

平成30年6月19日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03901

研究課題名（和文）ハイスループット細胞機能発現制御を実現する超並列デジタル細胞処理システムの開発

研究課題名（英文）Development of Massively Parallel Single-Cell Processing System for Regulation of Cellular Functions with High Throughput

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） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の機能発現過程を迅速かつ高効率に制御するための“超並列デジタル細胞処理システム”の実現を目的とし、要素技術として重要となる細胞内デリバリー技術および細胞内生体分子イメージング技術を開発した。振動援用による細胞膜穿孔および電場駆動力によるDNA導入技術によって、高効率・低侵襲な細胞内デリバリーを実現した。また、超並列な細胞操作に必要な自動調心機能付きマイクロチャンバレイを開発し、その有用性を実証した。さらに、チップ増強ラマン分光法（TERS）によって細胞内の生体分子の可視化が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：With the aim of developing an effective platform for the high-throughput cell-processing system for regulation of cellular functions at the single-cell level, we propose a novel electrokinetic intracellular delivery method for DNA molecules into living cells and combined it with a vibration-assisted insertion method for penetrating the cell membrane to reduce cell damage. We also developed a microchamber array for cell arrangement with automatic alignment required for massively parallel manipulation of individual cells. Moreover, we demonstrated that intracellular imaging of biological molecules was successfully achieved by employing atomic force microscopy (AFM)-based tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS).

研究分野：MEMS，マイクロ・ナノ加工

キーワード：細胞機能発現制御 細胞処理システム 細胞内デリバリー バイオMEMS

1. 研究開始当初の背景

「健康・安心な理想社会」の実現には、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、生命の本質、すなわち「システムとしての生命」の理解が不可欠であり、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、真の意味で「細胞・生命プログラム」の理解を通じた生命現象を統合的に理解するためには、体外 (*in vitro*) において3次元組織を再構築し、より実際の組織・臓器に近い状態(環境・機能)での機能発現のメカニズムを解明することが極めて重要な課題となっている。このためには、3次元組織(細胞システム)の形成に有用な多量の細胞(人為的な機能設計を行った細胞群)を高い選択性をもって提供する技術の確立が、生命科学の発展における極めて重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、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創出を支援するキーテクノロジーとして、MEMS技術によって作製した中空構造を有するSiO₂製ナノニードルアレイを細胞操作・計測用プローブとして利用することで、細胞内への生体分子などの超並列・低侵襲デリバリーと、機能発現過程を可視化(細胞内で発現した生体分子の同定)する多点同時計測チップ増強ラマン分光(TERS)イメージングの機能を実現し、人為的な機能設計(生化学的処理)を行った細胞群を高い選択性をもって提供するシステムの開発を目的として実施した。

3. 研究の方法

図1に本研究で提案する超並列デジタル細胞処理システムの概略図を示す。中空構造を有するSiO₂製の段付きナノニードルアレイ

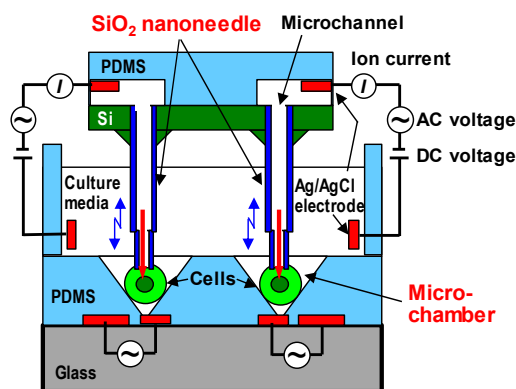


図1 超並列デジタル細胞処理システム

と細胞を正確な位置に配置するための細胞配列用の自動調心機能付きマイクロチャンバアレイからなる。ナノニードルアレイによって、多数の細胞へ超並列的に生体分子をデリバリーするためには、ニードルのピッチと個々の細胞の中心位置を厳密に一致させる必要がある。このため、マイクロチャンバを四角錐の凹形状とすることで、細胞を常にチャンバ中心位置に自動的に配置(自動調心機能)できるようになっている。また、チャンバ下部に形成した電極対にAC電圧を印加することで、細胞膜穿孔時に必要となる細胞の保持力(誘電泳動力)を得ることができる。これによって、超並列的な細胞操作が可能となり、人為的な機能設計を行った細胞群の量産技術が実現できる。

