

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04914

研究課題名(和文) 単一細胞の機械的特性評価と遺伝子発現の相関解析用バイオMEMSの基盤構築

研究課題名(英文) BioMEMS for mechanical characterizaion and consecutive gene expression analysis of single tumor cell

研究代表者

久米村 百子 (Kumemura, Momoko)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：50533642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞の機械的な特徴と、細胞骨格タンパク質の量の関係を明らかにするための手法開発を目的とした。微細加工技術により作製したMEMSピンセットとマイクロチャンバを用いて細胞の機械特性計測を実施し、その細胞を遺伝子発現解析してタンパク質の発現量を求める。様々なサイズの細胞を把持できる駆動構造を設計した。また、細胞を容易に捕捉・解放するために、ピンセット先端の構造や表面修飾を最適化した。計測した細胞を遺伝子発現解析で評価できる可能性が大きくなったが、実験結果では、コンタミネーションが発生し、細胞骨格タンパク質の発現量は求められなかった。遺伝子発現解析における異物混入の除去と手順の見直しが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1つの細胞に対して、機械特性計測と、機械特性に関わる遺伝子の発現解析という2つの手法を適用し、これまでに明らかにされていなかった力学的情報と遺伝子発現量の相関を、高い信頼性と共に取得することを課題とした。研究期間内に達成することはできなかったが、今後、機械特性計測後の細胞について、熟練した技術によって遺伝子の発現状態を解析できれば、血中循環腫瘍細胞(CTC)の変形能などの機械特性情報と、がん悪性度マーカー遺伝子との相関についても情報を得ることができる。細胞の機械特性によってCTCの悪性度を評価するがん診断技術開発の可能性もあり、臨床診断においても多大な意義がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is development of a method to clarify relationship between mechanical properties of tumor cell and the gene expression level of cytoskeletons/malignancies of tumor.

MEMS tweezers measure stiffness/viscoelasticity of trapped cell and transport it to a flow of gene expression analysis. We modified the integrated actuators to have the wide range of displacement of tip, which is for trapping a cell with various sizes. For successful cell releasing after mechanical characterization, surface chemical treatments and structural modification on tips were examined. While optimization of MEMS tweezers, we confirmed silicon does not affect to the reactions for transcription and amplification of mRNA and cDNA. Mechanical characterization and subsequent gene expression analysis with single cell were performed. However we could not obtain the results because of contamination. Checking and improvement of experimental procedure should be conducted.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：MEMSピンセット 単一細胞 機械特性計測 単一細胞遺伝子発現解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞の硬さ、粘弾性、変形能などの機械特性は、近年改めて注目を集めている[1]。例えば、がんの転移を引き起こすとされている血中循環腫瘍細胞は、組織から血管へ変形しながら浸潤する。遺伝子解析技術の発展により、細胞機械特性に関連する遺伝子(アクチン、ピメンチン、 β -カテニンなど)が特定されつつあるものの、実際の細胞機械特性と遺伝子発現の状態について両者を同時に取得することはできなかった。

細胞機械特性の計測手法としては、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた方法 [2]が主流である。基板に固定した細胞にカンチレバーを押しつけ、局所的な応力を計測する。他方で、マイクロ流路を用いた新しい方法 [3]も報告されている。マイクロ流路内で発生させた水圧を利用して細胞を変形させ、画像処理により機械特性を計測する。しかしこれらの手法では、計測後の細胞をハンドリング(選択・把持・輸送)できないため、機械特性の計測結果と遺伝子発現解析の結果を対応づけられなかった。

2. 研究の目的

細胞の硬さや粘弾性、変形能などの機械特性と関連遺伝子の発現状態を対応付け可能とする手法を開発する。具体的には、マイクロマシニングにより作製したMEMSピンセットを用いて単一細胞の機械特性を計測したのち、細胞をハンドリングし、遺伝子発現解析系へと接続する。これにより、既存技術では困難であった細胞の力学特性と遺伝子情報の一対一の相関が議論可能となる。研究の応用対象に転移性がん細胞を選び、がん転移能と細胞機械特性の関連性を解明する。

3. 研究の方法

MEMSピンセットには、細胞を捕捉するプローブ、アクチュエータ、プローブの変位量を検出するセンサーが集積されている(図1)。共振周波数計測により、細胞の硬さ・粘弾性を求めることができる。実験手順を以下に示す。マイクロチャンバに充填した細胞を、MEMSピンセットを用いて捕捉する(図2)。共振周波数計測を行ったのち、細胞を細胞溶解液に浸して、mRNAを含む溶液を回収する。これより、cDNA合成と増幅反応を行い、定量PCRにより細胞の硬さに関連する遺伝子発現量を求める。

