

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17066003
 研究課題名（和文） 細胞間ネットワークシグナルの解析
 研究課題名（英文） Analysis of cellular signals from cell-to-cell interactions

研究代表者
 民谷 栄一（TAMIYA EIICHI）
 大阪大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：60179893

研究成果の概要：バイオセンサー、チップ集積化技術、一細胞マニピュレーション技術などを駆使して、網羅的に且つ高感度に細胞シグナルなどを解析するバイオセンシングツールの開発に関する研究を行った。免疫一細胞刺激応答や、磁気液滴操作によるガン1細胞遺伝子発現解析、神経細胞ネットワーク形成、マイクロチャネルアレイ（MCA）による神経細胞シグナル計測など様々な機能を備えた各種一細胞情報解析チップの開発と応用に成果をあげた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	58,300,000	0	58,300,000
2006年度	55,000,000	0	55,000,000
2007年度	56,700,000	0	56,700,000
2008年度	55,000,000	0	55,000,000
年度			
総計	225,000,000	0	225,000,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：細胞チップ、シグナル応答、ニューロン、神経回路、ensemble recording、電極アレイ、ペプチドアレイ

1. 研究開始当初の背景

生体機構を理解するうえで細胞内のみならず細胞間シグナルの授受メカニズムを明らかにすることは、本質的な必須なアプローチと考えられる。特に、神経細胞ネットワーク、生体防御ネットワークなどに代表されるように数多くのヘテロな細胞からなる細胞集団を対象とし、基本単位である細胞の機能を一細胞あるいはサブセルレベルでの解析できる手法およびシステムの開発は緊急性があり、必要である。例えば、生体防御に関わる免疫細胞ネットワークでは、B細胞集団が10の8乗もの種類の抗体を生成できるが、1種類の細胞からは1種のモノクローナル抗体を生成しており、同時に極めて大きな数の

細胞集団を1個レベルで解析できなければ免疫ネットワーク全体を理解し、これを利用するには至らない。また、細胞機能の評価するうえでは、細胞間シグナル分子に対する応答解析が重要であり、アレイ上に配置された集積型電極やパッチクランプ細胞内電極などのハード開発が望まれる。これらを解決する研究手法および視点に本申請の学術的な特色および独創性がある。さらにこうしたシステムをバイオセンシングやドラッグ探索などへ応用展開するうえで、候補分子集団の設計およびチップへの配置とそのアッセイ手法の開発にも展開するもので、予想される結果および意義は高く、関連分野に与える波及効果はきわめて大きい。

2. 研究の目的

生体の有する高次機能を分子レベルで理解し、これを応用展開していくため、生体を構成する基本単位である細胞の機能に焦点をあて、一細胞レベルでの解析を可能としつつ、生体機能を発現するに不可欠な細胞間のネットワーク形成を視野に入れた細胞集団を定量評価する網羅的な解析手法の提案および実施展開が不可欠である。こうした解析手法を展開するには、ハード面においては、最新のマイクロ/ナノ微細加工技術を用いた一細胞アレイチップ、細胞集団を対象とする計測方法、ソフト面においては、網羅的細胞解析アルゴリズムの開発などが基盤となる。こうした研究を推進するために分析化学、生化学、微細加工、生体情報解析などを専門とする境界領域の研究者の連携をはかり、たとえば、一細胞の分解能を有する細胞集団チップ(10万個の細胞配置も可能)網羅的細胞シグナル応答解析、ペプチドシグナルアレイチップによる細胞レセプタ分子の解析、ドラッグの探索、機能予知プログラムの設計、集積型電極システムと神経細胞ネットワーク集団解析、MEMS 先端技術を用いたパッチクランプアレイなど細胞シグナルチップ開発と解析などに取り組む。

3. 研究の方法

(1) バイオセンサー、チップ集積化技術、一細胞マニピュレーション技術などを駆使して、網羅的に且つ高感度に細胞シグナルなどを解析するバイオセンシングツールの開発を行った。流路チップ、集積チップの作製は、その目的に応じて微細加工技術を駆使して行った。シリコンウェハー上に感光レジストを塗布し、マスクパターンを通して感光させ、パターンを形成する。これに PDMS 樹脂を成型し PDMS 流路を成型する。これとガラス基板の表面を酸素プラズマ処理し活性化させた後、貼り合わせることで PDMS 流路チップを作製した。一方、ウェットエッチングプロセスによりシリコン製マイクロチャンバーアレイを作製した。また LIGA プロセスで作製した鋳型を基に射出成型によりプラスチック樹脂製チャンバー型アレイチップも作製した。

