

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23750095

研究課題名（和文）電気化学顕微鏡を利用した初代培養細胞の動態解析システムの開発

研究課題名（英文）Analysis of cellular functions in primary cells using scanning electrochemical microscopy

研究代表者

平野 悠 (HIRANO YU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：70415735

研究成果の概要（和文）：生体より回収された植え継ぐ前の細胞（初代培養細胞）は生体臓器に近い機能を保持しているため薬剤活性の解析には必須である。本研究では、細胞を非接触で観察可能な走査型電気化学顕微鏡（SECM）を利用し、心筋細胞や脂肪細胞などの初代培養細胞を一細胞レベルで長時間・連続して観察可能なシステムを開発した。これにより、心臓への薬剤の効果を、拍動パターンの変化として解析することができた。

研究成果の概要（英文）：Analysis of primary-cell culture is currently used to evaluate the pharmacological and toxicological properties of drugs. We developed a SECM system for analyzing contraction kinetics in cardiomyocytes and cellular volume in adipocyte. This system enabled to investigate changes in cardiomyocytes function that resulted from changes in temperature and the addition of a bioactive agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析

## 1. 研究開始当初の背景

初代培養細胞は、株化された細胞とは異なり生体臓器に近い機能を持つことから、医薬品開発における薬剤スクリーニングなどにおいて不可欠となっている。中でも、心筋細胞は薬剤添加時の「活動電位持続時間の延長（QT延長）」を指標とした心臓への副作用のスクリーニングに使われている。また、褐色脂肪細胞（脂肪細胞）は体内の生理作用を調節する物質を多く分泌しており、肥満に関する研

究だけではなく、各種疾病の研究にも利用されている。しかしながら、生体より取り出された細胞は、目的以外の種類の細胞を含んでいる場合が多く、均質性に問題がある。そのため、初代培養細胞の活性評価の結果は、不均一な細胞群から得られる平均化された情報となっていると考えられ、定量的活性評価は困難な場合が多い。また、一般的に細胞を利用した解析では薬剤に一定時間暴露した後測定するため、細胞の微細な動きや形状

に生じる変化を連続して観察することは極めて困難である（図1）。

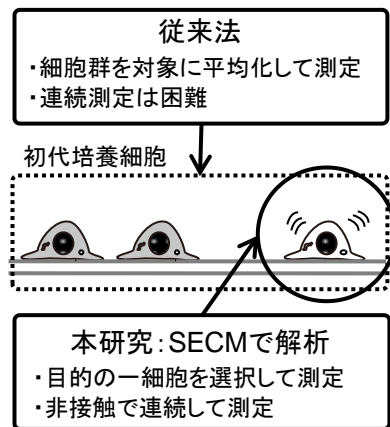


図1 研究概要

SECM はマイクロ電極をプローブとして、3 次元的に走査することによって局所領域における電気化学反応を検出・誘起することが可能なシステムである。最近ではこの性能を、細胞近傍の酸素濃度の検出をはじめ、細胞形状、膜透過性などの解析に活用した報告もなされている。さらに、他の走査型プローブ顕微鏡とは異なり、プローブと細胞が  $1\ \mu\text{m}$  以上離れていても測定可能であるため、細胞にほとんど障害を与えることなく観察できる。ところが、プローブの位置や温度による誤差などを補正する技術が必要とされ、従来の SECM も他の細胞評価法と同じく長時間にわたって細胞を観察することが困難であった。我々は、この問題点を解決するため、独自の自動化測定技術と、温度制御技術を開発し、一細胞を長時間連続測定可能な SECM システムを開発してきた。

## 2. 研究の目的

これまで SECM 解析に用いられてきた細胞は、比較的動きが小さな株化細胞に限られていた。そこで、本研究では、上記のように、より重要性の高い初代培養細胞（心筋細胞、脂肪細胞）の細胞動態を観察することを目的に、これまで開発してきた SECM システムとその周辺技術に改良を加えた新規な一細胞評価技術と、その解析システムを開発する（図1）。

