているにも関わらず、細胞応答評価法は依然として、従来の手法に頼っているのが実状である。

2. 研究の目的

上記のことを踏まえ本研究では、改善された細胞手法に、非侵襲的細胞応答モニタリング手法を組み合わせることで、生理学的機能を向上させた細胞応答評価系に関する基礎的知見を得るための方法論構築を目指した。本研究では、培養細胞に薬剤などの刺激を与え、そのときに細胞が消費したり分泌したりする化学種を、好氣的培養環境下で電気化学的手法を用いてオンサイトで連続計測できることを最終目標とした。このとき、インスリンまたはグルカゴンなどの生体内の血糖維持機構に関与するホルモンでラット初代肝細胞を刺激したときの糖代謝および糖新生の現象を代表例として用いた。

これを実現させるために、我々がこれまで検討してきている酸素透過性材料を用いた好氣的細胞培養手法に、電気化学的バイオセンシング手法を組み合わせた。これまでに我々は、高い導電性と広い比表面積をもつカーボンナノチューブや、電子局在性のグラフェンエッジ領域を表面に露出したカーボンナノファイバーを電極材料として用い、酸化還元酵素を含む化学種との電子移動が高効率で進行することを明らかにしている。具体的には、これら電極表面に酵素ペルオキシダーゼを吸着させ、基質となる過酸化水素を直接電子移動から検出できるなど、電気化学バイオセンサへの応用も検討してきていた。この知見を利用して、電気化学ヒスタミンセンサや電気化学グルコースセンサを構築し、免疫刺激やホルモン刺激を与えたときに、肥満細胞株から遊離されるヒスタミンや、初代肝細胞が消費・産生するグルコースを連続モニタリングするための知見を収集した。生理学的に妥当性のある細胞応答を、オンサイトで細胞非侵襲的に長時間分解で評価できれば、インビトロ細胞アッセイによる予測精度向上につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞応答を計測するためのセンサ開発を推進した。具体的には、カーボンナノチューブまたはカーボンナノファイバーの電極表面に、酸素の影響を受けないグルコース脱水素酵素やヒスタミン脱水素酵素をナフィオンで包括固定化することで、電気化学バイオセンサを作製した。この理由として、グルコース酸化酵素などを使用する場合、細胞の呼吸代謝によって培養液中の溶存酸素濃度が変化するため、得られる電流応答が酸素濃度によって影響を大きく受けるからである。また、セルロース系透析膜を電極面に被覆するなどして、培養液成分の影響を取り除く検討をした。

(2) 細胞が消費する物質の検出について、基礎的知見を収集した。ここでは、グルコースを指標とした。従来の培養皿で肝ガン細胞株を培養し、細胞の表面近傍に作製したグルコース検出用の電極を設置した。薬剤添加後の細胞のグルコース代謝応答変化の様子を、触媒酸化電流応答から評価した。これにより、通常の培養条件下で細胞応答を計測できることを確認した。本研究期間中、生体低分子以外にも、生体高分子を網羅的に検出できるシ

システムのニーズが高いことを知った。そこで並行して、液晶ディスプレイで用いられる薄膜トランジスタ (TFT) 技術により作製した TFT 電極アレイの表面に、生体高分子を認識する素子として抗体を被覆し、細胞から分泌される生体高分子を、結合に基づく電極表面の静電容量変化から検出できるも確認した。

(3) 細胞から遊離される物質の検出について、基礎的知見を収集した。ここでは、ヒスタミンを指標とした。従来の培養皿で肥満細胞株を培養し、細胞の表面近傍に作製したヒスタミン検出用の電極を設置した。免疫刺激後に細胞から培養液中に遊離されるヒスタミンの濃度変化を、触媒酸化電流応答から評価した。

(4) 酸素透過性基板表面でラット初代肝細胞を培養し、作製した電気化学グルコースセンサを細胞表面に設置した。好氣的培養環境下にて、インスリンまたはグルカゴンを追加時でのラット初代肝細胞による培養液中グルコースの消費量および産生量を計測した。得られた結果を、これまでに報告されているインビボでの応答と比較した。

4. 研究成果

(1) 単層カーボンナノチューブ電極表面をナフトキノロン類でコートし、グルコース脱水素酵素をナフィオンで包括固定化することで、グルコースを計測するための電気化学グルコースセンサを作製した。この電極は、グルコース脱水素酵素を経由して、グルコースの触媒酸化電流応答を得られる。ナフトキノロン類を単層カーボンナノチューブに物理吸着させることで、グルコース脱水素酵素とカーボンナノチューブとの間の電子伝達体として機能させた。単層カーボンナノチューブやナフトキノロン類、グルコース脱水素酵素などの被覆量を調節することで、おおよそ 40 mM までのグルコース濃度を計測できた。生体内では一般的に、約 3 mM 以下では低血糖状態、10 mM 以上では高血糖状態であるとのことから、低血糖から高血糖までの培養液条件でも計測可能となった。

