

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02574

研究課題名（和文）機能性ナノチャネル構造を用いた網羅的1細胞解析法の創成

研究課題名（英文）Development of comprehensive single-cell analysis using integrated nano-channels

研究代表者

有馬 彰秀 (Arima, Akihide)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任講師

研究者番号：20781347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、1細胞を極薄のマイクロポアに電気的に捕捉し、ポアを流れるイオン電流の変化から細胞の状態が解析できることを顕微観察と微小電流の同時計測により実証した。また、このイオン電流変化には細胞が有するイオンチャネルの寄与が含まれることを見出した。加えて、機能性高分子を表面に修飾したポアへと細胞を捕捉することで1細胞レベルの能動的な破碎に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、単純な細孔への電気的捕捉によって1細胞の状態が非破壊・非染色で簡便に評価できることが明らかになった。また細胞破碎能を付与したポアによる1細胞レベルの破碎技術は内包粒子の抽出へと繋がるため、今後ポア集積構造へと発展させることで、内包粒子の解析に基づく網羅的な評価が可能なシステムとして機能すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was demonstrated that cellular condition can be evaluated at a single-cell level through combining electrical trapping of a cell into an ultra-thin micropore and cross-membrane ionic current measurement. In addition, we found that this current decreasing due to the trapping was relaxed by ion transports through ion channels of a cell. Moreover, single-cell breakage was achieved by electrical dragging to a pore modified with functional polymers.

研究分野：マイクロ・ナノ科学

キーワード：マイクロポア イオン電流 1細胞解析

1. 研究開始当初の背景

ナノ細孔(ポア)を用いた1粒子・1分子分析は、次世代DNAシーケンサーや高感度ウイルス検査を志向した新しい分析技術として、国内外でその研究開発が勢力的に行われている(C. Dekker, *Nat. Nanotechnol.*, 2, 209 (2007))。その原理は、電解質溶液中の検体が電気泳動的にナノポアを通過した際に、検体の体積に応じたイオン流を阻害することで生じるイオン電流の変化に基づいている(M. Tsutsui et al., *ACS Nano*, 6, 3499 (2012))。特に、近年着目されるオーダーメイド医療分野において、1細胞解析に注目が集まっているが(M. B. Elowitz et al., *Science*, 297, 1183(2002))、1細胞と、その細胞内物質を対応付けられる網羅的解析法は確立しておらず、これを達成することで、1細胞レベルでの遺伝子の変化に起因するiPS細胞やがん細胞の正確な状態分析や、細胞への薬剤活性の評価等の応用の観点からも、重要な知見が得られると考えられる(P. Dalerba et al., *Nat. Biotechnol.*, 29, 1120 (2011))。

そのような中で、応募者は極薄ナノポアによる高空間・高時間分解能の生体粒子分析に関する研究を展開しており(*ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10, 34751(2018); *Nanotechnology*, 28, 155501 (2017); *Sci. Rep.*, 6, 31670 (2016); *Appl. Phys. Lett.*, 104, 163112 (2014))、ウイルスから細菌・細胞まで、幅広い検体を対象とした検出・解析を行ってきた(化学とマイクロ・ナノシステム, 17, 27 (2018); *Anal. Chem.*, 90, 1511 (2018); *Sci. Rep.*, 7, 17371 (2017))。しかし、ナノポアによるセンシングは、1粒子レベルでの検出が可能な高い感度がある一方で、実際の測定では対象の粒子をPCRなどの前処理により十分な濃度で調製し、得られたシグナルを統計的に処理している(J. T. Simpson et al., *Nat. Methods*, 14, 407 (2017))。また、そのシグナル解析においても、これまでの研究のほとんどはピーク高さ(波高)及び長さ(波幅)という2つのパラメータのみを活用しており、1分子・粒子レベルで検出できること、そしてそのシグナルが持つ単一検体由来の情報を活用することに関しては、さらなる発展可能性がある(*Sci. Rep.*, 8, 16305 (2018))。これを踏まえ、応募者がこれまで構築してきたナノスケールセンシングを可能にする単一粒子・分子計測系と、生体粒子への知見を基に、「ポアというナノ制限空間で、単一生体粒子の特性はイオン輸送にどのように反映されるのか」という学術的問いを突き詰めることで、網羅的な1細胞解析を実証する。

