# THERMAL ENGINEERING

# **TED Newsletter on the WEB**

日本機械学会熱工学部門ニュースレター TED Newsletter No.97 September 2022

# 目 次

# 1. TED Plaza

- 光熱誘起マイクロバブルを使ったマイクロ流体駆動 名村 今日子(京都大学),鈴木 基史(京都大学)
- 生物を構成する個々の細胞の熱応答およびそのシグナルの 多細胞間ダイナミクス

平塚 徹(大阪国際がんセンター研究所)

- 2. 第 100 期部門組織
- 3. 行事案内
  - > 部門企画行事案内
  - > 部門関連行事案内
  - > 国際会議案内
- 4. その他
  - > 編集後記

# **TED Plaza**

# 光熱誘起マイクロバブルを使ったマイクロ流体駆動



名村 今日子



京都大学 准教授 大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 namura@me.kyoto-u.ac.jp

鈴木 基史

京都大学 教授 大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 m-snki@me.kyoto-u.ac.jp

#### 1. はじめに

マイクロメートルスケールの流路の中で流体を扱う技術はマイクロ流体駆動技術と呼ばれ、特に分析技術の発展に貢献してきた(Whitesides, et al., 2006). マイクロ流体駆動技術を使えば、非常に少量のサンプルと試薬を使用し、高い感度、低コスト、短い時間で分析を行うことができるからである。また分析に限らず、流体を扱うあらゆるデバイスの小型化が、微小空間で流体を操る技術の必要性を高めてきた。しかし、流路の高さや幅が数 100 μm 以下になってくると、レイノルズ数が小さくなる影響で、流体の攪拌が困難になったり、圧力損失が増大したりする。そこで、マイクロ流体を駆動する様々な方法が検討されている(Laser, et al., 2004).

その中で、我々が最近着目しているのがマイクロバブル(気泡)である。マイクロバブルは、すでにインクジェットプリンティングにおける少量のインクの吐出に使われている。これは、液相から気相への相変化に伴う急激な体積変化を利用したものだ。この体積変化は、マイクロ流体の強力な駆動源となる。これに加えて、バブルの表面張力にも、流体を駆動する能力がある。表面張力はヘルムホルツ自由エネルギーで理解されるものであり、温度や気液界面の組成によって変化する(小野、1980)。そのため、温度勾配等によって表面張力の不釣り合いを誘起すると、表面張力が弱いところから強いところに向かってマランゴニ力と呼ばれるせん断力が生じる。この力によって気液界面周辺にはマランゴニ対流が生じる。特に、体積に対する表面積の比率が大きくなる  $\mu m$  スケールでは、重力などの体積力に比べて、表面に働くマランゴニ力の働きが顕著になる。そのためマランゴニ力は、表面張力を積極的に利用した強力なマイクロ流体駆動源として期待されている。しかし、このマランゴニ力を積極的に利用したマイクロ流体駆動法というのは、まだ広く実用化されているわけではない。

その理由の一つに、バブルの大きさと位置の制御の難しさが挙げられる。マランゴニ力は気液 界面上の温度勾配や濃度勾配に敏感である。そのため、期待した強さと向きの対流を得るために は、例えば熱源に対してよく決めた位置・大きさのバブルを配置しておく必要がある。しかし、 バブルの大きさや位置を保つことは容易ではない。後述する通り、水などの液体には空気がたく さん含まれており、バブルの一部を加熱すると、それらがバブルに取り込まれて肥大化すること が知られている(Baffou, et al., 2014). 肥大化したバブルが一度マイクロ流路を閉塞してしまうと、それを取り除くことは容易ではない.

最近我々は、光熱変換を用いた局所加熱と脱気による水中溶存気体の除去によって、バブルの大きさや位置の制御性の問題を解決し、さらに周辺対流を増強・制御することに成功した。また、このバブルが局所加熱点上で振動していることについても明らかにした。本稿では、これらの結果について報告する。是非、様々な分野の方からご意見をいただけると幸いだ。

#### 2. 脱気水中での水蒸気マイクロバブルの生成と周辺対流の様子

光をよく吸収して熱に変換する薄膜にレーザーを集光すると、そのレーザースポットを微小な熱源として扱うことができる。この熱源は照射する光の強さやスポットサイズを変えるだけで、総発熱量や発熱密度を変えることができる他、照射位置によって熱源の位置を自在に変えることができる。我々はこれまでに、このような熱源を用いて、主に水で満たされたマイクロ流路中でのマイクロバブルの生成と、周辺マランゴニ対流の制御を行ってきた。熱源位置や発熱量の任意性を生かすことで、マランゴニ対流を使った粒子のサイズソーティング(Namura, et al., 2015)や粒子収束流の生成(Namura, et al., 2016)、水アルコール混合液中での温度勾配および濃度勾配マランゴニ効果の遷移の様子(Namura, et al., 2018)などを報告してきた。このように、光熱変換を利用した局所加熱を用いることで、マイクロバブルの周りの温度勾配を自在に変え、様々な流れを発生できることを示した。しかし、これらのバブルを長時間加熱し続けると、周辺の溶存気体を取り込み、バブルの位置や大きさが変わっていくことがわかっていた。応用面から考えると、バブルの大きさや位置に合わせてレーザー照射位置を変えなくてはいけないというのは、好ましくはない。