4. 研究成果

(1) 細胞機能発現制御技術

図2に細胞内デリバリーの基礎実験のために作製した装置の概略図を示す。3軸ピエゾステージ(PI製 NanoCube)と市販の制御ソフト(LabVIEW)を用いて測定系を構築した。また、ガラスピペット内と培養容器内に配置したAg/AgCl電極(直径0.2mm)間に流れる微弱なイオン電流は、超高速電圧変換アンプ(ケスレー製428-PROG)を用いて増幅した。なお、本装置は倒立顕微鏡(ニコンTE2000U)上に設置して使用した。穿刺実験には、HeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来細胞株)を使用した。酸素プラズマ処理(30s)を行ったカバーガラス上に細胞を播種し、培養液(MEM+10%FBS)中で3~5日培養した。なお、穿刺実験の際には、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を満たした培養容器(PDMSチャンバー)内に細胞を設置して行った。また、本実験では、細胞内へDNAを導入するために、ピペット内には、蛍光標識DNA(塩基長19bp)をTEバッファで溶解し40μMとしたものを充填した。

図3に細胞への穿刺過程におけるイオン電流値の変化を示す。実験手順は、ガラスピペット(内径420nm)を28nm/step(68nm/s)でHeLa細胞に接近させ、イオン電流(印加電圧350mV)がある程度の値まで減少した位置で一旦停止させた後、所定の振動条件(振幅200nm一定)でピペットを励振させ30s保持し、再び退避させた。図(a)および(b)はそれぞれ振動条件20Hz、1kHzでのイオン電流の変化である。ピペット停止位置での細

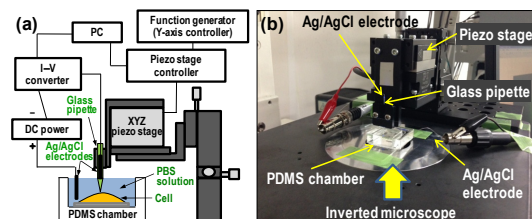


図2 細胞内デリバリー基礎実験装置

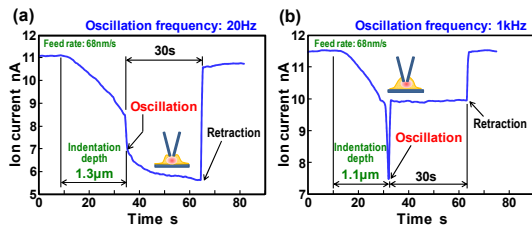


図3 細胞膜穿孔時のイオン電流の変化

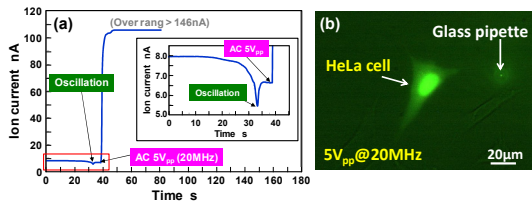


図4 電場駆動力による細胞内へのDNAデリバリー

胞への押し込み量はいずれも $1\mu\text{m}$ 程度である。図から、 20Hz の振動では電流値の変化は認められない。一方、 1kHz とするとイオン電流の値が急激に上昇した。これは、ピペット先端を覆っていた細胞膜が穿孔されたことで、ピペット抵抗が減少したためである。このように、高い周波数での振動援用によって細胞の粘性抵抗が増加し、細胞膜の容易な穿孔が可能になることが実証された。

振動援用の有無による細胞膜の穿孔確率を評価した。その結果、振動周波数が小さい場合 (20Hz) には細胞膜を穿孔することができなかった。一方、 1kHz の場合には、穿孔確率は 77% ($36/47$) と大幅に向上した。このように、押し込み量 $1\mu\text{m}$ 程度の状態で、わずか 200nm (PP) の振動振幅を与えるだけで、高い確率での細胞膜穿孔が可能となった。さらに、穿孔後の細胞の生存確率は 100% ($6/6$) となり、振動援用によって細胞膜の損傷が低減され、低侵襲での膜穿孔が可能となった。

