

令和元年6月19日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06074

研究課題名（和文）超並列単一細胞操作技術に基づく均一・安定細胞集団構築システムの開発

研究課題名（英文）Establishing Systems to Obtain Uniform and Stable Cell Population Based on Massively Parallel Manipulation of Single Cells

研究代表者

永井 萌土（Nagai, Moeto）

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：00580557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,400,000円

研究成果の概要（和文）：超並列の細胞核内デリバリー技術の開発を進め、細胞穿孔に必要な光学システムを構築した。Ti基板上に細胞を培養し、ナノ秒パルスレーザーを照射し、フォトアブレーションによる衝撃波を発生させた。開発した光学システムを用いて、細胞の生死判別とタイムラプス観察を行えるようにした。細胞ピックアップツールとしての、誘電泳動プローブアレイの開発に成功した。個々のプローブを個別に制御するための電極配線プロセスとマイクロウェルへの細胞操作に対応するための3次元プローブアレイの作製プロセスを開発した。また誘電泳動力を発生させて、並列的な細胞操作も実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した光照射光学系と光穿孔法は、低侵襲かつ高い効率でのトランスフェクションにつながる。さらに誘電泳動プローブアレイは、狙った細胞の選別につながる。これらの開発した技術を統合し、時系列で発現が安定な細胞を構築する技術が創出される。微細加工技術を利用した構造作製ならびにマイクロ・ナノメカトロニクス技術を元にした操作・観察を複合活用して、複数の単一細胞を処理して医学・生物学に貢献する新しい学術基盤が構築できる。

本研究の技術・システムは、基礎的な細胞構築方法を提供し、遺伝子組換え細胞を利用した広い科学技術と産業を活性化する。バイオ医薬品、iPS細胞を用いた再生医療・細胞医療の社会での普及に寄与する。

研究成果の概要（英文）：We have advanced the development of the massively parallel intranuclear delivery technology, and we established an optical system necessary for cell poration. Cells were cultured on a Ti substrate and irradiated with nanosecond pulsed laser to generate shock waves by photo-ablation. With the developed optical system, we carried out a cell viability assay and time lapse observation of irradiated cells.

The research team developed dielectrophoretic probe array as a cell pickup tool successfully. We have developed an electrode wiring process to control individual probes individually and a fabrication process of a three-dimensional probe array for cell manipulation into microwells. Parallel cell manipulation was demonstrated by generating dielectrophoretic forces.

研究分野：マイクロ・ナノロボティクス

キーワード：超並列単一細胞操作 ナノ秒レーザー 誘電泳動プローブアレイ 誘電泳動力 レーザ誘起衝撃波 光照射 DMD 光硬化性ゲル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

治療困難な疾患へのバイオ医薬品の普及、機能の失われた生体組織への iPS 細胞を用いた再生医療、細胞治療の産業化が期待される。これらには遺伝子組換えを中心とした技術で細胞を加工し、培養して用いる。例えば、再生医療では皮膚の細胞を取り出し、遺伝子導入で iPS 細胞を作製して、移植用の 10^4 個の網膜細胞からなるシートに加工培養される。生体内移植には、目的外の細胞を 10 細胞以下のレベルに減らす高い安全性が求められることから、1 人の治療には 10 ヶ月と数千万円の費用を要し、普及には課題がある。

大きな原因は、加工初期段階の細胞の品質にある。問題は、(1)皮膚細胞から iPS 細胞の作製時に、細胞核内へ導入する遺伝子量のばらつき存在、(2)遺伝子発現量の時系列測定データから細胞をスクリーニングする技術の不足にある。

そこで本問題に対し、申請者は超並列 (10^2 以上の並列細胞処理) 単一細胞操作・デリバリーを進めた結果、これらの細胞操作技術を発展させれば、(1)一定量の遺伝子を細胞核内へ導入し、(2)時系列的に発現した細胞を選別するシステムが開発できる着想を得た。