脱気をしていない水を局所加熱して生成したマイクロバブルは、主に空気でできていることが 知られている (Baffou, et al., 2014). 加熱や周辺対流は、そのバブルへの空気の取り込みを促進 し,バブルは大きく成長していく.そこで我々は水を脱気することで,このバブルの肥大化を防 ぐことができるのではないかと考えた. 図 1 に非脱気水中と脱気水中で生成するバブルの顕微鏡 像を示す(Namura, et al., 2017). 図 1(a)は非脱気水中で生成する典型的な空気バブルの顕微鏡像 を,図 1(c)はその模式図を示している.図 1(c)に示す通り,光をよく吸収して熱に変換する金ナ ノ粒子薄膜にレーザーを集光 (レーザースポット半径は 2-4 μm 程度) することで, 水を局所的に 加熱した. 薄膜が成膜されている基板表面すれすれの方向から観察を行い、水中には流れを可視 化するためにポリスチレン球を懸濁した、非脱気水を局所加熱すると、バブル生成の瞬間は水蒸 気のバブルが生じるが、その後、周辺の溶存気体を取り込みながら空気を多く含むバブルとして 成長していく. このとき,成長する空気バブルの近傍には、表面張力勾配に起因するマランゴニ 対流が観察される、表面張力は温度が上がると弱くなる性質がある、そのため、バブル表面の熱 源に近い方から遠い方に向かってせん断力が働き、周りの水を駆動する.一方、図 1(b)には脱気 水中で生成する水蒸気バブルを、図 1(d)にはその模式図を示す. 水中溶存酸素量が 0.9 mg/L 以下 になるまで真空超音波脱気を行い、非脱気水中と同様の実験を行った。その結果、最初の水蒸気 バブルの生成の後、溶存気体の取り込みが行われず、局所加熱点上に直径 10 μm 程度の水蒸気を 主に含むバブルが保持された.面白いことに、このバブルは1 m/s オーダーの非常に速い流れを 伴う. また、得られる流速分布はストークスレット(点力)という特異点を使ってよく表される ことがわかった(Namura, et al., 2017). 壁面近傍にストークスレットがある場合の流速分布の解 析解は J. R. Blake らによって報告されている(Blake, et al., 1974). この解析解を, ストークスレ ットの強さをパラメータにして実験結果にフィッティングすることで、水蒸気バブルが水に与え る力を見積ることができる。その結果、水蒸気バブルの力はレーザー強度に線形依存し、レーザ 一強度が 20 mW の時で 0.4 μN, 31 mW の時で 0.7 μN に達することがわかった. 重要なのは, 水 蒸気でできたバブルは加熱を続けても肥大化せず,局所加熱をやめると一瞬で消すことができる ということだ. つまり, 微小なポンプを必要な時に必要な場所に作って簡単に消すことができる. ただ、このままでは流体が常に基板表面に垂直な方向に駆動されてしまう. これでは、薄い流路 の中での流体攪拌には向いているが、流路に沿った一方向への流体駆動には向かない.

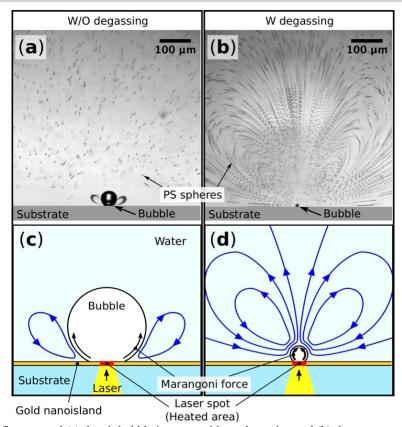


Fig. 1 Observed flow around (a) the air bubble in water without degassing and (b) the water vapor bubble in water with degassing. A series of 20 images taken during 0.2 s are merged to trace the motion of the polystyrene (PS) spheres in the well-developed flow. The trajectory of the polystyrene spheres represents rapid and large rotation flow generation around the vapor bubble compared to that around the air bubble. (c,d) show rough sketches of the flow directions in (a,b), respectively. (Namura, et al., 2017) [used in accordance with the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creative-commons.org/licenses/by/4.0/)]

そこで我々は、熱源の発熱密度分布を変えてバブルに与える温度勾配の向きを変えることで、 流れの向きを変えられるのではないかと考えた(Namura, et al., 2019). 光熱変換を使った流体加 熱では,薄膜に照射する光のスポットの形を変えるだけで,熱源の形を変えることができる.レ ーザースポットの形は,空間位相変調子という素子を使ってレーザー集光前の光線の空間的な位 相分布を制御することで、比較的自由に変えることができる. この方法を用いて、強度の異なる 2 つのレーザースポットを同時に照射した. 図 2(a)-(c)はレーザースポットのプロファイルを示し ており、原点近くにある山が主レーザースポットだ. このスポット上で水蒸気バブルが生成され る. 一方, その隣 5 μm ほどのところにある山がサブレーザースポットで, バブルに対して基板表 面に平行な方向に有効な温度勾配を与える. その結果, 図 2(d)-(f)に示すように, 水蒸気バブルか ら吹き出す流れの向きが、サブレーザースポットの強度に応じて傾くことがわかった. 図 2(f)の 流れは基板表面に平行な方向のストークスレットを使ってよく表すことができる. このように, 加熱の強さや形によって,大きさや向きの異なるストークスレットを生成することに成功した. これらを空間的に配置することで、マイクロ流路中に任意の合成流が得られると期待される. さ らに最近では、パターン化した光を一様な光熱変換薄膜に照射するだけでなく、空間的な光の吸 収分布を持つ薄膜パターンに一様光を照射することによっても、バブルの生成位置と流れの制御 を実現できることを明らかにした(Namura, et al., 2022). この結果は、本技術の実用性をさらに 高めるだろう.

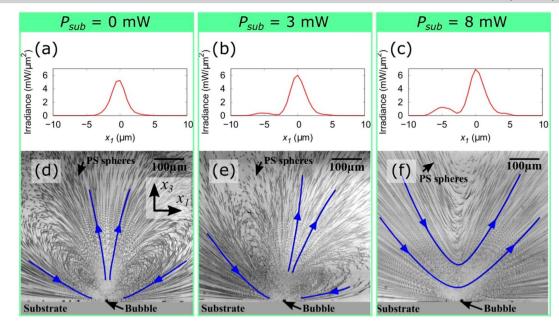


Fig. 2 (a–c) Measured irradiance of the laser spots on  $x_I$  axis when  $P_{sub} = 0$ , 3, and 8 mW, respectively. (d–f) Observed flow around the water vapor bubble in degassed water under laser irradiation conditions of  $P_{sub} = 0$ , 3, and 8 mW, respectively. A series of 200 images captured during 1 s were merged to trace the polystyrene spheres motion in the well-developed flow. (Namura, et al., 2019) [used in accordance with CC BY license]

## 3. 局所加熱点上での水蒸気マイクロバブルの振動

前節で述べた通り、局所加熱点上で生成する水蒸気マイクロバブルと周辺対流は、マイクロ流体駆動源として有望だ.しかし、実は流れができる原因は完全にはわかっていない.流れ発生の主な要因はマランゴニ力とバブルの振動であると考えている.バブルは主に水蒸気でできているため、大気圧に打ち勝つためには、その一端が100℃以上に過熱されていないといけない.一方で、熱源サイズはバブルよりも小さく、バブルがつくる流れによって周囲から引き込まれてくる水の温度は室温に近い.このような状況が、バブルに急峻な温度勾配を与え、強いマランゴニ対流を誘起している.また、この水蒸気バブルは激しい蒸発と凝縮によってサブMHzオーダーで振動していることがわかってきた(Namura, et al., 2020).このような振動もまた、同様の流れを生むことが知られている(Longuet-Higgins, 1998).これらの現象の流れの発生への寄与の切り分けは今後の課題である.ここでは、局所加熱点上での水蒸気バブルの振動についてもう少し詳しく紹介する.

