

磁気駆動式マイクロピラーを用いた焦点接着斑への直接力学刺激負荷と細胞力学応答の解析

Direct application of mechanical stimulation to individual focal adhesions with magnetic micropillars and analysis of subsequent cellular response

○ 井上 卓哉 (名工大) 正 長山 和亮 (名工大)
正 杉田 修啓 (名工大) 正 松本 健郎 (名工大)

Takuya INOUE, Nagoya Institute of Technology, Nagoya 466-8555
Kazuaki NAGAYAMA, Nagoya Institute of Technology
Shukei SUGITA, Nagoya Institute of Technology
Takeo MATSUMOTO, Nagoya Institute of Technology

Abstract: We have developed a novel magnetic micropillar substrate made of poly(dimethylsiloxane) to apply the mechanical stimulation to individual focal adhesions of cells, and to measure associated internal tension of cells. We have successfully embedded enough amount of iron particles into the micropillars and controlled their location on the substrate. By applying magnetic field to the magnetic micropillars, external force can be transferred to the focal adhesions formed on the top of these pillars. We investigated change in the internal tension of aortic smooth muscle cells (SMCs) before and after mechanical stimulation using the magnetic pillars. We found that the internal tension of SMCs fluctuated markedly during releasing of their pretension, which may be due to the tensional homeostasis of SMCs.

Key words: Cell biomechanics, Magnetic micropillars, Traction forces, Focal adhesions, Mechanotransduction

1. 緒言

細胞は焦点接着斑 (Focal adhesion, FA) と呼ばれる点状の接着部を介して基質と接着している。FA は収縮性の細胞骨格であるストレスファイバ (Stress fiber, SF) と機械的に結合しており、細胞のFA部位ではSFの収縮力によって張力が生じている⁽¹⁾。近年では、この張力の大きさや方向の変化が、細胞の増殖能⁽²⁾や分化⁽³⁾といった細胞機能を調整する上で重要であることが指摘されており、FA部位での張力分布を詳細に計測する研究が進められている。代表的な例として弾性マイクロピラー基板を用いた細胞張力の計測が挙げられる。これは、微細加工技術によって直径数 μm のシリコンゴム (Polydimethylsiloxane, PDMS) 製の円柱 (ピラー) がアレイ状に多数並んだ基板を作製し、その基板上で細胞を培養してFA部位での個々のピラーの変形量から張力を求める方法である⁽¹⁾。この方法によってFA部位では細胞の中心方向に向かって数10 nNの張力を発揮していることが明らかになってきている。しかし、個々のFA部位に直接的な力学刺激を負荷し、これに伴う細胞の力学応答を詳細に解析する技術はほとんどない。

そこで当研究室では、マイクロピラー内に磁性粒子を埋め込み、外部から磁場を印加することで、マイクロピラーを能動的にたわませ、細胞の個々のFA部位に力を負荷できる磁気駆動式マイクロピラー (磁性ピラー) の開発を進めている⁽⁴⁾。今回は、FAを介した細胞内の力の伝達のメカニズムを調べる第一歩として、磁性ピラー基板上で培養した細胞のFA部位に直接ひずみを負荷し、その時の細胞応答の変化を詳細に調べた。

2. 実験方法

2.1 磁性ピラー基板の作製

磁性ピラー作製の鋳型はTanらによるフォトリソグラフィ法に準じて作製した⁽¹⁾。細胞がFA部位で生じるnNオーダーの張力を正確に測定するために、ピラーの直径は3 μm 、高さは9 μm とし、ピラーのばね定数が10-30 nN/ μm の範囲になるように設計した。また、ピラー同士の接着を防ぎつつ、すべてのピラーを等間隔にするために、ピラーは三角格子状に配置し中心間距離は9 μm とした。ピラー内に埋込む磁性粒子として平均粒径1.5 μm の鉄粉 (HQ,BASF) を使用した。市販のPDMS (Sylgard 184, Dow-Corning) と鉄粉を調合した硬化剤を体積比10:1で混合し、鉄粉含有PDMSを作製した。そして、これを鋳型に流し込み、遠心力を負荷することにより、鋳型孔内に鉄粉を埋め込んだ。その後、100°Cで1時間熱処理し、鋳型からピラーを剥離して磁性ピラー基板を作製した。