2. 研究の目的

本研究は、応募者がこれまで展開してきたナノポアによる単一粒子レベルでの電気的捕捉を進展させ、機能性ナノチャネル構造への1細胞の捕捉・破碎による内液抽出を一貫して行う手法を実証する。そしてこの手法を駆使して、多数のイオンシグナル特徴量を活用した細胞内粒子の高精度識別に基づく網羅的な1細胞解析を創成する。本研究の達成により、1細胞とその細胞内物質を対応付けると共に、生命科学・構造生物学に資するバイオナノデバイスを創出することで、今後の1細胞解析及びオーダーメイド医療分野に大きなブレークスルーをもたらす。

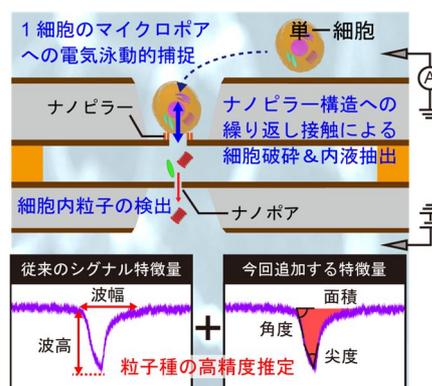


図1. 機能性ナノチャネル構造による1細胞解析。

3. 研究の方法

本研究では、ナノポアを通るイオン電流を指標とした網羅的1細胞解析法を創成する。

そのために、まず液中で熱的拡散の影響下にある細胞を、電気泳動的にポアへ捕捉し、ポア周辺に作製したナノピラー構造への繰り返し接触により破碎する。続いて、破碎により抽出された細胞内液中に含まれる、核や細胞内小胞に代表される細胞内物質の検出を実証するとともに、細胞集団破碎液との分画と多種特徴量を比較することで、物質の推定を試みる。

そして以上の知見を集約し、捕捉・破碎用と、検出用の2段階のポア構造を組み合わせたナノチャネル構造による網羅的1細胞内物質の解析を実証する。

4. 研究成果

(1) 1細胞捕捉によるイオン電流を介した状態評価法の創出

まず本研究における基礎検討のため、マイクロポアへの一細胞の捕捉を行った。これに際し、細胞における多様なイベントと電流シグナルの帰属を志向し、顕微観察と微小電流測定を同時に行うことが可能な系を構築した。一般に用いられる固体ポアデバイスは、ポアを掘削したシリコン基板の両面に流路を有するブロックを接着させ、電極を設置する。しかし今回の研究では顕微観察のため、片面を観察面として機能させ、もう片面を電流計測のための配線面として分離した。当該デバイスは、従来の構造(*AIP Adv.*, 6, 115004 (2016))を進展させ、微細加工技術によ

って作製した。具体的には、窒化シリコンの薄膜上に細胞サイズのマイクロポアを掘削し、このポアチップに厚膜レジスト SU-8 による観察用流路を形成した上で、この流路内に貫通孔を掘削した。この流路をポリプロピレンの接着シートによって封止するとともに、もう片面にはポリジメチルシロキサン (PDMS) によるマイクロ流路付ブロックを接合した。顕微鏡からは電装系を一部取り外し、加えて顕微鏡を含む計測系全体をシールドボックス中に設置することで、環境由来のノイズを低減させた。球形の Jurkat 細胞を主たる計測対象とし、測定では各流路に細胞分散液および緩衝液を導入した後、Ag/AgCl 電極を流路に設置し、顕微観察を行った状態で、ポアを流れるイオン電流を測定した。

計測では、顕微観察による 1 細胞のポアへの捕捉と、これに付随したイオン電流の減少が検出された。加えて、一部の細胞では変形を伴う通過も確認されており、変形能を指標とした細胞のキャラクタリゼーションの可能性も示唆された。なお、浮遊細胞である Jurkat 細胞だけではなく、接着細胞である HeLa 細胞に対しても捕捉が可能であることも確認された。さらに、状態識別の可能性を検討するため、蛍光色素によって生細胞と死細胞を染め分け、それぞれの捕捉時のイオン電流トレースを比較した。その結果、両者の捕捉時の減少量に差が見られたが、これは細胞死に伴う体積および表面電荷の減少に起因すると考えられ、シンプルな電氣的捕捉による細胞状態識別の展望が見出された。

さらに、捕捉時のイオン電流シグナルに着目したところ、顕微観察では細胞によってポアが完全に閉塞している一方、ポアを流れるイオン電流は遮断されなかった。このことから、細胞そのものがイオンのパスとして機能していることが示唆された。このパスの候補としてはイオンチャンネルやポンプが考えられ、1 細胞レベルでの薬剤応答評価へと繋がると考えられる。