図4に細胞膜穿孔後にAC電圧 (20MHz , $5V_{pp}$) を印加して細胞内にDNAを導入 (電気泳動) した結果を示す。図(a)のイオン電流の変化から、AC電圧印加によって電流が急激に上昇し、その後は一定値を示すことがわかった。一方、DC $5V$ 印加の場合には、電圧印加直後には電流は増加するが、その後急激に減少する結果となった。図(b)に細胞の様子 (蛍光観察) を示す。このように、AC電圧を印加することで、細胞内へのDNA導入に成功した。ただし、現状ではDNA導入確率は 50% ($16/32$) と十分とは言えず、その原因を精査し、さらなる改善を図る。

以上の結果から、振動を援用することで効率的に細胞膜の穿孔が可能であり、かつ細胞へのダメージの大幅な軽減が図れる技術を確認した。また、イオン電流の変化をモニタリングすることで、細胞膜穿孔の瞬間をインプロセスで捉えることができる。このため、電流変化をフィードバック信号に利用すれば、穿孔操作の自動化を図ることができる。

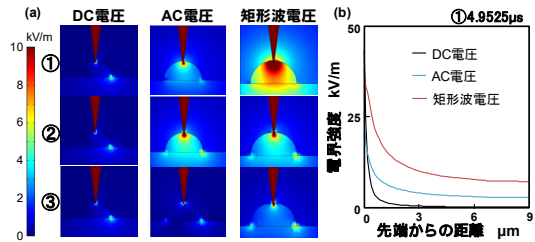


図5 細胞内の電界強度分布のシミュレーション

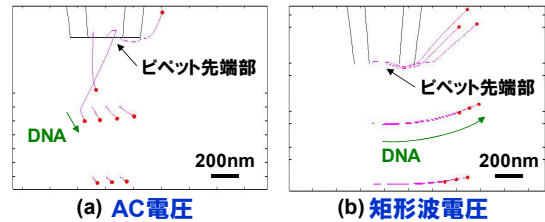


図6 電場駆動力によるDNAの泳動挙動解析

有限要素解析法 (COMSOL Multiphysics) によって細胞膜穿孔時のピペット先端近傍の電界強度分布を解析し、細胞への生体分子導入過程における電圧印加方式の影響を検討した。マイクロチャンバ ($1\text{mm} \times 6\text{mm}$ 程度) 内にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を充填し、直径 $20\mu\text{m}$ (半球状) の細胞 (細胞膜厚さ: 7nm) を配置したモデル (3次元解析モデル) とした。また、TEバッファを充填したガラスピペット (先端開口部の内径 250nm , 外径 500nm , テーパー角 9°) を細胞に $1\mu\text{m}$ の深さまで穿孔した状態としている。さらに、PBS溶液内にAg対向電極 (接地) を浸漬し、ピペット側に電圧を印加した。

図5に細胞内部の電界強度分布の解析結果を示す。定常状態での比較を行うため、電圧印加後の100周期目 (解析時刻: $4.9525\mu\text{s}$, $4.9625\mu\text{s}$, $4.9725\mu\text{s}$) の解析結果を示している。図(a)の電界強度のコンター図から、DC電圧 ($5V$) を印加した場合には、絶縁体の細胞膜に覆われているため、ピペット先端部での電圧降下が大きくなっている。図(b)にピペット先端からの距離と電界強度の関係を示す。DC電圧印加と比べてAC電圧印加の場合には、ピペット先端からの電界強度の拡がりが大きくなっている。さらに、矩形波電圧を印加した場合には、AC電圧印加に比べてより改善されていることがわかる。特に、電圧印加直後 (解析時刻 に対応) の急激な電圧の変化によって、細胞内の電界強度分布に両者で大きな差異が生じている。また、電圧波形1周期内での電圧降下も若干ではあるが抑制されている。

