

細胞の分化誘導を加速させる強誘電体デバイスの開発

High-throughput Cellular Control System Developed by Ferroelectric Electronic Devices

M20助自31

- 代表研究者 狩 野 旬 岡山大学 大学院自然科学研究科 応用化学専攻 准教授
Jun Kano Associate professor, Division of Applied Chemistry,
Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University
- 共同研究者 竹 田 哲 也 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 研究准教授
Tetsuya Takeda Research associate professor,
Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University
- 共同研究者 武 安 伸 幸 岡山大学 大学院自然科学研究科 分子科学専攻 准教授
Nobuyuki Takeyasu Associate professor, Division of Molecular Sciences,
Graduate School of Natural Science and Technology Okayama University

Everyone expects to realize a society with extended healthy life expectancy and people can enjoy an affluent life without fear of death from disease. Tailor-made drug discovery and regenerative medicine using functional cells derived from iPS cells is one of the crucial technologies that support such health and longevity, and is being vigorously studied both in Japan and overseas. However, the creation of disease model cells and differentiated cells for transplantation from patient-derived iPS cells that can be used for drug discovery requires a long period of time. In recent years, attempts have been made to supply disease-specific iPS cells and iPS cells for regenerative medicine from cell banks stocked with such cells, which has reduced the time and cost to about 1/10. However, the number of target diseases is still limited. The realization of rapid and safe precision medicine is an urgent issue. High-throughput cellular control system is strongly required. Biological body can keep its life due to internal charge transfer such as the redox cycle assisting the activation of the cationic channel. Although it has been believed that the cells can respond to electrical stimulation facilitating cell migration, differentiation, and wound healing, systematic understanding is so far. We demonstrate that cellular control by the electric field application can affect the anisotropy of the cellular morphology and cell growth ratio. Machine learning technique can reveal the different behavior between applied electric fields or not.

研究目的

医療技術革新により健康寿命が延び、病気による死に怯えることのない豊かな社会が創り出されることを誰もが望む。このような社会実現に最も有効な技術の一つがテーラーメイド創薬であり、iPS細胞を使った研究が精力的に

行われている。しかしながら、細胞の選択的高速培養技術はまだ十分確立したものと言えず、研究開発現場のボトルネックとなっている。細胞の分化（機能化）は細胞の対称性の破れにより生じるが、遺伝子発現、蛋白質変性など内因性の因子制御による研究しかなく、生命現象は複雑系の極みであり、細胞機能化について

での統一的な法則がなかった。電場印加・キャリア供給による生体機能の制御はこれまでも多くの研究があったが、その生体現象メカニズムの解明は大変遅れている。電気刺激による対称性の破れ(分化誘導)が起こるメカニズムは不明であるが、一つの可能性として、キャリア供給による細胞内酸化還元状態(レドックス)の変化が引き起こすシグナル伝達経路の活性化が考えられる。そこで本研究では、細胞の機能化および分化を半導体デバイス上で行い、細胞の分化誘導を加速し、効率よく機能性細胞を樹立する革新的な細胞分化システムの確立を目指す。

概 要

健康寿命が延び、病気による死に怯えることのない豊かな人生を過ごせる社会が創り出されることを誰もが望む。このような健康と長寿を支える基盤技術の一つが、iPS細胞由来の機能性細胞を使ったテラーメイド創薬と再生医療であり、国内外で精力的に研究が行われている。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。

本研究では、電場印加および電子供給制御が可能な強誘電体電子デバイス上で、細胞の分化誘導を加速し、効率よく機能性細胞を樹立する革新的な細胞分化システム(Automated Cellular Control by Electricity, ACCEL)の構築を目指す。我々の創る電子デバイスは、強誘電体の電気分極により細胞への電気刺激となる電場印加・電子供給が効率的になされることで、制御された細胞の分化誘導が実現する。本技術シーズの独創性は、生体活動の一部を半導体製造プロセスで作製された電子デバイスで補完することにある。これは細胞内での生化学反応、レドックスサイクルによる核内での遺伝子発現制御、細胞質でのタンパク質翻訳制御などの生体内活動を、酸化還元反応による電子授受がなされる物理現象として捉える。生体内に存在する酵素は天然の触媒である。触媒は化学反応を促進させる材料であり、酸化(=電子を失う)・還元(=電子をもらう)というプロセスは生体活動も電子授受として捉えることができる。ACCELは電場と電流という単純なパラメーターの制御で起こるが、生命現象は複雑である。そのため将来的にはDX(Digital transformation)技術を活用させ、ライブイメージング・オミクス解析から細胞機能化とその制御に関わるシグナル経路をリアルタイムで深層学習し、ACCEL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ACEEL制御を実験系にフィードバックさせる新規システムを構築したい。これにより、複雑系である細胞挙動の系を単純化させた理解につながり、細胞機能化に関わる生命現象の原理原則的理解が広がる。さらにこの技術は、現場にける実験スピードを加速させ、機能化させた細胞培養のハイスループット化技術革新につながる。