一方で、一般的に広く使用されているダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中でも作製した電極の応答を調べたところ、血清存在下では電流応答が著しく低下した。この原因として血清中に含まれるタンパク類による電極表面の妨害が考えられた。そこで、透析膜で電極表面を保護することで、タンパク類の電極表面の直接的な接触を防御した。これにより、電流応答の低下を改善できた。また、少なくとも 24 時間連続して電流応答を計測できることも確認した。

(2) 作製した電極を用いて、従来の培養皿に播種した株化細胞について、生理現象の 1 つであるグルコース消費を電流応答から明らかにした。ヒト肝ガン由来細胞株 Hep G2 の近傍に作製した電極を設置し、Hep G2 による糖代謝に基づくグルコース消費を DMEM 培養液中で 24 時間計測した。時間の経過とともに糖代謝が進行し、グルコースの消費を電流応答で示すことができ、また、抗がん剤シスプラチンを Hep G2 に曝露すると、抗がん剤によって Hep G2 が損傷したために、糖代謝の進行が妨げられ、電流応答の減少が抑制されることも確認できた。これにより、グルコース消費を指標として、薬物に対する影響を評価できることを明らかにした。

細胞応答を評価するために、低分子以外にも高分子の検出系も検討した。肝細胞は、タンパク類のアルブミンを産生することでも知られる。そこでオンサイト計測を考慮して、酵素免疫分析法のようなサンドイッチ法ではなく、ラベルフリーでアルブミンを直接検出する方法を検討した。具体的には、液晶ディスプレイで用いられる透明な薄膜トランジスタ

(TFT) 技術により作製した TFT 電極アレイ基板表面に抗アルブミンモノクローナル抗体を固定化し、アルブミンとの結合に基づく電極表面の静電容量変化からセンシングへの応用を試みた。その結果、0.3~300 pM のアルブミンを検出できることが明らかになった。各種認識素子をアレイ化することで、多成分同時計測への実現可能性を示した。

(3) 生理活性物質であるヒスタミンの検出系の検討も進めた。カーボンナノファイバー電極表面に、ここでも酸素の影響を受けないヒスタミン脱水素酵素をナフィオンで包括固定化することで、電気化学ヒスタミンセンサを作製した。本電極では、ヒスタミン脱水素酵素によるヒスタミンの直接的な触媒酸化が可能であった。また、ヒスタミン脱水素酵素の至適 pH 範囲はおおよそ 9.0~11.5 であるものの、細胞応答計測条件となる中性付近 (pH 7.4) でも、ヒスタミンの触媒酸化電流応答を計測できることを明らかにした。実際に、アレルギー研究で使用されるラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 を抗ジニトロフェニル IgE 抗体で感作し、抗原としてジニトロフェニル化ウシ血清アルブミンを作用させるときに脱顆粒により遊離されるヒスタミンを直接検出できた。またこの電流時間変化の結果から、ヒスタミンの遊離現象は、細胞からの脱顆粒速度に依存することも明らかになった。このように、細胞応答の現象を速度論的に評価できることを示した。