図6は電場駆動力 (電気泳動) による細胞内でのDNAの泳動軌跡を解析した結果 (電圧印加後 1ms) である。解析モデルは図5と同様とし、DNAの初期位置をピペット先端から下方に $0, 0.5, 1\mu\text{m}$ 離れた位置 (横方向の間隔 100nm) として運動の軌跡を追跡した。ただし、解析時間の都合により、今回は

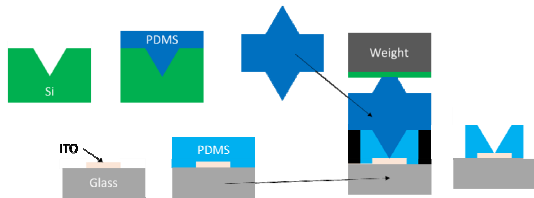


図7 マイクロチャンバレイの作製プロセス

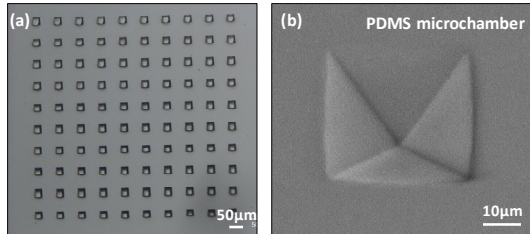


図8 自動調心機能付きマイクロチャンバレイ

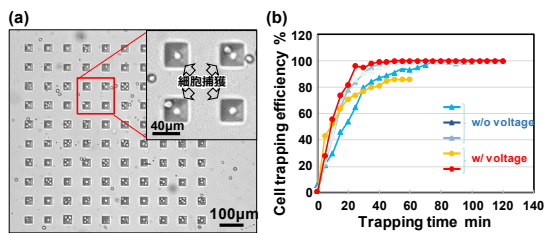


図9 HeLa細胞の捕獲実験

ACおよび矩形波電圧の周波数を100kHz(時間ステップ0.5µs)として解析を行い比較した。また、DNAの電気泳動移動度は $3.0 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ の値を使用した。図から、DNAは電界強度が強くなるAg対向電極の方向(図の右方向)に移動している様子が見られる。また、ピペット先端から離れるほど泳動距離が短くなっていることもわかる。総移動距離は、AC電圧で70~530nm、矩形波電圧で600~850nmとなっており、AC電場駆動力に比べて、矩形波電圧を印加する方が導入効率の向上が期待できる結果となった。加えて、矩形波電圧のデューティファクターを現状の値(50%)よりも大きくすることで、さらなる高効率化が期待できる結果と言える。

図7に自動調心機能付きマイクロチャンバレイの作製プロセスを示す。まず、単結晶Si(100)基板(25mm角)に水酸化カリウム(KOH)を用いた異方性エッチングによって四角錐形状の凹部を形成し、Siモールドを作製する。次に、PDMSを転写することで、凸形状の四角錐形状を有するPDMSモールドを作製する。ITO電極(膜厚200nm@ガラス基板)は、フォトリソをマスクとし、塩酸によってパターニングした。最後に、厚さ0.02mmのフィルターテープ(SK焼入鋼)をスペーサとして用い、ITO電極パターンの所定の位置にPDMSモールドを転写(荷重540g)することで、PDMSマイクロチャンバレイを作製した。図8に作製したマイクロチャンバレイ(10×10、ピッチ80µm)の一例を示す。図のように四角錐形状の頂点および稜線が明瞭に認められる。Siモールド

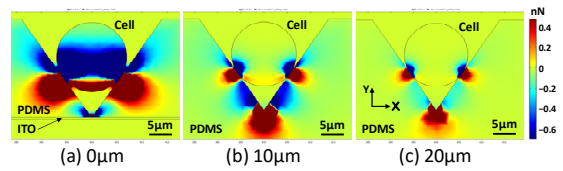
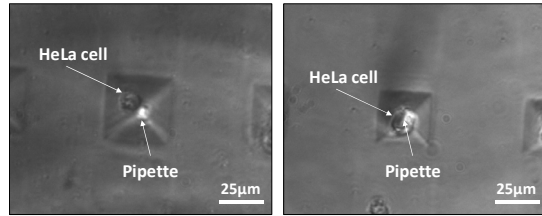