今回の研究において、我々が独自に生み出した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置する現象を発見した。さらに、同技術を用いた電流供給により細胞の分化（機能化）応答が誘導され、オルガノイド様の細胞集合体が形成されることを見出した。さらに、この電気刺激応答の過程では、細胞増殖スピードが7日間培養下で通常の約2倍にまで上昇することも明らかにした。DX技術を用いた画像診断により、電場印加した細胞とそうではない細胞をAIが判別可能であることを見いだした。AIは細胞形状だけでなく、ウェル内に占める細胞の分布具合、つまり空間的広がりの違いがあることをおおまかではあるが捉えている。これらの結果は、機能性細胞のハイスループット培養技術の実用化に必須な、細胞の増殖・分化の活性化が、電子デバイス上で実現可能であることを示している。従来の人の手による画像診断、AIを用いた画像診断に加えて、ラマン分光による細胞の微細構造へのアプローチについても試みた。ACCELに関わる観測には至っていないが、生命活動に必要な化学反応を捉えることができるだけでなく、光を使うことで特定の化学結合の切断が可能となり、今後電場だけでなく光でも細胞機能化を制御できる可能性を示すことができた。

本文

研究背景：電場印加・キャリア供給による細胞機能化

電場印加・電子供給による生体機能の制御は、古くは18世紀にガルバーニによるカエルの筋肉収縮が有名である。その後増殖や分化など細胞レベルでの影響が多く報告されてきた。発生過程の胚では、多分化能を持つ胚性幹細胞（ES細胞）が増殖し、様々な性質を持つ細胞へと分化する。幹細胞が分化誘導される際に

は、細胞を構成する細胞膜や細胞内成分の対称性が破れ、多様な機能性細胞が生み出される。これら対称性の破れは、細胞分化だけでなく、細胞分裂、細胞遊走や出芽など、様々な細胞機能に関わっている。近年、電場印加、電子・正孔などのキャリア供給のような細胞外からの刺激によって、細胞の対称性破れが観測されるようになってきた。^[1] 図1 (a) に示すように、細胞分裂、神経の突起形成、細胞遊走や創傷治癒、出芽酵母の出芽などは、すべて電場に平行に起こる。また極性を伴う細胞成長は、分裂酵母では電場に直行するのに対し、大腸菌は電場に平行に成長する。電気刺激による対称性の破れ（分化誘導）が起こるメカニズムは不明であるが、一つの可能性として、電子供給による細胞内酸化還元状態（レドックス）の変化が引き起こすシグナル伝達経路の活性化が考えられる（図1 (b)）。^[2] しかし現段階においては、電場・電子レスポンスな対称性の破れは基礎生物学の対象としての現象論に留まり、そのメカニズムの解明に迫った研究はは

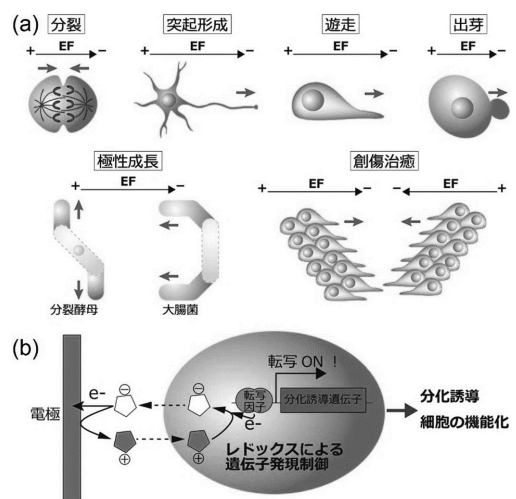


図1 電場印加およびキャリア受容に対する様々な細胞応答。(a) 電場 (EF) とそれに対応する細胞極性の方向性 (赤矢印) を示す。(b) 電子受容により遺伝子発現が制御され、細胞の分化誘導・機能化が発生する。