(2) 単一細胞を可視化しつつ細胞ネットワーク活動を観測するという観点から、single-cell manipulation 技術を利用した細胞の位置制御、基板表面への接着性の差異を利用した細胞の成長方向制御、非侵襲的に長期間の細胞群電気活動が可能な集積化電極基板を利用し、ラット海馬神経細胞、上頸神経節細胞、心室筋細胞、さらに P19 細胞用いた培養細胞ネットワークによる実験を行った。

(3) 単一細胞レベル、さらには細胞ネットワ

ークの電気的なシグナルを計測、解析することを目的に、従来のMEA(微小電極アレイ)等の電極アレイをMEMS/NEMS技術により改良し、吸引微小穴を一体化したマイクロチャンネルアレイ(MCA)をコア技術とした研究展開を行った。MCAにより、吸引による細胞操作やチャンネル部への細胞固定、チャンネル部からの流体入出力が可能となり、プロジェクト内での連携研究により有望な神経細胞系をはじめ、応用展開を進めた。(4) ペプチドアレイと磁性ナノ微粒子を用いた次のような研究を行った。

(i) 生体シグナル分子(ペプチド)の解析: Fmoc 固相合成法で生体シグナル分子である短鎖ペプチドをセルロース膜上にアレイ状に合成した。このペプチドアレイ上で細胞の応答を解析する技術を確認し、解析した。

(ii) 1細胞解析のための磁気液滴操作: 分散性の高いマグネタイトナノ微粒子を用いてオイル中で液滴を磁気操作し、液滴の移動・合一、および液滴からの磁性微粒子の離脱、他の液滴への融合を行い、液滴中の1細胞のPCR増幅を行った。

(iii) 細胞アレイによる細胞機能評価: 正電荷脂質で包埋した特殊なマグネタイトナノ微粒子を用いて細胞中に100万個程度の微粒子を導入し、外部に設置した永久磁石で誘導できる磁気ラベル化法を確認した。また、150 μ m 間隔の剣山状デバイスを作製し、細胞アレイの構築に用いた。

4. 研究成果

(1) 40万個以上のチャンバーを有するマイクロアレイチップ上に、単一B細胞を80%以上の確立で導入することができ、各感作段階における抗原感作マウス脾B細胞に抗原刺激を行い、特異的な単一B細胞のシグナルを検出、解析できることも示してきた。また、マイクロ流路中でピコリッターレベルのコンパートメントを多数形成させ、単一細胞を分離するフロー型一細胞アッセイチップを設計・作製した。容量70pLのコンパートメントを25個/秒で安定形成させ、また42%の確立で単一マウス脾臓由来B細胞の分離に成功した。このチップに刺激用試薬導入流路を増設し、コンパートメント中に単離したマウスB細胞に刺激用試薬導入流路からAnti-Mouse IgMによるマウスB細胞の刺激を行い、カルシウム応答による蛍光強度の増加の観測に成功した。これにより刺激前後の抗原特異的な単一B細胞のシグナル応答検出と評価に成功した(図1)。また、チップ上でPCRによる一細胞DNA増幅および検出が行えるマイクロチャンバーアレイチップの開発も行った。これには、母体末梢血液中にごくわずかに存在する胎児由来細胞を非侵襲的かつ選択的に回収し胎児DNA情報解析への応用を検討した。

臍帯血より作製した母体血液細胞標本から、マイクロマニピュレーター制御の下、ピンセット型プローブを用いて1個体の胎児由来有核赤血球を回収し、マイクロチャンパー内に配置した。母子間の血液型不一致の判定に重要なRhD (Rhesus blood group, D antigen) 遺伝子に対するPCR増幅を検討した結果、46%のチャンパーにおいて目的のDNA増幅が観察され、また母体由来赤血球では増幅はみられなかった。これにより、オンチップ細胞PCRによるDNA情報解析が可能であることが示された。さらに、マイクロ流路とチャンパーを組み合わせたiPS細胞チップを設計・作製し、マイクロフローを用いて液滴を形成させ、iPS細胞の分化誘導に重要な細胞塊を効率的に形成させることに成功した。さらに、得られた細胞塊組織からの分化誘導にも成功した。以上、様々な機能を備えた各種一細胞情報解析チップの開発と応用に成果をあげた。