(4) 好氣的環境培養手法を用いて生理学性を向上させたラット初代肝細胞について、高血糖時でインスリンを添加したときの糖代謝、および無血糖時でグルカゴンとフルクトースを添加したときの糖新生におけるグルコース濃度の経時変化を電流応答で記述することを試みた。約 30 mM グルコースを含む培養液にインスリンを添加すると、電流応答がわずかに減少したことから、糖代謝速度がわずかに加速化されることが明らかになった。一方で、グルコース非存在下でフルクトースとグルカゴンを投与すると、グルカゴンによるラット初代肝細胞内での糖新生機構の促進化に基づいて、フルクトースからグルコースを産生する様子を電流時間変化で示すことができた。このとき、大幅な電流応答の向上を確認できた。ここで得られた現象は、肝臓でも酸素濃度の高い門脈近傍と同様の現象傾向を示していることが明らかになった。このようなインビトロでの肝細胞について、生理学的に妥当な糖代謝・糖新生の現象を電流応答でモニタリングできた例は調べた限り無い。このことは、電気化学グルコースセンサと好氣的培養手法の組合せにより実現できたと言える。加えて、好氣的培養手法が可能な膜型培養器を、電気化学センサを組み込んだデバイスに設置可能な一体型システムを作製し、電気化学特性についても調べた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Komori Kikuo, Komatsu Yuto, Nakane Masaharu, Sakai Yasuyuki	4. 巻 138
2. 論文標題 Bioelectrochemical detection of histamine release from basophilic leukemia cell line based on histamine dehydrogenase-modified cup-stacked carbon nanofibers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 107719 ~ 107719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bioelechem.2020.107719	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 Zhu Dongchen, Cathcart Grant A, Ihida Satoshi, Toshiyoshi Hiroshi, Tixier-Mita Agnes, Sakai Yasuyuki, Komori Kikuo	4. 巻 31
2. 論文標題 Toward the development of a label-free multiple immunosensor based on thin film transistor microelectrode arrays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 115002 ~ 115002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6439/ac2547	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 Komori Kikuo, Usui Masataka, Hatano Kohei, Hori Yuma, Hirono Keita, Zhu Dongchen, Tokito Fumiya, Nishikawa Masaki, Sakai Yasuyuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 143
2. 論文標題 In vitro enzymatic electrochemical monitoring of glucose metabolism and production in rat primary hepatocytes on highly O ₂ permeable plates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 107972 ~ 107972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bioelechem.2021.107972	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 小森 喜久夫	4. 巻 59
2. 論文標題 カーボンナノ材料を利用した電気化学バイオデバイス	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 材料の科学と工学	6. 最初と最後の頁 78 ~ 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小森喜久夫、碓井政貴、酒井康行、木村啓志
2. 発表標題 GDH修飾SWCNT電極による初代ラット肝培養細胞の糖代謝・糖新生モニタリングの試み
3. 学会等名 電気化学会第88回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Komori, M. Usui, Y. Sakai, and H. Kimura
2. 発表標題 Amperometric Monitoring of Glucose Level for Non-invasive Cell-based Assays Based on Glucose Dehydrogenase-modified SWCNTs
3. 学会等名 PRIME 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小森喜久夫
2. 発表標題 積層型カーボンナノファイバー電極での電子移動反応の解明とバイオデバイスへの応用
3. 学会等名 The 5th International Workshop on Advanced Nanoscience and Nanomaterials
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小森喜久夫
2. 発表標題 機能性バイオデバイスの開発
3. 学会等名 近畿大学工学部研究フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Komori
2. 発表標題 Nanobioelectrochemistry for Novel Bioanalytical and Bioassay Devices
3. 学会等名 The 4th International Workshop on Advanced Nanoscience and Nanomaterials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小森喜久夫、小松唯人、酒井康行
2. 発表標題 ラット好塩基球様RBL-2H3から遊離されたヒスタミンの電気化学的直接検出
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第32回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 碓井政貴、木村啓志、酒井康行、小森喜久夫
2. 発表標題 細胞非侵襲型電気化学グルコースセンサを利用した肝組織の糖代謝モニタリングの検討
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小森喜久夫、小松唯人、酒井康行
2. 発表標題 ラット好塩基球様RBL-2H3から遊離されたヒスタミンの電気化学モニタリング
3. 学会等名 電気化学会 第87回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀 優真、福田裕亮、木村啓志、小森喜久夫
2. 発表標題 電気化学グルコースモニタリングシステムを搭載したカセット式細胞培養器の試作
3. 学会等名 電気化学会関東支部・第39回夏の学校
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷 勇太、谷川 滉、小森喜久夫
2. 発表標題 電気化学的に合成した熱感応性相転移ポリマーによるヘムペプチド電極の活性制御
3. 学会等名 電気化学会関東支部・第39回夏の学校
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小森喜久夫、相川智紀
2. 発表標題 PQQ架橋による再構築型酵素の直接電子移動反応
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 D. Zhu, A.-C. Eiler, S. Ihida, Y. Sakai, H. Toshiyoshi, A. Tixier-Mita, and K. Komori
2. 発表標題 Pancreatic Cells Real-Time Simultaneous Electrophysiology Mapping and Fluorescent Bioimaging with a High-Resolution Thin-Film Transister Arrays
3. 学会等名 第38回「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 2021年

1. 発表者名 小森喜久夫、碓井政貴、畑野航平、堀 優真、朱 東晨、廣納敬太、時任文弥、西川昌輝、酒井康行、木村啓志
2. 発表標題 好氣的培養環境下でのラット初代肝細胞の糖代謝・糖新生の電気化学モニタリング
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 優真、福田裕亮、木村啓志、小森喜久夫
2. 発表標題 グルコースモニタリングシステムを搭載した簡易型共培養デバイスの設計検討
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小森喜久夫、碓井政貴、畑野航平、堀 優真、朱 東晨、廣納敬太、時任文弥、福田裕亮、西川昌輝、酒井康行、木村啓志
2. 発表標題 好氣的培養環境下での肝細胞の糖代謝・糖新生の電気化学モニタリングデバイスへの応用
3. 学会等名 2021年度シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小森喜久夫、井原 稜、豊田祐貴、中田充俊
2. 発表標題 近赤外光照射によるPNIPA/カーボンナノファイバー被覆ITO電極の応答制御
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
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
研究協力者	酒井 康行 (Sakai Yasuyuki) (00235128)	東京大学・工学系研究科・教授 (12601)	
研究協力者	木村 啓志 (Kimura Hiroshi) (40533625)	東海大学・マイクロ・ナノ研究開発センター・教授 (32644)	
研究協力者	ティクシエ三田 アニエス (Tixier Mita Agnes) (00334368)	東京大学・生産技術研究所・准教授 (12601)	
研究協力者	小松 唯人 (Komatsu Yuto)		
研究協力者	碓井 政貴 (Usui Masataka)		
研究協力者	朱 東晨 (Zhu Dongchen)		

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