

論文の内容の要旨

論文題目 MEMSフォースプレートによる
iPS細胞由来心筋細胞の伸展長さと拍動力の計測

氏名 松平 謙英

1. 研究の目的・背景

本論文は、ヒトiPS細胞に由来する心筋細胞を定量的に伸展させた際の拍動の力を計測するため、シリコン製の可動培養基板とピエゾ抵抗型カンチレバーからなるMEMSフォースプレートを利用した計測手法を提案し、その有効性を検証することを目的とする。

心筋細胞は心臓を構成する主要な細胞であり、引き伸ばすと拍動の力が増加することが確認されている(Fig.1)。近年のiPS細胞に関する研究の発展によって、iPS細胞から心筋細胞を効率的に製作することが可能となった。このiPS細胞由来心筋細胞は、心臓の再生医療に利用できるものと強く期待されている。iPS細胞由来心筋細胞を再生医療を用いるためには、細胞の培養開始時から力-長さ関係を計測する必要がある。従来の研究では、iPS細胞由来心筋細胞の力-長さ関係の評価を行うためには3次元状に培養したiPS細胞由来心筋を用いていた。しかし、3次元状の細胞組織を構築するには数週間以上必要であり、通常の手順で2次元培養されたiPS細胞由来心筋細胞の力-長さ関係を評価することは難しかった。

そこで、MEMSプロセスによって製作した可動培養基板と変位センサ、ピエゾステージからなる計測システムを提案する。

2. 理論

本研究で製作した計測システムは、シリコン製の培養基板とピエゾ抵抗型変位センサからなる(Fig. 2)。心筋細胞はシリコン製の培養基板のうち、可動部(可動培養基板)と固定部をまたぐように接着する。心筋細胞が収縮力することにより、可動培養基板は固定部へ近づくように変形する。心筋細胞の収縮によるピエゾステージの変位を Δx_c 、変位センサにより得られた変位を d_c とする。さらに、可動培養基板と変位センサのばね定数をそれぞれ k_p 、 k_c とすると、心筋細胞の収縮力 ΔF は $\Delta F = (k_p + k_c)\Delta x_c$ で表され、定量的に計測できることがわかる。

3. 設計・製作

カンチレバー型変位センサと可動培養基板の設計をFig.3に示す。カンチレバー型変位センサ

は顕微鏡で上部から観察できるよう45度の角度で設計し、また顕微鏡の対物レンズの下部をくぐらせるためL字型とした。ばね定数と感度を考慮し、カンチレバーの厚みは2 μm 、長さを300 μm として製作を行った。可動培養基板は製作の容易性から、デバイスSi層が10 μm のSOIウェハによって製作した。細胞培養部は細胞が安定して培養できるよう300 μm とした。また、収縮方向のみに変位するよう2本の梁を設計し、長さは細胞のばね定数を考慮し1100 μm とした。製作したチップをFig. 4, 5に示す。設計通りに製作されたことがわかる。

4. チップの特性評価

ピエゾステージとロードセルによってカンチレバー型変位センサの特性を求めた。ばね定数は1.07 N/mであり、変位に対する感度は $1.18 \times 10^{-3} / \mu\text{m}$ であった (Fig. 6)。一方で可動培養基板のばね定数は平均して2.99 N/mであり要求仕様を満たす値となった (Fig. 7)。加えて、システム全体のノイズ評価を行った。特に卓上インキュベータのノイズが大きいですが、温度補償センサにより大きくノイズを減らすことが可能であることを確かめた。100 kHzのサンプリング周波数で計測を行えば、変位に対する分解能14 nmを達成できることを確認した。これらの結果から、可動培養基板とカンチレバー型変位センサのばね定数の和4.06 N/mを考慮すれば、力に対する分解能は約57 nNということができる。