2. 研究の目的

本課題では、単一細胞レベルで 10^3 個以上の細胞処理が可能なシステムを開発し、その基盤技術を確立することを研究の目的とした。最終的には、均一かつ安定細胞を構築するシステムの開発を目指した。これにより、細胞機能の均一化、安定発現細胞のスクリーニングを一貫して行い、発現量が均一で時系列的にも発現が安定した細胞を得ることとした。最終システムでは、次の 2 つのサブシステムを統合する。本報告書では、特に細胞核内への一定量の遺伝子導入システム、安定発現細胞スクリーニングシステムにおける細胞ピックアップ技術の開発について説明する。

①細胞核内への一定量の遺伝子導入システム：細胞核内へ導入する遺伝子量を制御して、細胞の遺伝子発現量を均一化させる。要素技術として、A)細胞核膜を穿孔し、一定量の遺伝子を導入する技術を開発する。細胞接着で細胞核の位置を制御し、ナノ秒パルス光にて細胞の核膜を穿孔し、ポンプで一定量の遺伝子を送り込む。

②安定発現細胞スクリーニングシステム：細胞の遺伝子発現量の時系列データを記録し、自動で安定な細胞をピックアップする。目的達成に 2 種の要素技術を開発する。B)単一細胞配置・時系列細胞機能解析技術の開発：単一細胞をウェル内に約 100%で同時配置するシングルセルスポットを開発し、細胞数分布で生じるノイズを抑えて細胞機能を計測する。C)細胞ピックアップ技術の開発：誘電泳動力を利用して独立の捕獲箇所を持つピックアップツール「誘電泳動マニピュレータアレイ」を開発して、目的のウェル内細胞を選択的に抽出する。

3. 研究の方法

細胞核内への一定量の遺伝子導入システムの開発を進めた。観察しながら狙いの位置にレーザーが照射できる光学系を構築した。ナノ秒パルス光にて細胞の核膜を穿孔し、ポンプで一定量の遺伝子を送り込むことを目指し、レーザーパワーにパラメータを設け、レーザー照射前後での細胞の剥離と細胞生存率の評価実験を行った。

レーザー照射中の Ti 薄膜表面の状態観察も同様の装置を使用した。レーザーパワーは 10, 30, 50 μ J とした。単一パルス照射することにより、各パワー 3 点ずつレーザーを照射した。レーザー照射後は、PBS 溶液に浸し基板表面を洗浄した。Calcein AM 及び PI を PBS に溶解した溶液に浸すことで蛍光観察を行った。このときの Calcein AM と PI の濃度はそれぞれ 2 μ mol/L, 4 μ mol/L とした。15 分間インキュベートした後に、倒立顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U, Nikon)にて明視野と蛍光で観察した。

誘電泳動力を利用して独立の捕獲箇所を持つピックアップツール「誘電泳動マニピュレータアレイ」として、主要な 3D 電極プロブを形成するプロセスを確立した。さらには作製したプロブでの細胞操作を行った。誘電泳動プロブアレイは、3 次元電極を基軸とし、狙った電場勾配 (図 1) を発生させるため、電極先端のみを露出した。個々のプロブやプロブアレイで細胞操作を制御するため、配線プロセスを確立した。犠牲層はリフトオフレジスト LOR20B とその上にパターニング用の SU-8 で 2 層とした。スパッタリングやリフトオフを組み合わせ、3 次元構造に電極のパターンを形成した。3 次元電極に絶縁体の SU-8 3050 をコートし、フォトリソグラフィでプロブを形成した。このとき SU-8 3050 をシクロペンタノンで 70wt% に希釈して使用した。希釈して粘度を低くして、表面張力を低減した。