とどなく、制御された分化誘導技術も確立していない。我々は既に広く知られる生体現象を、物理法則に基づいて理解する試みが進展できなかったことが本質的な問題点であると考え。この問題点は具体的には以下のような技術的な課題による：

- (1) 生体への電場印加および電子授受が可能なデバイスが未だ存在しないこと、
- (2) 細胞-デバイス間での電場およびキャリア量を計測し理解する方法が確立されていないこと、
- (3) 電場印加およびキャリア授受による細胞機能化メカニズムを検証する術がないこと。

そこで本研究では、細胞サイズに合わせた電場印加・電子供給可能なデバイスを半導体製造プロセスで作成し、レドックスの変化が引き起こす信号伝達経路の活性過程をデバイス表面でミクロスコピックに可視化しつつ、分化誘導を能動的に行わせ、機能性細胞を高効率で培養するACCELシステムの構築を目指す。我々の電子デバイスによる細胞機能化培養は、原理的に半導体物性と細胞分化誘導による機能性発現機構の知見により、十分実現可能であると言える。デバイスは半導体製造プロセスで製造されるため、次世代シーケンサーのようなテーブルトップ型の能動的細胞制御システムを開発することが可能となる。本システムで電場印加・キャリア授受による細胞の機能発現が自在化すれば、機能性細胞の生産ハイスループット化が実現し、例えば、iPS細胞を用いたテーラーメイド創薬医療現場の生産効率が、飛躍的に増進する。さらに、電子デバイスを組み込んだ細胞制御システムが大量に導入されることで、電子部品産業界へ貢献できるだけでなく、バイオテクノロジーと半導体電子工学分野の融合も期待できる。

結果その1：電場印加実験

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った。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まで実験を行った。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にした。まずは細胞数増加について見てみよう。図3にday 4での電場有無の違いによる観察像を示す。明らかに電場印加の有無を感じた細胞数増加が見られた。タイムラプス観測からも、電場印加により細胞数増加が時間発展的に進んでいることがわかり(図3 (a)の挿入グラフ)、およそ2倍の増加率を示した。なお、図3 (b)では、紙面左から右側へ向けて面内に電場を印加しており、わずかながら電場方向を感じた配列が確認された。次に細胞形状の違いを画像解析ソフトImageJで解析した。図4 (a) に示すように、ImageJ上

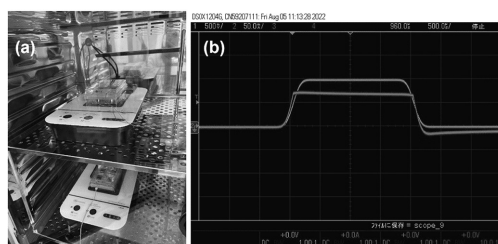


図2 (a) 炭素板で作成したマクロサイズの電気刺激セルをCO₂環流のインキュベーターに設置した様子。セルは倒立顕微鏡の上に設置し、タイムラプス観察が可能となっている。(b) 10 V、20 msecの電場/パルスを1 Hzで印加する。

で細胞を手動で選択し電場印加によって異方性に変化が生じるのかどうか調べた。細胞形状を表現するパラメーターは色々あるが、ここでは真円度についての結果を示す。真円度は0から1の間の値を持ち、1の場合は真円で値低下と共に真円から崩れた形をもつことを意味する。図4 (b) にday 4での細胞の真円度分布を示す。電場印加なしのものに対し電場印加有りの細胞について真円度が低い側に分布していることがわかる。細胞の分化(機能化)は細胞の対称性の破れにより生じることが知られており、分化方向に発展する際に細胞は自身の形状に異方性を生じさせる。さらに別の実験により、細胞の分化(機能化)応答が誘導されオルガノイド様の細胞集合体が形成も観察された。つまり電場印加により分化誘導が促進される