5. 心筋細胞の拍動力の計測

iPS細胞由来心筋細胞は、表面張力を用いて可動培養基板にスポットして播種することで少ない細胞数で確実な接着を確認した。また、観察においてはHoechstとPhalloidinにより細胞核とアクチン繊維の染色を行った上で正立かつ落射光の顕微鏡を用い、明視野顕微鏡・蛍光顕微鏡観察・共焦点レーザー顕微鏡による観察を行うことで多角的に評価を行った。写真より、数十の心筋細胞が可動培養基板一面に接着していることを確認した。

伸展とともに拍動力を計測すると、伸展長さは約16–23 μm であった。初期状態では約5–11 μN の拍動力が計測された一方で、伸展を行った際の拍動力は、およそ1.8–2.7倍まで増加し、最大で約23 μN の力を発揮した (Fig. 8)。また、心筋細胞のする仕事を計算できる可能性を示した (Fig. 9)。

フィードバック制御による可動培養基板の制御実験では、可動培養基板に接着した細胞の長さをリアルタイムに制御しつつ拍動力を計測できることを確かめた (Fig. 10)。制御を行わなかった場合には拍動力が3.9 μN であったが、等尺性収縮を行うよう制御したところ、拍動力は6.0 μN へ増加した。これは、接着基板のばね定数が変化することにより、拍動力をリアルタイムに変化させる性質があることを示唆している。

6. 結論

本システムによって二次元培養されたiPS細胞由来心筋細胞の伸展長と拍動力を計測できることを確かめた。心筋細胞は非線形なばね定数を持っており、進展によって拍動の力が数倍以上になることが明らかになった。また、フィードバック制御を行うことで、動的な力学環境における心筋細胞の振る舞いを評価できることを示した。

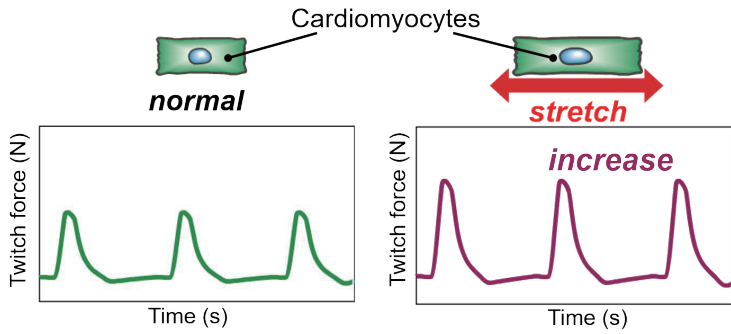


Fig.1 計測の概念図.

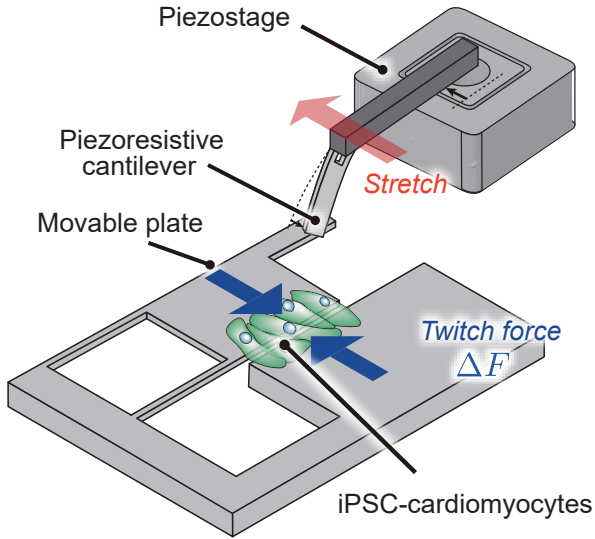


Fig.2 計測システムの構成.

