

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360365

研究課題名(和文)プローブ分子を要しないリアルタイム細胞応答観察法の開発とバイオセンシングへの応用

研究課題名(英文)Development of Real-time Observation Method for Cell Response without Probes and Its Application to Biosensing

研究代表者

篠原 寛明(Shinohara, Hiroaki)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：60178887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円、(間接経費) 3,240,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養細胞の高解像度2次元SPRイメージング観察、および交流電場下での配向状態の顕微鏡観察法(電界配向法)により、リアルタイムに個々の細胞の活性化状態や生死状態を判別する新規なバイオセンシング法を確立できた。

開発した細胞応答観察法は、一切プローブ分子を要することなく、生理活性物質や薬物、毒物の簡便で、検出能の高いバイオセンシングを実現できた。今後もそのメリットを活かせる細胞を用いた薬物作用スクリーニングが重要な医薬品開発分野や、細胞の識別や分化判定が重要な細胞組織工学などの分野への応用を継続研究する計画である。

研究成果の概要(英文)：In this research, novel cell-based biosensing system with a high resolution of two dimensional surface plasmon resonance (2D-SPR) imager was developed. Response of some neural or endocrine cells which were adhered on an Au chip to agonist stimulation was successfully observed by the reflection intensity change in the individual cell regions with the 2D-SPR imager at real-time. It was further demonstrated that the cell response in 2D-SPR imaging to agonist stimulation might be based on intracellular recruitment of signal transduction proteins such as PKC to cell membrane. Furthermore, we have found that the electro-orientation of cells such as cylinder-like cells such as fission yeast under high frequency AC electric field clearly depended on the cell viability. These results suggested future wide applications of label-free cell-based biosensing with 2D-SPR imaging method or electro-orientation observation method to drug screening, cell state evaluation, cell recognition and so on.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンシング 細胞応答 イメージング 非標識 2次元SPR 薬物作用評価 電界配向 生死判定

### 1. 研究開始当初の背景

培養動物細胞の生理活性物質や薬物に対する応答観測は、その細胞における情報変換メカニズムの解明はもちろん、細胞を用いた生理活性物質や薬物の作用評価やスクリーニングに極めて有効である。従来、こうした動物細胞の生化学的・刺激応答の観測には、Fura2などの蛍光指示薬をプローブに用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化や細胞膜電位変化を可視化・定量する方法や、刺激に応じて細胞から培養液中に放出された情報伝達物質をHPLC等で検出・定量する方法などが良く用いられているが、操作が煩雑で、時間がかかるなど、より迅速で簡便な観測・観察法が求められている。このような中、研究代表者の篠原は、神経系の株化細胞から放出される情報物質を酵素反応により発光反応に導き、リアルタイムにしかも高感度に検出する酵素発光法を開発し、細胞集団の薬物刺激応答を迅速簡便に観測評価することを可能にしてきた。

また、近年のES細胞やiPS細胞の研究進展により、再生医療の急速な進展が期待されているが、こうした多能性万能細胞を、期待するそれぞれの標的細胞に分化させるための生体因子や化学物質、環境条件の検討は、まだまだこれからである。この細胞の分化状態を調べるにも従来のような免疫染色法やmRNAの分析では、細胞が生きたまま行うことは難しい。そこで、分化に伴う薬物刺激応答性の変化を、プローブ試薬を用いることなく、単一細胞レベルで迅速簡便に観測することができれば、その観察した細胞の分化度を生きたまま容易に評価できることになり、その後その細胞をそのまま利用することも可能となると期待できる。

一方、最近、これまで抗原-抗体反応やDNAのハイブリダイゼーションの検出に用いられてきた表面プラズモン共鳴(SPR)測定法を用いて、金チップ表面に接着固定した肥満細胞(アレルギー応答に関与する免疫系細胞)を抗体感作後アレルギー刺激した際の細胞応答をSPRシグナルの変化として観測できることが明らかとなり、細胞膜の内側で起こる動的反応を観測できる見込が出てきた。しかしこれまでのSPR測定装置は、数多くの細胞の応答シグナルを合わせたものを時間的に観測することはできても、個々の細胞の応答を別々に観測することはできなかった。またすでに市販の一般的な2次元SPRイメージング装置を用いても、解像度不足から10~20 $\mu$ mの個々の細胞領域のSPRシグナル観測は不可能である。