本研究では、細胞の一部分のFA部位に直接ひずみを加え、その時の細胞応答を詳しく調べるため、鉄粉を埋め込んだピラーを基板の所望の領域に作製した。すなわち、厚さ1mm程度のPDMS製シートを鋳型の表面にマスクとして貼り付け、鉄粉を埋め込むピラー以外の孔を閉じた状態で、前述の方法で鉄粉を孔内に沈み込ませた。そして、マスクを取り外し、鉄粉を含まないPDMSを新たに注ぎ込んでピラー基板を作製することで、磁性ピラー領域と通常のピラー領域を持つ基板を作製した。

2.2 細胞焦点接着部位への直接ひずみ負荷実験

前述の方法で作製した磁性ピラーと通常ピラー領域を持つ基板を使用した。試料はブタ胸大動脈より単離後、培養した血管平滑筋細胞 (継代数4-10) を用いた。ピラー先端面に細胞を接着させるため、マイクロコンタクトプリンティング法⁽¹⁾でピラー端面にフィブロンectinをコートし、細胞を基板上に播種した。10%FBS (biowest) を添加したDMEM (Sigma) 培地を用い、インキュベーター内で細胞が基板上で十分広がるまで4-6時間静置培養した。そして、磁性ピラー領域と通常ピラー領域の両領域をまたぐように付着した細胞を実験対象とした。試料を37°Cに保温した倒立顕微鏡ステージ上にセットし、予めマイクロマニピュレータに取り付けておいたネオジム永久磁石 (表面磁束密度0.47 T, サンギョウサプライ) を試料の両側から近づけていき、最大で0.3 Tの磁場を印加し、磁性ピラーを変形させて細胞のFA部位に直接ひずみを負荷した。この時のFA部位のピラーの変形の様子をCCDカメラ (ORCA-ER, 浜松ホトニクス) を用いて30秒間隔でタイムラプス撮影した。撮影した連続画像に対して、輝点追跡ソフトウェア (G-Track, ジーオングストローム) を用いて個々のピラー先端部の重心座標を求め、ピラーの変形量の変化を計測した。そして、別途求めておいたピラーのばね定数⁽⁴⁾に変位を乗じてピラー先端部に加わっている細胞の張力の変化を計測した。そして試験後、細胞内のSFの状態を確認するためSFの蛍光画像を撮影した。

3. 結果および考察

直接ひずみ負荷実験時の細胞の代表画像をFig. 1に示す。今回は、通常ピラー領域と磁性ピラー領域の両領域をまたぐようにして広がった細胞を実験対象とした。対象の細胞に対して、磁場を印加した状態で保持し、細胞の片側のFA部位に対して圧縮ひずみを負荷した。この時に、鉄粉の埋め込まれていない通常のピラーに接着しているFA部位 (Fig. 1(A), Pillar 1-5) に注目し、その張力変化を計測

本研究ではニューラルネットワークでの波形解析手法を用いる。

ヒトの神経伝達回路をモデル化した多層パーセプトロンモデルにおいて、あらかじめ入力・出力を例示し、各ユニットの重み調整（学習）を行うことで、パターン認識を可能にする手法としてバックプロパゲーションがある⁽⁵⁾。これにより、未学習の入力データでも、このネットワークを通せばパターン認識が可能になる。また、重み修正を繰り返し行うことで、識別精度が向上する。これを本研究における筋肉活動電位におけるデータ識別に応用する。

3.従来モデルからの改良点

3-1 アクチュエータの変更

従来モデルでは、Table.1 に示す平均的な体格の 65 歳男性の定常歩行動作時にかかる床反力（踵接地時約 600N、爪先離地時 700N）を 30%アシストするように、Table.2 上段の DC モータ（マクソンジャパン株式会社 RE25）を使用していた。しかし、高負荷がかかると強度不足によりギアの破損が生じていた。

今回はモータ本体の耐久性を向上させ、さらに装着者が労働作業に従事し、運搬する荷物の重量が 10kg 程度であると仮定、それを運搬可能にするモータの使用を検討する。なお、今回は脚部モデルのみの製作であるため、上半身モデルを装着する今後の展開を考慮し、そのみで上半身の保持、荷物保持のアシストが可能にようにする。

