

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05288

研究課題名（和文）単一細胞・細胞部位の機械的特性と遺伝子発現情報の相関評価

研究課題名（英文）Local/whole cell-mechanical measurements and transportation of a single cell by BioMEMS and its correlation evaluation with gene expression data

研究代表者

久米村 百子（Kumemura, Momoko）

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：50533642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：単一細胞の機械的な特徴と遺伝子情報を取得することを目的とし、MEMSによる細胞の力計測と細胞マニピュレーション、遺伝子発現解析を実施した。2種類の細胞について機械特性と細胞骨格タンパク質の発現レベルの相関関係を得た。また、接着細胞の力計測とマニピュレーションのために、実験プロトコルの最適化、デバイス設計、接着細胞のマニピュレーションを行い、MEMSによる力計測と細胞搬送を実証した。加えて、細胞局所における力計測と空間的遺伝子発現解析を目指し、神経細胞を対象とした基礎検討を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の硬さや粘弾性などの特徴は、細胞の機能を保つ物質と密接に関係している。がん細胞は、健全な細胞に比べて柔らかいとの報告があり、機械特性を知ることにより、将来的に疾病の検査につながる可能性があると考えられる。しかし、現在は硬さが細胞のどの物質、機能に関わっているかなど、疾病との詳細な関係は明らかではない。本研究では、単一細胞ごとに細胞の硬さと遺伝子情報を取得して評価を行うシステムを用い、データを取得した。浮遊細胞計測に加えて接着細胞についてもシステムと手法確立の目処を立てた。機械特性と遺伝子情報の相関評価については、さらに実験データ数を増やすことにより、疾病との関係を導くことができると考える。

研究成果の概要（英文）：Gene expression analysis following cell characterization and manipulation was conducted to compare the mechanical property and gene expression level on a single cell. The correlation between cell stiffness and gene expression level of the cytoskeleton in two types of cells was obtained. The experimental protocol was optimized for precise measurement of adherent cells by MEMS. A new device was designed and fabricated to transport the adherent cell. Using the device, capturing and retrieving from the solution a cell was performed. In addition to the above, we tried to measure the stiffness of a neuronal cell in the local area.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：MEMSピンセット 単一細胞 機械特性計測 遺伝子発現解析 バイオMEMS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体組織の生理学的・病理学的な状態は、細胞の硬さ、粘弾性、変形能などの機械的な特徴として表出すると言われている[1]。例えばがんの転移を引き起こすとされている血中循環腫瘍細胞は、組織から血管へ変形しながら浸潤する。一方で、細胞の硬さは、主に細胞骨格と細胞核に依存すると考えられる。細胞骨格であるタンパク質のうち、アクチン、ビメンチン、 β -カテニンなどに対応する遺伝子が同定されている。しかし単一細胞スケールでの遺伝子発現情報と細胞の機械特性の関連性は明らかにされていない。

申請者はこれまでに、遺伝子発現情報と機械特性の関連性を取得することを目指し、単一細胞の機械特性と遺伝子発現解析の相関を導く MEMS 実験プラットフォームと手順を開発している。

2. 研究の目的

これまでに確立した手順を用いて、細胞の機械的な特徴に関連する遺伝子と、その細胞の機械特性との関連性を具体的に明らかにする(図 1-(1))。特定のタンパク質の情報を改変した細胞を計測し、タンパク質がもたらす機能の細胞硬さへの影響を評価する。さらに、細胞の機械特性と遺伝子発現情報の空間的な把握を目指し、基礎実験を実施する。

ピンセット型 MEMS (図 1-(2)) は、試料を捕捉する先端部分、くし歯アクチュエータ (図 1-(3))、変位センサ (図 1-(4)) から構成され、共振周波数の変化を検出することにより球状の細胞 (浮遊細胞) の機械特性を評価する。また、単一の浮遊細胞のマニピュレーションが可能である。今回の提案では、接着性細胞の特性評価を可能にするプローブ型の MEMS (図 1-(5)) による計測ワークフローの確立も並行して行う。