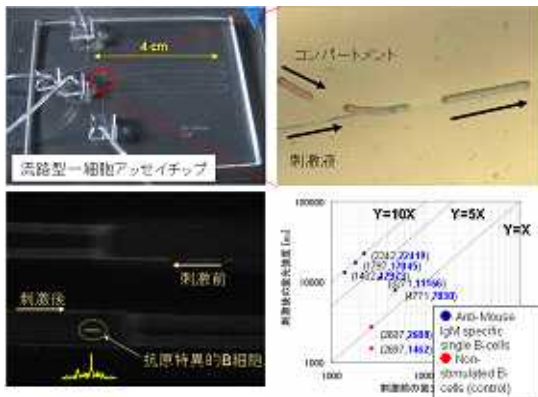


図1. 流路型チップを用いた一細胞アッセイ

(2)小規模神経回路形成技術の開発について、単一細胞の活動と細胞ネットワークの機能との関係を理解することを目指し、個々の細胞を可視化した小規模神経回路の形成を試みた。インクジェット、マイクロピペット描画法の2つの手法で細胞接着領域のパターン化を行った。ラット海馬神経細胞を用いた実験で、1個から100個まで、様々な数のニューロンから成る神経回路の形成が可能であることを確認した。構成細胞数に依存した自発電気活動の変化とそれに対応した細胞内Ca濃度変化を観測した。神経-心筋共培養系の構築については、異なる組織由来の細胞を集積化電極基板上で共培養することにより、細胞間信号伝達の観測を試みた。集積化電極基板上にPDMS製マイクロ構造を形成し、神経-心筋共培養系を構築した。神経側の電気刺激に対する心筋拍動リズムの亢進と、 α -アドレナリン受容体遮断薬によるその障害が確認され、機能的なシナプスが形成されていることが確認できた。集積化電極基板による幹細胞由来神経回路の自発電気活動

計測については、細胞間相互作用が強い作用を及ぼすと考えられている細胞分化過程に注目し、神経/心筋両組織への分化能を有するP19細胞を用いて集積化電極基板上での培養を試みた。P19細胞由来の神経回路が、その発達過程で大脳皮質初代培養系と類似の周期的な自発電気活動を発生することがわかった。薬理実験により、この電気活動にNMDA受容体、GABA受容体が関与していることが明らかになった。

(3)MEMS技術を用いた細胞インタフェース上での所望の「組織形成」および「細胞・細胞ネットワーク定量観測」を目指し、細胞吸引孔と電極を一体化したマイクロチャンネルアレイ(MCA)を基本構造とするMEMSデバイスを用いた研究展開を行った。

(i)細胞ネットワーク計測用MCA

MCAを基本構造とし、2次元形成した組織において吸引固定による特徴を活かした細胞外観測に向けてデバイスの更なる改良を目指した、「細胞ネットワーク解析用MCAデバイス」(図2)の研究を推進してきた。電気的に独立した1つの電極に1個の微小な細胞吸引孔が対応している本デバイスは、MEA基

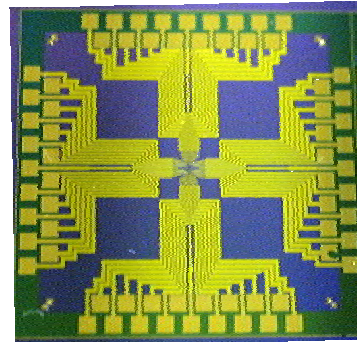


図2 単一細胞、細胞群計測用MCA
吸引孔: 5 μ m、絶縁膜開口部: 10 μ m。
(a)全体写真、(b)1チャンネル拡大。



図3 MCAチャンネル周囲の培養神経細胞

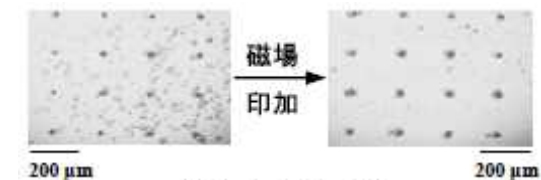
板では困難であった単一細胞と細胞ネットワークの同時観測実現が可能となる。まず、1)白金黒による電極インピーダンス値の低減および2)高い生体適合性を有する絶縁膜材料の導入に取り組み、ラット大脳皮質スライスを観測対象とした吸引固定時における自発活動電位の多点同時計測を確認することがで