前述の通り、脱気水を局所加熱することで得られる水蒸気マイクロバブルは、サブ MHz オーダ ーで振動していることがわかってきた (Namura, et al., 2020) . ここで注意したいのは, 局所加熱 に使用しているのはパルスレーザーではなく CW レーザーであるということだ. つまり, バブル は強制的に振動させられているというよりは、激しい蒸発と凝縮のサイクルによって自発的に振 動している.光熱変換を使った局所加熱は,この振動の様子を詳しく調べるのに適している.図 3(a)は薄膜に照射するレーザーのスポットサイズを一定に保ったまま強度を変えた場合,図 3(b) はレーザー強度を一定に保ったままスポットサイズを変えた場合の発熱密度分布を示している. このように、加熱範囲や発熱密度を系統的に変えることができる. この特徴を利用して、バブル の振動周波数の変化を調べたのが図 3(c)である. 全体的には、レーザースポットサイズが小さく なるほど, バブルの振動周波数が大きくなる傾向にあった. 一方, スポットサイズを一定にして, レーザー強度を大きくしていくと、黒い矢印のところで周波数が極大を取ることがわかった.こ のような極大値を取る時のレーザースポット中心での発熱密度  $S_c$ は、図 3(d)の赤丸で示す通りス ポットサイズによらず一定で 1 mW/μm<sup>2</sup>程度だった.これらの結果から,バブル振動周波数の極 大には核沸騰から膜沸騰への遷移が起こる限界熱流束が関わっており, その遷移を μm スケール で捉えることができたのだと考えられる.バブルが振動する原因について考察するために、安定 した振動が観察される遷移後のバブルの振動数を簡単なモデルと比較した. 図 4(a)のようにバブ

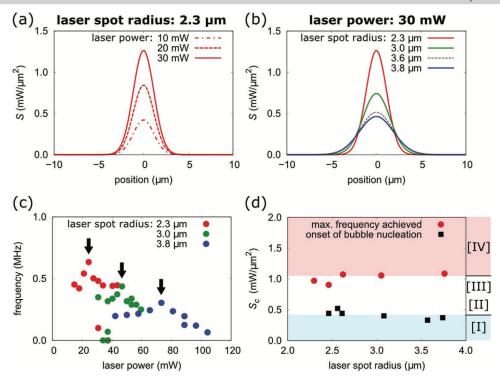


Fig. 3 (a) Absorbed laser power density profiles at a laser spot radius of 2.3 μm with varying laser power. (b) Absorbed laser power density profiles at a laser power of 30 mW with varying laser spot radii. (c) Measured bubble oscillation frequency at the different laser spot radii as a function of the laser power. Measurement was performed once at each data point. (d) Value of S<sub>c</sub> at onset of bubble nucleation (black squares) and maximum oscillation frequency (red circles) as a function of the laser spot radius. Each data point of the maximum oscillation frequency was determined from the systematic measurements of bubble oscillation frequency versus laser power. The typical data of the measurements are shown in (c). The nucleation threshold was determined by irradiating the laser for 1 s.

Measurement was performed once at each data point. (Namura, et al., 2020)

ルを半球で近似し、レーザースポットと同じサイズの熱源が下にあると仮定する. 気体の断熱効果を考えて、液相が熱源に接触しているときのみ、バブルにエネルギーが与えられると考えて、Keller-Miksis 方程式とバブル内部のエネルギー方程式を用いてバブルの半径方向の時間的な変化を数値的に計算した(Li, et al., 2017, Namura, et al., 2020). その結果、図 4(b)に示す通り、バブルが半径方向に振動するという計算結果が得られた. バブルの大きさが熱源サイズより小さい場合、バブルは加熱され、急速な成長を見せる. 一方、バブルが熱源より大きくなると流体側に熱が伝わらなくなり、バブルは収縮する. 図 4(c)-(f)は、発振中の最大バブル半径および振動周波数をレーザー出力とレーザースポット半径に対してそれぞれ示したものである. 簡単な数値解析ではあるものの、レーザー強度とスポットサイズが大きくなると、バブルが大きくなり、振動周波数が減少する傾向が定性的に再現された. この結果は、液体の水の局所熱源への周期的な接触が、バブルの振動の原因であることを示唆している. ただし、バブル半径に関しては実験と計算の間に良い一致が見られた一方で、振動周波数の計算結果は実験結果の 2~3 倍となった. この結果は、小さなバブルが振動中に壁から強い力を受けていることを示唆している. 今後、バブルの振動についてより詳しく調べることで、対流発生原理の解明や、多バブル系での振動相互作用などについて明らかにしていきたい.

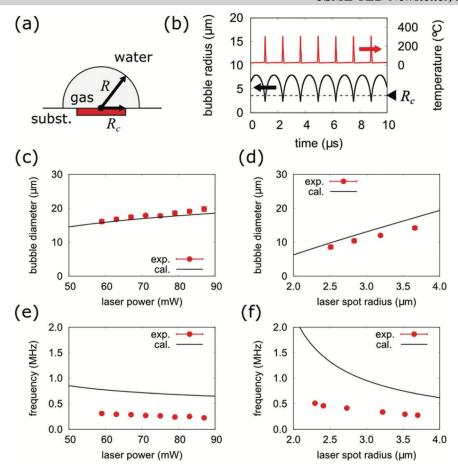


Fig. 4 (a) Schematic of the model for the numerical calculation. (b) Numerical calculation results of the time trace of the radius and temperature inside the bubble. (c,d) Calculation (black line) and experimental results (red circles) of maximum bubble diameter based on (c) the laser power and (d) the laser spot size. Error bars in (d) represent SD (n = 5). (e,f) Calculation (black line) and experimental results (red circles) of the bubble oscillation frequency based on (e) the laser power and (f) the laser spot size. Error bars in (f) represent SD (n = 5). Note that the laser spot size is fixed to 3.6  $\mu$ m in (c) and (e), whereas  $S_c$  is fixed at 1.2 mW/ $\mu$ m<sup>2</sup> in (d) and (f). (Namura, et al., 2020)

# 4. おわりに

本稿では、脱気水の局所加熱によって生成する水蒸気マイクロバブルとその周辺対流について報告した。水蒸気バブルはその振動およびマランゴニ力によって強力なポンプとして働く。今後はバブルだけに囚われず、流体界面の自在な制御とそれを使った新しい機械の創出に向けて研究を進めていきたい。

#### 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 (Nos. 15H06310, 17H04904, 17H01050, 19K21932, and 21H01784)、JST 創発的研究支援事業 (No. JPMJFR203N)、マツダ財団 (No. 15KK-280)、住友財団 (No. 161284)、クリタ水・環境科学振興財団 (No. 16E019)、及び京都大学-三菱電機組織連携「革新的機械システム・機械デバイス論」の補助を受けて実施した研究成果である.