こうした中、申請者らは、拡大レンズを装着して改良された高解像度の2次元SPRイメージング装置を用いれば、金チップ表面上に接着した種々の動物細胞の刺激応答を一個一個別々にしかも同時にSPRイメージングできるものと発想し、まず金チップ上で培養した肥満細胞のアレルギー刺激に伴う脱顆粒応答をリアルタイムにSPRイメージングで

きるかどうか実験したところ、世界で初めて、個々の肥満細胞のアレルギー応答をSPRイメージング化することに成功し、国際学会で発表するまでに至った。

さらに最近、電極基板上での動物細胞の接着性や増殖挙動、また薬物刺激に対する応答を、細胞集団が接する電極界面のインピーダンス測定により検討する研究が進み、やはりプローブ試薬の要らない細胞応答観察法として注目され、測定装置も市販されるまでになっていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を基に、第1の目的として、高解像度の2次元SPRイメージング法を用いて、一切蛍光色素や蛍光タンパク質などのプローブ分子を用いることなく、様々な生理活性物質や薬物の投与刺激に対する株化動物細胞内で起こる動的反応を単一細胞レベルでリアルタイム観察することのできる新規な細胞応答観察法を開拓し、薬物の識別、定量、さらには異種細胞の選別、細胞の分化評価などに応用できるバイオセンシング法に発展させることを目指した。

また、第2の目的として、生細胞と死細胞の細胞内誘電率の変化に着目し、培養細胞の交流電場下での配向状態を顕微鏡観察するという大変簡単な方法(電界配向法)で、染色試薬を一切用いることなくリアルタイムに生細胞と死細胞を1個1個判別し、生存率を解析できることを明らかにし、さらに薬剤の細胞への毒性作用を評価するのに応用できることを示すことを目的とした。

このような一切プローブ分子を要しない細胞の薬物刺激応答のリアルタイム観察法や細胞のリアルタイム生死判定法の開発は、今後の薬物作用スクリーニングが重要な医薬品開発分野や、細胞の分化判定が重要な細胞組織工学などの分野に大きく寄与するものと期待できる。

### 3. 研究の方法

生理活性物質や薬物による刺激によって引き起こされる細胞内反応を考慮し、神経系や内分泌系の細胞を選んだ。図1に示す高解像度の2次元SPR装置を用いて、もともと細胞を活性化することが知られている生理活性物質や薬物を投与した際の株化動物細胞の応答を観察し、従来の知見と合わせて、一体どのような細胞内の動的反応を観測することができるのかを検討した。

次いで、一個一個の細胞応答のマルチ同時観測・解析に基づく細胞膜受容体に作用するアゴニスト(活性化剤)やアンタゴニスト(阻害剤)のセンシングを試みた。また、選択的薬物応答を利用する標的細胞の選別も試みた。さらには、細胞分化に伴う受容体の発現に着目して、分化マーカーとなる受容体に対するアゴニスト刺激時のSPR応答から分化評価の可能性も検討した。

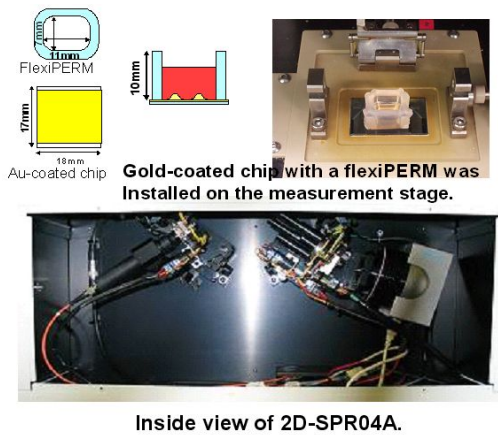


図1 2次元SPR装置による細胞応答観察系

第2の目的に対しては、交流電界下で、分裂酵母の生細胞と死細胞が印加周波数に依存して異なる配向方向を示すことを観察できるように、透明電極をごく薄いスペーサーを挟んで並行に配置し、その間に細胞懸濁液を入れて交流印加下で顕微鏡観察するシステム(図2)を開発した。さらに、抗菌薬などの分裂酵母細胞への殺菌作用をリアルタイムに評価できるか検討した