図10 誘電泳動力(保持力)の解析結果



(a) 誘電泳動力なし (b) 誘電泳動力あり

図11 細胞膜穿孔実験(誘電泳動力の有無)

に対するPDMSチャンバ幅方向の転写精度は $3.9 \pm 1.7\%$ ($n=900$)と良好であった。

図9(a)にHeLa細胞の捕獲実験の結果を示す。チャンパ中心に対する細胞の中心位置のずれ量は $1.7 \pm 0.7\mu\text{m}$ ($n=127$)と高い位置決め精度が得られた。図(a)に100個のチャンバに対する細胞の捕獲率の時間変化を示す。誘電泳動の有無による差異は認められなかった。これは、チャンバに近い領域でのみ捕獲に有効な大きさの誘電泳動力が作用しているためと考えられる。図のように、細胞懸濁液滴下後40min程度で90%以上の捕獲率が得られた。しかし、チャンバ内には複数個の細胞が捕獲されており、単一細胞の捕獲率は20%程度と低い値となった。チャンバの大きさを最適化するなど今後対策を行う。

マイクロチャンバレイに作用する誘電泳動力を有限要素法(COMSOL)によって解析した。解析モデルは、5個のマイクロチャンバ(開口幅28µm、深さ20µm)をピッチ80µmで配置した単純な2次元解析モデルとした。印加したAC電圧は実験と同様に電圧±10V、周波数500kHzとした。図10に誘電泳動力のコンター図を示す。マイクロチャンバの底部(頂点位置)からITO電極までの距離を0, 10, 20µmとし、その影響を調査した。図から、PDMSチャンバと細胞(直径14µm)が接触している部分で誘電泳動力が最も大きくなっていることがわかる。また、ITO電極との距離が増加するとともに誘電泳動力が急激に減少することがわかった。距離0µm(細胞がITO電極に最も近い条件)で最大220nNの誘電泳動力(細胞の保持力)が得られることがわかった。

細胞内へのDNAデリバリーを想定して、ガラスピペット(内径1.2µm、外径2.0µm)を用いて穿孔実験を行なった。なお、細胞膜穿孔時にはピペットを振動(200nm@1kHz)させた。図11に実験結果の一例を示す。電圧印加なしの場合(図(a))には、ピペット先端が細胞に接触すると横方向に移動して穿孔が行えなかった。一方、電圧を印加した場合(図(b))には、誘電泳動力によって保持力

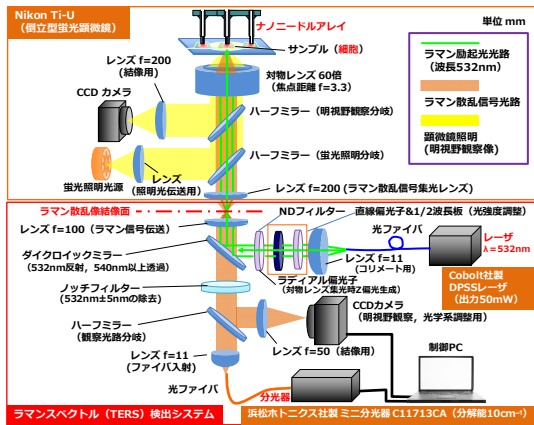


図 12 倒立顕微鏡組込み型チップ増強ラマン分光光学系の概略図

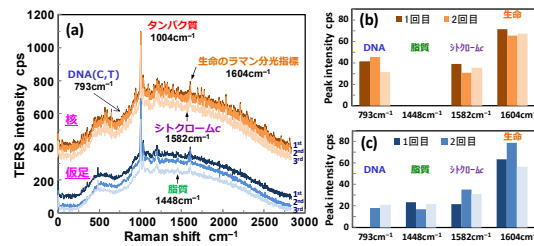


図 13 細胞内 TERS イメージング (核 vs 仮足)

