

細胞骨格のタイムラプス観察による 超音波応答性イオンチャネル発現の解明

倉科 佑太*

Observation of the Time-lapse of the Cytoskeleton to Clarify the Expression of Ultrasound-responsive Ion Channel

Yuta KURASHINA*

Neurons are long-lived cells whose functions are difficult to restore once lost, leaving many neurological disorders without curative treatments. Although optogenetics enables precise control of neuronal activity, its clinical application is limited by invasiveness. This study focuses on ultrasound-based, non-invasive control of cellular activity via the ion channel TRPA1. By patterning cell adhesion and analyzing cytoskeletal organization, enhanced ultrasound responsiveness was observed at the cell periphery, suggesting that TRPA1 activation is closely linked to cytoskeletal dynamics and offering a promising approach for non-invasive neuromodulation.

1. 研究背景

神経細胞は生体組織を構築している細胞の中で最も寿命が長く、老化や疾患により一度機能を失うと取り戻すことが極めて困難な組織である。そのため、神経疾患の治療法は対症療法に留まり、未だに根本的な治療法がないものが数多く存在する。そこで、外部の刺激から神経細胞の活動を制御することができれば、神経細胞の再活性化も不可能ではない。例えば、光刺激を用いた光遺伝学 (図 1a, オプトジェネティクス¹⁾) が報告されている。これは神経細胞に光に反応する受容体 (刺激を感じ取るセンサー) を発現させ、光の照射により受容体を応答させ、細胞内外のカルシウム濃度を変化させる技術である。しかし、光は波長が短く減衰が激しいため、細胞に照射する際には極めて近付いて照射する必要がある。in vivo 実験では開頭して頭蓋骨を切除して脳内に光ファイバを挿入し、光を細胞に照射する必要がある。すなわち、医療に展開するハードルは極めて高い。そのため、侵襲性の提言が求められる高度先進医療への展開には障害が大きく、ヒトへの医療応用は実現が難しい。そこで本研究では、超音波の機械刺激により細胞の活動を制御する技術に着目した。この超音波による細胞の活性を操作する技術を確認することで、神経疾患の根本的な治療に期待できる。具体的には、非侵襲的に生体深部にある脳や脊髄といった中枢神経細胞の活性を制御し (図 1b)、異常をきたしている細胞に起因した脳疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病など) や、中枢神経疾患 (筋萎縮性側索硬化症など) の治療など、これまで困難であった神経疾患のアンメットメディカルニーズの根本的な治療法の確立に期待できることからそのインパクトは甚大である。

細胞の活性操作は、近年では光による操作が報告されてきた。光遺伝学は、脳科学への応用が期待される近年最も注目された技術であり、この15年間で数多くの論文が散見されてきた。一方で、超音波を用いた音響遺伝学については、散発的な報告に留まり、未だほとんど知見のない未開拓の分野である。

本研究では、超音波への応答性が報告されているイオンチャネル型受容体の TRPA1 に着目する。これまでの報告では、細胞膜の

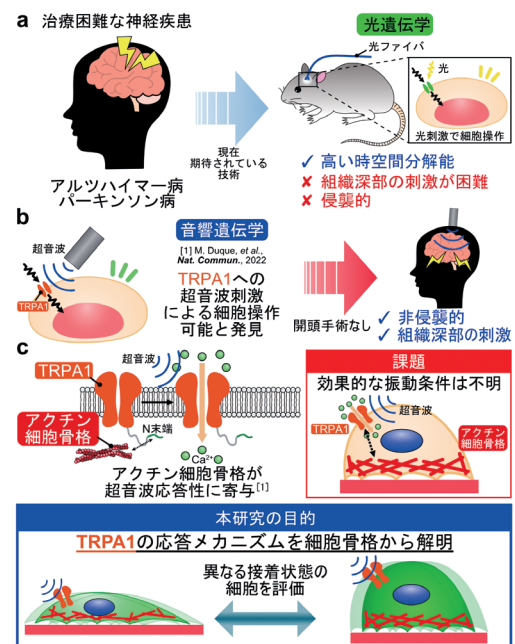


図 1 本研究の概要。(a) 神経疾患治療に期待される従来技術 (光遺伝学) と (b) 注目する次世代の治療法 (音響遺伝学)。(c) 音響遺伝学の現状と問題点、その解決方法 (本研究の目的)。細胞骨格の観点から応答メカニズムを解明。

2026年2月26日 受理

* 豊田理研スカラー

東京農工大学工学研究院先端機械システム部門

振動や細胞骨格がTRPA1を刺激することが報告されているが、そのメカニズムに言及した研究は皆無である。そこで、本研究ではTRPA1の超音波応答メカニズムを細胞膜の振動に寄与する細胞骨格から解明した(図1c)。

上記の背景と課題から、本研究では効率的にTRPA1を刺激できる条件を探索する方法として、接着領域や細胞骨格といった細胞の構造力学的な視点から、細胞に発現させたTRPA1の超音波応答メカニズムを解明することを目的とした。具体的には、異なる接着状態を有する細胞の骨格構造を観察することで、細胞の構造力学的な状態を把握し、TRPA1の超音波応答性をCa²⁺流入に应答するGCaMP6fを遺伝子導入することで観察して評価した^{2,3)}。このように未解明であるTRPA1の超音波応答メカニズムを解明し特性を体系化することは、超音波を用いた非侵襲的な神経疾患治療の発展に大きく寄与する。