作製したプロブアレイを用いて細胞操作を実証した。誘電泳動プロブアレイと ITO 平面電極を設置した。電極間隔は 50 μm とし、HeLa 細胞懸濁液を導入した。懸濁液は低導電率バッファ (8.5wt% Sucrose, 0.3wt% Glucose) を使用した。細胞は Calcein-AM (2 μM) で染色し、観察しやすくした。

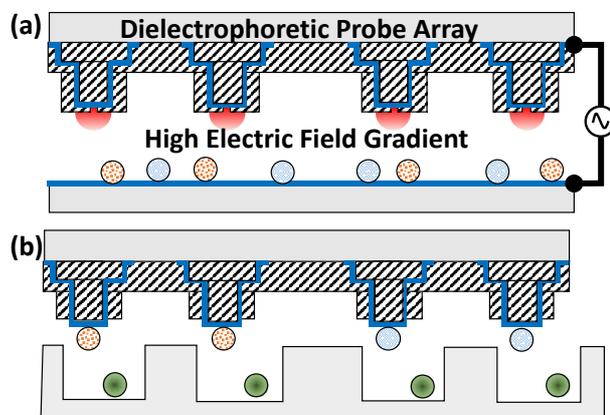


図 1 細胞ピックアップツールとしての誘電泳動プロブアレイの概略図。(a)細胞捕獲。(b)細胞輸送とリリース。深さのあるマイクロウェルへの細胞輸送に対応するためには、3次元のプロブ形状が有効である。

4. 研究成果

パルスレーザー照射光学系の構築を完了した。使用したナノ秒パルスレーザーは、レーザーダイオード励起型の TECH-527(Laser-Export 社)を用いた。実験中の Ti 表面の観察には、観察光 (MCWHL1, ThorLabs)及び、CMOS カメラ(ASI1600MC-Cool, ZWO)を用いた。ダイクロイックミラー (DMLP550R, 25 mm x 36 mm Longpass Dichroic Mirror, 550 nm Cutoff, ThorLabs)を使用することで、レーザー照射系と観察系を同時に用いることができる。レーザー照射位置は自由に選択でき、ガラス基板と Ti 薄膜との境界への走査状の照射も行った。

タイムラプス観察には、倒立顕微鏡(ECLIPSE Ti-E,Nikon)を用い、ブラスト社の細胞培養コンパクトチャンバ (C-150A) を取り付けて、必要な環境を維持した。レーザー照射直後に細胞を PBS で洗浄後、MEM(Minimum Essential Medium)中にて、24 時間 1 時間毎に観察を行うセットアップを実現した。

観察結果を図 2 に示す。求めたグラフより、どのレーザーエネルギーについても、半径 50 μm 以内であるレーザー照射部付近の細胞生存割合が最も低い。距離が大きくなるにつれて、生細胞割合は高くなった。レーザーエネルギーが低くなるにつれて、若干ではあるが生細胞の割合が大きくなっている。30 μJ では、一番生細胞の割合が高かった一方で、標準偏差も大きい。標準偏差を減らす

には、 $10\mu\text{J}$ の方が適切なレーザーエネルギーである。今後、細胞内デリバリも行い、さらに最適なエネルギーを探索していく。

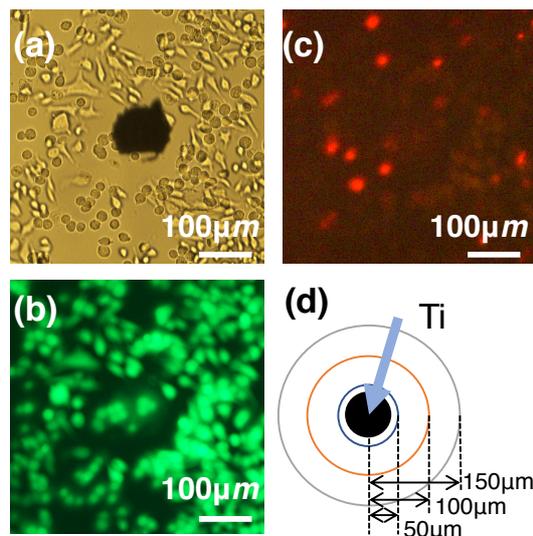


図2 $30\mu\text{J}$ でレーザーを照射後の細胞観察像。(a)明視野、(b)緑蛍光は生存細胞、(c)赤蛍光は死細胞を表す。(d)は計測方法の模式図を示す。レーザーを照射したTiパターンを中心に半径50、100、150 μm の3つの領域に分けて細胞数のカウントを行った。