(2) 機能性分子のポアへの修飾による 1 細胞破碎の実証

続いて機能性ナノチャンネル構造の創出のため、細胞破碎能を有するポアを開発した。当初、破碎機構として、ナノピラー形成を結晶成長によって作製することを構想していたが、アルキル鎖を有するイオン性高分子へと変更した。ポア表面へと当該分子を静電的に吸着させ、捕捉した細胞の脂質膜へアルキル鎖部分を侵入させることで破碎を試みた。

この細胞破碎ポアへ 1 細胞を捕捉すると、顕微観察において非修飾ポアとは異なる変形を示した。加えて、イオン電流トレースにおいて、電流値の上昇も確認された。この変化は細胞内のイオン漏出に起因すると考えられ、目的とする細胞破碎が実証された。積層集積ナノポア構造の作製についても確立しており、今後この細胞破碎表面と組み合わせることで、本研究計画で目的とする 1 細胞の捕捉・破碎による内液抽出および内包粒子検出を一貫して行うことが可能なデバイスが作製できると考えられる。

以上本研究により、機能性ナノチャンネル構造を用いた 1 細胞解析の要素技術が確立するとともに、マイクロポアへの電氣的捕捉による低侵襲性・非修飾での 1 細胞状態識別の展望も拓かれた。今後 1 細胞レベルでの薬効評価への発展も期待される。

