

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14256

研究課題名(和文)細胞融合マイクロフォトニックデバイスの創成

研究課題名(英文)Development of cell-integrated micro-phonic device

研究代表者

太田 淳(Ohta, Jun)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：80304161

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)：ヒスタミン応答細胞センサのマイクロフォトニック(μ P)デバイス上への導入：ヒスタミン応答細胞センサの半導体チップ上での培養に成功した。ヒスタミン応答細胞センサはGFPが発現しており、これまでGFP蛍光検出用に研究室で開発した吸収フィルターを用いることで高い励起光除去比を得ることができる。今回接着層を工夫することにより高い確率での細胞培養に成功した。ヒスタミン応答細胞を培養した μ Pデバイスの動作検証をPBS(Phosphate Buffered Saline:リン酸緩衝生理食塩水)中で動作を行った。ヒスタミン滴下によるGFPによる蛍光信号を μ Pデバイスを用いて検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded to culture GFP expressed HeLa cells on our micro-phonic device. An adhesive layer has been developed for this purpose. The absorption filter to detect green fluorescence from GFP and block blue light from an excitation light source have already been developed in our lab and can be applied to this experiment. The whole device is put into a PBS solution. Next, we dropped a histamine solution onto the device. We have successfully demonstrated to obtain fluorescent image from the cells when a histamine solution is dropped. This clearly shows our device can be used as a cell-sensor to detect a chemical substance through fluorescence.

研究分野：光電子工学

キーワード：集積回路 細胞 イメージセンサ 蛍光

1. 研究開始当初の背景

統合失調症, うつ病, 認知症など脳神経系の不調による精神疾患は大きな社会問題となっており, 様々な角度からの研究が進められている. これらの疾患の研究では, マウス等の実験小動物の自由行動下での脳内活動を計測する事が重要となる. 研究代表者は, マウス脳内埋植可能な超小型イメージングデバイス「バイオメディカルフォトニック LSI (bmp-LSI)」を JST-CREST のプロジェクトにおいて開発し, 自由行動下での脳内活動の分子イメージングに成功している (J. Neurosci. Method 2006). 対象とする分子に反応して蛍光を発する薬剤等を脳内に注入することで特定分子の活動を蛍光を通じて非拘束でリアルタイムに計測可能である (J. Neurosci. Method 2008, Biosensors & Bioelectronics 2012).

一方, 近年光と遺伝子工学を組み合わせた光遺伝子工学が急速に発展し, バイオ・医療分野における計測手法を一変している. 例えば GFP (緑色蛍光タンパク) にカルシウムイオン反応性を付与した GCaMP はカルシウムイオンに反応して蛍光を発する細胞を容易に作製することを可能としている (中井, 比較生理生化学 2002). 最近, この光遺伝子工学と膜タンパクである受容体とを組み合わせると蛍光リポーターとしての細胞センサを実現した報告がなされている (Nguyen, Nature Neurosci. 2010). 受容体を変えれば様々なリガンドの検出が可能となると期待されている.

2. 研究の目的

本研究では, 申請者が開発した bmp-LSI と細胞センサを融合して, 図 1 に示すような全く新しい細胞融合マイクロフォトニック (μ P) デバイスを提案しその基本的機能を実証する. 研究期間内には以下を明らかにする. (1) 研究協力者佐藤が開発したヒスタミンに反応する蛍光タンパクを遺伝子導入した細胞を Si 上に固定化した細胞融合 μ P デバイスを作製する. (2) 試作した細胞融合 μ P デバイスの応答特性

など基本的な動作を *in vitro* 環境下で実証する. (3) 更に細胞融合 μ P の細胞表面保護等を行い生体内埋植を可能とする.

3. 研究の方法

本研究は, 以下の3段階で進める. ヒスタミン応答細胞センサをマイクロフォトニックデバイス上への培養あるいは固定化による細胞融合 μ P デバイスの実現と基本動作実証, 細胞融合 μ P デバイス表面保護構造の考案と生体内埋植動作. これらを研究代表者の太田が, 本申請で雇用する研究員が中心となり, 連携研究者の徳田 (チップ設計), 笹川 (デバイス・システム設計), 野田 (デバイス実装), 竹原 (動物実験) と共に行う. ヒスタミン応答細胞センサは東京大学佐藤准教授より入手済みである. またマウス, ラット脳内へのデバイス埋植は実績がある. ヒスタミン応答細胞センサのデバイス上への導入による細胞融合 μ P デバイスの試作を行い, 表面保護構造の導入と細胞融合 μ P デバイスの生体内埋植実験を実施する.

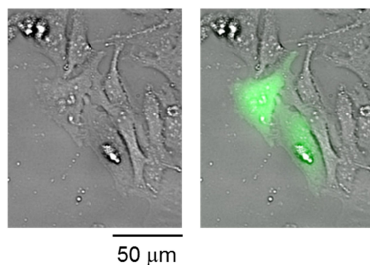
4. 研究成果

ヒスタミン応答細胞センサのマイクロフォトニックデバイス上への導入
東大佐藤准教授より提供して頂いたヒスタミン応答細胞センサの半導体チップ上での培養に成功した. マイクロフォトニックデバイスについては以下の工程で試作を行った. まず LSI チップ設計を研究室で行い, LSI 試作ファウンドリーサービスを利用して半導体チップを作製する. 基本動作を確認した後, 研究室の設備を用いてポストプロセスを行い, フレキシブル基板上に励起光源と集積化を行い, 最後にワイヤ部分をエポキシ樹脂で包埋した後, デバイス全体にパリレン膜を形成することで, 生体適合性と防水性を確保する. 最後に生理食塩水中での動作試験を行う.