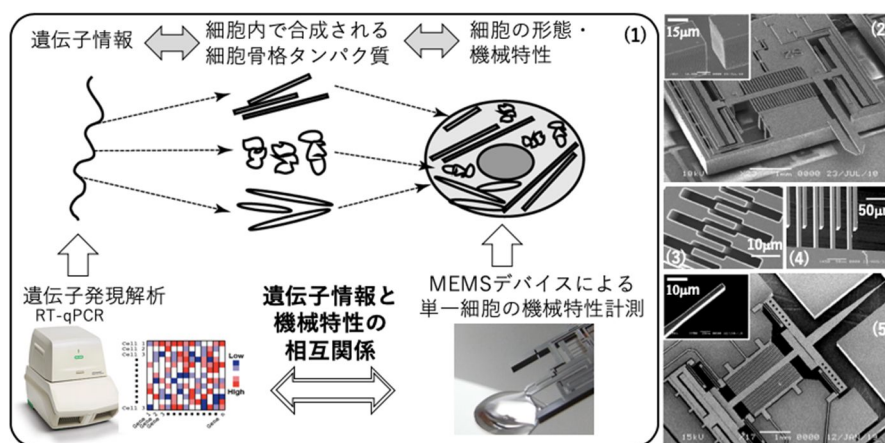


図 1. 細胞の機械特性と細胞骨格タンパク質遺伝子の情報取得と相関評価

(1) 本申請の概要, (2) ピンセット型 MEMS, (3) MEMS に集積されたアクチュエータ部分, (4) 同センサ部分, (5) プローブ型 MEMS

3. 研究の方法

(1) 細胞骨格タンパク質の遺伝子発現情報と機械特性との相関評価

培養した単一細胞の硬さ・粘弾性を計測したのち、遺伝子発現解析を行う。機械特性評価では、細胞の形態に合わせてピンセット型 MEMS とプローブ型 MEMS を用いる。浮遊細胞について、プローブ間に細胞を捕捉し、直径に対して 20% の距離を圧縮する。計測後に溶液から細胞を取り出して細胞溶解液へ入れ、遺伝子発現解析のフローに持ち込む。

(2) 接着細胞の機械特性計測プロトコルの確立

プローブ型 MEMS による接着細胞の計測方法を確立する。MEMS は高精度のマニピュレータに固定して最小 100 nm の変位量でプローブ位置を制御する。基礎検討として、濃度の異なるアガロースゲルを用いて、プローブの押し量による応答の変化を計測して計測特性を評価したのち、接着細胞の機械特性計測を実証する。

(3) 接着細胞の回収方法の検討

接着細胞の機械特性と遺伝子情報を比較するためには、機械特性計測後に細胞をディッシュ底面から引き剥がし回収する必要がある。微小物質のマニピュレーションが可能な MEMS ピンセットを用いて、細胞の引き剥がし、捕捉、溶液からの取り出しを行う。ディッシュに伸展した細胞を捕捉する必要があるため、アクチュエータを設計から見直し、プローブの駆動変位量を増大させたデバイスを作製・使用して細胞の回収を試みる。

(4) 遺伝子を制御した細胞の機械特性評価

これまでに評価した細胞は、がん細胞株であり、同じ細胞種類でも細胞ごとに性質が変化するなど細胞個々の特性を調べることができるが、自然に発生した細胞であるため、様々な要因が機械特性に関連している。特定の遺伝子と機械特性の関連性を絞り込むために、特定のタンパク質を遺伝子改変により制御し(欠損や増大)この細胞の機械特性を計測する。遺伝子情報やタンパク質の種類と、機械特性との関連度を評価する。

(5) 細胞内遺伝子発現解析とその細胞部分の機械特性評価について基礎検討

単一細胞の遺伝子発現解析では、細胞に含まれる遺伝子の全量を測定することになるが、細胞の内部において遺伝子情報は分散していると考えられる。そこで、細胞を局所的に計測したのち、その部分だけを取り出して遺伝子発現解析を行い、単一細胞内の遺伝子情報の空間分布と機械特性を把握することを目指す。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格タンパク質の遺伝子発現情報と機械特性との相関評価

構築した実験プラットフォームを用いて、HeLa 細胞とリンパ腫である Ramos 細胞を対象とし、機械特性計測ののちに遺伝子発現解析を実施した。ターゲット遺伝子としてβアクチン、ピメンチン、内在性コントロールには GAPDH を選択した。ピメンチンについては、Ct 値が得られた細胞数が少なく、細胞種類における比較は断念した。βアクチンについては、HeLa 細胞においては、硬さが大きくなるほど発現レベルが大きく、Ramos 細胞においては、ばらつきがあるものの、硬さと発現レベルは反比例の関係となった。計測した細胞数が 6 細胞と少ないため、さらなる検証が必要である。この結果はマイクロ流体デバイスの国際会議において発表した(文献[2])。

(2) 接着細胞の機械特性計測プロトコルの確立

プローブ型 MEMS を用いた接着細胞の計測については、プロトタイプデバイスを用いて実施した経緯はあるものの、細胞に対するプローブの押し込み量(長さ)によって計測値が大きく変化するため正確な位置決めが必要である。また、微量な押し込み量での計測が望ましいが、センサ感度との兼ね合いがある。そこでプローブ位置の制御手順と適切な押し込み量の導出を行った。適度な弾性を持ち、比較的容易に平面を形成できるアガロースゲルを実験試料とした。濃度の異なるアガロースゲルに対して、プローブの押し込み量と共振周波数の変化を検討し、現在の実験セットアップにおいては 500 nm から 1 μm の押し込みを最適値とした。この結果は電気学会 E 部門総合研究会において報告した(文献 [3])。

