

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18976

研究課題名（和文）半導体デバイスを用いた電気刺激による細胞の分化誘導とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）Cellar differentiation on the electronic semiconductor device induced by the electric stimulation

研究代表者

狩野 旬（Kano, Jun）

岡山大学・環境生命自然科学学域・准教授

研究者番号：50375408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本課題は、細胞挙動を電場・電流印加で制御することを目的としている。細胞挙動に限らず生命現象は複雑系の極みであるため、DX技術を導入している。細胞生育環境に悪影響を与えない新しい電気刺激セルの開発を行った。これまで我々の電気刺激セルでは、プリント基板上に銅配線した回路上に炭素板電極を取り付けたものを用いてきたが、(1) 銅イオンによる培地汚染、(2) 炭素電極の細孔構造に起因するカビ繁殖、の問題があった。また電気刺激下での細胞外形変化のイメージングから、形状変化を深層学習し、電気刺激に伴う形状変化と同時に細胞間の空間的な広がりをつ捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに開発した電気刺激セルで採用した電極では、表面酸化、純度の問題、特定の有機物の表面固定化、などの問題が生じているが従来の炭素電極に比べずいぶんハンドリングが改善され、当初抱えていた問題をほぼ解決するに至った。DXにおいても電気刺激強度を大きく変えた系での測定結果を含めた学習を始める準備を進めており、我々のAIがこれまで捉えてきた細胞挙動が真に電気刺激を捉えているのかを判断できるようにしていく。なお新しい2024年度より、本課題で得られた成果を元にした新しいプロジェクトがAMEDで開始されている。

研究成果の概要（英文）：Our project aims to control cell behavior by applying electric fields and currents. DX technology has been introduced because cell behavior and life phenomena are complex systems. We have developed a new electrical stimulation cell that does not adversely affect the cellular growth environment. Our electrical stimulation cells have used carbon plate electrodes attached to a copper-wired circuit on a printed circuit board. Still, there were problems with (1) contamination of the culture medium by copper ions and (2) mold growth due to the pore structure of the carbon electrodes. The shape change was studied in depth from the imaging of cell shape change under electrical stimulation, and the spatial spread between cells was successfully captured at the same time as the shape change caused by the electrical stimulation.

研究分野：固体物理学

キーワード：半導体物性 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

日本を含めた多くの先進国では、高齢者の割合が 20%を超え、超高齢化社会に突入している。このような世界規模の人口高齢化に伴い、老人の筋力や身体機能の低下(サルコペニアやフレイル)、アルツハイマー病などの認知症が社会問題化しているが、いまだに有効な予防法や治療法が確立していない。健康寿命を延伸しつつ病気に怯える必要がない豊かな人生を過ごせる「未病社会」の実現は、単に高齢者のためだけではなく今後の日本経済の持続的発展の鍵ともなりうる。その鍵を握る有効な技術として、日本発の技術でもある iPS 細胞を使った再生医療や細胞医療が注目されている。しかし患者由来の iPS 細胞から、創薬に利用可能な疾患モデル細胞や移植用分化細胞を作成するためには、長い期間(半年から2年)が必要であることや、高コストの問題がある。その対応策として近年、疾患特異的 iPS 細胞や再生医療用 iPS 細胞をストックした細胞バンクから供給する試みが始まり、時間やコストが約 1/10 まで短縮されたものの、未だ対象となる疾患の種類が限られている。また創薬のみならず再生医療への応用を考えた場合、移植時の拒絶反応や一部の細胞によるがん化のリスクなど、解決されるべき問題が数多く残されている。迅速かつ安全なプレジジョン・メディシン(一人ひとりの患者に最適な治療、個別医療)の実現は喫緊の課題である。そのためにも、研究現場の負荷を大幅低減させた、超高品質な機能性細胞のハイスループット培養を可能にする革新的技術が求められている。

2. 研究の目的

我々は最近、微細電極構造デバイスを用いて、細胞が電場印加方向に規則的に配列する現象(図 1ab)、さらに電子キャリア供給により細胞の分化(機能化)応答が早まること(図 1cd)を見出した。これは、電気刺激という物理的外場からの応答を利用し、細胞分化誘導の制御が可能であることを示唆する。そこで本研究では、半導体デバイス上で電気刺激により誘発される生命現象を、DX 技術で機械学習させ、細胞の機能化現象について新しい基本原理の発見を目指す。

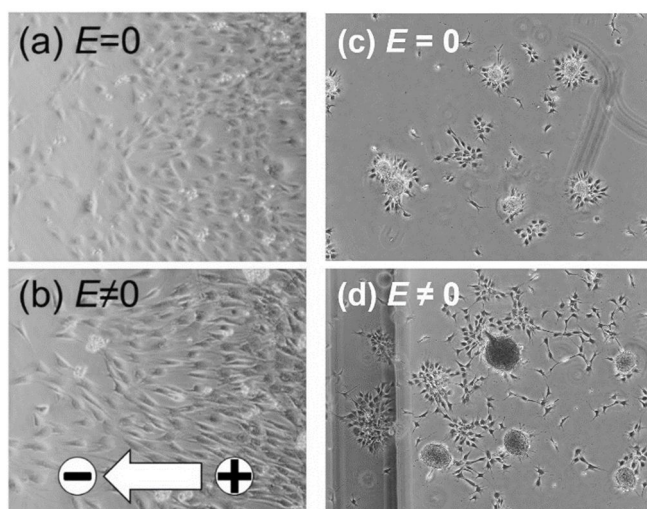


図 1: マウス筋芽細胞 C2C12 に対しパルス電場印加させた様子。電場方向に沿って配列したり(b)、他条件下では筋組織化が加速される(d)。

3. 研究の方法

図 2(a)に示すように、細胞に対し炭素電極で電場印加可能なセルを CO₂ 環流のインキュベーターに配置し、ファンクションジェネレーターを用いて電場印加を行う。なお細胞はマウス筋芽細胞 C2C12 を用い、その中でもあえて分化しにくい株種を選んでいる。CO₂ 濃度は 5%とし、インキュベーター内温度は 37 の恒温状態にしている。電場の強度は 10 V、パルス幅 20 msec を 1 Hz で印加させた(図 2(b))。電場印加時を day 0 とし、day 7 まで実験を行う。細胞はインキュベーター内に設置した倒立顕微鏡でタイムラプス観測し細胞数変化を捉え、day 4 と day 7 の時に高解像度での観察で細胞異方性を捉えることが可能である。