きた。本研究成果については、国際会議で報告し、学術論文誌に掲載されている。

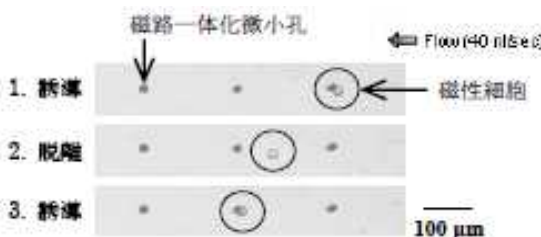
細胞培養の際に用いる3) コーティング材の検証および4) デバイス上で形成した細胞群ネットワーク(図3)を対象とする吸引固定による多点同時信号計測を実施した。その結果、本実験条件において最も適すと見られるコーティング材(ポリエチレンイミン)の選定および電極を双方向に用いた吸引固定時における細胞群ネットワークの多点同時信号計測(自発・誘発)を新たな成果として得ることが出来た。本成果についても、国際会議で報告し、学術論文誌への投稿準備中である。

(ii) 磁路一体化MCA デバイス

デバイス上での所望の「組織形成」に向けて、従来の陰圧制御との組み合わせによる確実な細胞群位置制御を実現するため、MCA構造内に強磁性材料を組み込んだ磁路一体化微小孔による磁気を用いた細胞群位置制御に取り組んだ。その結果、磁路一体化微小孔への細胞群磁気誘導(図4(a))および磁気・流体の力を組み合わせた単一細胞の移動制御(図4(b))を成果として得ることが出来た。これにより吸引用として用いていた微小孔を単一細胞への薬液送液等の他の用途へ転用することも可能であると考えられ、更なる改良に取り組む予定である。本成果については、国際会議で報告し、学術論文誌投稿準備中である。



(a) 細胞群磁気誘導結果



(b) 磁気・流体による単一細胞移動制御

図4 磁路一体化MCAによる細胞操作

(4) 細胞の高次機能を解析するため、ペプチドアレイと磁性ナノ微粒子を用いた研究を行い、次のような成果を得た。

(i) 生体シグナル分子(ペプチド)の解析

ペプチドアレイを用いて様々なペプチドリガンドに対するアポトーシス、細胞接着、分化などの細胞応答を評価・解析することで細胞レセプター分子の解析を行った。

(ii) 1細胞解析のための磁気液滴操作

磁性粒子を利用した細胞計測に着目し、磁

性微粒子を分散させた液滴を搬送することで、液滴中の1細胞からの遺伝子発現解析が可能であることを実証した。

(iii) 細胞アレイによる細胞機能評価

磁気誘導を利用した細胞アレイの作製に成功した。この方法はいかなる培養面上でもアレイ配置可能で、細胞シート上やコラーゲンゲル中も可能である。この方法でがん細胞の浸潤評価に成功し、細胞外マトリクス溶解酵素阻害剤で浸潤阻害できることを実証した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計59件)

J. Suzurikawa, M. Nakao, Y. Jimbo, R. Kanzaki, H. Takahashi, Light-addressed stimulation under Ca²⁺ imaging of cultured neurons, *IEEE Trans. BME*, in press (査読有)

Y. Takayama, A. Saito, H. Moriguchi., Y. Jimbo., Ensemble Stimulation of Embryoid Bodies using Substrate- Embedded Electrodes, *IEEJ Trans.*, in press (査読有)

高山祐三、齋藤淳史、森口裕之、小谷潔、神保泰彦、幹細胞由来培養神経回路の構築と電気活動計測、*電気学会論文誌 C129: 8-16*, 2009 (電気学会電子情報システム部門誌論文奨励賞受賞)

H.M. Hiep, T. Endo, M. Saito, M. Chikae, D.K. Kim, S. Yamamura, Y. Takamura, E. Tamiya, Label-Free Detection of Melittin Binding to a Membrane Using Electrochemical-Localized Surface Plasmon Resonance, *Anal. Chem.*, 80: 1859-1864, 2008. (査読有)