#### 汝献

小野周,表面張力,小出昭一郎,大槻義彦 編,共立出版社,(1980),pp. 62-70.

Baffou, G., Polleux, J., Rigneault, H., Monneret, S., Super-Heating and Micro-Bubble Generation around Plasmonic Nanoparticles under cw Illumination, The Journal of Physical Chemistry C, Vol. 118 (2014), pp. 4890-4898.

Blake, J. R., Chwang, A. T., Fundamental singularities of viscous flow Part I: The image systems in the vicinity of a stationary no-slip boundary, Journal of Engineering Mathematics, Vol. 8 (1974), pp. 23-29.

- Laser, D.J., J.G. Santiago, A review of micropumps, Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 14 (2004), pp. R35-R64.
- Li, F., Gonzalez-Avila, S. R., Nguyen, D. M., Ohl, C.-D., Oscillate boiling from microheaters, Physical Review Fluids, Vol. 2 (2017), p. 014007.
- Longuet-Higgins, M. S. Viscous streaming from an oscillating spherical bubble, Proceedings of the Royal Society of London, Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, Vol. 454 (1998), pp. 725-742.
- Namura, K., Nakajima, K., Kimura, K., Suzuki, M., Photothermally controlled Marangoni flow around a micro bubble, Applied Physics Letters, Vol. 106 (2015), p. 043101.
- Namura, K., Nakajima, K., Kimura, K., Suzuki, M., Sheathless particle focusing in a microfluidic chamber by using the thermoplasmonic Marangoni effect, Applied Physics Letters, Vol. 108 (2016), p. 071603.
- Namura, K., Nakajima, K., Suzuki, M., Quasi-stokeslet induced by thermoplasmonic Marangoni effect around a water vapor microbubble, Scientific Reports, Vol. 7 (2017), p. 45776.
- Namura, K., Nakajima, K., Suzuki, M., Investigation of transition from thermal- to solutal-Marangoni flow in dilute alcohol/water mixtures using nano-plasmonic heaters, Nanotechnology, Vol. 29 (2018), p. 065201.
- Namura, K., Imafuku, S., Kumar, S., Nakajima, K., Sakakura, M., Suzuki, M., Direction control of quasi-stokeslet induced by thermoplasmonic heating of a water vapor microbubble, Scientific Reports, Vol. 9 (2019), p. 4770.
- Namura, K., Okai, S., Kumar, S., Nakajima, K., Suzuki, M., Self-Oscillation of Locally Heated Water Vapor Microbubbles in Degassed Water, Advanced Materials Interfaces, (2020), p. 2000483.
- Namura, K., Hanai, S., Kondo, S., Kumar, S., Suzuki, M., Gold Micropetals Self-Assembled by Shadow-Sphere Lithography for Optofluidic Control, Advanced Materials Interfaces, (2022), p. 2200200.
- Whitesides, G.M., The origins and the future of microfluidics, Nature, Vol. 442 (2006), pp. 368-373.

# **TED Plaza**

# 生物を構成する個々の細胞の熱応答 およびそのシグナルの多細胞間ダイナミクス



平塚 徹

地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪国際がんセンター研究所 腫瘍増殖制御学部 研究員

toru.hiratsuka@oici.jp

#### 1. はじめに

生体における適切な熱の制御は、言うまでもなく重要である。血液の循環のようなマクロな機能から、個々の細胞内で起こるミクロの酵素反応に至るまで、熱のエネルギーは必要不可欠であり、恒温動物はそれを最適に保つ仕組みを持っていると言える。同時に、過剰な熱は生体の機能を損ない、個々の細胞にとってストレスになるものでもある。熱ストレスにさらされた細胞では、細胞増殖と細胞死の両方が誘導されうる(Beere, 2001)。その一見矛盾した細胞の機能は、細胞の品質管理機構であると理解できる。つまり、克服可能なレベルのストレスに対しては、細胞増殖や修復によって回復を図るが、過度のストレスに対しては、細胞が破壊され周囲の細胞に悪影響を及ぼす前に、自ら細胞死を誘導するのである。

細胞が熱に反応して細胞機能を調整する分子機構の歴史は古く、1960年代にモデル生物であるショウジョウバエで行われた研究に端を発する。そこで、ショウジョウバエの幼虫を高温下にさらすと、高発現するタンパク質が存在することが報告された(Tissieres, et al., 1974). 1980年代には、それらのタンパク質が、タンパク質の正常な立体構造の維持に寄与することや、タンパク質の細胞内輸送に重要であることが明らかとなった(Kregel, 2002). この一群のタンパク質は、熱ショックタンパク質(heat shock protein)と呼ばれ、ヒトを含む様々な生物で、正常の生育温度から 5-10 度高い環境において発現し、細胞の機能修復や細胞死を誘導する。それはストレスから1-2 日ほどで多く合成されるが、3-4 日もすると次第に無くなることが一般的であり、熱ストレスに対する可逆的な変化であると言える。熱ショックタンパク質は正常組織の維持に不可欠であり、それによる品質管理機構の破綻はがん、炎症性疾患、虚血性疾患を含む様々な病態との関連が知られている(Benjamin and McMillan, 1998).

このように、熱ショックタンパク質は古典的によく知られた細胞のシステムであるが、いかにして細胞が熱ストレスを感知し、熱ショックタンパク質が合成されるかという分子メカニズムは未だに不明な部分が多い。事実、熱ショックタンパク質の発現は熱ストレスだけでなく、炎症、活性酸素、紫外線、栄養状態、低酸素状態などの様々なストレスにより誘導されることが知られており、熱ショックタンパク質の誘導メカニズムは多種多様であることが窺い知れる(Kregel、2002; Wu, 2017; Tsan and Gao, 2004).

一方、細胞が熱ストレスを感知する分子メカニズムとして広く知られているのが、細胞内シグナルの活性化である。ヒトを含む全ての多細胞生物は、それを構成する個々の細胞の機能の集合体として存在している。それぞれの細胞は自らの外部の環境(栄養状態、増殖刺激、物理的刺激など)に反応し、その細胞としての機能(細胞増殖、細胞死、遊走、分化など)をダイナミックに制御している。外部の環境因子は細胞表面上の様々な受容体を介して認識される。受容体の活性化は細胞内の機能的タンパク質の化学的修飾を起こし、それが最終的に細胞核へと伝えられ、

細胞は細胞増殖などの機能に必要な一連のタンパク質の発現を誘導する(図 1). この受容体から始まる一連のタンパク質の変化は「細胞内シグナル」と呼ばれ、細胞外の刺激は細胞内シグナルへと変換されることで検知され、細胞機能の制御を起こす.