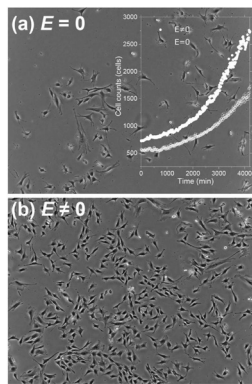


図3 day 4での細胞数増殖の様子。(a) 電場印加なし、(b) 電場印加。グラフはタイムラプス観察から得られた細胞数増加の時間依存性。

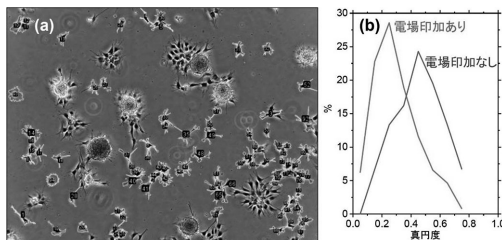


図4 ImageJを用いた細胞形状解析。(a) day 4での細胞をImageJ上で選択している様子。(b) 形状解析より得られた真円度の分布。

ことがわかった。なお大変興味深いことに、これらの現象は細胞を播種したウェル内で明かな場所依存性があった。電極から離れた場所、および陽極付近に比べ陰極付近で細胞数増加と異方性変化が顕著に現れた。これは単なる電場効果だけでなく、電子供給がACCELに効果的に作用していることを示唆している。

生命現象は複雑系であるため、人間の眼では識別困難な細胞組織化の違いを情報科学分野のDX技術をACCELに導入した。まだトライアル段階ではあるが、細胞毎の機能化状態を推定する深層学習モデルを開発しているところである。先行研究としてNagaoらは深層学習を用いて細胞周期の各フェーズを同定する問題に取り組み、良好な識別性能を得ていることを報告している。^[3] その際に6層の畳み込み層と2層の全結合層からなるニューラルネットワークモデルを用いている。またGrad-CAMを用いてモデルがどのような特徴に注目しているかの可視化を行っている。^[4] 同様に我々も畳み込みニューラルネットワークモデルを作成し、電場印加の分類問題に対する可用性を検証した。ここではGrad-CAMを用いて、電場印加有無に関係する画像上の細胞部位を可視化する。畳み込みニューラルネットワークモデルには、VGG19^[5]に基づく転移学習を用いることで、活性化→増殖過程の画像データからACCELによる電場印加の有無を高精度(F1スコア0.9)に識別できることがわかってきた。^[6] その結果を図5に示す。Conv4_4では、細胞のエッジの部分にAIが注目していることがわかる。その後畳み込み層が進むにつれ、徐々に細胞周辺へ注目が移っていく。そして最後の層Conv5_4では細胞間の空間に注目する。この傾向は他のデータによる可視化結果にも見られた。AIの注目がエッジから細胞間に変化している理由として、電場印加の有無により細胞

間の距離の違いが生じているということが考えられる。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る。しかしまだDXの適用は始めたばかりであり、実際に電場印加有無により細胞間距離の違いに有意な差が生じているかどうかの検証は今後の課題である。

結果その2：表面増強ラマン散乱によるライブセルイメージング

レーザー分光によるライブセルイメージングを試みた。プラズモニック粒子（ここでは金、または銀ナノ粒子）やそれらで作製した2Dアレイ基板を用いて、顕微ラマン分光による酵母細胞の観察を行った。金属ナノ粒子を試料近くに配置させ光を照射することで、プラズモンが生成され、金属ナノ粒子付近の試料からのラマン散乱光を増長させる表面増強ラマン散乱が起こる。この手法を用いれば無機単結晶とは異なり蛍光成分を多く含む細胞においても、細胞形成物質に由来するラマン信号を高感度に捉えることが可能となる。図6に、銀ナノ粒子2Dアレイ上で測定した2種類の酵母、v細胞とg細胞の表面増強ラマンスペクトルを示す。図中の丸印は過去の報告で帰属が示されているピークである。^[7]ここで観測されたラマンスペクトルは表面増強しない通常のラマン分光ではS/N比が悪くほとんど見えないが、表面増強ラマン散乱により酵母細胞の細胞壁に由

来するものが観測された。プラズモニック粒子を用いることで、それらが細胞内に取り込まれ、細胞内部の情報が得られると考えている。

ところでプラズモニック粒子は、光照射下で化学反応を誘起することが知られている。^[8]細胞に含まれるタンパク質は、多数のアミノ酸が鎖状に連結した巨大な高分子であり、安定な折りたたみ構造をとることが知られている。なかでもシステインと呼ばれるアミノ酸では硫黄(S)を含んでおり、タンパク質のフォールディングでは、ジスルフィド結合(SS結合)の形成が中心的な役割を果たしている。特に小胞体内腔では、分泌される多数のタンパク質のSS結合による構造形成がなされている。小胞体は、膜タンパク質や分泌タンパク質のフォールディングや翻訳後修飾を担うため、生体には欠かせない細胞小器官である。小胞体内でSS結合の形成に異常が生じると、うまくフォール

