

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14132

研究課題名(和文)細胞内分子ダイナミクス診断のためのIn-Cell機能イメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of In-Cell Imaging Technique for Studying Molecular Dynamics in Living Cells

研究代表者

柴田 隆行 (SHIBATA, TAKAYUKI)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10235575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の生体分子のダイナミクスな振る舞いを高い時間・空間分解能で多角的に解析・可視化するためのIn-Cell機能イメージング技術の開発を目的とし、ナノニードル搭載型バイオプローブ構造の最適化に必要なSiカンチレバー内への矩形流路の作製プロセスを開発した。さらに、倒立顕微鏡組込み型顕微ラマン分光装置を構築し、細胞内環境下でのチップ増強ラマン分光(TERS)スペクトルの時系列変化から、細胞の機能発現過程をリアルタイムで高度に可視化できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：With the aim of developing an in-cell imaging technique for studying the dynamic behavior of biological molecules inside cells with high spatial and temporal resolution, we developed a fabrication process for a flat rectangular fluidic microchannel embedded into a Si cantilever beam structure for the geometric optimization of a newly designed AFM probe we call a "bioprobe" that is integrated with a sharp-tipped hollow nanoneedle instead of a conventional solid tip. Moreover, we demonstrated the possibility of utilizing tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) for enabling quantitative study on molecular dynamic processes inside single living cells with the homemade Raman system.

研究分野：MEMS, マイクロ・ナノ加工

キーワード：走査型プローブ顕微鏡 チップ増強ラマン分光法 細胞機能解析 細胞操作 バイオMEMS

### 1. 研究開始当初の背景

生命科学の新たな知を創出し、医療・医薬分野のイノベーションへと進化・発展させることが極めて重要な課題である。このためには、ゲノム、タンパク質、糖鎖などの生体分子の構造・機能解明に加えて、生命活動の基本単位である細胞の機能を解き明かすことが、ライフ・イノベーション創出の命題となる。このため、生命の機能を分子レベルで理解しようという研究が国内外で盛んに行われている。しかしながら、細胞機能解析を対象とした従来のアプローチは、多量の細胞を破碎(溶解)して抽出した生体分子(遺伝子、タンパク質など)を解析対象としているため、集団としての細胞の平均的な情報の理解に留まっている。したがって、真の意味で「生命現象を統合的に理解」するためには、細胞を単なる集団機能の構成要素として捉えるだけではなく、個々の細胞が有する高い情報能や応答性を個別に理解することが必須であり、単一細胞レベルでの解析 (Single-Cell Analysis) に注目が集まっている。このような背景の中、本研究が目指す生きた細胞内環境での生体分子ダイナミクス解析手法 (In-Cell 機能イメージング技術) の確立は、細胞内で発現・機能する生体分子の動的振る舞いと細胞機能との関係を解き明かすための希求の課題であり、最もチャレンジングな研究分野の一つである。

### 2. 研究の目的

本研究では、生命機能機序の新たな知を創出し、高度先進医療技術・革新的医薬品開発における次世代産業化のイノベーションを支援するキーテクノロジーとして、細胞内の生体分子のダイナミクスな振る舞いを高い時間・空間分解能で多角的に解析・可視化するための In-Cell 機能イメージング技術の開発を目的として実施した。

### 3. 研究の方法

本提案のキーデバイスとなるナノニードル搭載型バイオプローブ(図1参照)の最大の特徴は、原子間力顕微鏡 (AFM) で使用される通常の探針(中実の針状構造体)のかわりに、中空構造を有する SiO<sub>2</sub> 製の先鋭化ナノニードル(先端径<50nm)が Si 製カンチレバー先端に一体形成されていることである。さらに、カンチレバー内部に形成した管路と連通させることで、微小流体のハンドリ

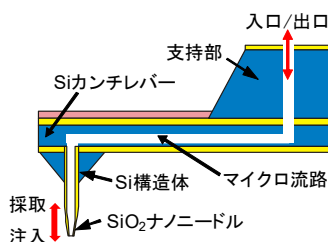


図1 ナノニードル搭載型バイオプローブの概略図

ングが可能な構造となっている。このため、従来の AFM のもつ形状観察・物性評価機能に加えて、生細胞に穿刺したナノニードルを介して、申請者が提案した低侵襲細胞内デリバリー技術(電場駆動力を利用した生体分子の高精度吐出制御技術)によって、生体分子(DNA, mRNA, タンパク質など)の高精度な注入(生化学的刺激付与)や、原理的には、細胞内で発現した極微量の物質(tRNA, タンパク質など)の採取(生化学的応答計測)が可能となり、他に類を見ない革新的な新機能を提供することができる。本研究では、バイオプローブ構造の最適化を行い、さらに、チップ増強ラマン分光法(TERS)による生体分子の非標識・高感度検出を細胞内環境下で実現し、細胞の機能発現過程をリアルタイムで高度に可視化する細胞診断技術(In-Cell 機能イメージング技術)としての可能性を実証した。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオプローブ構造の最適化