## 3. 研究の方法

初代培養細胞の細胞動態を測定するために、培養環境を SECM 観察下で再現し、さらに心筋細胞や脂肪細胞に適した新たな細胞評価技術を確認する。

### (1) SECM を利用した心筋細胞評価システムの開発

#### ①心筋細胞の培養

心筋細胞を様々な濃度で培養し、播種してから定期的に観察することで、拍動が安定し、かつ一細胞単位で測定可能な濃度及び培養期間を検討した。生体から取り出された心筋細胞は増殖することはないが、別の細胞（例えば繊維芽細胞など）が混入していると、増殖して拍動を阻害する可能性がある。そこで、細胞増殖抑制試薬（5-プロモデオキシウリジンなど）を培地に添加して培養条件を検討した。

#### ②測定条件の検討

SECM のプローブであるマイクロ電極の電流値は、電極先端と対象との距離に依存し、対象との距離が近接した場合電流値は減少する。ここでは、電気学活性種 (Med) が心筋細胞に与える影響を評価し、測定に使用する Med の種類や濃度、印加電位を検討した。

#### ③拍動パターンの測定と解析

細胞と同程度以下のサイズ ( $1-10\ \mu\text{m}$ ) のディスク電極を利用し、細胞上  $1-10\ \mu\text{m}$  の位置に正確に配置することで心筋細胞の収縮、弛緩に伴う形状変化を電流応答として測定した。電極の細胞上への配置は、電流測定を伴う垂直方向の走査（アプローチカーブ）を利用して自動化する。また、電流値を  $10\ \text{kHz}$  以上のサンプリング間隔で測定することで、1 秒間に 1 回以上のペースで拍動する心筋細胞の動きを定量した。

#### ④QT 延長の測定

薬剤の誘発する心室筋の活動電位持続時間 (QT 間隔) の延長は、最悪の場合、心停止を伴う重篤な副作用であり、一般的には心筋細胞の拍動時の細胞外部電位を測定することで評価されている。そこで、開発したシステムを QT 延長アッセイへ適用し、心臓へ副作用を起こす薬剤（アステミゾール）を培地に添加した時の拍動パターンの変化を測定した。

### (2) SECM を利用した脂肪細胞評価システムの開発

#### ①脂肪細胞の培養

ラット由来の前駆体細胞を様々な濃度で培養する。数日間培養した後、分化誘導培地に交換する。成熟したところで再び培地を交換し、脂肪滴の形成を観察した。培地組成、交換の時期などを検討し、脂肪滴を有する細胞群を対象に SECM 測定可能な播種濃度、培地条件、及び培養日数を検討する。

#### ②脂肪細胞の体積測定

脂肪細胞は培養中、脂肪の蓄積や消費により形状が変化する。そこで、マイクロ電極を細胞に近接させ、水平方向に走査することで SECM イメージから細胞体積を測定可能なシステムを構築した。さらにアプローチカーブを併用することで細胞高さおよび体積変化を高精度に評価した。

#### 4. 研究成果

(1) SECM を利用した心筋細胞評価システムの開発

##### ①心筋細胞の培養

マウス、ラット、チキン由来の心筋細胞を様々な濃度で培養し、播種してから定期的に観察することで、培養条件を検討した。ラット由来の心筋細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種することで拍動が安定し、かつ一細胞単位で測定することが可能であった。

##### ②測定条件の検討

Med が心筋細胞に与える影響を評価し、測定に使用する Med の種類や濃度、印加電位を検討した。また、マイクロ電極の電流値は血清由来のタンパク質の電極表面への吸着などにより減少するため、測定に使用する培地も併せて検討した。その結果、1 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]、2 % Knockout Serum Replacement (Invitrogen) を含む無血清培地において拍動を維持したまま電流応答が測定可能であり、この条件を利用して心筋細胞の拍動解析を行った。