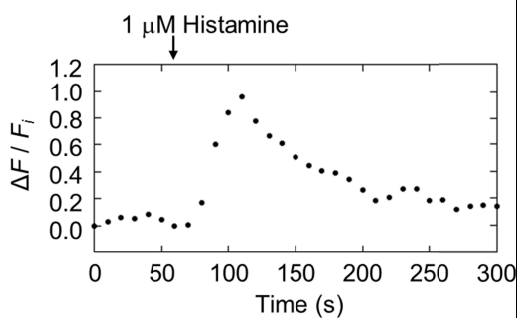
撮像面上には励起光を抑制し，蛍光のみを透過する吸収フィルターを形成している．

ヒスタミン応答細胞センサは GFP が導入されているため，これまで GFP 蛍光検出用に研究室で開発した吸収フィルターを用いることで高い励起光除去比を得ることができる．更に超小型イメージングデバイス上への細胞培養に関しては，すでに別チップで確認をしており，今回接着層を工夫することにより高い確率での細胞培養に成功した．図 1 は GFP を発現させた HeLa 細胞である．図 1(a) 右はヒスタミン刺激により蛍光を発している様子を蛍光顕微鏡で撮影したものである．図 1(b) はヒスタミン滴下による蛍光強度変化をプロットしたものである．図 2 はこの HeLa 細胞を培養したデバイスの写真である．

GCaMP-expressing HeLa cells



(a)



(b)

図 1 : GFP 発現 HeLa 細胞 . (a) ヒスタミン滴下前後の蛍光顕微鏡像 . (b) 滴下前後の蛍光量の時間変化 .

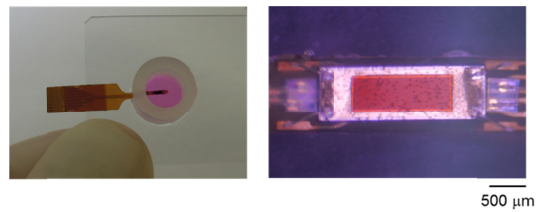
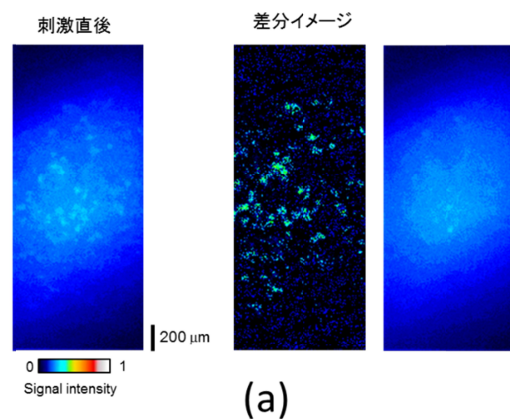


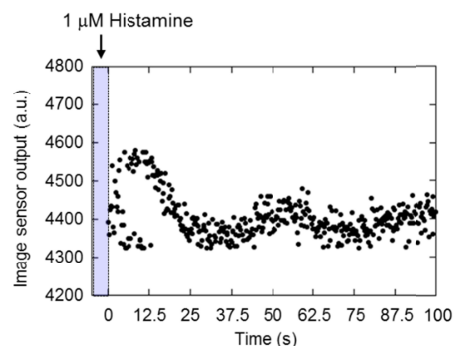
図 2 : GFP 導入 HeLa 細胞を培養したマイクロフォトリックデバイスの写真

細胞融合 μ P デバイスの動作検証

ヒスタミン応答細胞を培養した μ P デバイスの動作検証は，空気中と PBS (Phosphate Buffered Saline:リン酸緩衝生理食塩水) 中での動作を行った．これまでのデバイスはパリレンでコートされており水溶液中での動作には問題ないことを確認している．PBS 中では，ヒスタミン滴下による GFP による蛍光信号をチップから出力することができ，ヒスタミン濃度に対するデバイ



(a)



(b)

ス出力特性を計測することに成功した．

図 3:GFP 発現 HeLa 細胞培養マイクロフ
ォトニックデバイスへのヒスタミン刺激によ
る出力結果 . (a) デバイス出力画像 . (b)
デバイス出力の時間変化 .

図 3 はマイクロフォトニックデバイス上に培
養した GFP 発現 HeLa 細胞にヒスタミンを
滴下した場合のデバイス出力を示したも
のである . 図 3(a)はヒスタミン滴下直後の
デバイス出力画像である . 差分イメージに
より細胞からの蛍光画像をとらえることが
できている . 図 3(b)は特定領域に注目し
たヒスタミン滴下前後の出力値の時間変
化である . ヒスタミン滴下により蛍光出力
が増加していることが確認できる .

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

中元健太, 大澤和高, 春田牧人, 野田俊
彦, 笹川清隆, 徳田崇, 太田 淳, CMOS
イメージセンサを用いた培養細胞のレン
ズレスオンチップ蛍光計測システム, 応
用物理学会春季学術講演会, 2017 年 3 月
14 日 パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市 .
Hee Wan Shen, Makito Haruta, Toshihiko
Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi
Tokuda, Jun Ohta, Fabrication of a
Prototype Dual Filter CMOS Image
Sensor for FRET Imaging, 応用物理学会
春季学術講演会, 2017 年 3 月 14 日, パ
シフィコ横浜, 神奈川県横浜市 .

[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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

太田 淳 (OHTA, Jun)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・教授
研究者番号 : 80304161

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

徳田 崇 (TOKUDA, Takashi)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・准教授
研究者番号 : 50314539

笹川 清隆 (SASAGAWA, Kiyotaka)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・助教
研究者番号 : 50392725

野田 俊彦 (NODA, Toshihiko)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・助教
研究者番号 : 20464159

竹原 宏明 (TAKEHARA, Hiroaki)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機
構・特任助教
研究者番号 : 60723088

(4)研究協力者

()