図2に作製したバイオプローブの一例を示す。Si カンチレバー(長さ 680μm、幅 40μm、厚さ 20μm)の先端部に SiO<sub>2</sub> ナノニードル(根元外径 4μm、全長 67μm、突出部長さ 29μm、先端径<50nm)が形成されている。また、ニードルに十分な機械強度をもたせるために、根元部分に Si 構造体(幅 105μm、高さ 38μm)を位置選択的に形成している。さらに、Si カンチレバー内部には、深さ 10μm の位置に直径 9μm のマイクロ流路が形成されており、厚さ 0.9μm の SiO<sub>2</sub> 膜で密閉している。最終的には、集束イオンビーム(FIB)加工を用いて、ニードル先端部を斜めにカットすることで、曲率半径を 50nm 以下に保ちつつ、直径 500nm 程度の開口部を形成する。

図3は作製したバイオプローブを用いて、ガラス基板に接着させた HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌由来細胞株)を液中(リン酸緩衝生理食塩水, PBS)で AFM 観察(振幅像)した結果である。走査速度 5.0μm/s (0.07Hz)でタッピングモード(共振周波数 60kHz)によって取得した、細胞表面の微細な凹凸形状も観察されており、液中での細胞形状イメージングが可能であることがわかる。

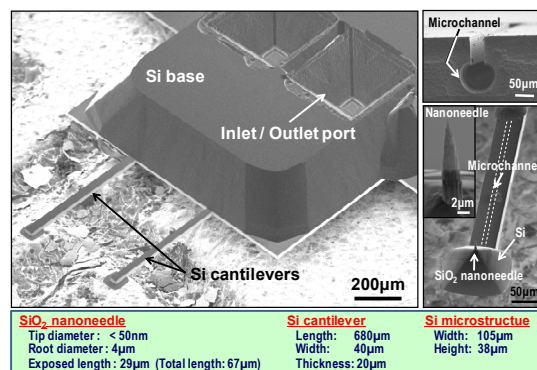


図2 ナノニードル搭載型バイオプローブの一例

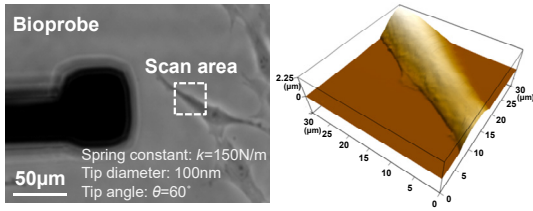


図3 液中でのHeLa細胞のAFM像

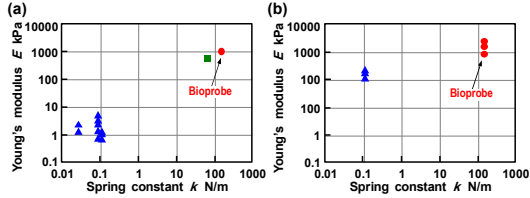


図4 生細胞および固定細胞のヤング率の測定結果

図4(a)は種々のばね定数をもつプローブを用いて評価した生細胞のヤング率の測定結果である。市販のプローブ ( $k < 0.11 \text{ N/m}$ ) の場合には  $1 \sim 5 \text{ kPa}$  程度と一般に報告されている生細胞のヤング率とほぼ同程度の値となった。一方、バイオプローブ ( $k = 150 \text{ N/m}$ ) ではヤング率は  $1.0 \text{ MPa}$  程度と大きく評価された。これはバイオプローブ特有の現象ではなく、市販のAFMプローブを用いた場合でもばね定数の大きなプローブ ( $k = 64 \text{ N/m}$ , 先端角  $35^\circ$ ) ではヤング率 ( $E = 0.5 \text{ MPa}$ ) は大きく見積られる結果となった。この理由としては、プローブのたわみにくさの影響やプローブ自身の硬さが反映された結果であると考えられる。また、柔らかいプローブ ( $k < 0.11 \text{ N/m}$ ) を用いた場合には、固定細胞のヤング率(図(b))は、生細胞に比べて1桁程度大きくなった。これは、グルタルアルデヒドによってタンパク質同士の架橋反応が起こったためと考えられる。一方、バイオプローブを用いた場合でもヤング率は2倍程度の差が認められ、相対的には両者の違いが評価できることがわかる。

