

研究報告書

「1 細胞パルペーションデバイスの創製」

研究タイプ：通常型

研究期間：2016年10月～2020年3月

研究者：加地 範匡

1. 研究のねらい

細胞の硬さ・柔らかさといった機械的性質が、正常細胞とがん細胞では異なるなど、細胞を構成する分子的要素を統合した細胞全体としての表現型が細胞の「健康状態」をはじめ、幹細胞の分化能や分化状態、がん細胞の浸潤能・転移能といったある時間における細胞の診断指標となることが期待されている。本さきがけ領域が目指す「1細胞の表現型・機能・個性を本質的に理解するためには、生体物質・分子情報、およびそれら物質間の相互作用に関する情報を、定量的・網羅的に極限の精度と分解能で解析するアプローチと同時に、これらの分子的要素を統合した結果として表れる「細胞の表現型」を解析するアプローチも必須である。

そこで本研究では、「細胞の表現型」のひとつである細胞の変形能(cell deformability)に着目し、研究実施者がこれまでに開発してきたマイクロ・ナノ粒子の電流・光学同時計測システム(PCT/JP2016/061225、特願 2015-243615、PCT/JP2015/079532、特願 2014-214090)をもとに、これまでバイオマーカーに基づいた染色や標識を用いて行われてきた生化学的な細胞診断とは一線を画し、AFM や光ピンセット等によるロースループトの方法とも異なる「細胞のパルペーション(触診)」技術を確立し、最終的には「細胞の表現型」に基づいて細胞を分取して生化学分析へ提供できるマイクロデバイスを構築することをねらいとする。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞の性質は、これまで蛍光物質を化学的に標識したり、蛍光タンパク質を生化学的に発現したりすることで、研究されてきた。しかしながら、これらの手法は細胞に細工を施した状態で観察しているため、「真の」細胞の姿を見ているとは言えない。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスを活用することで、細胞をひとつずつ触って調べる方法を開発した。細胞の大きさは、直径が 10~20 μm 程度なので、細胞の大きさより少し大きな 1 段目のマイクロ流路と少し小さな 2 段目のマイクロ流路を連続的に配置することで、細胞の大きさを測定した後に細胞の変形しやすさを調べることができるデバイスを基本とし、細胞を生きたままひとつひとつ触診できるデバイスを構築した。この結果、がん細胞の悪性度や幹細胞の分化状態などを簡便に調べることを可能とした。

(2) 詳細

- 本研究は、主に下記の三つの項目に分けて実施し、それぞれ研究目的を定めて推進した。
1. デバイス構造最適化と取得シグナルの正確な解釈：細胞の変形能を計測する際の流路形状・サイズ、そして材質の最適化過程で、得られるシグナル（電流・光学）の蓄積と理論的裏付けを行う。
 2. 細胞膜表面・細胞内部構造に起因する細胞変形能の解析：狭窄流路での物理的相互作用と化学的相互作用を判別することにより、細胞の変形能について分子論的理説を進める。
 3. 細胞ソーティング機構の構築：特定の機械的性質を有する細胞を計測後に再回収し、生化学的アッセイを行える機構を構築する。

以下、それぞれのテーマの達成状況を説明する。

1. デバイス構造最適化と取得シグナルの正確な解釈

電流・光学同時計測部のマイクロ流路形状を、単純なストレート型のものから、細胞が通過する際に変形しなければ通過できない程度の幅を有する狭窄流路を設けたものを用意した。細胞がこの狭窄流路を通過する際に計測される電流値変化（イオン電流の遮断により生じる電流値の減少）とその継続時間から、細胞の変形能を評価できる計測システムを構築し、流路形状・サイズ、電流計測系、光学観察系の最適化を総合的に検討し、細胞を触診するためのマイクロデバイスとしての基本性能を確立した。