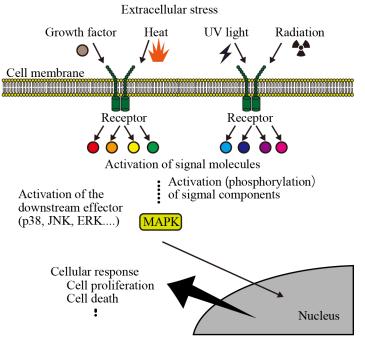


Fig. 1 Cellular signaling cascades induced by various types of cellular stress.

熱によって活性化される細胞内シグナルとしてよく知られているのがマップキナーゼ(MAPK)と呼ばれる一群のシグナル伝達分子である。マップキナーゼは細胞の増殖,分化,死,ストレス応答など多くの細胞機能の制御に関わり,酵母から高等植物や哺乳動物に至るまで高度に保存された細胞内シグナル伝達経路である。マップキナーゼのメンバーは主に,p38,ERK(extracelluar-signal regulated kinase),JNK(c-Jun N-terminal kinase)である。 それぞれの MAPK の活性化は,その分子にリン酸基が付与される(リン酸化)によって生じる。細胞には,このリン酸基を外す(脱リン酸化)システムも存在しており,リン酸化と脱リン酸化がダイナミックに起こることによって MAPK の活性は細胞外環境に即座に対応することが可能である。

それぞれの MAPK を活性化する刺激について簡略に紹介すると、p38 は熱ショックのほか、紫外線、放射線、高浸透圧刺激、炎症などによって活性化を受ける(Obata, et al., 2000). また、ERK は細胞の増殖を促進する細胞増殖因子によって特に活性化され(Sun, et al., 2015)、JNK は紫外線や炎症によって活性化される(Weston and Davis, 2007). これらの MAPK は、刺激の種類によって厳密に使い分けがされているわけではなく、細胞の種類や細胞のおかれている環境によってどの MAPK が活性化されるかは異なる他、複数の MAPK が活性化される場合もあり、非常に複雑な制御を受けている。また、先述の熱ショックタンパク質の発現と MAPK の活性化の関連も報告されている(Volloch, et al., 2000; Woessmann, et al., 1999; Song, et al., 2001).

筆者はこれまでに、ERK の活性を単一細胞レベルで可視化する技術を用いて、皮膚細胞に起きる ERK 活性化のダイナミクスと細胞機能との関連を調べてきた. 本稿では、まず ERK の活性化を可視化する技術を紹介したのち、その技術によって明らかになった ERK の時空間的な活性化パターンを紹介したい.

#### 2. ERK 活性をシングルセルで検出するための研究手法

細胞内シグナルの検出は、シグナル分子のリン酸化等の活性化の指標となる分子修飾を特異抗体で検出する生化学的手法が一般的である。つまり、ERKの活性化のためには、ERKがリン酸化した時にのみ結合する抗体を用い、それに発光物質などを結合させることによって、ERKの活性

化を光の強さとして検出するのである.しかし,これらの手法では個々の細胞のシグナル活性の時間変化までを追うことはできない. 抗体を用いる方法では,細胞を固定,回収する必要があり,その前後の活性変化を捉えることができないのである. 筆者が用いるライブイメージング技術は,抗体を用いず,代わりに蛍光タンパク質プローブを用いることによって ERK の活性を検出する.この方法は,個々の細胞の不均一なシグナル応答性をも明らかにし,さらに個々の細胞内シグナルの時間変化を追うことを可能にする.

細胞を生きたまま観察するためには、大まかに分けて、顕微鏡と蛍光プローブが必要となる。 まず、顕微鏡に関して、比較的安価で、広く用いられる落射型蛍光顕微鏡は、一般的な2次元培 養細胞の観察に用いられる. 一方, Z 軸方向の分解能が必要となる 3 次元培養や後述の生体ライ ブイメージングにおいては共焦点顕微鏡や多光子顕微鏡などの顕微鏡が必要となる.一方,蛍光 プローブに関しては、GFP(green fluorescent protein)に代表される蛍光タンパク質を用いる. こ れによって、蛍光が ERK の活性に応じて変化するようなシステムができれば、ERK 活性をモニ ターする蛍光プローブとなる. ERK の活性はそれがリン酸化されているかで決定されるため、単 なる発現量や分子の局在をモニターするのではなく、リン酸化状態を検出するための蛍光プロー ブが必要である. FRET (Förster resonance energy transfer) を利用した蛍光プローブはリン酸化状 態を検出する手法の1つである. FRET とは, 2種類の蛍光タンパク間におけるエネルギーの移動 であり、励起した蛍光タンパクに隣接する、別の蛍光タンパクから蛍光が発せられる現象である (図 2) . ERK の活性をモニターする FRET プローブは 2008 年に Harvey らによって報告された EKAR (Extracellular regulated-signal kinase activity reporter) 以来 (Harvey, et al., 2008), 改良が近 年に至るまで続けられ, 高感度かつ特異性の高いプローブが開発されている (Komatsu, et al., 2011; Komatsu, et al., 2018; Lin, et al., 2022) . その基本構造は、青色蛍光タンパク質である CFP (Cyan fluorescent protein) と黄色蛍光タンパク質である YFP (Yellow fluorescent protein), およびそれ らをつなぐ領域から構成される. さらに両者の間には、活性化型 ERK によってリン酸化される基 質ドメインと、それがリン酸化された場合に結合する認識ドメイン (WW domain) が存在する (図 2). ERK の活性が低い場合には、そのバイオセンサーは 3 次元的に開いた構造をとり、440nm の光による CFP の励起によって CFP からの蛍光がシグナルとして観察される. 一方, ERK の活 性が高い場合には、基質ドメインがリン酸化を受け、WW domain と結合することによってバイオ センサーの3次元構造が変化する.具体的には、CFPとYFPの間の距離が非常に近くなり、この 状態で CFP を励起する光エネルギーは隣接する YFP へと移動 (FRET) し、YFP からの蛍光がシ グナルとして観察される. つまり, YFP への FRET シグナル強度を CFP からのシグナル強度で割 った比 (FRET/CFP) によって ERK 活性をモニターすることができる (図 2). 以後,この ERK の FRET バイオセンサーを用いて明らかになった ERK 活性の時空間的なダイナミクスを紹介さ せていただきたい.