K. Kerman, M. Saito, S. Yamamura, Y. Takamura, E. Tamiya, Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications, *TrAC*, 27: 585-592, 2008. (査読有)

K. Ino, M. Okochi, N. Konishi, M. Nakatochi, R. Imai, M. Shikida, A. Ito, H. Honda, Cell culture arrays using magnetic force-based cell patterning for dynamic single cell analysis, *Lob on a Chip*, 8: 134-142, 2008. (査読有)

K. Kotani, K. Takamasu, Y. Jimbo, Y. Yamamoto, Postural-induced phase shift of respiratory sinus arrhythmia and blood pressure variations - insight from respiratory-phase domain analysis, *Am. J. Physiol.* 294: H1481-H1489, 2008. (査読有)

殿村 渉、倉島 利明、高山 祐三、森口 裕之、神保 泰彦、小西 聡、マイクロチャンネルアレイ構造を有した細胞間ネットワーク解析用デバイス、*電気学会論文誌 C*, 127: 1575-1580, 2007. (査読有)

W. Tonomura, H. Okamura, S. Konishi, Transparent Biosensor with Micro Channel Array for Optical and Electrophysiological Detection of Luciferin-Luciferase Reaction, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, 2: 372-377, 2007. (査読有)

T. Endo, K. Kerman, H.M. Hiep, D.K. Kim,

Y. Yonezawa, K. Nakano, E. Tamiya, Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance based core-shell structured nanoparticle layer nanochip, *Anal. Chem.*, 78: 6465-6475, 2006. (査読有)

M. Okochi, M. Nakanishi, R. Kato, T. Kobayashi, H. Honda, High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence, *FEBS Letter*, 580: 885-889, 2006. (査読有)

S. Yamamura, H. Kishi, Y. Tokimitsu, S. Kondo, R. Honda, S. R. Rao, M. Omori, E. Tamiya and A. Muraguchi, Single-cell microarray for analyzing cellular response, *Anal. Chem.*, 77: 8050-8056, 2005. (査読有)

M. Vestergaard, K. Kerman, M. Saito, M. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's Amyloid-beta aggregation, *J. Am. Chem. Soc.* 127: 11892-11893, 2005. (査読有)

ほか 4 6 件

[学会発表](計 105 件)

国際

W. Tonomura, K. Shimizu, and S. Konishi, Spatially Arranged Microelectrodes Using Wire Bonding Technology for Spatially Distributed Chemical Information Acquisition, *Proc. Of 22nd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 09)*, pp.741-744, Sorrento, Italy, Jan 26, 2009.

E. Tamiya Single-Cell Based Microchips for Cellular Signal Analyses, PRiME 2008, 214th ECS Meeting October 12-17, 2008 Honolulu

M. Okochi, "Screening of adhesion peptide for mesenchymal stem cell", 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2008/9, Zurich, Swiss

Moriguchi H., Tamai N., Takayama Y., Kotani K., Jimbo Y, Hierarchical oscillatory patterns observed in the spontaneous and evoked activity in cultured small recurrent networks, 6th FENS Forum, Geneva, July 2008

Takayama Y., Saito A., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y, Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells establish functional neuronal network, 6th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes, Reutlingen, July 2008

T. Hiranishi, W. Tonomura, K. Ino, M. Okochi, H. Honda and S. Konishi, Both Pneumatic and Magnetic Induction of Scattered Cells on Micro Channel Array for Cellular Analysis, *Proc. of the 21st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 08)*, pp. 284-287, Tucson, Arizona, USA, Jan 15, 2008.

K. Ino, A. Ito, M. Okochi, H. Honda, "Magnetic force-based cell patterning for tissue engineering, International Conference on Cellular & Molecular Biology", 2007/12, シンガポール

K. Ino, A. Ito, M. Okochi, H. Honda, "A cell patterning technique using magnetic force", The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2007/9, Waseda Univ., Tokyo

E. Tamiya, "New technologies and materials", The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2007/9, Tokyo

R.R. Sathuluri, M. Kitamura, S. Yamamura, Y. Takamura, E. Tamiya, "Single-cell picoliter microfluidic chip system for high-throughput screening and analysis of antigen-specific B-cells from bulk suspensions", *Engineering cell biology II*, 2007/8, Massachusetts

W. Tonomura, T. Kurashima, Y. Takayama, H. Moriguchi, Y. Jimbo and S. Konishi, Simultaneous Multipoint Measurement of Cellular Network by Isolated Micro Channel Array with Pt-Black Electrode, *Proc. of the 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 07)*, Lyon, France, pp. 1793-1796, Jun 13, 2007.