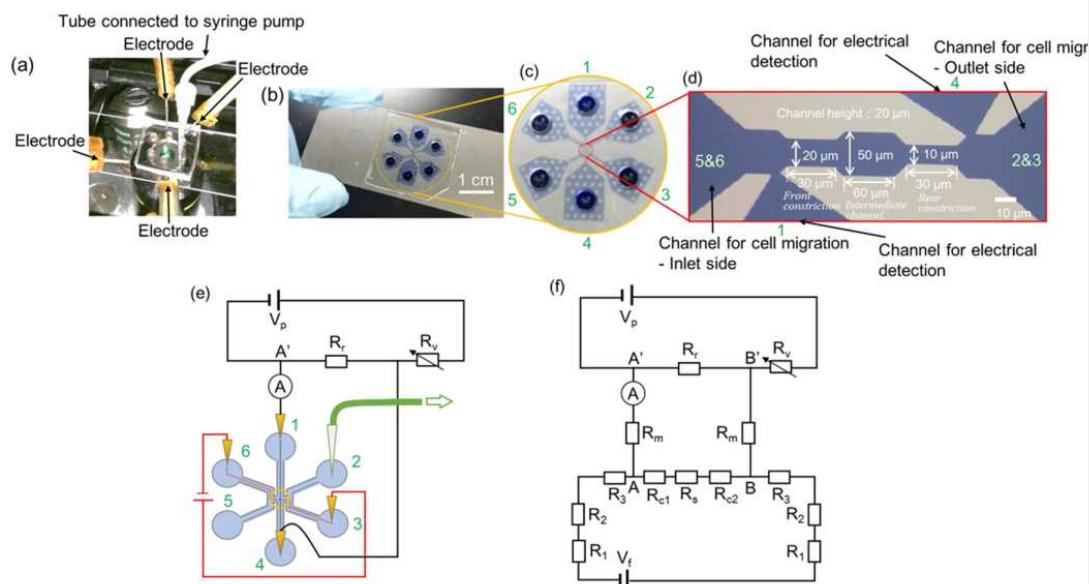


図 1. 作製した 1 細胞パルペーションデバイスとその実験系回路図。細胞の大きさを測定する幅 20 μm のマイクロ流路と、細胞を変形させてその変形能を調べる幅 10 μm のマイクロ流路を連続的に配置することにより、細胞の粘弾性などの物理的・機械的パラメータを数十ミリ秒の時間で計測することができる。

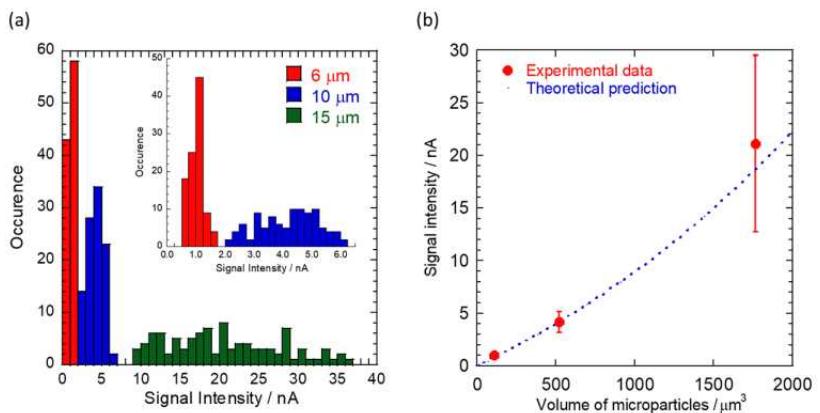


図 2. マイクロビーズを用いた電流計測システムの精度検証結果。

2. 細胞膜表面・細胞内部構造に起因する細胞変形能の解析

構築したマイクロデバイスを用い、狭窄流路内にPEGやPEG脂質、PLL、細胞接着性ペプチド(RGD)、抗体などを固定化することで、細胞が狭窄流路内を変形して通過する際の滞在時間を探討することとした。これは、細胞が通過する際に発生する細胞膜表面と狭窄流路表面との物理的摩擦や化学的分子間相互作用により影響をうけることから、細胞の変形能というマクロな視点の機械的性質とは異なる、細胞膜表面の膜タンパク質やリン脂質二重膜の状態など、よりミクロな視点での性質が反映されたデータが取得できると期待できたからである。しかしながら、PDMS表面のケミストリーを一から構築する必要があったため、東京大学山口先生と共同でPDMS表面の化学修飾法を開発することとし、現在も検討を進めている。

このような細胞膜表面や細胞膜そのものに着目した検討と同時に、細胞骨格もしくは核膜内膜の裏打ち構造に影響を与えるような処置(Latrunculin AやPaclitaxelなどの薬物)を施した後に変形能の計測を行い、細胞内部の分子的状態が細胞の変形能にどのような影響を与えているのかについても検討し、細胞の変形能を細胞内部の分子的状態に基づいて議論できるデータを取得することに成功した。また、脂肪細胞由来幹細胞の分化能を、細胞変形能測定に基づいて判定することにも可能であることを明らかとした。