(3) 培養した接着細胞の回収方法の検討

接着細胞を計測したのち遺伝子発現解析を行うため、ディッシュに接着した細胞を引きはがし、水溶液中から取り出す必要がある。現行の MEMS ピンセットのプローブ駆動量は 3 μm 程度であり、伸展した接着細胞をつかむことが困難と予想されたため、10 μm 程度駆動できるアクチュエータへ設計変更しデバイスを作製した。これを用いてディッシュに培養した HeLa 細胞の回収実験を行なった。細胞の末端部分をプローブで把持した場合は、プローブを液中から取り出す際に溶液の表面張力によって細胞が脱落する問題があったが、細胞核が存在する細胞の中央部分を選択的に把持することで、液中からの取り出しを達成した(未発表)。デバイスの設計変更と、細胞回収の検討については第 39 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウムにおいて発表(文献 [4])すると共に電気学会論文誌 E に投稿し掲載が決定している。

(4) 遺伝子を制御した細胞の機械特性評価

研究計画では、遺伝子組替えにより細胞骨格タンパク質を制御した細胞を作成し、評価する予定としていたが、細胞の遊走能や浸潤能に関わる遺伝子を組み換えた細胞を対象として実験を行った。細胞は、宇部工業高等学校 小林准教授より提供いただいた。機械特性計測の結果では、移動性を高めた細胞とコントロールの細胞において、わずかにコントロール細胞の硬さが大きい結果が得られたが、測定した細胞数が少ないため、細胞の遊走能・浸潤能と機械特性を評価するためには、さらに実験を繰り返す必要がある。

(5) 細胞内遺伝子発現解析とその細胞部分の機械特性評価について基礎検討

神経細胞の細胞体部分と軸索部分の機械特性計測を行なった。試料は、ヒト人工多能性幹細胞株(409B2 株)より分化した神経細胞を用いた。軸索部分と細胞体部分の硬さ平均値(n=6)では、軸索と比較して細胞体部分の硬さが 3 倍程度高い結果が得られた。

文献

- [1] C. Rianna and M. Radmacher, "Cell Mechanics as a Marker for Diseases: Biomedical Applications of AFM", AIP Conference Proceedings, 1760, 020057, 2016.
- [2] K. Takamura, M. Kumemura, "Gene expression analysis following mechanical characterization of a cell

by MEMS tweezers”, The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS), pp. 1157-8, Hangzhou China and Virtual, Oct. 23nd-27th 2022.

- [3] 浅倉悠斗, Karsten Stanislav L., Kudo Lili C., Ma Zhongcai, 久米村百子, 接着細胞の機械特性計測プロトコルの構築, 電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会, 合同研究会, pp.43-45, 金沢, 2022年6月7-8日.
- [4] 岩下誠也, 久米村百子, MEMS ピンセットによる接着細胞の剥離・把持・搬送, 第39回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム (Future Technologies from Tokushima 2022), 16P2-P-22, 徳島, 2022年11月14-16日.

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Mitsuzawa, N. Suzuki, T. Akiyama, M. Ishikawa, T. Sone, J. Kawada, R. Funayama, M. Shirota, H. Mitsuhashi, S. Morimoto, K. Ikeda, T. Shijo, A. Ohno, N. Nakamura, H. Ono, R. Ono, S. Osana, T. Nakagawa, A. Nishiyama, R. Izumi, S. Kaneda, Y. Ikeuchi, K. Nakayama, T. Fujii, H. Warita, H. Okano, M. Aoki	4. 巻 16
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1527-1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.04.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nobutaka Inoue and Momoko Kumemura
2. 発表標題 Stiffness measurements of suspended/adherent cell with MEMS tweezers
3. 学会等名 9 th International Symposium on Applied Engineering and Sciences (SAES2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村公平、久米村百子
2. 発表標題 細胞の機械特性と細胞骨格タンパク質の遺伝子発現量の相関評価に向けた 単一細胞搬送から解析までの手法検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Takamura, M. Kumemura
2. 発表標題 Gene expression analysis following mechanical characterization of a cell by MEMS tweezers
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅倉悠斗, Karsten Stanislav L., Kudo Lili C., Ma Zhongcai, 久米村百子
2. 発表標題 接着細胞の機械特性計測プロトコルの構築
3. 学会等名 電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会, 合同研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩下誠也, 久米村百子
2. 発表標題 MEMSピンセットによる接着細胞の剥離・把持・搬送
3. 学会等名 第39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 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
研究分担者	金田 祥平 (Kaneda Shohei) (10542467)	工学院大学・工学部・准教授 (32613)	
研究分担者	藤田 博之 (Fujita Hiroyuki) (90134642)	東京都市大学・付置研究所・教授 (32678)	

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