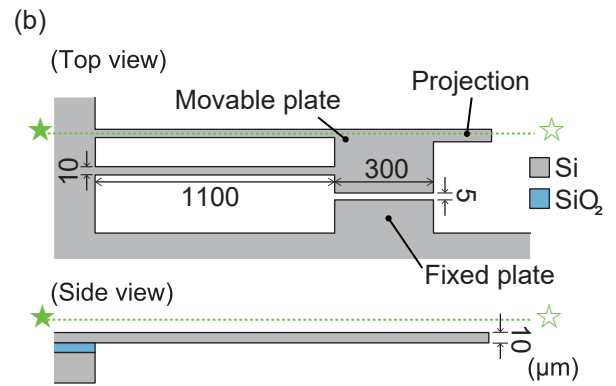
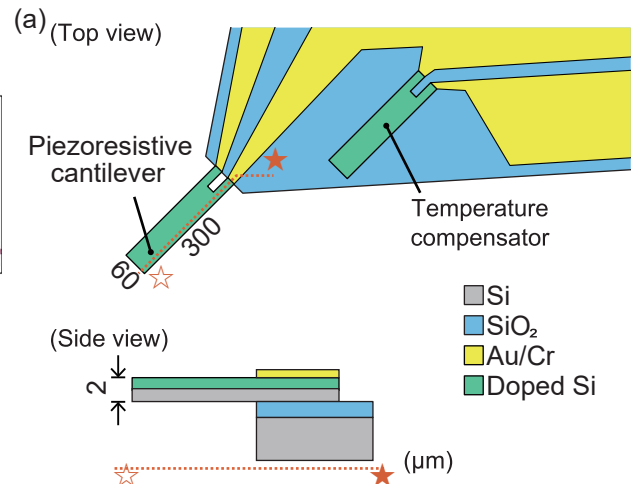