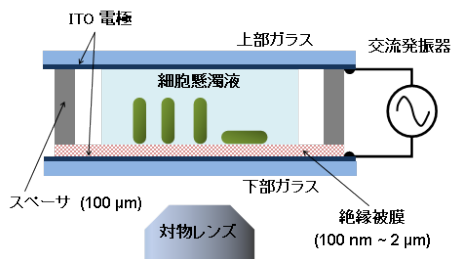


図2 交流印加下の細胞の電界配向観察系

#### 4. 研究成果

3年度に渡り、掲げた目的に対応して、十分な研究成果を上げることができた。

##### 【平成23年度】

免疫系細胞株の薬物刺激応答の2次元SPRイメージング観察を実現した。

免疫系細胞株として、ラットの肥満細胞モデルであるRBL-2H3細胞を用い、IgE刺激や、IgE感作後の抗原刺激を行い、その細胞応答を2次元SPRイメージャーで観察した。その結果、細胞領域の反射強度がIgEや抗原の濃度に依存して増加し、従来法よりも迅速、簡便でしかも検出限界も勝る抗体や抗原のセンシングが可能であることを示せた。また、内分泌系細胞株として、ラットの副腎髄質由来褐色腫瘍細胞であるPC12細胞を用い、そのK<sup>+</sup>刺激応答を2次元SPR観察の反射光強度の増加として、しかも個々の細胞ごとに観察できることを示し、応答強度や細胞の応答率から、刺激薬物のセンシングが可能であることを明らかにできた。

2次元SPRイメージングで可視化される

細胞内反応へのPKCの関与を明らかにした。

薬物刺激によって細胞内で引き起こされるPKC(プロテインキナーゼC)の細胞膜近傍へのトランスロケーションに着目し、RBL-2H3細胞、PC12細胞いずれもPKCを直接活性化するホルボールエステルでの刺激を試みた。その結果、確かにほとんどの細胞領域で予期した反射光強度のゆっくりとした上昇が観察された。また、PKC阻害剤であるスタウロsporinで前処理をしておく、ホルボールエステル刺激による細胞領域の反射光強度の増加が大きく抑制されることも明らかにできた。2次元SPRは金チップ上に接着した細胞内でのPKCの細胞質から底面の細胞膜近傍へのトランスロケーションを観ている可能性が大きく支持された。

インピーダンス測定により非染色で細胞生存率の簡便評価が可能であることを示した。

酵母をモデル真核細胞として用い、平板電極間でのインピーダンス測定により、培養液に懸濁した細胞のキャパシタンスを測定したところ、細胞生存率との相関が明らかとなり、非染色で細胞の生死評価に応用できる可能性が示せた。

##### 【平成24年度】

内分泌系動物細胞株で、ラット副腎髄質褐色腫瘍細胞由来のPC12細胞を用いて、その細胞膜上のニコチン性アセチルコリン受容体あるいはムスカリン性アセチルコリン受容体に対するアゴニストで刺激した際の細胞応答を2次元SPRで個々の細胞ごとに観察できることを示した。図3に観測例を示すが、その応答強度の変化や細胞の応答率から、蛍光試薬などのプローブを一切用いることなく、それらの薬物の迅速で簡便な検出、定量が可能であることを明らかにした。また受容体アンタゴニストの存在下では、アゴニスト刺激によるSPR応答の抑制が観察され、アゴニストの作用評価への応用も可能であることが示された。

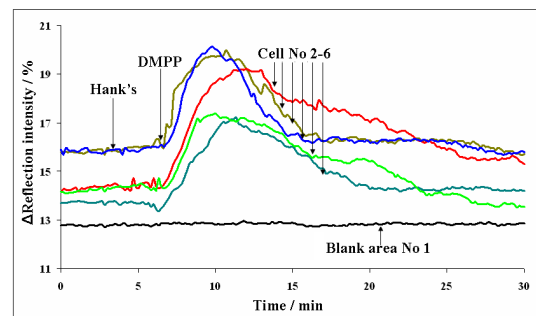


図3 薬物刺激時の細胞のSPR応答の観測例：nACh受容体アゴニストであるDMPPで刺激した際の2次元SPRイメージング観察した個々のPC12細胞の反射光強度(SPR応答)の変化

また、上記の2次元SPRイメージングで可視化される薬物刺激に伴う細胞内反応としてプロテインキナーゼC(PKC)の細胞膜近傍へのトランスロケーションに着目し、PKC阻害剤共存下では、薬物刺激応答が抑制される結果

から、SPR応答観察原理としてやはりPKCを始めとする情報伝達タンパク質のトランスロケーションの関与が極めて高いことを明らかにできた。

平板電極間に長短比の大きな(楕円状の)分裂酵母の懸濁液を入れ、交流電界を印加した場合、高周波(5MHz以上)では生細胞は電界に平行に配向するが、死細胞は平行な配向を取れないことから、これも全く新規なプローブ分子を要しないシンプルな培養細胞の生死判定法となることを発明した(特許出願)。