##### ③拍動パターンの測定と解析

測定には直径 10 μm のプラチナ製マイクロディスク電極を利用した。マイクロ電極の電流値は、電極先端と対象との距離に依存して変化する。そこで、電極に 0.5 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加し、電流測定を伴う 50 nm ステップの垂直方向の走査 (アプローチカーブ) を利用して細胞から 9 μm 離れた位置に電極を配置するシステムを開発した。この配置で電流応答を測定した結果、心筋細胞の収縮、に同期して電流の減少が観察された (図 2)。

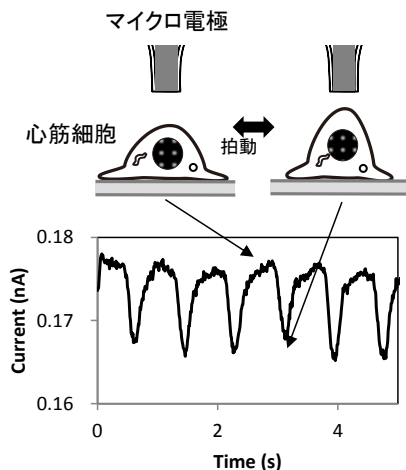


図2 SECMを利用した心筋細胞の拍動測定

これは、開発した SECM システムを利用することで、心筋細胞の収縮に伴う細胞高さ変化を電流応答として測定できることを示している。また、収縮に伴う電流応答の各パルスを平均化することで、細胞収縮時の動きの大きさ、早さなどを解析することができた。

##### ④QT 延長の測定

開発したシステムを QT 延長アッセイへ適用し、心臓へ副作用を起こす薬剤 (アステミゾール) を培地に添加した時の拍動パターンを観察した。その結果、薬剤添加により拍動の間隔が乱れる様子を観察することができた。以上の結果より、将来的に医薬品開発や基礎研究に役立つシステムへと発展する可能性を有していると考えている。

(2) SECM を利用した脂肪細胞評価システムの開発

##### ①脂肪細胞の培養

ラット由来褐色脂肪前駆細胞を様々な濃度で培養し、播種してから定期的に観察することで、培養条件を検討した。播種から 24 時間後に、分化誘導用培地に交換して 48 時間培養し、以降は脂肪細胞維持培地で培養を続けた。維持培地に交換後数日で、細胞内に脂肪滴の形成が確認できた。

##### ②脂肪細胞の体積測定

脂肪滴を形成している脂肪細胞の体積測定が可能なシステムを構築した。測定には直径 10 μm のプラチナ製マイクロディスク電極を利用し、1 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] を含む、無血清培地で行った。マイクロ電極を利用することで、プローブと細胞が 1 μm 以上離れていても細胞高さを測定することが可能であるため、細胞にほとんど障害を与えることなく脂肪細胞の体積を評価することができた。このシステムを利用することで、薬剤添加に伴う、脂肪の蓄積や消費を細胞レベルで評価することが可能になると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① “Development of a scanning electrochemical microscopy-based micropipette and its application to analysis of topographic change of single-cell”

Y. Hirano, K. Kowata, M. Kodama, Y. Komatsu, *Bioelectrochemistry*, 92, 1-5, 2013, 査読有

DOI:10.1016/j.bioelechem.2013.01.004

② “Imaging of Enzyme Reactions Captured via Immuno-recognition by Scanning Electrochemical Microscopy with Distance Control System”

Y. Hirano, T. Yasukawa, Y. Mase, D. Oyamatsu, H. Shiku, F. Mizutani and T. Matsue, *Electrochemistry*, 80, 30-32, 2012. 査読有

DOI:10.5796/electrochemistry.80.30

[学会発表] (計 1 件)

“Electrochemical monitoring of enzyme reactions promoted on double stranded DNA” Y. Hirano, K. Ichikawa, N. Kojima, and Y. Komatsu

第 38 回国際核酸化学シンポジウム, 2011 年 11 月 10 日 北海道大学 (北海道)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 悠 (HIRANO YU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号 : 70415735