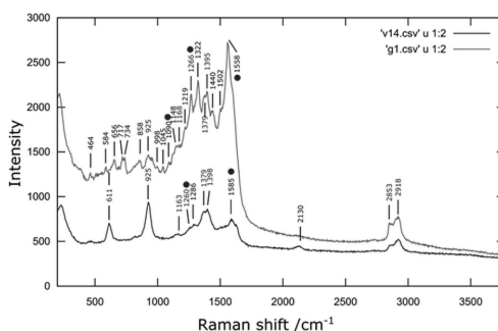


図6 銀ナノ粒子2Dアレイ上で測定した2種類の酵母、v細胞とg細胞の表面増強ラマンスペクトル。

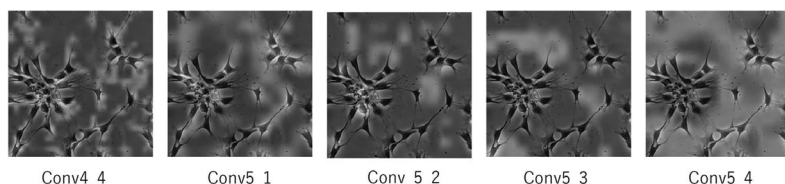


図5 Grad-CAMを用いた画像特徴の可視化。AIが特徴的と感じた箇所が薄い色で表示されている。各量込み層でAIが注目する場所が変遷している様子がわかる。初期(Conv4_4~5_2)では細胞形状に着目し、その後(Con5_3~)細胞がいない空間を注目する。これは、電場印加下では、細胞数が多い割に空間的に広がっている傾向があることをAIが特徴として捉えているからである。

ディングしなかった異常なタンパク質が凝集・蓄積され、癌、老化、神経変性疾患と関わりのある小胞体ストレスと呼ばれる状態を招く。異常なタンパク質凝集体には細胞毒性があるため、細胞にはこのストレス状態を軽減する応答機構である小胞体ストレス応答が備わっている。しかし、これまで細胞内のSS結合の様子を直接可視化した研究はなく、SS結合の細胞内動態は不明である。SS結合の生成・消滅といった動的過程を直接可視化できれば、異常なSS結合を処理する細胞の応答機構の理解が可能となる。細胞中のSS結合の観測が困難だったため、モデル試料としてL-システインとL-シスチンの表面増強ラマン散乱実験を行なった。L-システインには分子基終端にSH結合が存在し、L-シスチンは二つのL-システインがSS結合を介して結合した分子構造を有する。表面増強しない通常のラマンスペクトルでは、L-システインにおいてSH結合由来のピークが 2600 cm^{-1} に、L-シスチンにはSS結合由来のピークが 500 cm^{-1} に現れ両物質の違いがわかる(図7(a)の矢印で示したピーク)。次に表面増強ラマンスペクトルを見てみよう。図7(b)はL-システインのスペクトルであるが、通常ラマン計測で観測された 2600 cm^{-1} 付近のピークが消失した。L-システインはSH基を通して銀粒子表面に結合したと考えられる。図7(c)はL-シスチンのスペクトル

で、通常ラマン計測で観測された 500 cm^{-1} 付近のピークが消失した。この結果は、表面プラズモンによりSS結合が切断されたことを暗示している。またいずれのアミノ酸に対しても、励起光出力がOD1 (0.6 mW) とOD2 (0.06 mW) とでスペクトル形状の違いが見られ、L-システインもL-シスチンも表面プラズモンによってSS結合以外にも化学変化が起こっていると考えられる。今後は細胞においても同様の実験を進めていきたい。

まとめ

電場印加下の細胞は成長が促進され、細胞数増加率が2倍になること、および形状に異方性が生じることが本研究より明らかになった。またAIによる画像診断からも電場有無の違いを認識することができた。今回の結果より、機能性細胞製造現場におけるハイスループット化実現の目処がたった。では、なぜ電場印加により細胞機能が促進されるのであろうか？ これまでに示した一連の現象は、電気刺激が細胞内に広く存在するミトコンドリアの電子伝達系に直接作用しているのではないかと仮説を立てている。何故ならば、細胞は生命活動に必要なエネルギーの大部分をミトコンドリアに頼っており、ミトコンドリアの主な活動は電子伝達系でなされていることが知られているからである。電場印加によるキャリア供給により、細胞中のミトコンドリアは成長に必要なエネルギーとなるATP(アデノシン三リン酸)生産量が増えることがACCELの主要な起源であると考えている。このことは、図4(b)で示した細胞の異方性が陰極側で顕著に観察されている事実などからも示唆される。この仮説を元に現在、ミトコンドリアの膜電位測定を行うことで実証を試みている。膜電位は染色し、その蛍光強度を測定することで評価可能である。

