

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14703

研究課題名（和文）細胞老化評価のための長期ナノ動態計測システムの創出

研究課題名（英文）Developmet for visualizatiiosystem of long-term nanoscale morphologies to evaluate senescence

研究代表者

井田 大貴（Ida, Hiroki）

名古屋大学・工学研究科・講師

研究者番号：80844422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）はナノスケールの空間分解能を有し、細胞にダメージを与えないで計測が可能のため、細胞の連続的な追跡に利用できる。そこで数日レベルのスパンで進行する長期的な細胞の変化である細胞老化を対象に、SICMで評価した。所属機関の異動などがあったものの、装置の再構築や自作のSICM系に培養用のヒーターを増設するなどの改良を達成した。また、老化様細胞の誘導と形状測定について一定の進展があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた細胞の動きを観察することは基礎研究から応用研究に至るまで、極めて重要です。SICMは従来法では難しい非侵襲計測が可能であり、本研究により数日レベルの一細胞の変化を連続的に追跡することができれば、更なる細胞・疾病理解に繋がります。また、計測対象である細胞老化は、これまで細胞内のたんぱく質の発現量などから評価されてきましたが、本研究が更に進展することで表面形状という別の尺度からの評価も可能になります。

研究成果の概要（英文）：Scanning ion conduction microscopy (SICM) allows continuous visualization of single cell surface at nanoscale spatial resolution without damaging the cell. Therefore, we attempted to evaluate senescence, which is a long-term cellular variation, using SICM. In this research, we succeeded in improving our SICM system, which is required for a long-term visualization. In addition, some progress was made in the induction and morphological measurement of senescence-like cells.

研究分野：分析化学

キーワード：走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 SICM 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光の回折限界 (約 200 nm) を超えた構造を計測するための手法として、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡など、数多くの技術が開発されてきた。走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) も上記の高解像度計測のための走査型プローブ顕微鏡技術であるが、とりわけ生細胞の計測に特化している。先端部にナノスケールの開口部を有するガラスナノピペットをプローブに用い、そこに電解質溶液を充填して電極を挿入する。この状態で、試料培地中に浸漬して電圧を加えると、ナノピペット内部の電気的中性を保つために先端部分でイオンの流れが生じ、それに起因するイオン電流が取得できる。このまま試料に近接すると、空間的なイオン流の障害により電流値が変動し、それを検出することで試料とピペット間の距離制御を非接触・非侵襲で行うことが可能である。そのまま試料表面を走査することで、ナノスケール形状を連続的に取得することができる。

一般的に微小構造観察に用いられている電子顕微鏡観察などの手法は、エンドポイントの解析であるため時間情報を取得できない。一方で、SICM 系は数時間から数日程度でも、単一細胞レベルで追跡できる潜在能力がある。培養環境下で長期間、ナノスケール形状を追跡することができれば、基礎研究から応用研究に至るまで、細胞理解に大きく貢献できる情報を提供できる。しかし、SICM 系の多くはナノスケール計測に熱膨張が大きな悪影響を及ぼすことや位置制御装置が結露に極めて弱いことなどを考慮し、大気条件下で計測していた。

2. 研究の目的

本研究では、培養環境・測定位置の自動調整機能などを整えた新規 SICM 系を立ち上げて、数日レベルで生じる代表的な細胞の変化である細胞老化を対象に長期計測を行う。

3. 研究の方法

培養環境下での SICM 計測が困難である最大の理由は温度変化による熱膨張である。たとえわずかな温度変化でもピペット先端では数十 nm 数 μm レベルの変位が生じるため、SICM イメージは大きくゆがんでしまう。特に、一般的な温度制御機構は熱源の温度をアナログで調整するのではなく ON-OFF 時間を調節することで PID 制御を行っているため、長期的には安定でも短期間では温度がわずかに上下する。そこで、位相制御による出力調整機能を持った温調器と、二層構造をもったチャンバー構造を新たに作成する。また、結露に弱い精密位置制御ステージは金属ケースに封入されたものに換装する。長期計測で他に懸念されるものとして、ナノピペット先端の汚れが考えられるため、針の修飾や先端部の汚れを強制的に除去する機能を追加する。以上のような施策により、数日レベルの長時間計測を可能とする。

4. 研究成果

移送制御と二層構造を持った温度調節可能な SICM 系については、研究準備期間中に立ち上げに成功し、固定化細胞および生細胞において 24 時間以上の連続計測に成功した。その後、研究機関の異動があり、ナノピペットの作製条件の再調整や SICM・細胞培養系の再構築などの必要があったものの、異動前の精度での計測を達成できた。また、二層構造の温

度調節系はかなり大がかりであるため、ピエゾステージに固定するタイプのヒーターも立ち上げた。同様に、結露対策のため、金属ケース封入ピエゾ素子を搭載した自作ピエゾステージについても開発することができた。長期計測で課題となるピペット先端の汚れについては、高速でピペットを移動させることで除去する方法が、再現性が高く、事前準備も不要であるためより有用であった。細胞計測については、ドキシソルビシンを添加することにより細胞の肥大化を伴う老化細胞様の形態変化を誘導でき、老化様の細胞を SICM によって計測できた。しかし、細胞老化の判定に一般的な SA-β-Gal 染色については対照群との差が見られなかった。SA-β-Gal 染色及び細胞老化に伴う形状変化の長期観察については今後の課題としたい。

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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroki Ida
2. 発表標題 Development of multiscale single cell evaluation using a glass nanopipette
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Ida
2. 発表標題 Spatiotemporal analysis of cellular nanostructure based on scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 34th 2023 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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