Fig.3 (a) カンチレバー型変位センサと(b)可動培養基板の寸法

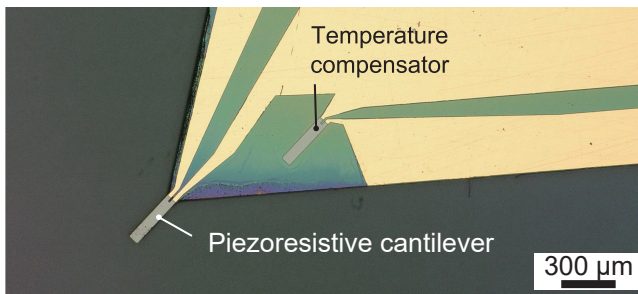


Fig.4 製作したカンチレバー型変位センサの顕微鏡写真

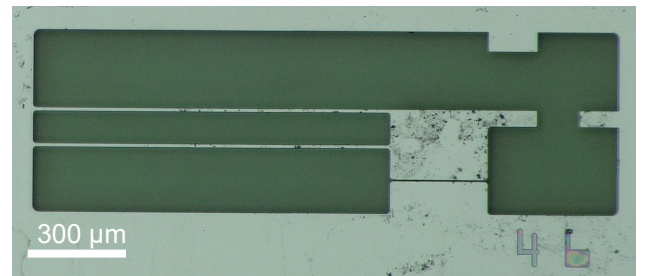


Fig.5 製作した可動培養基板の顕微鏡写真

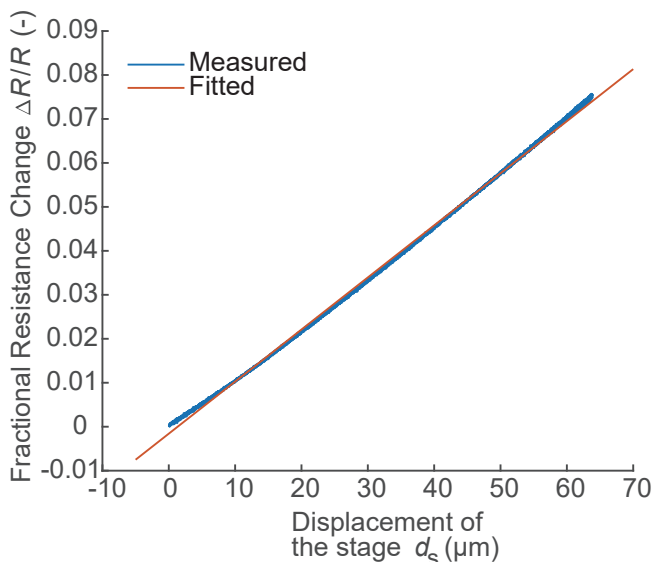


Fig.6 カンチレバー型変位センサのキャリブレーション結果

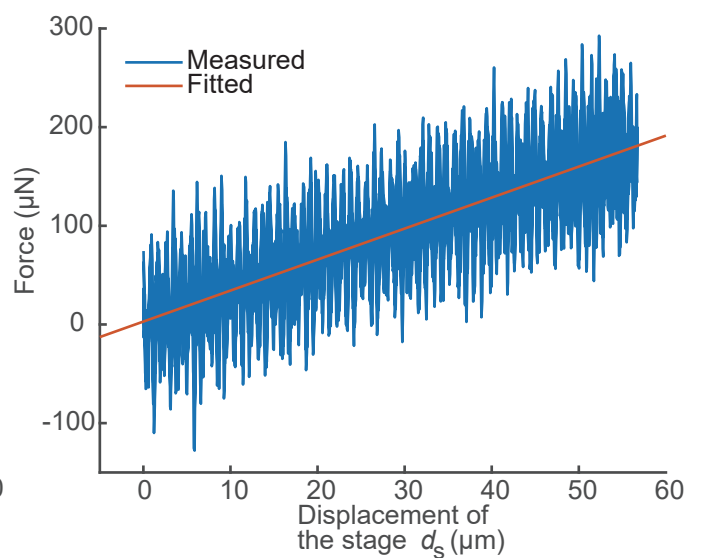