4. 研究成果

細胞の機械特性計測の項目では、個体ごとにサイズが異なる細胞を捕捉するため、MEMSピンセットのプローブの駆動範囲を広く改良した。駆動部分のスプリングや配置を変更することで、当初4マイクロメートル程度であった駆動範囲を、10マイクロメートルとした。

細胞を機械特性計測したのちに、遺伝子発現解析の手順に効率的に移行するために、1. 計測後に細胞がプローブ表面に接着することを防ぐ、プローブ表面の改善検討を行った。試薬によるプローブ表面の化学修飾と、プローブ面におうとつをつける方法を検討した。この結果、試薬Pluronicによる表面コーティングと、シリコンエッチング時に、おうとつを施したプローブ面において、効果を得られた。2. 細胞の解放が困難な場合は、MEMSピンセットで細胞を把持したまま、薄膜ヒータにより反応温度に加熱した細胞溶解液に浸すことで、試料を得ることができた(図2(4))。

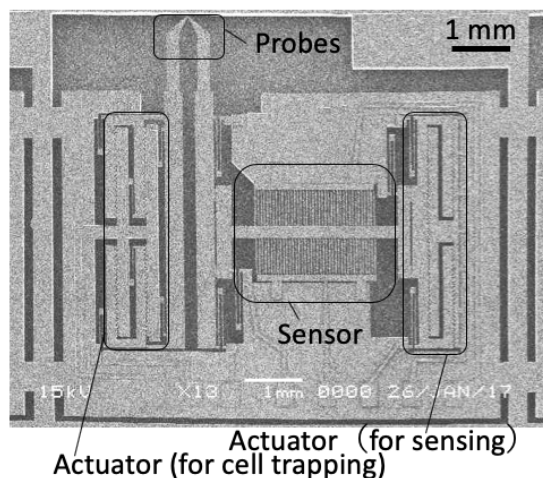


図1 シリコン製MEMSピンセット
細胞を捕捉する2本のプローブ、2つのくし歯アクチュエータ、変位センサから構成される。

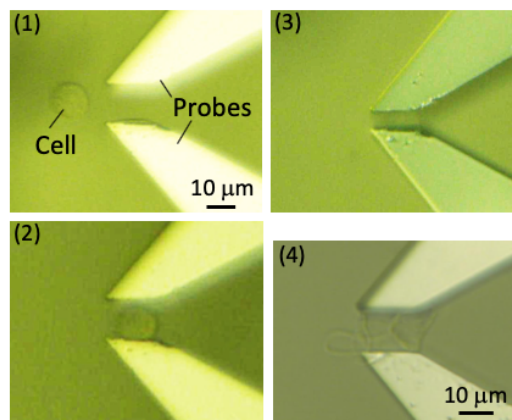


図2 MEMSピンセットによる細胞の捕捉
(1)細胞に対してプローブの位置合わせ、(2)細胞の捕捉、(3)細胞へ力印加、(4)細胞溶解液へ浸漬(この細胞は(1)-(3)で捕捉した細胞とは別の細胞である)。

遺伝子発現解析の項目では、中間系フィラメントであるビメンチンを測定対象とした。内在性コントロールとして、GAPDH の遺伝子発現量も求め、この相対比からビメンチンの定量を行う。遺伝子発現解析では、細胞溶解反応、逆転写反応、DNA 増幅反応のステップがある。連続的にこれらのステップを実施する前に、ピンセットの材質であるシリコンの反応阻害確認の実験を行った。細胞数を 1,000 とし、細胞溶解反応前、逆転写反応前、ポリメラーゼ連鎖反応前に、それぞれ MEMS ピンセットのプローブを浸した溶液について、電気泳動を行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をターゲット遺伝子とした (反応産物の塩基対数: 129 bp)。図 3 に示すように、レーン 2~4 の MEMS ピンセットプローブを接触させた試料において、100-150 bp の間にバンドを確認し、またバンドの輝度がほぼ等しいことから、MEMS ピンセットが各反応を阻害していないことを確認した。