以上のように、現状のバイオプローブの作製方法では、Siカンチレバー内に円形のマイクロ流路(直径  $10 \mu\text{m}$ )を形成するため、Siカンチレバーには必然的に  $20 \mu\text{m}$  程度の厚さが必要となる(図2参照)。このため、ばね定数が  $150 \text{ N/m}$  程度と大きくなり、柔らかい細胞の力学的特性を正しく評価できないことがわかった(ヤング率が  $100 \sim 1000$  倍程度大きく見積られる)。この問題を解決するため、新規に矩形断面を有するマイクロ流路の作製プロセスを開発した(図5参照)。本プロセスの独創的な点は、Si(111)基板を用いた結晶異方性エッチングによって、幅方向のみに広い流路を形成できることにある(図の例では流路高さ  $1 \mu\text{m}$ , 幅  $55 \mu\text{m}$  を達成)。このため、流路高さを  $1 \mu\text{m}$  程度とすれば、Siカンチレバーの厚さを  $4 \mu\text{m}$  程度まで薄くて

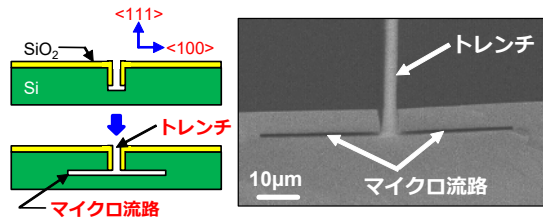


図5 新規開発の矩形マイクロ流路(Si基板内)

きる。計算上は、高い共振周波数 ( $80 \text{ kHz}$ ) を維持したまま、ばね定数を  $6 \text{ N/m}$  程度(現状の  $1/125$  に低減)まで低減できることから、本作製プロセスによって、バイオプローブの性能を大幅に向上することが可能となる。

## (2) In-Cell 機能イメージング

本研究では、バイオプローブの機能としてTERSイメージングによる生体分子のダイナミクス観察機能(In-Cell機能イメージング)を付与することを検討した。具体的には、バイオプローブの探針先端にAgナノ粒子を形成し、局所表面プラズモン共鳴(LSPR)効果を発現させ、細胞内でのTERS分光を可能とする。

図6に本研究で開発した倒立顕微鏡に組み込み可能なラマン分光光学系の模式図を示す。励起光源には、波長  $532 \text{ nm}$  のCobolt社製半導体励起固体(DPSS)レーザ(出力  $50 \text{ mW}$ )を使用し、 $1/2$ 波長板と偏光子によって偏光方向と光強度の調整を行った後、ラディアル偏光子によってz偏光成分を増加させた励起照明を形成し、ダイクロックミラーを介して倒立顕微鏡(ニコン製Ti-U)内に導入し、対物レンズ( $60$ 倍,  $\text{NA } 0.7$ )によってバイオプローブ探針先端に集光する。また、試料(探針先端の極近傍)から得られたラマン散乱光は、同一の対物レンズで集光し、ダイクロックミラー、ノッチフィルタ( $532 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ )を介して励起光を除去した後、分光器(浜松ホトニクス製C11713CA, 分解能  $10 \text{ cm}^{-1}$ )に導入する光学系となっている。