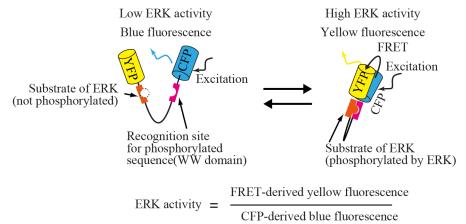


Fig. 2 The principle of FRET (Fluorescence resonance energy transfer) probe for ERK activity.

#### 3. 皮膚における ERK 活性のシグナルダイナミクス

#### 3・1 ERK のパルス様活性化と伝搬

ERK の FRET プローブが高感度になった利点は、例えば、がんなどの病態で ERK 活性の異常を高感度に捉えられるようになったことだけにとどまらない。従来の ERK の蛍光プローブは主に培養細胞での実験系に使用されてきたが、その高感度化によって、ノイズシグナルの多いマウス生体での観察においても ERK 活性をシングルセルレベルで検出できるようになっている (Kamioka, et al., 2012) . 筆者は、ERK の FRET プローブの 1 つである EKAR-EVnls (Komatsu, et al., 2011) を発現するトランスジェニックマウスを用い、皮膚細胞における ERK 活性を生体にて観察した(Hiratsuka, et al., 2015). その結果、ERK の活性は正常皮膚でも一定ではなく、ときおり局所的な発火と伝搬を示すことを明らかにしている。この現象を筆者は Spatial propagation of radial ERK activity distribution(SPREAD)として報告している(図 3)(Hiratsuka, et al., 2015). SPREAD は皮膚でいつも起きているわけではなく、起きている時と起きていないときがあり、その発生は周囲の細胞の皮膚細胞の増殖と時空間的な関連が認められた。また、その伝搬メカニズムには細胞表面の EGFR を活性化させる EGFR リガンドの切断による活性化が必要であることが報告されており、その切断を起こすタンパク質である ADAM (A disintegrin and metalloproteinases)が ERK 活性の伝搬を仲介する(図 4)(Hiratsuka, et al., 2015).

また、筆者は創傷治癒過程における ERK 活性も同様に観察している. その結果、創傷治癒における集団的な細胞遊走の際に ERK 活性が傷口より連続的に伝搬することを明らかにしている(図5) (Hiratsuka, et al., 2015). さらに、その後の培養細胞を用いた検討により、この ERK 活性の伝搬は細胞遊走の方向決定に重要であることが明らかとなっている(Aoki, et al., 2017).

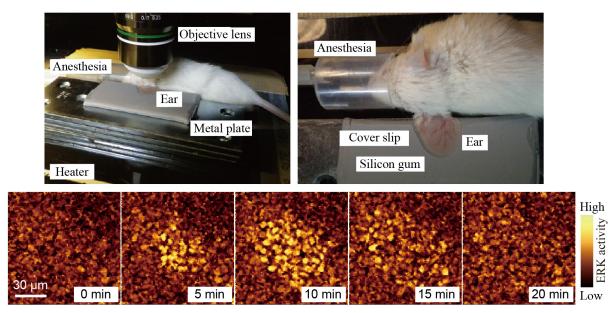


Fig. 3 Observation of SPREAD (Spatial Radial ERK Activity Distribution) in living mouse.

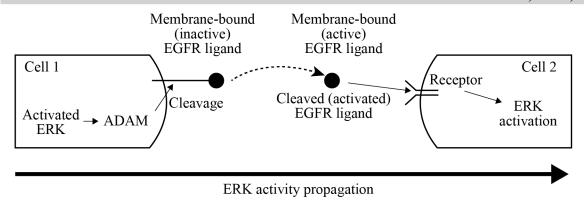


Fig. 4 ERK activity propagation mediated by the cleavage of EGFR ligand.

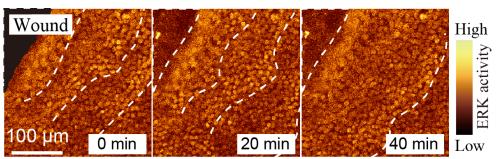


Fig. 5 ERK activity propagation during wound healing in living mouse.

#### 3・2 表皮幹細胞状態を規定する ERK 活性の時間活性パターン

この様な現象はシングルセルのレベルで見れば、ERK のパルス様の一過性活性化としてとらえられる.この様な ERK のパルス様活性は複数の細胞種において確認されている(Albeck, et al., 2013; Aoki, et al., 2013; Muta, et al., 2018). 筆者は、ヒト表皮幹細胞で ERK 活性をライブイメージングすることで、皮膚、表皮組織の大元となる幹細胞が増殖、分化する際の ERK 活性のダイナミクスに取り組んだ (Hiratsuka, et al, 2020).皮膚幹細胞は、増殖活性の低い休止期の状態から、盛んな増殖をする増殖期を経て、細胞増殖を行わない分化細胞へと推移する.この様な幹細胞状態の推移における ERK 活性の時間パターンを観察したところ、ERK 活性は定常的に高い状態(休止期幹細胞)に始まり、パルス状の活性化を伴うパターンに変化し(増殖期幹細胞)、次第にパルスが消失することで定常的に低い状態(分化細胞)へと推移することが明らかとなった(図 6)(Hiratsuka, et al., 2020).

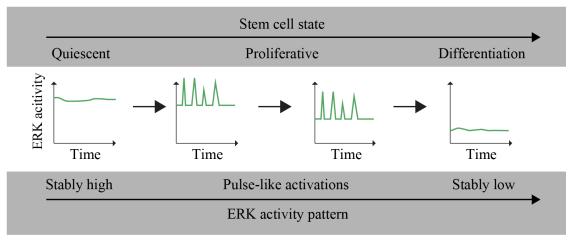


Fig. 6 Transition of ERK activity temoral patterns during epidermal stem cell state transition.

以上のように、発がんメカニズムおよび治療ターゲットとして注目される ERK の活性状態は、正常の組織維持においてでさえ、時空間的に非常にダイナミックな制御が行われており、それが細胞増殖を含む多様な細胞機能の制御に関与している.

#### 4. がんにおける細胞内シグナル

がんと ERK の関連において、ERK は多くのがんにおいて異常活性化が報告されており、その 細胞増殖への機能が第一に注目されるところである. 実際、ERK は発がん遺伝子 RAS の転写産 物である RAS タンパク質の下流に位置しており、がん細胞の増殖に重要な役割を担うことが疑いの余地がない. ERK シグナル経路をターゲットとした分子標的薬も多く開発されており、一定の 臨床的効果をあげていると言える.