また、抗真菌薬を投与後の細胞の生死判定を電界配向状態より簡便にモニターできることを示すことができ、その細胞生存率と細胞の配向率との相関から、培養細胞系での非標識での薬物作用評価法として応用できることを明らかにした。

さらに、デジタルホログラフィック顕微鏡を用いる動物細胞の精密な形態観察、特に細胞高さの簡便精密観測により受容体アゴニストの検出や定量に応用できる可能性を示した。この方法も全く新しい、しかもプローブ試薬を必要としない簡便な薬物作用評価法として期待できる。

#### 【平成25年度】

神経系細胞株としてラットグリオーマ由来のC6細胞を用い、また、神経内分泌系の株化細胞として、ラット下垂体腫瘍由来のGH3細胞を用いて、その細胞膜受容体に対するアゴニスト刺激した際の細胞内反応を2次元SPRイメージング観測した。グルタミン酸受容体に対するアゴニストのセンシング、また、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)のセンシングを2次元SPR応答の観察から実現できた。またこれらのSPR応答にも、PKCのトランスロケーションの関与が示された。

また、GH3細胞と異種細胞を混合した共培養系で、TRH刺激時の細胞応答をSPR観察することにより、GH3細胞を選択的に識別できることを示せた。

さらに、NGF添加に伴うPC12細胞の末梢神経様細胞への分化の進行をムスカリン刺激時のSPR応答の増加から評価できる可能性を示し、非侵襲の新しい分化評価法として応用できる可能性を示せた。

分裂酵母以外にも長短比の大きな乳酸菌などの微生物細胞について、高周波域での電界配向観察により、生死判定を実現できることが示せた。蛍光試薬等を一切用いないで、簡便、迅速に生細胞を選別してそのまま利用できる道を開けたと考えている。

以上の研究成果より、研究課題名の通り、プローブ分子を一切用いることなく、リアルタイムに細胞内タンパク質移動や細胞配向を観察する方法を開発することができ、生理活性物質や薬物、毒物の簡便で、検出能の高いバイオセンシングを実現できた。今後、そのメリットを活かした新規な細胞の生死判

定法、活性評価法、細胞選別法、分化評価法などとして一層発展を図る計画である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件、うち査読有は4件)

M. Horii, H. Shinohara, Y. Iribe, M. Suzuki, Mammalian cell-based drug sensor using 2D-SPR imager, *Analyst*, **136**, 2706-2711 (2011). 査読有

T. A. Mir, H. Shinohara, Label-free observation of three-dimensional morphology change of a single PC12 cell by digital holographic microscopy, *Analytical Biochemistry*, **429**, 53-57 (2012). 査読有

篠原 寛明, 薛 騏晟, ミーア タンベール アハマド, 2次元SPRセンサを用いた細胞応答観察による薬物センシング, *Chemical Sensors*, 29, Supplement A, No.39 (2013). 査読無

T. A. Mir, H. Shinohara, Two-dimensional surface plasmon resonance imager: An approach to study neuronal differentiation, *Anal. Biochem.*, **443**(1), 46-51(2013). 査読有

H. Shinohara, Y. Sakai, T.A. Mir, Real-time monitoring of intracellular signal transduction in PC12 cells by two-dimensional surface plasmon resonance imager, *Anal. Biochem.* **441**(2), 185-189. (2013). 査読有

薛 騏晟, 藤井正喜, 篠原寛明, PC12細胞のFRET観察とSPRイメージングによる刺激薬物のセンシング, *Chemical Sensors*, 29, Supplement B, No.16 (2013). 査読無

薛 騏晟, 須加 実, 篠原寛明, C6グリオーマ細胞のSPRイメージングによるグルタミン酸受容体アゴニストのセンシング, *Chemical Sensors*, 30, Supplement A, No.11 (2014). 査読無

〔学会発表〕(計18件、うち国際会議発表7件)

H. Shinohara, S. Demura, Y. Sakai, T. A. Mir, Cell-based biosensing with a 2D-surface plasmon resonance imager for drug assessment, 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日, 横浜市.