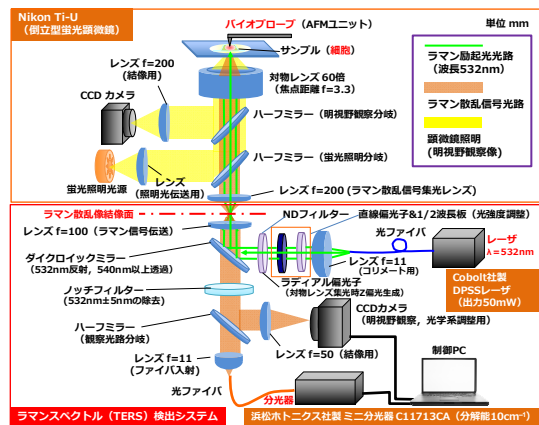


図6 倒立顕微鏡組み込み型チップ増強ラマン分光光学系の概略図

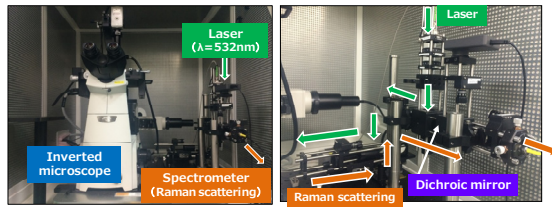


図7 倒立顕微鏡組込み型 TERS 分光装置

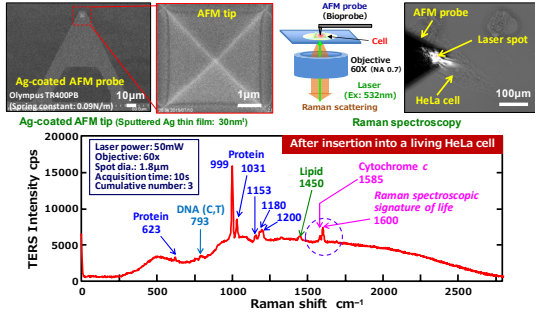


図8 細胞内 TERS イメージングの一例

図7に作製した倒立顕微鏡組込み型 TERS 分光装置の外観を示す。市販の AFM 装置 (Asylum Research 社製 MFP-3D-BIO) 用の防音カバー付き防振台内に収まるように励起光とラマン散乱光を上下2段に平行して伝送することで、幅方向にスペースを取らないコンパクト (50(W)×350(H)×350(D)) な光学設計となっている。

図8に Ag 薄膜 (厚さ 30nm) を成膜した市販の AFM プローブの探針先端を HeLa 細胞に穿刺して取得した TERS スペクトルの一例を示す。ラマン測定条件は、レーザーパワー50mW、露光時間 10s、積算回数 3 回とした。図に示すように、細胞内のタンパク質 (例えば、999 $\text{cm}^{-1}$ )、DNA (793 $\text{cm}^{-1}$ ) および脂質 (1450 $\text{cm}^{-1}$ ) に起因するピークが明瞭に観察された。さらに、1500~1700 $\text{cm}^{-1}$  付近のピークに着目したところ、興味深いラマンスペクトルとして、細胞がストレス (アポトーシス誘導刺激) を受けた際にミトコンドリアから放出されるシトクロム *c* (1585 $\text{cm}^{-1}$ ) に起因するスペクトルおよびミトコンドリアの代謝活性を反映した “生命のラマン分光指標” (1600 $\text{cm}^{-1}$ ) と呼ばれるピークが観察された。

図9(a)に細胞内 TERS スペクトルの時系列変化の一例を示す。また、図(b)には代表的なラマンスペクトルのピーク強度の時間変化を示す。細胞内のタンパク質に起因する 1001 $\text{cm}^{-1}$  のピーク強度は、Ag 被覆 AFM プロブ探針を細胞に穿刺して 10min 経過しても大きな変化は認められなかった。一方、356 $\text{cm}^{-1}$  と 484 $\text{cm}^{-1}$  付近のラマンスペクトルは時間とともにピーク強度に著しい変化が認められた。前者は、ミトコンドリア内膜における呼吸鎖電子伝達系におけるシトクロム *c* 酸化酵素の反応中間体 (P 中間体) に起

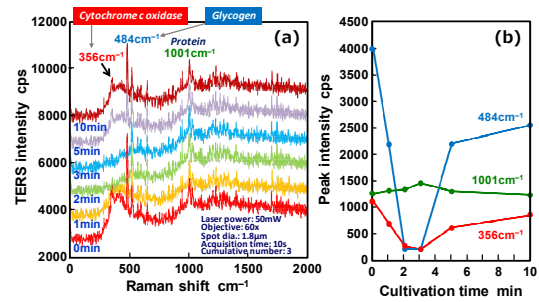


図9 細胞内 TERS スペクトルの時系列変化

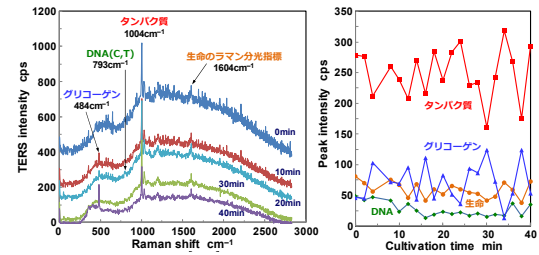


図10 細胞内 TERS スペクトルの時系列変化

因している可能性がある。また、後者は、動物における貯蔵多糖類として知られているグリコーゲン由来のスペクトルと考えられる。いずれも細胞の代謝に関わる物質であり、細胞機能のダイナミクスな変化を捉えることができたと言える。