しかし、ERK 分子の機能は決して細胞増殖の ON、OFF を切り替えるスイッチのようなものではない。ERK は細胞の増殖に限らず、分化、遊走、代謝、細胞死など多くの細胞機能を調節する多機能な分子であり、生理的な組織の維持や発生において綿密に制御される分子である。この多機能性こそが ERK に関する研究の難しさであり、細胞機能制御のために ERK が注目されるゆえんである。ERK がいかにして多くの細胞機能を使い分けるかというメカニズムに関しては、ERK の時間的・空間的な活性パターンの違いがかつてより注目されているところであるが、未だにそれがどのようなものであるかは不明な点が多い。

#### 5. おわりに

熱を含む様々な細胞へのストレスは、熱ショックタンパク質の誘導や、細胞内シグナルの活性化を介した細胞機能の制御(細胞増殖、細胞死など)につながる。MAPK シグナルは様々な細胞機能を制御する分子であるが、その制御は単なる ON, OFF ではない、時間空間的に非常にダイナミックなものである。例えば、ある免疫細胞において、熱による刺激は p38 を活性化しないが、JNK を即座に活性化させ、さらに一方で、ERK は JNK に遅れて持続的な活性化を起こすことが報告されている(p38 Rg and p38 Bogovevitch, p38 2000)。

このような複雑な細胞内シグナルの細胞制御メカニズムを明らかにするために、ライブイメージングを用いたアプローチは必要不可欠なものとなっている。それは特に、がんの不均一性の解明および耐性獲得のような困難な病態へのアプローチにおいて顕著である。さらに、FRETを用いた分子活性をモニターするプローブをはじめ、分子活性を光で制御する光遺伝学的アプローチや、CRISPR-Cas9システムと呼ばれる遺伝子編集技術によって、更なる技術的発展も見込まれる研究領域である。

今後,生物学や医学が,物理学,工学,数学などの分野と連携する重要性はますます増加する ものと考えられ,本稿が,少しでもその橋渡しのきっかけになれば幸いである.

#### 謝の辞

本稿の執筆および研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました大阪国際がんセンター研究所 谷口直之所長、東山繁樹部門長、京都大学大学院医学研究科の松田道行教授および英国 King's College London Centre for Gene Therapy & Regenerative Medicine の Fiona Watt 教授に厚くお礼申し上げます.

#### 文献

- Albeck, J. G., Mills, G. B., Brugge, J. S., Frequency-modulated pulses of ERK activity transmit quantitative proliferation signals, Molecular Cell, Vol.49(2) (2013), pp.249-261.
- Aoki, K., Kumagai, Y., Sakurai, A., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C., Matsuda, M., Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation, Molecular Cell, Vol.52(4) (2013)., pp.529-540.
- Aoki, K., Kondo, Y., Naoki, H., Hiratsuka, T., Itoh, R. E., Matsuda, M., Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration, Developmental Cell, Vol.43(3) (2017), pp.305-317.
- Beere, H. M., Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. Science's STKE, 2001(93) (2001), re1.
- Benjamin, I. J., McMillan, D. R., Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease, Circulation Research, Vol.83(2) (1998), pp.117-132.

- Harvey, C. D., Ehrhardt, A. G., Cellurale, C., Zhong, H., Yasuda, R., Davis, R. J., Svoboda, K., A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.105(49) (2008), pp.19264-19269.
- Hiratsuka, T., Fujita, Y., Naoki, H., Aoki, K., Kamioka, Y., Matsuda, M., Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin, Elife, Vol. 4 (2015), e05178.
- Hiratsuka, T., Bordeu, I., Pruessner, G., Watt, F. M., Regulation of ERK basal and pulsatile activity control proliferation and exit from the stem cell compartment in mammalian epidermis, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 117(30) (2020), pp.17796-17807.
- Kamioka, Y., Sumiyama, K., Mizuno, R., Sakai, Y., Hirata, E., Kiyokawa, E., Matsuda, M., Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors, Cell Structure and Function, Vol.37(1) (2012), pp.65-73.
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., Matsuda, M., Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases, Molecular Biology of the Cell, Vol.22(23) (2011), pp.4647-4656.
- Komatsu, N., Terai, K., Imanishi, A., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Jin, T., Okada, Y., Nagai, T., Matsuda, M., A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging, Scientific Report, Vol.8(1) (2018), p.8984.
- Kregel, K. C., Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, Journal of Applied Physiology, Vol.92(5) (2002), pp.2177-2186.
- Lin, S., Hirayama, D., Maryu, G., Matsuda, K., Hino, N., Deguchi, E., Aoki, K., Iwamoto, R., Terai, K., Matsuda, M., Redundant roles of EGFR ligands in the ERK activation waves during collective cell migration, Life Science Alliance, Vol.5(1) (2022), e202101206.
- Muta, Y., Fujita, Y., Sumiyama, K., Sakurai, A., Taketo, M. M., Chiba, T., Seno, H., Aoki, K., Matsuda, M., Imajo, M., Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine, Nature Communications, Vol.9(1) (2018), 2174.
- Ng, D. C., Bogoyevitch, M. A., The mechanism of heat shock activation of ERK mitogen-activated protein kinases in the interleukin 3-dependent ProB cell line BaF3, Journal of Biological Chemistry, Vol.275(52) (2000), pp.40856-40866.
- Obata, T., Brown, G. E., Yaffe, M. B., MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway, Critical Care Medicine, Vol.28(4 Suppl) (2000), pp.N67-N77.
- Song, J., Takeda, M., Morimoto, R. I., Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth, Nature Cell Biology, Vol.3(3) (2001), pp.276-282.
- Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., Zhou, H. F., Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis, Journal of Receptors and Signal Transduction Research, Vol.35(6) (2015), pp.600-604.
- Tissieres, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. M., Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs, J. Mol. Biol., Vol.84(3) (1974), pp.389-398.
- Tsan, M. F., & Gao, B., Cytokine function of heat shock proteins, American Journal of Physioloy Cell-Physiology, Vol.286(4) (2004), pp. C739- C744.
- Volloch, V., Gabai, V. L., Rits, S., Force, T., Sherman, M. Y., HSP72 can protect cells from heat-induced apoptosis by accelerating the inactivation of stress kinase JNK, Cell Stress and Chaperones, Vol.5(2) (2000)., pp.139-147.
- Weston, C. R., Davis, R. J., The JNK signal transduction pathway, Current Opinion in Cell Biology, Vol.19(2) (2007), pp.142-149.
- Woessmann, W., Meng, Y. H., Mivechi, N. F., An essential role for mitogen-activated protein kinases, ERKs, in preventing heat-induced cell death, Journal of Cellular Biochemistry, Vol.74(4) (1999), pp. 648-662.
- Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., Cao, S., Heat Shock Proteins and Cancer. Trends in Pharmacological Sciences, Vol.38(3) (2017), pp.226-256.