誘電泳動プローブアレイの作製を完了させた。配線幅は設計値 $105\mu\text{m}$ に対して、 $131.7\pm 5.9\mu\text{m}$ ($N=5$)、配線間隔は設計値 $95\mu\text{m}$ に対して $84.4\pm 2.6\mu\text{m}$ ($N=5$)となった。プローブ高さは $15.1\pm 2.3\mu\text{m}$ ($N=5$)、露出した電極の直径が $28.7\pm 1.3\mu\text{m}$ ($N=5$)だった。

での細胞操作として、配線を施したプローブを用い、細胞パターンニングに必要な細胞操作を行うことに成功した。(a)交流電圧 3Vpp , 1MHz を印加した。(b)誘電泳動力により、細胞をプローブエッジ部で捕獲した。(c)誘電泳動力で細胞を保持したまま、水平方向に約 $70\mu\text{m}$ 輸送した。(d)電圧印加を停止し、細胞をリリースした。細胞が重力沈降し、顕微鏡の焦点が合わなくなった。これで細胞の捕獲からリリースまでの基本操作を実証した。

作製したプローブアレイを用い、細胞を並列的に捕獲し、そのときの捕獲特性を評価した。電圧印加時を 0s として、時間経過によって細胞が各プローブに捕獲されたデータを取得した。交流電圧は 5Vpp と 10Vpp 、周波数 1MHz にして印加した。細胞は各プローブ近傍から順に捕獲された。電圧印加 60s 後にはすべてのプローブで細胞が1個以上捕獲された。その後も、各プローブで、捕獲細胞数が徐々に増加した。最大で7個の細胞が1つのプローブに捕獲された。単一細胞のみを確実に捕獲操作するには、フォトリソグラフィでプローブ開口径を細胞直径の $15\mu\text{m}$ 以下にすることが望ましい。

プローブと細胞間の距離 X に対して捕獲に要した時間 T の関係も求め、回帰曲線を得た。 10Vpp では 5Vpp に比べ、遠方の細胞を捕獲することができる。プローブと細胞間の距離が増加すると、捕獲に要した時間は指数関数的に増加した。本データから求めた回帰曲線は、初期のプローブ細胞間距離から捕獲時間を予測する際に役立つ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- (1) Moeto Nagai, Kohei Tanizaki, Takayuki Shibata, “Batch Assembly of SU-8 Movable Components in Channel Under Mild