図10は別の HeLa 細胞で取得した細胞内 TERS スペクトルの時間変化である。測定は 2min ごとに 20 回行った。図(a)に示すように、細胞内のタンパク質 (1004 $\text{cm}^{-1}$ )、DNA (793 $\text{cm}^{-1}$ )、グリコーゲン (484 $\text{cm}^{-1}$ ) に起因するピークが明瞭に認められた。さらに、ミトコンドリアの代謝活性を反映した “生命のラマン分光指標” (1604 $\text{cm}^{-1}$ ) のピークも観察されている。図(b)は主な細胞内分子のピーク強度の経時変化をプロットしたものである。図から、DNA および生命のラマン分光指標に起因するピーク強度の時間依存性はほとんど認められない。一方、タンパク質とグリコーゲンに起因するピーク強度は大きく変動し、さらに、両者の関係に逆相関があることがわかった。現時点では細胞の代謝メカニズムにおける生理学的な意味は不明ではあるが、細胞内の分子動態のイメージングが可能であることを示唆する結果である。

以上のように、今後は TERS イメージングの再現性の確認や、意図的な外部環境変化によるラマンスペクトルの時系列解析データの蓄積などのより詳細なデータの取得が必要とはなるが、本研究の成果として、スペクトルの変化を時系列的に観察することで、細胞活性の動的変化の定量化が行える可能性を実証することができたと言える。

(3) まとめ  
本提案技術のキーデバイスであるナノニ

ードル搭載型バイオプローブの問題点の一つとして、ばね定数が大きく細胞の力学的特性を正確に評価できないという課題に対して、新規な矩形断面を有するマイクロ流路（従来のばね定数の 1/25 を実現）の作製プロセスを確立した。さらに、細胞内の分子動態イメージング機能（In-Cell 機能イメージング）をバイオプローブに付与するための基礎的検討として、顕微ラマン分光装置を作製し、HeLa 細胞内の高感度 TERS イメージングが可能であることを示した。また、Ag 被覆 AFM プローブ先端を細胞内に穿刺した状態で、細胞内分子動態の時間変化を長時間追跡可能であることを実証した。今後の展望としては、バイオプローブ先端に Ag ナノ粒子を形成し、細胞の生化学操作（遺伝子などの導入）と細胞内 TERS イメージングを同時に実現することで、本提案の In-Cell 機能イメージング技術の有用性を実証する。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

柴田隆行 単一細胞への生体分子デリバリーを実現する MEMS ナノニードル, 精密工学会誌, 査読なし (解説), 82, 12, 1018-1022, 2016.  
<https://doi.org/10.2493/jjspe.82.1018>

〔学会発表〕（計 9 件）

柴田隆行, 永井萌土, 細胞を基軸とした精密工学の新展開, 2018 年度精密工学会春季大会シンポジウム「生命科学と精密工学」(招待講演), 2018.

長濱真弘, 山根真大, 林 照剛, 永井萌土, 柴田隆行 細胞機能解析のためのナノニードル搭載型バイオプローブの開発 (第 15 報) - 細胞内 TERS イメージングのための金属ナノ粒子の最適化 -, 2017 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2017.

佐藤直彦, 山根真大, 永井萌土, 柴田隆行, 細胞機能解析のための扁平マイクロ流路搭載型バイオプローブの開発, 第 26 回ライフサポート学会フロンティア講演会, 2017.

柴田隆行, 異分野融合マイクロ・ナノ構造創成技術, 第 11 回マイクロ・ナノ加工研究会(NPO ナノ構造ポリマー研究協会)招待講演, 2017.

柴田隆行, オンチップ細胞診断・機能デザイン制御用 MEMS プラットフォーム, 第 2 回 EIIRIS インテリジェントセンサ・MEMS 研究会 (豊橋技術科学大学), 2017.

T. Shibata, G. Miyazaki, T. Hayashi, M. Nagai, Intracellular Imaging of Molecular Dynamics in Living Cells Based on Tip-enhanced Raman Spectroscopy, The 8th Asia-Pacific

Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT 2016), Kanazawa, Japan, 2016.

T. Shibata, G. Miyazaki, T. Hayashi, M. Nagai, In-cell Imaging Technique Based on Tip-enhanced RAMAN Spectroscopy for Studying Molecular Dynamics in Living Cells, The 3rd International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE 2016), Penang, Malaysia, 2016.

柴田隆行, オンチップ細胞診断・機能デザインプラットフォーム, 第 36 回表面科学学術講演会・第 57 回真空に関する連合講演会 (招待講演), 2016.

佐藤直彦, 山根真大, 永井萌土, 柴田隆行, 細胞機能解析のためのナノニードル搭載型バイオプローブの開発 (第 14 報) - 扁平マイクロ流路の作製プロセスの検討 -, 2016 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://mems.me.tut.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 隆行 (SHIBATA, Takayuki)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10235575