# 第100期部門組織

# 熱工学部門運営委員会

●部門長 店橋 護

東京工業大学

●副部門長

高橋 厚史 九州大学

●幹事

畠山 友行 富山県立大学

●部門運営委員

 迫田 直也
 九州大学

 岩本 薫
 東京農工大学

 窪山 達也
 千葉大学

杉井 泰介 (株) 日立製作所 千足 昇平 東京大学

長谷川 洋介 東京大学清水 信 東北大学植村 豪 北海道大学高橋 周平 岐阜大学

中村 祐二 豊橋技術科学大学

網 健行 関西大学 平岡 賢二 ヤンマー 野村 信福 愛媛大学 サ 篇 新潟大学 森 昌司 九州大学 秋濱 一弘 日本大学 川南 剛 明治大学 笹部 崇 東京工業大学 田中 勝之 日本大学 塚原 隆裕 東京理科大学 横森 剛 慶應義塾大学 早川 晃弘 東北大学 (株) デンソー 栗本 直規 長野 方星 名古屋大学 赤松 史光 大阪大学 岸本 将史 京都大学 村川 英樹 神戸大学 春木 直人 岡山県立大学 宮崎 康次 九州工業大学

## 熱工学部門各種委員会

●総務委員会

委員長 店橋 護 東京工業大学 幹事 迫田 直也 九州大学

委員 小原 拓 東北大学

 畠山 友行
 富山県立大学

 菊川 豪太
 東北大学

 田部 豊
 北海道大学

 浅野 等
 神戸大学

稲垣 昌英 (株)豊田中央研究所

高橋 厚史 九州大学

渡邊 裕章 九州大学

鈴木 佐夜香消防研究センター佐藤 英明(株) デンソー巽 和也京都大学元祐 昌廣東京理科大学西村 浩一大阪ガス(株)

●広報委員会

委員長 菊川 豪太 東北大学

幹事 川村 洋介 名城大学 委員 境田 悟志 茨城大学

志村 敬彬東京大学藤井 宏之北海道大学

 安藤 詩音
 九州大学

 出島 一仁
 滋賀県立大学

 三浦 正義
 千葉工業大学

●年次大会委員会

委員長 角田 直人 東京都立大学

幹事 小山 幸平 東京工業高等専門学校

●熱工学コンファレンス委員会

委員長 浅野 等 神戸大学 幹事 村川 英樹 神戸大学

●学会賞委員会

委員長 伏信 一慶 東京工業大学 幹事 渡部 弘達 立命館大学 ●講習会委員会

 委員長 巽
 和也
 京都大学

 幹事
 網
 健行
 関西大学

●日韓合同会議委員会

委員長 鈴木 雄二 東京大学 幹事 李 敏赫 東京大学

●部門賞委員会

委員長 高橋 厚史 九州大学 幹事 畠山 友行 富山県立大学

●年鑑委員会

 委員長
 田部 豊
 北海道大学

 幹事
 植村 豪
 北海道大学

●出版委員会

委員長 熊野 寛之 青山学院大学 幹事 寺岡 喜和 金沢大学

●環太平洋熱工学会議委員会

 委員長 店橋
 護
 東京工業大学

 幹事
 津島
 将司
 大阪大学

●JTST 委員会

委員長 高橋 周平 岐阜大学 幹事 桑名 一徳 東京理科大学

●分野連携委員会

委員長 小原 拓 東北大学

# 行事案内

## 部門企画行事案内

-2022 年度-

●熱工学コンファレンス 2022

開催日:2022 年 10 月 8 日 (土) ~9 日 (日) 場 所:東京大学本郷キャンパス,東京都文京区

● 『伝熱工学資料(改訂第5版)』の内容を教材にした熱設計の基礎と応用(No.22-68)

開催日: 2022 年 9 月 8 日 (木) ~9 日 (金) 場 所: オンライン開催 (WebEX meeting)

### 部門関連行事案内

-2023 年度-

●第 16 回動力エネルギー国際会議(ICOPE-2023)

開催日: 2023 年 5 月 21 日 (日) ~26 日 (金) 場 所: 国立京都国際会館,京都府京都市

主 催:日本機械学会 動力エネルギーシステム部門

#### -2022 年度-

●第24回スターリングサイクルシンポジウム

開催日: 2022年12月3日(土)

場 所:神奈川大学 みなとみらいキャンパス, 神奈川県横浜市

主 催:日本機械学会 エンジンシステム部門

●第33回内燃機関シンポジウム

開催日:2022 年 11 月 21 日(月)~24 日(木)場 所: KFC Hall & Rooms,東京都墨田区主 催:日本機械学会 エンジンシステム部門

●第 35 回計算力学講演会(CMD2022)

開催日: 2022年11月16日(水)~18日(金)

場 所:オンライン開催

主 催:日本機械学会 計算力学部門

●講習会「実験流体力学 流体計測の基礎」(No.22-84)

開催日:2022 年8月29日(月) 場 所:オンライン開催(Zoom) 主 催:日本機械学会 流体工学部門

## 国際会議案内

-2022年-

●蓄熱の科学と工学に関する国際シンポジウム 2022 (TESSE2022)

開催日:2022年9月5日(月)

場 所:北海道大学工学部オープンホールおよびオンラインのハイブリッド開催

# その他

#### 編集後記

本号の TED Plaza では、微小スケールの熱工学に関連して 2 件のご寄稿をいただきました。京都大学の名村今日子先生・鈴木基史先生からは、熱的に制御したマイクロバブルを用いて周囲流体を駆動させる技術についての話題をご提供いただきました。大阪国際がんセンター研究所の平塚徹先生からは、ライブイメージング技術より明らかになった細胞の熱応答と細胞機能についてご紹介いただきました。いずれの内容からも、マイクロスケールにおける熱の計測や制御、応答の領域横断的な重要性をあらためて強く感じた次第です。

この度はご多忙にもかかわらず執筆をご快諾いただきました先生方に心より御礼申し上げます.

(編集担当委員:出島・藤井)

#### 第 100 期広報委員会

委員長: 菊川 豪太 東北大学 幹事: 川村洋介 名城大学 委員: 境田 悟志 茨城大学 安藤 詩音 九州大学 志村 敬彬 東京大学 出島 一仁 滋賀県立大学 藤井 宏之 北海道大学 三浦 正義 千葉工業大学

©著作権: 2022 一般社団法人 日本機械学会 熱工学部門