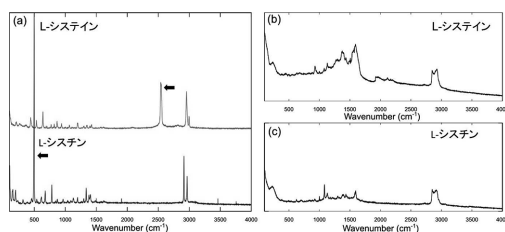


図7 (a) L-システインとL-シスチンの通常のラマンスペクトル。矢印部分のピークがそれぞれの物質を特徴付ける指紋スペクトルになる。(b) L-システインとL-シスチンの表面増強ラマンスペクトル。

本研究の実施にあたり、村田学術振興財団研究助成金から細胞数増加観測、細胞形状観察に関わる装置購入を充てさせていただいた。海のものとも山のものともつかぬ萌芽的な研究にも関わらず支援を賜れたことは、困難を伴う研究現場では大変有り難く心強く感じる事ができた。この場をお借りして、感謝の意を表します。

参考文献

- [1] G. Thrivikraman, S. K. Boda, B. Basu, *Biomaterials* **150**, 60 (2018).
- [2] T. Tschirhart et al., *Nat. Commun.* **8**, 14030 (2017).
- [3] Y. Nagao et al., *Mol Biol Cell* **31**, 1346 (2020).
- [4] R. R. Selvaraju et al., 2017 IEEE ICCV 618 (2017).
- [5] K. Simonyan, A. Zisserman, *ICLR 1* (2015).
- [6] 福井凜ら、人工知能学会知識ベースシステム研究会, 39, (2022).
- [7] A. Sujith et al., *Appl. Phys. Lett.* **92**, 103901 (2008).
- [8] N. Takeyasu et al., *J. Phys. Chem. C* **120**, 12163 (2016).

今後の研究の見通し

本研究によりACCELの実証に近づくことができたが、まだ道のりは長い。今回の報告で紹介した細胞への電場印加実験は細胞サイズに比べ大きな炭素電極を用いたものである。半導体製造プロセスによる細胞サイズに合わせた電極を配置させた電場印加セル、強誘電体薄膜によるダイオード・トランジスタ基板も作成済であるが、結果を示すまでには至っていない。当初計画に含めていなかったDX技術の適用が思いのほか面白い結果を示し、まずは炭素電極を用いた実験結果を優先し解析を進めた。

今後は、新しい電極セルを用いるだけでなく、より高度化させたDX活用によりACCEL解明に努めたい。なお今回の実験を進めるにあたり、思わぬトラブルに遭遇した。炭素電極はプリント基板上に配置させたのだが、基板上の銅配線から、銅がイオン化し炭素電極を経由して細胞を含む培地に流れ込んでしまい、そのために細胞成長が抑制されてしまった。本研究の一番初めの実験では、配線を一部銀ペーストを使ったため、銀がイオン化することで溶出し細胞が全滅した経験があった。そのため、今回の実験では、プリント基板配線が銅であったが、培地とは直接接触しないので大丈夫だろうとたかをくくっていたが、細胞培養を行うインキュベーターの高湿度により見事に銅イオンが溶出してしまった。今後細胞機能化に関わる電子デバイスを作製していく際には、生体に毒となる金属は徹底的に排除しなければならないことを痛感した。

研究代表者の狩野はこれまで強誘電体の物性研究に従事してきたが、細胞を用いた実験の再現性の悪さを再認識した。まったく勝手が異なるため、この点については共同研究者からの再三の教育により徐々に理解していくことができた。新しい分野への挑戦は実験現場で今までにない事象に多く遭遇する。

本助成金による主な発表論文、著書名

福井凜, 中山匡太, 山本泰生, 狩野旬, 坂井恵子, 多賀みなみ, 竹田哲也, 守屋央朗, 武安伸幸, 「深層学習による細胞の機能過程の同定に向けて」人工知能学会知識ベースシステム研究会, 39-44, https://doi.org/10.11517/jsaikbs.125.0_07 (2022)