3. 細胞ソーティング機構の構築

これまでに1細胞レベルで細胞の変形能を計測する様々な手法が開発されてきたが、いずれの手法も計測後の細胞を再回収して遺伝子発現情報を取得するといった生化学的解析を行うことは極めて困難であった。本研究で用いるマイクロデバイスは、他の手法と比べて細胞の再回収機構を組み込みやすいという利点がある。そこで、狭窄流路を用いた電流計測系だけではなく、その下流に細胞のソーティング機構を組み込み、目的とする細胞を再回収できるデバイスを構築することとした。しかしながら、現在市販されているセルソーターの性能は数kHzを優に超えていること、また、同じさきがけ領域内でも完成度の高いセルソーターを開発しておられる研究者がおられることから、自前での開発は行わず、共同研究もしくは市販の製品を拝借することとした。

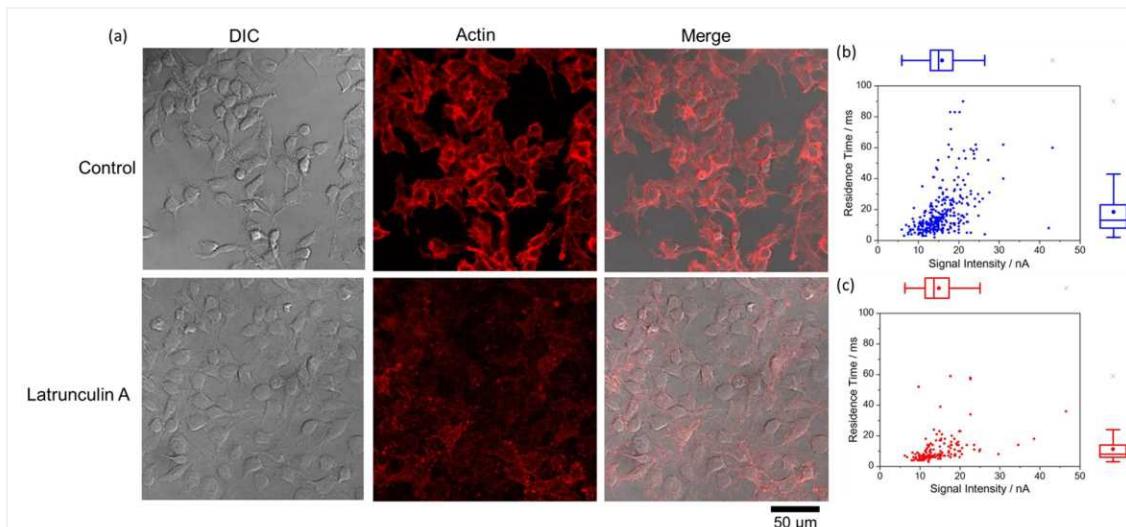


図 3. Latrunculin A を作用させた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡写真と、細胞変形能計測の結果。アクチン纖維の合成が阻害されるため、同じ大きさの細胞でも変形能に大きな差が見られるようになった。

