

集束超音波による培養細胞の超解像化と局所力学刺激の付与およびその応答の系統的研究

	研究代表者	大阪大学・大学院工学研究科・教授 荻 博次（おぎ ひろつぐ）	研究者番号：90252626
	研究課題情報	課題番号：24H00045 キーワード：超音波、細胞、メカノバイオロジー、超解像	研究期間：2024年度～2028年度

なぜこの研究を行おうと思ったのか（研究の背景・目的）

●研究の全体像

高周波集束超音波により、培養細胞に対し局所力学刺激を付与し、かつ、深層学習による超音波画像の超解像化を可能とする独自の超音波細胞解析システムを開発し、非侵襲かつ精密に制御された局所力学刺激に対する細胞応答を長時間にわたって系統的に探求し、細胞が力学刺激にตอบสนองする学理の解明への貢献を目指す。特に細胞核への選択的非侵襲力学刺激を中心に、機能や分化能、分泌物質への影響を調べる。また、病的に重要な細胞内での蛋白質凝集現象への力学刺激の影響を探求し、パーキンソン病の原因蛋白質の細胞内凝集能に注目し、診断や薬剤効能評価等への応用研究へ展開する。

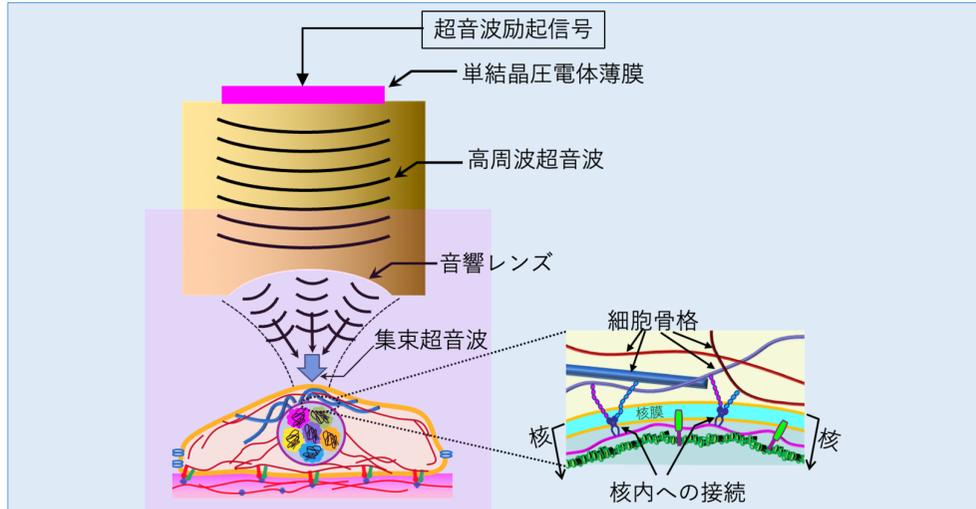


図1 本研究において実施する実験のイメージ図。細胞内の局所領域、特に、核に対して、非侵襲・長時間・無標識において力学刺激を付与し、その影響を系統的に探求する。

●背景と目的

我々は、重力をはじめとする様々な力学的負荷を受けながら生命活動を維持している。運動時には大きな力学刺激が細胞に付与される。血流が生み出すせん断応力が細胞へ与える影響も大きい。細胞はこういった力学負荷に順応してきたと考えられるが、「力学刺激をどのように感知し、利用し、機能へ反映しているのか」、は生命科学における極めて重要な核心的問いである。こういった背景のもと、様々な力学負荷への細胞応答を探求する研究が注目されているが、従来の力学刺激付与には、侵襲的問題、巨視的問題、定量性の欠如、非培養環境での実験、という問題があるため、本質的なメカニズム解明には至っていない。現在考え得る技術のうち、上記課題の全てを同時に解決することができるのは、高周波集束超音波のみである。本研究では、このコア技術を革新的に進化させた超音波細胞解析システムを開発し、細胞の力学応答のメカニズム解明への決定的な貢献を目指す。特に、細胞の司令塔である核に対する選択的・非侵襲刺激を実施し、核への刺激が、細胞内物質、機能、そして、細胞内蛋白質凝集能等へ与える影響を定量的かつ系統的に探求する。