E. Tamiya, "Nanotechnology- Oriented Biosensors and Biochips", *Asia Sense 2007*, 2007/6, マニラ (Invited)

M. Saito, K. Nakagawa, T. Takekawa, K. Yamanaka, Y. Takamura, G. Hashiguchi, E. Tamiya, "A single human chromosome manipulation and gene detection via trace volume PCR amplification using microtweezer probe and microchamber array", *Micro Total Analysis System 2006*, 2006/11, Tokyo

M. Saito, K. Nakagawa, K. Yamanaka, Y. Takamura, E. Tamiya, "A new design of knife edged-AFM probe for chromosome precision manipulating", The 13th international conference on solid-state sensors, actuators and Microsystems (Transducers05), 2005/6, KOREA

国内

高野翔、大河内美奈、千賀威、本多裕之、"磁気細胞パターニング法を用いた3次元がん細胞挙動評価モデルの構築"、化学工学会第74年会、2009/3、横浜国立大

齊藤真人、吉川裕之、民谷栄一、"ナノ・マイクロバイオデバイスの開発と安全安心社会への応用"、日本分光学会高感度表面・界面部会第1回シンポジウム、2008/12、産業技術総合研究所つくばセンター(招待講演)

民谷栄一、"ナノ構造デバイスとインターフェース分子を連携したバイオチップ"、第26回医用高分子研究会講座-検査・診断を支える高分子-、2008/11、産業技術総合研究所臨海副都心センター、東京(招待講演)

大河内美奈、"細胞接着ペプチドの探索法の開発とペプチド固定化基盤上での細胞"、第17回日本バイオイメージング学会、2008/10、千葉

大河内美奈、"接着ペプチド修飾基盤における間葉系幹細胞の分化誘導"、日本生物工学会平成20年度大会、2008/9、仙台

本多裕之、"磁性微粒子を用いた液滴ハンドリングによる細胞計測"、第6回ライフサイエンスシンポジウム、2008/6、大阪大学

清水良純、山村昌平、奥山亮、高村禅、中野秀雄、民谷栄一、"一細胞マイクロアレイチップを用いた抗原感作マウス脾B細胞の発現解析"、日本化学会第88春季年会、2008/3 千葉

森口裕之、高山祐三、小谷 潔、神保泰彦、"微小神経回路アレイのネットワーク活動の電氣的・光学的計測"、電気学会電子・情報・システム部門大会、函館、2008 (優秀論文発表賞受賞)

ほか81件

〔図書〕(計10件)

神保泰彦、"神経回路活動の計測"、分担執筆(合原、神崎編 理工学系からの脳科学入門、東京大学出版会 2008)

S. Yamamura, S.R. Rao, E. Tamiya, "Pico/Nanoliter Chamber Array Chips for Single-cell, DNA and Protein Analyses", Nanomaterials for Biosensors, Wiley-VCH Publishers, USA, 2007, pp.368-397

酒井康行、民谷栄一他57名、"動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス"、シーエムシー出版、2007、総ページ数324

民谷栄一、"バイオセンサーの先端化学技術と応用"、シーエムシー出版、2007、総ページ数320

ほか6件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/surveyor/>

総説(計5件)

山村昌平、民谷栄一、"ナノ・マイクロ技術を用いた細胞間ネットワークシグナルの解析"、表面科学 28, 211-217 (2007)

山村昌平、民谷栄一、"細胞機能解析をめざしたオンチップバイオデバイス"、電気化学および工業物理解析 74, 890-894 (2006)

ほか3件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

民谷 栄一 (TAMIYA EIICHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60179893

(2) 研究分担者

本多 裕之 (HONDA HIROYUKI)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70209328

神保 泰彦 (JINBO YASUHIKO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20372401

小西 聡 (KONISHI SATOSHI)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：50288627