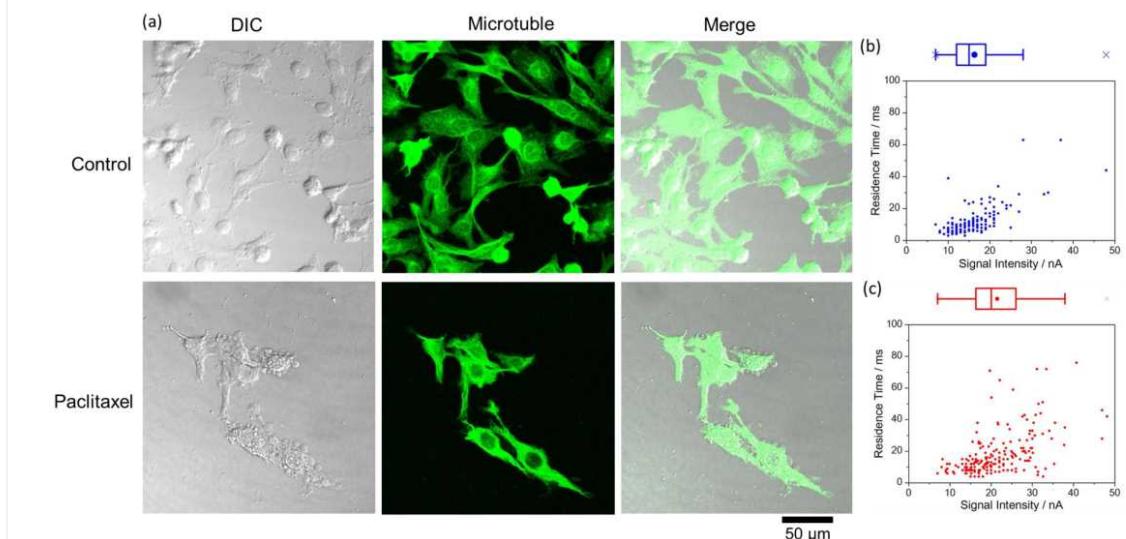


図 4. Paclitaxel を作用させた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡写真と、細胞変形能計測の結果。微小管の脱重合を阻害する Paclitaxel は、細胞全体の機械的強度には大きく影響を与えないことが分かった。

3. 今後の展開

単一細胞を非標識で診断できる技術は、細胞の真の姿に迫るために必須の技術であり、特に分析後に再回収・再利用が必要とされる貴重細胞種の研究や細胞医療での移植細胞の事前診断といった分野への適用を考えている。

4. 自己評価

本研究の最大の研究成果は、化学的・生化学的な標識を行わず、非標識で单一細胞レベルで細胞を診断する技術を構築したことである。本技術を用いると、幹細胞をはじめとした貴重な細胞を廃棄することなく、再利用または細胞医療へ診断後に応用することが可能となることから、細胞生物学・再生医療などへ大きな波及効果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Sano, M.; Kaji, N.; Rowat, A. C.; Yasaki, H.; Shao, L.; Odaka, H.; Yasui, T.; Higashiyama, T.; Baba, Y., Microfluidic Mechanotyping of a Single Cell with Two Consecutive Constrictions of Different Sizes and an Electrical Detection System. *Anal. Chem.* **2019**, *in press*
2. Hattori, Y.; Shimada, T.; Yasui, T.; Kaji, N.; Baba, Y., Micro- and Nanopillar Chips for Continuous Separation of Extracellular Vesicles. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (10), 6514–6521.
3. Yasaki, H.; Shimada, T.; Yasui, T.; Yanagida, T.; Kaji, N.; Kanai, M.; Nagashima, K.; Kawai, T.; Baba, Y., Robust Ionic Current Sensor for Bacterial Cell Size Detection. *Acs Sensors* **2018**, *3* (3), 574–579.
4. Sano, M.; Kaji, N.; Wu, Q.; Naito, T.; Yasui, T.; Taniguchi, M.; Kawai, T.; Baba, Y., Quantitative Evaluation of Dielectric Breakdown of Silicon Micro- and Nanofluidic Devices for Electrophoretic Transport of a Single DNA Molecule. *Micromachines (Basel)* **2018**, *9* (4).
5. Yasaki, H.; Yasui, T.; Yanagida, T.; Kaji, N.; Kanai, M.; Nagashima, K.; Kawai, T.; Baba, Y., Substantial Expansion of Detectable Size Range in Ionic Current Sensing through Pores by Using a Microfluidic Bridge Circuit. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (40), 14137–14142.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. N. Kaji, Micro and nano-sensing techniques for the diagnosis of bacteria and cells International Conference on Nanomaterials and Nanotechnology, London, UK, 2018/10/29
2. N. Kaji, An assessment of mesenchymal stem cell properties by ionic current detection system in microfluidic devices RSC Tokyo International Conference 2018 ~Future of Single Cell Analysis~ International Conference Session, JASIS Conference, Makuhari, Japan, 2018/7/23
3. Kaji, N.; Yasui, T.; Baba, Y., Single-cell deformability analysis by a microfluidic chip High



Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2017 Jeju),
2017/11/6

4. Kaji, N.; Sano, M.; Ito, S.; Yasaki, H.; Yasui, T.; Yukawa, H.; Baba, Y., Single-cell analysis by a microfluidic chip 17th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE 2017 Shanghai), 2017/11/11
5. Kaji, N.; Baba, Y., Single Cell and Bacterium Analysis by Microfluidic Chips Workshopo on Biomedical Engineering in collaboration of Nagoya University and North Carolina State University, 2017/11/3