H. Shinohara, Reagent-less observation of intracellular event for drug screening, Mini-Basel-Toyama Meeting on Pharma Technology, 2011年9月21日, Basel, Switzerland. 招待講演

T. A. Mir, S. Demura, Y. Sakai, H. Shinohara, Mammalian cell-based drug sensor using 2D-SPR imager, 9<sup>th</sup> Asian Conference on Chemical Sensors, 2011年11月16日, Taipei, Taiwan.

薛 騏晟, 篠原寛明, Mir Tanveer Ahmad 須加 実, Yellow Cameleon発現PC12細胞のFRET観察によるアセチルコリン受容体アゴニストのセンシング, 電気化学会第79回大会, 2012年3月29日, 浜松市.



H. Shinohara, Novel cell-based biosensing with 2D-SPR imager, The 14th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS 2012), 2012年5月21日, Nuremberg, Germany.招待講演

T. A. Mir and H. Shinohara, Real-Time Monitoring of Cell Response to Drug Stimulation by 2D-SPR Sensor: An Approach to Study Neuronal Differentiation, The 14th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS 2012), 2012年5月21日, Nuremberg, Germany.

H. Shinohara and T. A. Mir, Label-free cell-based 2D-SPR biosensor for drug assessment, BioValley Science Day /Basel-Toyama Symposium 2012, 2012年09月25日, Basel, Switzerland.

M. Suga, A. Kunimoto and H. Shinohara, Evaluation of antifungal drug to fission yeast cells by electro-orientation method, BioValley Science Day /Basel-Toyama Symposium 2012, 2012年9月25日, Basel, Switzerland. 優秀ポスター賞

篠原寛明, 薛 騏晟, ミーア タンピール アハマド, 2次元SPRセンサを用いた細胞応答観察による薬物センシング, 第54回化学センサ研究発表会, 2013年3月31日, 仙台市.

薛 騏晟, 篠原寛明, Mir Tanveer Ahamd, デジタルホログラフィック顕微鏡を用いたPC12細胞の3D形態変化観察による刺激薬物のセンシング, 第54回化学センサ研究発表会, 2013年3月29日, 仙台市.

篠原寛明, 細胞内反応の非標識イメージング技術と薬物作用評価への応用, 日本動物細胞工学会2013, 7月18日, 福井. 招待講演

薛 騏晟, 藤井正喜, 篠原寛明, PC12細胞のFRET観察とSPRイメージングによる刺激薬物のセンシング, 第55回化学センサ研究発表会, 2013年9月27日, 目黒区.

須加 実, 国本 彩, 羽田ゆかり, 篠原寛明, 分裂酵母細胞への電界配向を用いたリアルタイム殺菌作用評価, 2013年電気化学学会秋季大会, 2013年9月28日, 目黒区.

羽田ゆかり, 須加 実, 篠原寛明, 電界配向を用いた乳酸桿菌の生死判定システムの開発, 2013年電気化学学会秋季大会, 2013年9月28日, 目黒区.

曹 弦, 篠原寛明, 2次元SPRセンサによる細胞の薬物刺激応答と異種細胞識別, 2013年電気化学学会秋季大会, 2013年9月28日, 目黒区.

Q. Xue, H. Shinohara, Sensing of glutamate receptor agonist by 2D-SPR imaging of individual cell response of C6 glioma cells, 10<sup>th</sup> Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2013), 2013年11月12日, Chiang Mai, Thailand.

須加 実, 大上健太, 高安勇吉, 山崎登志成, 篠原寛明, 絶縁被覆ITO電極を用いた電界配向による分裂酵母菌細胞の高精度生

死判定システムの開発, 第81回電気化学学会, 2014年3月29日, 吹田市.

薛 騏晟, 須加 実, 篠原寛明, C6グリオーマ細胞のSPRイメージングによるグルタミン酸受容体アゴニストのセンシング, 第56回化学センサ研究発表会, 2014年3月29日, 吹田市.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: 非球体細胞の生死活性判定方法及び判定装置

発明者: 須加 実, 篠原寛明

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2011 - 281386

出願年月日: 2011年12月22日

国内外の別: 国内

名称: 非球体細胞の高精度生死活性判定方法及び判定装置

発明者: 須加 実, 篠原寛明

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2014 - 028602

出願年月日: 2014年02月17日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://evaweb.u-toyama.ac.jp/html/290\\_ja.html](http://evaweb.u-toyama.ac.jp/html/290_ja.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠原 寛明 (SHINOHARA Hiroaki)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号: 6017887

### (2) 連携研究者

須加 実 (SUGA Minoru)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・助教

研究者番号: 10262502