2. 実験方法

本研究では、マイクロコンタクトプリンティング(μ CP)を用いて細胞をパターンニングし、細胞接着領域がTRPA1の超音波応答性に与える影響を評価した。まず、フォトリソグラフィによりSU-8をシリコンウェハ上にスピコートし、露光・現像工程を経てモールドを作製した。次に、モールドにPDMSを流し込み、脱気・加熱硬化することでPDMSスタンプを作製した。スタンプ表面をプラズマ処理後、フィブロネクチンでコーティングし、ディッシュに転写して細胞接着領域を形成した。さらに、非接着領域をプルロニックF-127で処理し、選択的に細胞を播種・培養することで、パターンニング細胞を用いた超音波刺激を印加した。なお、細胞にはリポフェクタミンを用いてTRPA1およびGCaMP6fを遺伝子導入したヒト胎児腎細胞(HEK)293細胞を用いた。

3. 実験結果・考察

細胞に超音波を照射するために、圧電単結晶であるLNの両面にクロムとアルミニウムを蒸着して金属電極を形成し、所定寸法に切断することで7MHzのLN振動子を製作した。さらに、印加電圧を伝達するスプリングプローブ付き電極を3Dプリンタで作製し、LN振動子を設置した。最終的に、振動子とディッシュ間を水で満たした超音波照射デバイスを構築し、アンプとオシロスコープを用いて電圧・電流を調整して測定した。

TRPA1の超音波応答性が細胞骨格に及ぼす影響を評価(図2a)するため、マイクロ加工を用いて線状の接着領域を制限して細胞を培養した(図2b)。これらの細胞に超音波を照射して、GCaMP6fの発光を中心部(青矢印)および縁辺部(赤矢印)を観察した(図2c)。その結果、縁辺部で超音波感受性が高くなるが示された(図2d,e)。また、細胞骨格を評価するために、細胞を固定したのちに細胞骨格の主要なタンパク質であるアクチンを免疫染色した(図2f,g)。その結果、G-アクチン(単量体)とF-アクチン(フィラメント状)の比は縁辺部で増加した(図2h)。すなわち、TRPA1の超音波応答性と細胞骨格の重合率との関係性を示唆する結果が得られた。以上の結果から、今後は単一細胞において接着領域を変化させることで、G-アクチンとF-アクチンの重合率を制御した際の超音波応答性について観察することで、TRPA1の応答メカニズムを体系化し、効率的にTRPA1を刺激できる条件の探索へとつながる。

REFERENCES

- 1) K. Deisseroth, *Nat Methods*, **8** (2011) 26-29.
- 2) L. Mitsuda, R. Konno, S. Koda, S. Miura and Y. Kurashina, *International Symposium on Biomolecular Ultrasound & Sonogenetics (ISBUS 2025)*, Pasadena, CA, USA, 2025/12/10-12.
- 3) L. Mitsuda, S. Koda, S. Miura and Y. Kurashina, *The 2025 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS 2025)*, Utrecht, Netherlands, 2025/9/15-18.

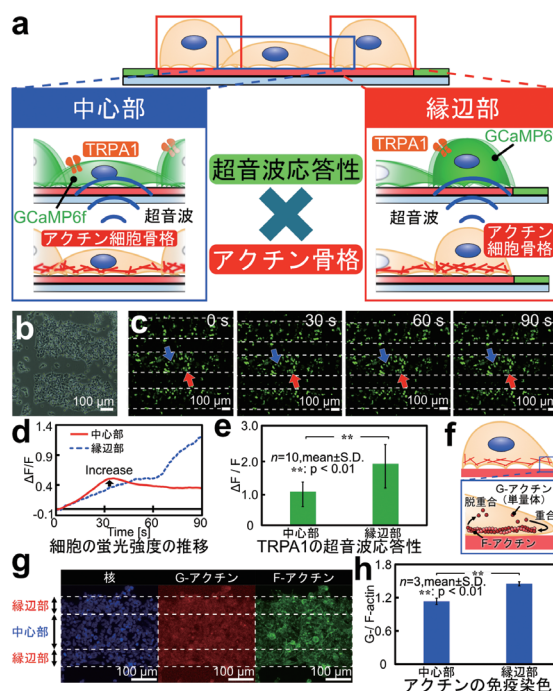


図2 超音波応答性と細胞骨格の関係性についての実験。(a) 実験概要。異なる接着状態の超音波応答性とアクチン骨格。(b) 線状に接着させた細胞と(c)超音波応答性の観察。(d)異なる接着状態の細胞の蛍光強度の推移と(e)TRPA1の超音波応答性の平均。(f,g)G-アクチン(単量体)およびF-アクチン(フィラメント状)の観察と(h)異なる接着状態の細胞のそれぞれのアクチンの量の比。