が作用し、細胞膜穿孔が可能となった。以上の結果から、誘電泳動力を利用することで、未接着細胞においても細胞膜の穿孔に必要な十分な保持力が得られることを確認した。基礎的検討として、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬 (蛍光試薬 Fluo 3-AM) を用いて、誘電泳動による細胞配列過程における電場ストレス応答を調査した。その結果、細胞膜に作用する電界強度が $800kV/m$ 以上でストレスが誘起され、細胞死に至ることがわかった。一方、流体中を泳動 ($\sim 70\mu m/s$) する細胞にはストレスが誘起されないことも明らかとなった。

(2) 細胞機能発現可視化技術

生化学的処理 (遺伝子導入など) を施した細胞の機能発現スクリーニングを実現するために、チップ増強ラマン分光法 (TERS) による細胞内の生体分子ダイナミクス観察の基礎的検討を行った。図 12 に倒立顕微鏡に組み込み可能な自作のラマン分光装置の光学系の模式図を示す。励起光源には、波長 $532nm$ の Cobolt 社製半導体励起固体レーザー (出力 $50mW$) を使用し、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, $NA 0.7$) によってナノニードル先端部に集光する。また、細胞 (ニードル先端の極近傍) 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 ($532 \pm 5nm$) 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 $10cm^{-1}$) に導入する光学系となっている。

図 13(a) に細胞内 TERS スペクトルの測定結果を示す。励起光のレーザー出力を $50mW$ に

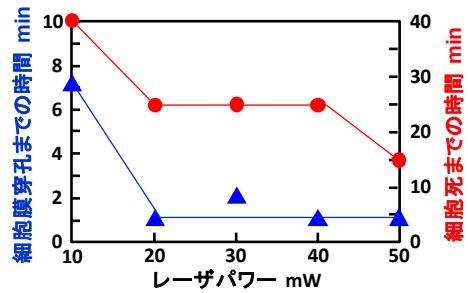
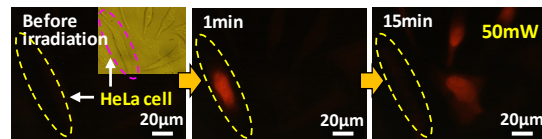


図 14 レーザパワーと細胞損傷との関係

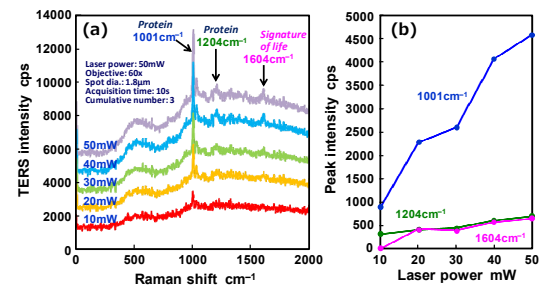


図 15 レーザパワーとラマンピーク強度の関係

設定し、露光時間 $10s$ 、積算回数 3 回とした。なお、本実験では、基礎的検討として、ナノニードルの代わりに市販の AFM プロブに Ag を $30nm$ 成膜 (平均粒子 $60nm$) したものを計測用ツールとして使用した。図から、細胞内に存在するタンパク質 ($1004cm^{-1}$)、DNA ($793cm^{-1}$) および脂質 ($1448cm^{-1}$) に起因するピークが明瞭に認められていることがわかる。さらに、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 ($1582cm^{-1}$) に起因するスペクトルや、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” ($1604cm^{-1}$) と呼ばれる特徴的なピークも観察された。図(b)および(c)は、同一の細胞の細胞核および葉状仮足から取得したラマンスペクトル (ピーク強度) を定量的に比較した結果である。図から、シトクロム c および生命のラマン分光指標については両者で大きな差異は認められない。一方、DNA に起因するピークは細胞核で強く現れ、仮足では弱いことがわかる。さらに、脂質については、細胞核ではピークが認められず、両者の差異が明瞭に観察できていることがわかる。細胞へ与えるダメージを評価するために、レーザーパワーを変化させたときの細胞の状態を観察した。細胞の生死判別には、赤色蛍光を発する核酸染色色素 (PI: Propidium iodide, $4\mu M$) を用いた。PI は細胞膜を不透過であるため、物理的に細孔が形成された場合のみ細胞が赤色蛍光を発することになる。図 14 の写真 (蛍光像) はレーザーパワー $50mW$ ($2.0MW/cm^2$) で HeLa 細胞に照射した際の

