

補助事業番号 2023M-392

補助事業名 2023年度 遠隔から細胞操作を可能とするハイドロゲルを用いた音響応答性
マイクロデバイスの開発 補助事業

補助事業者名 倉科 佑太

1 研究の概要

本研究では、音響応答性マイクロデバイスの開発と、それを用いた細胞の超音波応答機構の構築を目指して複数年度にわたり実験した。はじめに、気泡核を含有したマイクロサイズのハイドロゲル複合体を製作し、超音波照射による気泡の膨張・収縮を観察することで、その音響応答性を評価した。また、気泡核の大きさを動的光散乱法で測定し、活性酸素の発生を分光光度計により定量的に評価した。加えて、細胞に活性酸素応答プローブや過酸化水素応答遺伝子を細胞に導入し、超音波刺激による遺伝子発現の変化を可視化した。さらに、音響応答性マイクロデバイスの配置と活性酸素発生との関係を解析し、基礎的な知見を得た上で、その有効性を検討した。

2 研究の目的と背景

我が国の65歳以上の高齢者数は世界最高水準の総人口の3割に迫る中、定年退職後も働く人が増え、誰もが健康に生きられる人生100年時代が重要視されている。そのような社会背景の中、アルツハイマー病やパーキンソン病などの遺伝子発現に異常をきたした細胞に起因される病気である認知症は、一生を通してほとんど細胞の置換が起きない脳が長寿となることで生じるエラーとも言える。85歳以上の50%以上が認知症であることから、社会の高齢化が今後も進む中で深刻な問題となっており、抜本的な解決策が求められている。

以上の背景から、ハイドロゲルに微細な気泡核を含有し、高周波の超音波を照射することで反応する音響応答性マイクロデバイスを開発した。さらに、本デバイスを用いて生体内の細胞機能をON/OFFする技術を構築することで、治療への応用を可能とする超音波による細胞の遺伝子発現操作を実現した。1年目には本デバイスの構築とその評価により超音波を照射することで音響応答性マイクロデバイスから放出される活性酸素を制御することを目指し、2年目には細胞が本デバイスに照射した超音波に反応して遺伝子を発現することを確かめた。

3 研究内容

(1) 音響応答性マイクロデバイスの開発

<https://tuat-kurashina.jp/research/>

(2)ハイドロゲルデバイスと細胞操作

① マイクロバブルを含有したハイドロゲルデバイスの開発

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041772400422X>

② 活性酸素による細胞操作の研究

https://www.jstage.jst.go.jp/article/use/45/0/45_1P4-5/_article/-char/en

③ 超音波応答性受容体を用いた細胞操作の研究

https://www.jstage.jst.go.jp/article/use/45/0/45_1P4-4/_pdf/-char/ja

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究は脳神経の疾患や損傷により正常な命令を下せなくなった神経細胞に、外側から刺激を付与することで制御を可能とする治療に期待できる。さらに脳神経だけでなく、様々な細胞の操作が遠隔で可能である。とくに手術が難しい臓器の細胞を操作することに親和性が高く、例えば内分泌系の病気(糖尿病やバセドウ病, グレーブス病など)の治療や原因究明を加速させるためのツールとなる。加えて、活性酸素は発生量が増加すると老化・細胞死を引き起こす細胞毒にもなり得る。本デバイスを用いると精度高く局所的に活性酸素を発生できることから、外側から生体内で局所的な老化を誘導することができる。このように活性酸素と老化・細胞死との関係について、精度の高い研究にも応用が期待できる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

事業者は、生体の活性向上やそのメカニズムを分析するため、主に超音波をアクチュエータとして生体に照射するバイオメカニクスの研究に従事してきた。加えて、マイクロ加工を基盤とした細胞培養システムやDDSデバイスを開発し、バイオメディカルデバイスに新たな機械要素を取り入れる研究に従事してきた。本研究を遂行することで、超音波が細胞の受容体に及ぼす影響や超音波応答性マテリアルについて深い知見を得ることができた。すなわち、超音波を生物・材料分野に応用を広げるための第一歩の研究成果を得ることができた。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