●細胞核の非侵襲・選択的力学刺激

細胞の力学刺激に対する応答の研究においては、特に、司令塔である核への刺激が重要であることが認識されてきた。しかし、これまでの核への力学刺激においては、細胞から核部を抽出して力学負荷を付与する手法や核に磁気ビーズなどを注射するなど、極めて侵襲性の高い手法が用いられており、細胞死を避けることができず、生きた細胞の核への力学刺激の影響という最も重要な現象を捉えることが困難であった。一方、本研究では、刺激に使用する超音波の周波数を、核の膨張収縮の共振周波数に一致させることにより、非侵襲で核に力学刺激を付与することが可能となる。例えば図2に示すように、高周波（200 MHz）の超音波画像は分解能は高いものの、核部を特定することができないが、150 MHzでは核が黒く染まり、超音波を顕著に吸収していることがわかる。理論的に、150 MHzは核の共振周波数と一致する。つまり、こういった周波数を利用すると、核に選択的に力学刺激を付与することができる。

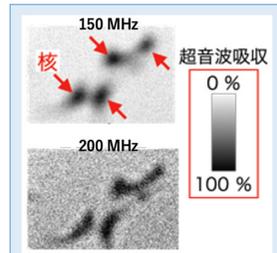


図2 周波数に依存した細胞核の超音波吸収。細胞核の力学的共振周波数に近い周波数の超音波により非侵襲かつ選択的に細胞核に力学刺激を付与することが可能。

この研究によって何をどこまで明らかにしようとしているのか

細胞の力学刺激研究において未解決であった上述の課題を解決するため、細胞培養環境を維持した状態で細胞を画像化し、かつ、様々な力学刺激を局所的・長時間にわたって付与可能な独自の計測システムを開発する（図3）。超音波画像は、短パルス・低出力の超音波を用い音響プローブを操作して取得する。その後、力学刺激を付与したい箇所にプローブを移動し、高出力のバースト波を入力することで、力学刺激を付与する。電気に超音波のパワーを正確に制御して定量性を担保する。下方からは斜角光入射による散乱光検出法を利用した光学顕微鏡システムを設置する。ただし、光計測では、一定の侵襲を避けることはできないため、長時間連続観察においては、超音波画像の超解像化についても実施する（図4）。これは、様々な形態を有する細胞を基板に固定化し、同一細胞に対して超音波画像と光学顕微鏡画像を取得して、これらの画像を対応させたデータセットを作成する。そして、多数のデータセットを用いてこれらの対応を深層学習により学習させ、解像度の低い超音波画像の高解像化にとりくむ。

また、本研究で開発する計測システムを用いて、蛋白質の細胞内凝集現象の理解を深化させる。パーキンソン病等においては細胞内で疾患特有の蛋白質が凝集し、アミロイド線維と呼ばれる硬直な細長い線維を形成して毒性を発することが主要因である。細胞内での蛋白質凝集実験を様々な力学負荷条件下で実施し、力学刺激が凝集に与える影響について系統的に調べ、診断や創薬分野への貢献を目指す。

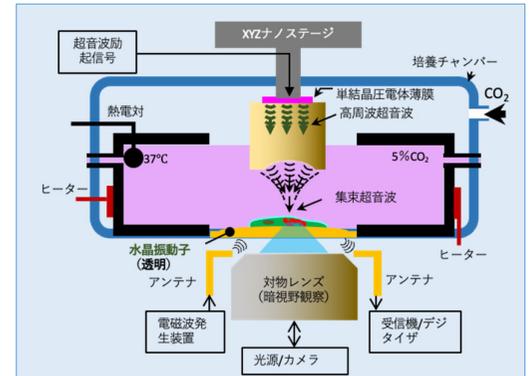


図3 開発する超音波細胞解析システムのイメージ図

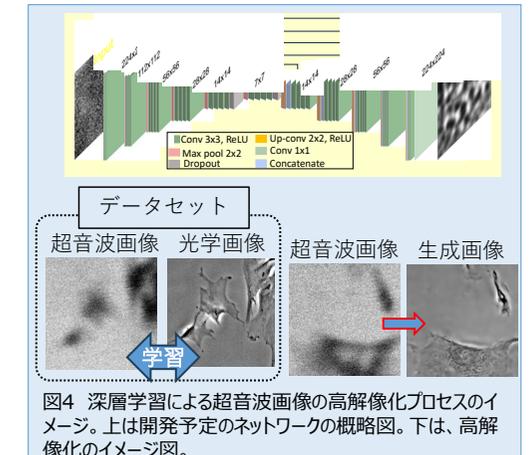


図4 深層学習による超音波画像の高解像化プロセスのイメージ。上は開発予定のネットワークの概略図。下は、高解像化のイメージ図。