Table.1 のモデルから、モータ最大出力を求める。上半身 α に重力加速度と大腿長 γ を掛け、膝関節を 90° 屈伸させた場合の静止状態で片足の膝関節にかかるトルクを求めると、(1) 式になる。なお本来は動的加重で発生するトルクを考慮する必要があるが、余剰トルクを持たせていることから、今回は詳しくは検討しない。

$$53\text{kg} \times 9.8\text{m/s}^2 \times 0.4\text{m} \times \frac{1}{2} = 104\text{Nm} \quad (1)$$

これに重量物保持に余裕を持たせ、耐久性を向上させたモータを検討した結果、Table.2 下段の DC モータ（マクソンジャパン株式会社 RE40）を用いる。

Table.1 The average value of 65-year-old men's body

Height	164cm
Weight	63kg
Upper body α	53kg
Lower body β	10kg
Thigh γ	0.4m

Table.2 Specification of each motors

	Torque (motor+gearhead+ spiral bevel gear)	Radial direction withstand load	Axial thrust direction withstand load	Weight (motor+gearhead)
RE25	29.8Nm	16N	3.2N	720g
RE40	144.5Nm	28N	5.6N	2820g

3-2 各部品の改良

これまではモータと傘歯車が直接繋がっていたため、傘歯車の受けるモータの耐久力以上の力が直接モータに伝わっていた。

重量物保持モデルにおいては更に大きな負荷がかかるこ

とが予測されるため、この荷重を吸収するために、Fig.3 に示すようにモータと傘歯車間にモータ保護装置を設ける。この装置はモータ耐荷重以上の力がかかった場合に变形・破断することで過負荷をモータに伝えず、保護する機能を持つ。本報では CAE による解析で、その機能を確認する。

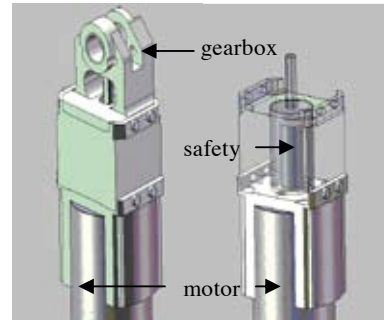


Fig.3 Safeguard unit

4.結果

Fig.4 は設計した装置を Dassault Systemes SolidWorks Corporation の CAE(COSMOSWorks)によって応力解析したものである。モータ保護装置の材質をアルミ合金 3003 番で設定し、モータの耐久力以上の力（ラジアル方向 28N、軸スラスト方向 5.6N）をギアボックス側軸からかけたところ、モータ保護装置は变形して負荷を吸収し、モータ側にはほとんど負荷が伝わっていない。

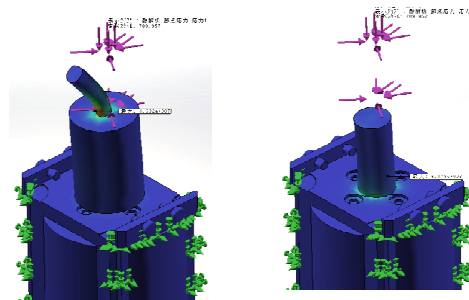


Fig.4 The analysis by cosmosworks

5.今後の課題

今回はこれまでのモデルを元にモータ換装による改良を行い、設計したモータ保護装置に対してシミュレータによる評価を行ったところ、モータ耐久以上の力で变形して負荷を吸収し、保護装置として機能する良好な結果が得られた。

今後はこれを製作の後、動作実験とアンケート調査を行い、装着感等の改良とこれまでのモデルと比較し、最終的な評価を行う。またここで得られた結果を参考に、上半身モデルの制作に着手し、パワーアシストスーツを実用的なものに近づけて行こうと考えている。

参考文献

- (1) 総務省統計局・政策統括官（統計基準担当）・統計研修所、人口推計（平成 23 年 8 月確定値、平成 24 年 1 月概算値）
- (2) 高瀬鍛，二関節筋モデルを用いたパワーアシストスーツの研究（第 1 報），WWLS2010 講演会，2010
- (3) 福井勉，理学療法ジャーナル 42 巻 6 号（2008. 06）pp. 511
- (4) 三田勝己，筋電図計測、BME, Vol. 5, No. 1, 1991, pp. 33-40
- (5) 西川隆記，離散学習パラメータを持つバックプロパゲーション学習法の評価、電子情報通信学会技術研究報告. CAS, 回路とシステム 98(223), (1998-07-30) p23-29,