1. Ryuto Yamakawa, Hiroaki Onoe, Yuta Kurashina*, “Hydrogel carrier with bubble vibration enhancer for ultrasound-triggered drug release,” *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 112, 107173, 2025.
2. OKotaro Fujishiro, Ryota Kawamae, Satoshi Okada, Takahiro Kuchimaru, and Yuta Kurashina, “Effects of high frequency ultrasound caused by lithium niobate on the intracellular generation of reactive oxygen species,” *The 45th Symposium on UltraSonic Electronics (USE 2024)*, Tokyo, Japan, 2024/11/25-27.
3. OLisa Mitsuda, Shun Koda, Shigenori Miura, and Yuta Kurashina, “Visualizing

Ultrasound Responsiveness of Ion Channel Receptors for Sonogenetics,” The 45th Symposium on UltraSonic Electronics (USE 2024), Tokyo, Japan, 2024/11/25–27.

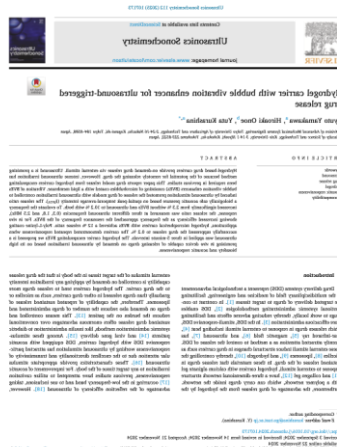
4. OKengo Matsubara, Kentaro Nakamura, Yuta Kurashina, “Transdermal Penetration Effect of Sequential Ultrasound Irradiation in the kHz and MHz Bands on Biopolymer Drug Models,” 2024 IEEE Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control Joint Symposium (UFFC–JS 2024), Taipei, Taiwan, 2024/9/22–26.
5. ORyuto Yamakawa, Hiroaki Onoe, Yuta Kurashina, “Drug Release by Synergy Effect of Hydrogel Microcarrier Containing Microbubbles with Ultrasound Irradiation,” 2024 IEEE Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control Joint Symposium (UFFC–JS 2024), Taipei, Taiwan, 2024/9/22–26.
6. Yuta Kurashina, “Cell Culture and Drug Delivery System Using High-Power Ultrasonic Actuators,” 2024 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems, Nagoya, 2024/11/20.
7. ○山川龍斗, 板東雄太, 尾上弘晃, 倉科佑太, “薬剤放出のための生体安全性と超音波刺激応答性を具備したハイドロゲル微小球状キャリア”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第50回研究会 (CHEMINAS 50), 仙台, 2024/11/25–28
8. ○藤代晃太郎, 河前遼太, 倉科佑太, “高周波帯におけるリチウムナイオベートの厚さ振動が活性酸素に及ぼす影響”, Dynamics and Design Conference 2024 (D&D2024), 横浜, 2024/9/3–6.
9. ○満田理彩, 香田駿, 三浦重徳, 倉科佑太, “ソノジェネティクスのためのリチウムナイオベート基盤を用いた超音波照射デバイスの開発”, Dynamics and Design Conference 2024 (D&D2024), 横浜, 2024/9/3–6

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

題目: Hydrogel carrier with bubble vibration enhancer for ultrasound-triggered drug release

Author links open overlay panel, 雑誌: Ultrasonics Sonochemistry



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041772400422X>

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

題目: Effects of high frequency ultrasound caused by lithium niobate on the intracellular generation of reactive oxygen species 学会名: The 45th Symposium on UltraSonic Electronics (USE 2024)

1P4-5

Effects of high frequency ultrasound caused by lithium niobate on the intracellular generation of reactive oxygen species

Kotaro Fujishiro^{1*}, Ryota Kawamae¹, Satoshi Okada², Takahiro Kuchimaru¹, and Yuta Kurashina^{1*} (¹Tokyo Univ. of Agriculture and Technology; ²Tokyo Institute of Technology; ³ichi Medical Univ.)