Fig.7 可動培養基板のキャリブレーション結果

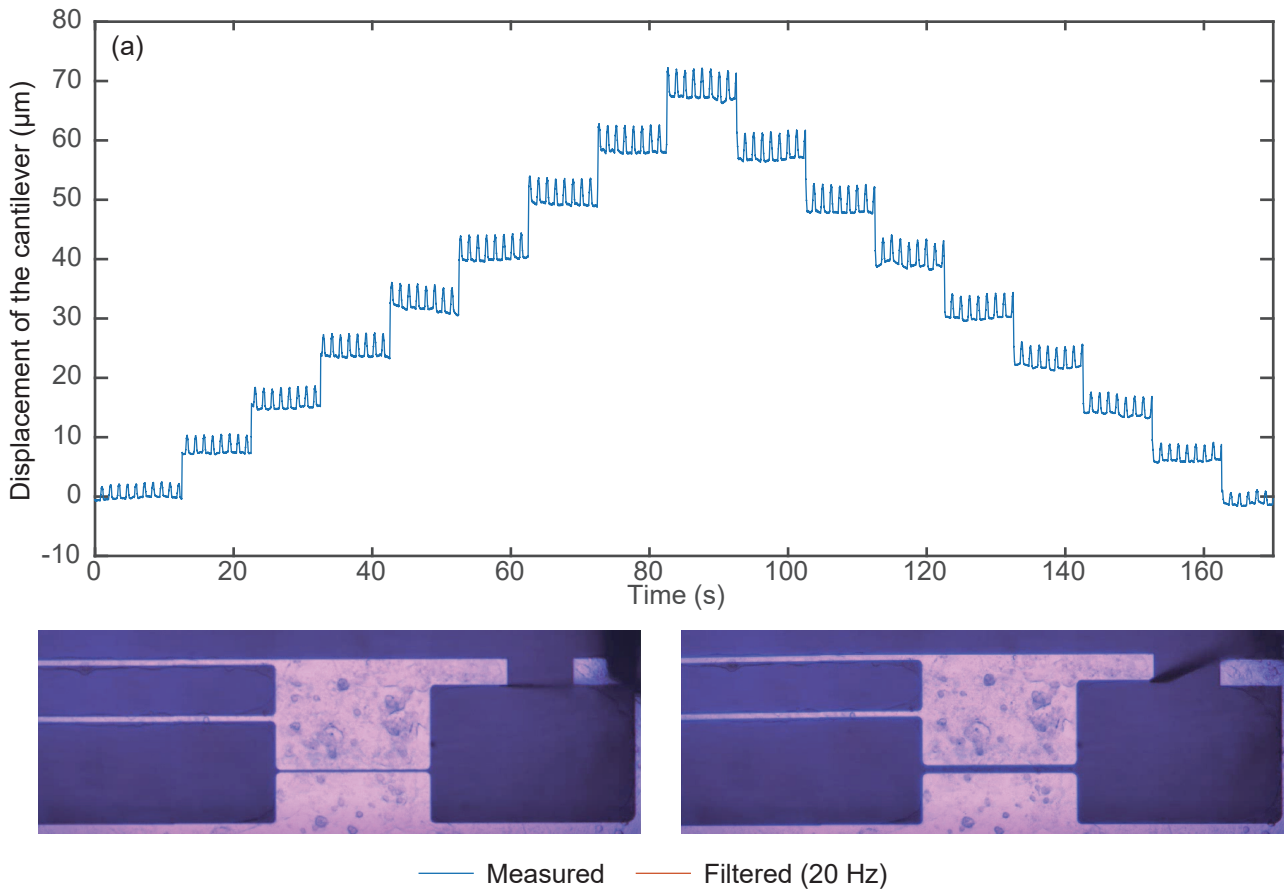


Fig.8 (a)心筋細胞を伸展させた際の拍動力の計測結果と(b)(c)その拡大図.

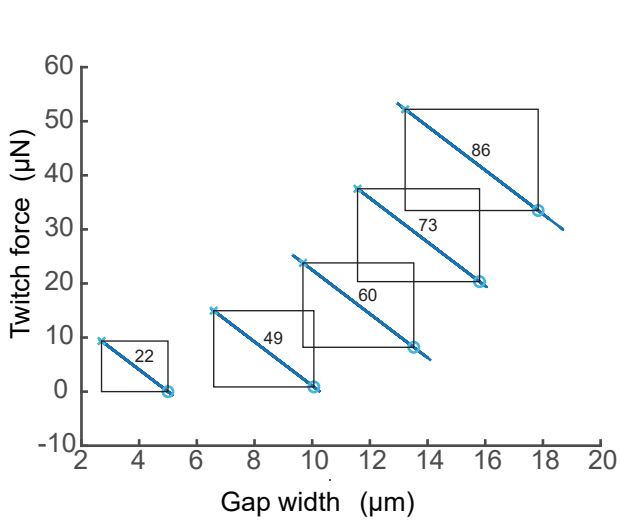


Fig.9 静的な伸展を与えた際の空隙の幅と拍動力の関係. 長方形は心臓内での拍動を仮定した際の仕事の大きさ(単位 $\times 10^{-12}$ J).

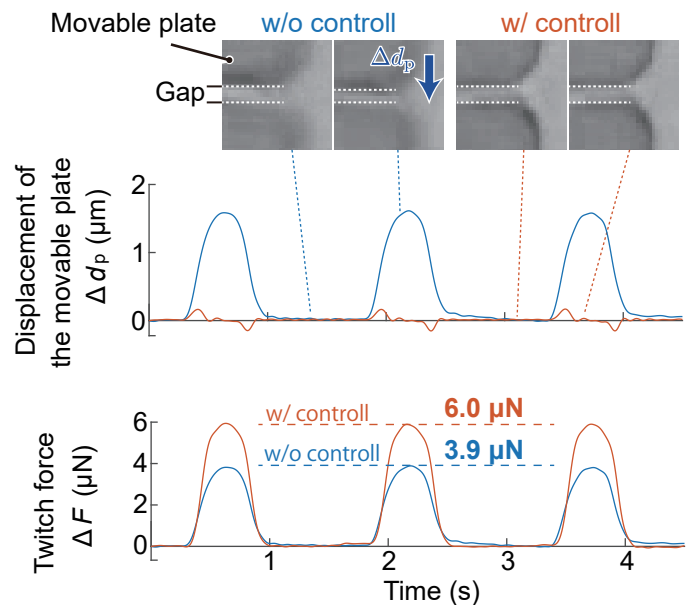


Fig.10 動的な伸展を与えた際の(a)可動培養基板の変位と(b)拍動力.