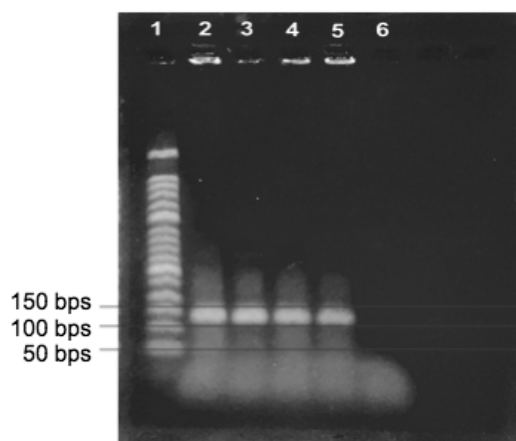


図 3. ゲル電気泳動によるターゲット遺伝子の増幅確認

定量 PCR 後の試料中の DNA をゲル電気泳動し、129 bp 付近にある GAPDH の遺伝子の存在を確認した。

レーン 1: 50 bp ラダー, レーン 2: 細胞溶解反応前, レーン 3: 逆転写反応前, レーン 4: DNA 増幅反応前, にそれぞれ MEMS ピンセットのプローブを接触させた試料。レーン 5: ポジティブコントロール, レーン 6: ネガティブコントロール

遺伝子発現解析の準備実験を経て、単一細胞での連続的な機械特性計測と遺伝子発現解析を行った。具体的には、単一細胞を MEMS ピンセットで把持し、共振周波数応答を計測したのち、MEMS ピンセットのプローブに把持した細胞を細胞溶解液に浸漬した。この溶液について逆転写反応、定量 PCR にて増幅量を解析した。定量 PCR においては、増幅サイクルごとに増える産物量を蛍光強度として経時的にモニタしていくが、細胞サンプルの Vimentin, GAPDH について、ネガティブコントロールの蛍光が検出された。この原因として、操作中のコンタミネーションが考えられる。確認のため、同じサンプルを電気泳動により分離・検出したところ、本来は生じない 50-100 bp からも蛍光が確認された。

上記の手順を数回繰り返したが、同様にネガティブコントロールから蛍光が検出され、発現量を決定することはできなかった。遺伝子発現解析では、市販のキットを利用したが、ごく微量の mRNA から適切に遺伝子を増幅するためには、ある程度の実験経験が必要であったと考える。今後も、実験プロトコルの見直しとコンタミネーションの除去について工夫し、改善を行う。

<引用文献>

- [1] J. Guck and E. R. Chilvers, "Mechanics Meets Medicine", *Science translational medicine*, Vol.5, 212fs41, 2013.
- [2] A. B. Mathur, A. M. Collinsworth, W. M. Reichert, W. E. Kraus, G. A. Truskey, "Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy", *Journal of Biomechanics*, Vol.34, pp. 1545-1553, 2001.
- [3] H. T. K. Tse, D. R. Gossett, Y. S. Moon, M. Masaeli, M. Sohsman, Y. Ying, K. Mislick, R. P. Adams, J. Rao, D. D. Carlo, Quantitative Diagnosis of Malignant Pleural Effusions by Single-Cell Mechanophenotyping, *Science translational medicine*, Vol.5, Issue 212, 212ra163, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① K. Hayashi, M. Kumemura, S. Kaneda, V. Menon, L. Jalabert, S. Tachikawa, M. C. Tarhan, T. Fujii, B. J. Kim, H. Fujita, Optimization of Surface Treatment on MEMS Probes for Single Cell Capture and Release, *Sensors and Materials*, 査読有, 2019. In print.
- ② Y. Tauran, M. Kumemura, M. C. Tarhan, G. Perret, F. Perret, L. Jalabert, D. Collard, H. Fujita & A. W. Coleman, Direct measurement of the mechanical properties of a chromatin analog and the epigenetic effects of para-sulphonato-calix[4]arene, *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 8, 5816, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42267-x>
- ③ 林謙作, 久米村百子, 金田祥平, 藤井輝夫, 金範俊, 藤田博之, シリコン製ナノピンセットにおける細胞の把持・解放のためのプローブ表面改良, *生産研究*, 査読無, 70 巻, 3 号, pp.78-80, 2018.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① T. Baetens, G. Perret, Y. Takayama, M. Kumemura, L. Jalabert, S. Meignan, C. Lagadec, H. Fujita, D. Collard, M. C. Tarhan, A practical single cell analysis method for mechanical characterization of cancer cells, IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017), Jan. 22-26 2017, Las Vegas, NV, USA.
- ② M. C. Tarhan, M. Kumemura, S. Kaneda, Y. Takayama, G. Perret, T. Fujii, D. Collard, H. Fujita, Trapping of a cell and its mechanical characterization by silicon nanotweezers, International Conference on Single Cell Research 2016, Nov. 16-15 2016, Ito International Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：金田 祥平

ローマ字氏名：KANEDA, Shohei

所属研究機関名：工学院大学

部局名：工学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10542467

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：