1. Introduction

In recent years, cancer therapy methods using reactive oxygen species (ROS) have been attracting attention because of cancer-specific cell death induction by ROS¹⁾. Cancer treatment by inducing cell death using ROS generation in cells by light²⁾ or drugs³⁾ has been reported as a conventional method. These methods face the problem of difficulty in stimulating cancer cells effectively. The light-based method is highly invasive, requiring the insertion of optical fibers into the body due to the penetration limits of the laser⁴⁾. In addition, drug-based methods are less effective due to the small number of intracellular catalysts⁵⁾. On the other hand, ultrasound avoids these problems. Ultrasound is minimally invasive due to its long wavelength allowing external irradiation. Therefore, ROS generation by cavitation using ultrasound is effective in cancer therapy⁶⁾. However, ultrasound methods have so far been reported only at low frequencies with wavelengths large enough for cells. In this study, we generated ROS in cells using high-frequency ultrasound with a wavelength size of a cell (~7 MHz).

The aim here is to assess the intracellular behavior of ROS generated by high-frequency ultrasound using fluorescent reagents. In this report, the conditions for ROS generation were first examined. Based on the results of this experiment, the ROS behavior was visualized on the intracellular level.

2. Experimental methods

2.1 Preparation of experimental device

The lithium niobate transducer was made by double side deposition of aluminum lithium niobate plate (Fig. 1a). This transducer vibrates when a steel plate and probe electrode turn on electricity (Fig. 1b).

2.2 Acoustic Pressure measurements

Acoustic pressure was measured to determine the ultrasound irradiation conditions for the ROS generation evaluation experiments. The original

system was built to measure acoustic pressure (Fig. 2). This system accurately measures acoustic pressure by removing the noise from the acoustic pressure waveform data acquired with a fiber optic acoustic pressure probe.

2.3 Evaluation of ROS generation

The amount of ROS generated by ultrasound irradiation was measured by 2-hydroxyterephthalic acid (HTA). HTA is a substance formed by the reaction of disodium terephthalate (NATA) with OH radicals. The fluorescence intensity of HTA (ex: 310 nm, em: 425 nm) was measured by the spectrofluorometer to quantitatively evaluate the amount of ROS generated. The following experiment investigated ROS generation in response to changes in acoustic pressure. First, 7 mL of 4 mM NATA was poured into a dish. The dishes were then irradiated with the 6.8 MHz ultrasound for 5 minutes under each ultrasound condition. The liquid was collected from these dishes to measure fluorescence intensity by the fluorescence spectrometer.

2.4 Visualization of intracellular ROS

Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF) was used to observe OH radicals in cells. The procedures for the visualization of intracellular ROS generation are as follows. First, 4.0×10^4 HeLa cells were incubated at 37 °C for 24 hours to attach to a 35 mm glass bottom dish. After washing the dish 3 times with PBS (-), the solution in the dish was replaced with 50 μ M HPF and incubated at 37 °C for 20 minutes. Lastly, after washing 3 times with PBS (+), oxidative stress was added. The changes due to oxidative stress were observed under the fluorescence microscope for 15 minutes.

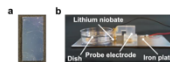


Fig. 1. Ultrasound irradiation device. (a) Lithium niobate. (b) Irradiation device.

E-mail: *fujishiro@st.tuat.ac.jp, *kurashina@at.tuat.ac.jp

https://www.jstage.jst.go.jp/article/use/45/0/45_1P4-5/article/-char/en

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 東京農工大学工学部機械システム工学科
(トウキョウノウコウダイガクキカイシステムコウガクカ)

住所: 〒184-0012

東京都小金井市中町2-24-16 6号館 401号室

担当者: 倉科佑太・准教授(クラシナユウタ)

担当部署: 工学研究院 先端機械システム部門

E-mail: kurashina@go.tuat.ac.jp

URL: <https://tuat-kurashina.jp/>