- Conditions for Dynamic Microsystems: Application to Biohybrid Systems,” *IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems*, Volume: 28, Issue:3, pp. 419-428 (2019).
- (2) Moeto Nagai*, Takahiro Hirano, Takayuki Shibata, “Phototactic Algae-Driven Unidirectional Transport of Submillimeter-sized Cargo in a Microchannel,” *Micromachines*, Vol. 10(2) p. 130 (2019).
 - (3) Moeto Nagai*, Tokuma Miyamoto, Takeshi Hizawa, Takayuki Shibata, “Scalable Hollow Nanoneedle Array Using Stepper Lithography for Parallel Intracellular Delivery,” *Precision Engineering*, Vol. 55, pp. 439-446 (2019).
 - (4) Moeto Nagai*, Kyohei Tada, Takayuki Shibata, “Rapid Prototyping of PDMS Microchannels Using Cutting Plotter and Double Casting,” *Mechanical Engineering Letters*, Vol. 4, p. 18-00377 (2018).
 - (5) Pallavi Shinde, Loganathan Mohan, Amogh Kumar, Koyel Dey, Anjali Maddi, Alexander N. Patananan, Fan-Gang Tseng, Hwan-You Chang, Moeto Nagai, and Tuhin Subhra Santra*, “Current Trends of Microfluidic Single-Cell Technologies,” *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 19(10), p. 3143, (2018).
 - (6) Kar, Srabani; Loganathan, Dr. Mohan; Dey, Koyel ; Shinde, Pallavi ; Chang, Hwan-You; Nagai, Moeto; Santra, Tuhin*, "Single Cell Electroporation-Current Trends, Applications and Future prospects," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 28, p. 123002, (2018).
 - (7) Moeto Nagai*, Keita Kato, Kiyotaka Oohara, Takayuki Shibata, "Pick-and-Place Operation of Single Cell Using Optical and Electrical Measurements for Robust Manipulation," *Micromachines*, 2017, 8(12), p. 350; DOI:10.3390/mi8120350.
 - (8) Kota Yamamoto, Keisuke Sato, Junji Sasano, Moeto Nagai and Takayuki Shibata*, "Localized etching of silicon in water using a catalytically active platinum-coated atomic force microscopy probe," *Precision Engineering*, Vol. 50 (2017) pp. 344–353.
 - (9) Sangjin Ryu*, Rachel Pepper, Moeto Nagai, Danielle C. France, "Vorticella: A protozoan for bio-inspired engineering," *Micromachines*, Vol. 8(1), 4 (2017). Review Paper
 - (10) Takayuki Shibata*, Naohiro Iio, Hiromi Furukawa, and Moeto Nagai "Nanofabrication technique based on localized photocatalytic reactions using a TiO₂-coated atomic force microscopy probe," *Applied Physics Letters*, Vol. 110, p. 063701 (2017).
 - (11) Takayuki Shibata*, Tatsuya Ozawa, Yasuharu Ito, Keita Yamamoto, and Moeto Nagai "Minimally invasive intracellular delivery based on electrokinetic forces combined with vibration-assisted cell membrane perforation," *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 56 p. 017001 (2017).

〔学会発表〕（計 11 件）

- (1) 澤井 慎, Gupta Harsh, Santra Tuhin, 鹿毛あずさ, 柴田隆行, 永井萌土, 「超並列細胞内デリバリーシステム開発に向けた照射光学系の評価及びデバイス作製」, 令和元年度電気学会 E 部門総合研究会, 東京工業大学すずかけ台キャンパス・すずかけ台大会館, 2019 年 7 月 1 日 ~ 2019 年 7 月 2 日, BMS-19-031. 発表予定
- (2) ○Harsh Gupta, Naoki Iwasaki, Shin Sawai, Pallavi Shinde, Tuhin Subhra Santra, Takayuki Shibata, Moeto Nagai, 「Parallelized Single-cell Optoporation Using Nanosecond Laser for Homogeneous Transfection」 2019 年度精密工学会春季大会学術講演会, pp. 331-332, 東京電機大学 北千住キャンパス, 2019 年 3 月 13 日(水)~15 日(金) .
- (3) ○Gupta Harsh, Keisuke Funahashi, Naoki Iwasaki, Toshiki Minemura, Shin Sawai, Shinde Pallavi, Tuhin Subhra Santra, Takayuki Shibata, Moeto Nagai, "Shock Wave Generation in Laser Ablation and Microcontact Printing for Uniform Transfection"第 35 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 札幌市民交流プラザ, 2018 年 10 月 30 日 (火) ~11 月 1 日 (木).
- (4) ○鈴木裕也, 佐伯拓朗, 平塚翔太, 柴田 隆行, 永井萌土 「多点光照射で形成した構造物を用いた超並列単一細胞回収技術の開発」平成 30 年度 E 部門総合研究会, バイオ・マイクロシステム研究会, pp. 35-38, BMS-18-034, 奈良県文化会館, 奈良, 2018 年 7 月 12 日, 13 日.
- (5) ○澤井 慎, 舟橋圭佑, Harsh Gupta, Pallavi Shinde, Tuhin Santra, 柴田隆行, 永井萌土, 「超並列細胞核内デリバリーシステムの基盤となる照射光学系の構築と評価」, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2018, 北九州国際

コンベンションゾーン, 北九州市, CDROM (3pp), 2018年6月2~5日.