様子である。レーザ照射後 1min で細胞が赤く発色しており、細胞膜が穿孔され PI が取り込まれたことがわかる。一方、15min 後には赤色蛍光が認められなくなった。これは、細胞膜が大きく損傷して細胞が死滅したためである。グラフは細胞膜穿孔()および細胞死に至るレーザ照射時間()の関係である。図から、10mW の条件では細胞へのダメージが低減できることがわかる。

図 15 に示すように、ピーク強度はレーザパワーに比例して増加することがわかった。最もピーク強度が大きいタンパク質(1001 cm^{-1})に起因するのスペクトルに着目すると、10mW の条件でも明瞭なピークが観察される。一方、ピーク強度が小さい“生命のラマン分光指標”(1604 cm^{-1})を検出するためには、最低でも 20mW が必要であることがわかった。そこで、ラマン分光装置の対物レンズ(60 倍, NA 0.7)を開口径数(NA)の大きな水浸対物レンズ(60 倍, NA 1.2)に変更してスペクトルの検出感度を評価した。その結果、ピーク強度が 2.0~2.7 倍程度まで大幅に向上することがわかり、低侵襲でのイメージング(10mW 以下)が可能となった。

(3) まとめ

本研究では、迅速かつ高効率な細胞機能発現制御技術を実現するための“超並列デジタル細胞処理システム”の開発を目的とし、要素技術として重要となる超並列・低侵襲細胞内デリバリー技術(細胞機能発現制御技術)および細胞内 TERS イメージング技術(細胞機能発現可視化技術)の基礎的検討を行った。前者においては、電場駆動力および振動を援用することで、高効率・低侵襲な細胞内デリバリーの可能性を実証した。また、超並列操作を実現するための自動調心機能付きマイクロチャンバアレイの作製プロセスを確立し、その有効性を実証した。後者においては、チップ増強ラマン分光法(TERS)によって細胞内生体分子の可視化が行えることを実験的に明らかにした。さらに、顕微ラマン分光装置の高感度化を行い、細胞へのダメージを低減したイメージングが可能となった。今後の展望としては、本研究で開発した要素技術を統合し、提案する超並列デジタル細胞処理システム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 2 件)

T. Shibata, T. Ozawa, Y. Ito, K. Yamamoto, M. Nagai, Minimally Invasive Intracellular Delivery Based on Electrokinetic Forces Combined with Vibration-Assisted Cell Membrane Perforation, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 56, 1, 017001 (7pp), 2017.

<https://doi.org/10.7567/JJAP.56.017001>
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 21 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.

小笠原広大, 吉井恭祐, 永井萌土, 沼野利佳, 柴田隆行, 電場駆動力を利用した生体分子の細胞内デリバリー技術の開発(第 8 報) - 細胞配列用マイクロチャンバを用いた DNA 導入実験 -, 2017 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2017.

山本圭太, 永井萌土, 沼野利佳, 柴田隆行, 電場駆動力を利用した生体分子の細胞内デリバリー技術の開発(第 7 報) - 自動調心機能付き細胞配列用マイクロチャンバアレイの評価 -, 2017 年度精密工学会春季大会学術講演会, 2017.

石原昌季, 吉井恭祐, 永井萌土, 柴田隆行, オンチップ細胞機能制御のための圧電駆動型マイクロ細胞培養デバイスの開発(第 6 報) - 誘電泳動を利用した細胞配列過程における電場誘導ストレスの影響 -, 2017 年度精密工学会春季大会学術講演会, 2017.

K. Yamamoto, M. Nagai, R. Numano, T. Shibata, Development of Cell-processing System for On-chip Regulation of Cellular Functions, The 42nd International Conference on Micro and Nano Engineering 2016 (MNE 2016), Vienna, Austria, 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：1 0 2 3 5 5 7 5

(2)研究分担者

沼野 利佳 (NUMANO, Rika)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：3 0 4 6 2 7 1 6

(3)連携研究者

永井 萌土 (NAGAI, Moeto)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：0 0 5 8 0 5 5 7