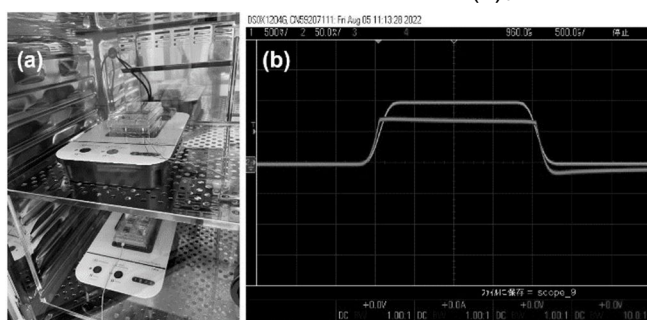


図 2: (a) 炭素板で作成したマクロサイズの電気刺激セルを CO₂ 環流のインキュベーターに設置した様子。セルは倒立顕微鏡の上に設置し、タイムラプス観察が可能となっている。(b) 10 V、20 msec の電場パルスを 1 Hz で印加する。

これまで我々の電気刺激セルでは、プリント基板上に銅配線した回路に炭素板電極を取り付けたものを用いてきたが、(1) インキュベーター内の高湿環境において銅イオンが溶出し、毛細管現象により炭素電極に浸潤し、培地を汚染する問題、(2) 炭素電極は細孔構造を有するため、カビ繁殖を促してしまい培地を汚染する問題、が本課題進行中に遭遇した。これらの問題を解決するため、新しい電気刺激セル作りを主なテーマの一つとした。とりくんだ改善点は以下の通りである：(a) プリント基板上の配線を金とする。(b) 電極種を炭素以外の金属板に変更する。

生命現象は複雑系の極みであるため、DX技術の導入を目指した。ライブイメージングから、細胞挙動をリアルタイムで深層学習し、電気刺激による細胞制御方法を検討させ、速やかにAIに推論させた電気制御法を実験系にフィードバックさせ、現場実験を加速させることを目指した。

4. 研究成果

4-1. 新しい電気刺激セルの開発

これまで用いていた電極は炭素板である。アモルファスカーボンでコーティングしたものをしていたが、細孔構造は保持されたままであり、そのため毛細管現象によりプリント基板上の銅配線がインキュベーター内の高湿雰囲気下でイオン化し、炭素電極を経由して細胞へのダメージがあった。また細孔部に汚れが溜まりやすくカビ発生の原因となっていた。そこで電気測定で用いられるプローバーと同材質なものを作成した。具体的にはタングステン板表面を金コートしたものであるが、金薄膜固定のために用いたNiが溶出し細胞毒となることがわかった。そこで、別途ある金属の板を採用したところ、細胞が死ぬことなく電気刺激を与えられることができた。最終年度においては、当初抱えていた問題をほぼ解決するに至った。

4-2. DXの活用

Pythonを用いて強化学習機能を備えた細胞セグメンテーションのシステムを構築した。これまではImageJなどを用いた手作業でのセグメンテーションだったため、膨大な時間がかかるだけでなく、人の主観が入ったものとなり精度のよいものではなかった。新システムでは、これまで1実験あたり30時間要していた解析を2時間まで短縮することに成功し、自動解析技術が確立できた。

人間の眼では識別困難な細胞分化の違いを深層学習から細胞画像を識別し、電気刺激による細胞挙動を捉えることを目指した。実験を重ねるたびに細胞画像のデータ量が増える中、データの分布シフトに適切に対応しながら汎化性能を獲得することが求められる。この問題に対処するため継続した学習が必要になるが、学習途中でこれまで覚えた解析法を忘れてしまうという破滅的忘却と呼ばれる現象に遭遇し継続学習が困難になってしまった。これを回避する手法としてElastic Weight Consolidation(EWC)がよく知られており、今回適用を試みた。EWCを用いて継続学習を行う場合の受容野の違いを可視化させたところ、現在の我々のデータでは破滅的忘却を完全に防ぐことはできなかった。そのため継続学習させたAIでの画像解析は出来なかったが、ある程度若いAIでの学習においては、電場印加により細胞の密集度が増え、結果として細胞間の距離に変化が生じている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 福井 凜、山本 泰生、狩野 旬、坂井 恵子	4. 巻 127
2. 論文標題 深層学習による細胞の機能過程の同定?第2報?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 人工知能学会研究会資料 知識ベースシステム研究会	6. 最初と最後の頁 08 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11517/jsaikbs.127.0_08	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0件

〔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	山本 泰生 (Yamamoto Yoshitaka) (30550793)	静岡大学・情報学部・准教授 (13801)	
研究分担者	竹田 哲也 (Takeda Tetsuya) (30302368)	岡山大学・医歯薬学域・研究准教授 (15301)	
研究分担者	守屋 央朗 (Moriya Hisao) (60500808)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

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