- (6) ○グプタ ハルシュ, 舟橋 圭佑, 澤井 慎, 岩崎 真己, 峰村 俊輝, シャインデ パラッピ, サブハラ サントラ ツィン, 柴田 隆行, 永井 萌土, "Pulse laser activated uniform transfection and massively parallel intracellular delivery with high efficiency and high cell viability," 電気学会バイオマイクロシステム研究会, pp. 35-39, BMS-18-013, 東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区), 2018年3月5日.
- (7) 舟橋圭佑, 澤井慎, Gupta Harsh, Shinde Pallavi, Santra Tuhin, 柴田 隆行, 永井 萌土「ナノ秒パルスレーザを用いた超並列核内デリバリ技術の開発—光照射による細胞膜穿孔の実証—」精密工学会 2018 年度春季大会, pp. 459-460, 中央大学後楽園キャンパス (東京都文京区), 2018年3月15日(木)~17日(土).
- (8) ○中水 泰輝, 長羅 優幸, 永井 萌土, 柴田 隆行, 「藻類を利用した環境光応答デバイスアレイの開発 —並列的な構造物駆動手法の確立—」, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 4 pp., 01pm4-PS-194, 広島国際会議場 (広島県), 2017年10月31日(火)~11月2日(木).
- (9) ○永井萌土「大量の単一細胞を並列的に加工する基盤技術とシステムの開発」, 若手研究者によるポスターセッション, 平成29年度 電気学会 E 部門総合研究会, 兵庫県 イーグレひめじ. 2017年6月29日~2017年6月30日
- (10) ○坂本良作, 佐伯拓朗, 永井萌土, 柴田隆行「超並列単一細胞操作のための誘電泳動プローブアレイの開発」精密工学会 2017年度春季大会, pp.379-380, 慶應義塾大学矢上キャンパス 2017年3月13日(月)~15日(水)
- (11) ○坂本良作, 佐伯拓朗, 永井萌土, 柴田隆行「超並列単一細胞操作のための誘電泳動プローブアレイの開発」第26回ライフサポート学会フロンティア講演会, 1A2-2, p.46, 芝浦工業大学 豊洲キャンパス, 2017年3月10日(金)~11日(土).

〔図書〕(計 2件)

- (1) Kumar A., Mohan L., Shinde P., Chang HY., Nagai M., Santra T.S. (2018) Mechanoporation: Toward Single Cell Approaches. In: Santra T., Tseng FG. (eds) Handbook of Single Cell Technologies. Springer, Singapore.
- (2) Takayuki Shibata, Junji Sasano, Moeto Nagai, "Catalytic AFM-Based Nanofabrication", in Jiwang Yan (ed.), Micro and Nano Fabrication Technology, Springer, Singapore, pp.857-880, 2018.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1件)

名称: 「貫通孔と流路を一体化したマイクロ流体輸送構造体および, その製造方法」

発明者: 永井萌土, 柴田隆行, 河原田翔

権利者: 豊橋技術科学大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-026311

出願年: 出願日 2017.2.15

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等: <https://sites.google.com/site/moeton/home>

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名: Tuhin Subhra Santra

ローマ字氏名: Tuhin Subhra Santra

研究協力者氏名: Pei-Yu (Eric) Chiou

ローマ字氏名: Pei-Yu (Eric) Chiou

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。