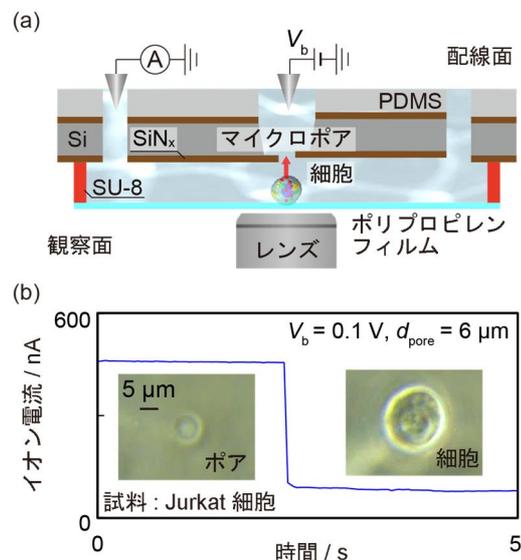


図 2. (a) 同時計測デバイスの概要図。 (b) 1 細胞捕捉時の顕微画像およびイオン電流トレース。

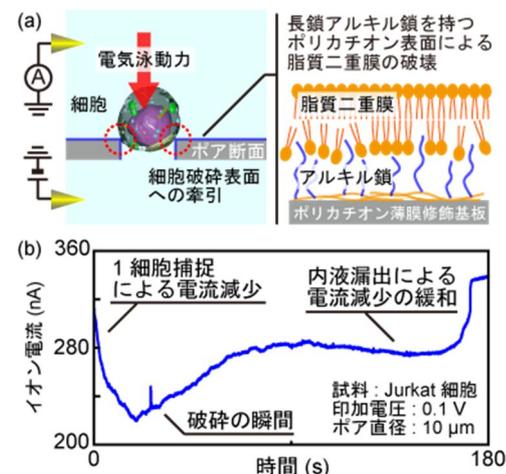


図 3. 細胞破碎ポアによる 1 細胞破碎。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 有馬彰秀、馬場嘉信	4. 巻 37
2. 論文標題 デジタル・トランスフォーメーションで変わる医療：ナノバイオデバイス、量子科学技術とAIが拓く未来医療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharm Tech. Japan	6. 最初と最後の頁 85-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsui Makusu, Arima Akihideo, Yokota Kazumichi, Baba Yoshinobu, Kawai Tomoji	4. 巻 8
2. 論文標題 Ionic heat dissipation in solid-state pores	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abl7002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akihideo Arima, Makusu Tsutsui, Takashi Washio, Yoshinobu Baba, Tomoji Kawai	4. 巻 93
2. 論文標題 Solid-State Nanopore Platform Integrated with Machine Learning for Digital Diagnosis of Virus Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 215-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c04353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akihideo Arima, Makusu Tsutsui, Takeshi Yoshida, Kenji Tatematsu, Tomoko Yamazaki, Kazumichi Yokota, Shun'ichi Kuroda, Takashi Washio, Yoshinobu Baba, Tomoji Kawai	4. 巻 5
2. 論文標題 Digital Pathology Platform for Respiratory Tract Infection Diagnosis via Multiplex Single-Particle Detections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 3398-3403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssensors.0c01564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 有馬彰秀	4. 巻 19
2. 論文標題 ナノポアデバイスによる単一生体粒子分析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学とマイクロ・ナノシステム	6. 最初と最後の頁 44-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsutsui Makusu, Yokota Kazumichi, Arima Akihide, Washio Takashi, Baba Yoshinobu, Kawai Tomoji	4. 巻 5
2. 論文標題 Detecting Single Molecule Deoxyribonucleic Acid in a Cell Using a Three Dimensionally Integrated Nanopore	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small Methods	6. 最初と最後の頁 2100542 ~ 2100542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smt.202100542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 有馬彰秀, 筒井真楠, 吉田剛, 横田一道, 立松健司, 山崎智子, 黒田俊一, 谷口正輝, 鷲尾隆, 川合知二, 馬場嘉信
2. 発表標題 ナノバイオデバイスをを用いた単一生体粒子検出
3. 学会等名 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会 研究会 「時代を切り拓く有機分子・バイオエレクトロニクス研究」 (応用物理学会M&BE研究会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬彰秀
2. 発表標題 ナノバイオデバイスによるイオン電流計測に基づく単一粒子分析法の開拓
3. 学会等名 第52回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬彰秀, 山内晴加, 筒井真楠, 安井隆雄, 湯川博, 嶋田泰佑, 小野島大介, 馬場嘉信
2. 発表標題 マイクロボアデバイスを用いた1細胞解析に向けた基礎検討
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内晴加, 有馬彰秀, 安井隆雄, 嶋田泰佑, 湯川博, 小野島大介, 馬場嘉信
2. 発表標題 顕微観察とイオン電流計測による単一細胞の状態評価
3. 学会等名 第52回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内晴加, 有馬彰秀, 筒井真楠, 安井隆雄, 嶋田泰佑, 湯川博, 小野島大介, 馬場嘉信
2. 発表標題 マイクロボアデバイスを用いた1細胞の電氣的捕捉による状態評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会(CHEMINAS 44)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内晴加, 有馬彰秀, 安井隆雄, 嶋田泰佑, 湯川博, 小野島大介, 馬場嘉信
2. 発表標題 マイクロボアデバイスを用いた1細胞の電氣的捕捉による識別と分離
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内晴加, 有馬彰秀, 筒井真楠, 安井隆雄, 嶋田泰佑, 湯川博, 小野島大介, 馬場嘉信
2. 発表標題 マイクロポアデバイスを用いたイオン電流計測に基づく単一細胞の特性評価
3. 学会等名 第44回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬 彰秀, 山内 晴加, 筒井 真楠, 馬場 嘉信
2. 発表標題 マイクロポアデバイスを用いた顕微観察とイオン電流計測による1細胞検出
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihide Arima, Yoshinobu Baba
2. 発表標題 Single-Cell Analysis Using Pore Sensors
3. 学会等名 PITTCON 2021 Conference and Expo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬彰秀
2. 発表標題 ナノポアデバイスによる単一生体粒子分析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第42回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有馬彰秀, 筒井真楠, 吉田剛, 横田一道, 立松健司, 山崎智子, 黒田俊一, 谷口正輝, 鷺尾隆, 川合知二, 馬場嘉信
2. 発表標題 ナノポアデバイスを用いた単一生体粒子分析
3. 学会等名 応用物理学会 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会 研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihide Arima
2. 発表標題 Single-Particle Analyses Using Nanobiodevices
3. 学会等名 4th Nagoya University UNC/NC State BME Seminar NLS Seminar/GTR Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Takeshi Yoshida, Kazumichi Yokota, Wataru Tonomura, Takao Yasui, Taisuke Shimada, Tomoko Yamazaki, Kenji Tatematsu, Shun'ichi Kuroda, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, Tomoji Kawai, and Yoshinobu Baba
2. 発表標題 Identifying Bioparticles at a Single-Particle Level by Machine-Learning Approach
3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE10) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihide Arima, Makusu Tsutsui, Takeshi Yoshida, Kazumichi Yokota, Wataru Tonomura, Takao Yasui, Taisuke Shimada, Tomoko Yamazaki, Kenji Tatematsu, Shun'ichi Kuroda, Masateru Taniguchi, Takashi Washio, Tomoji Kawai, and Yoshinobu Baba
2. 発表標題 IDENTIFYING MULTIPLE VIRAL SPECIES AT A SINGLE PARTICLE LEVEL USING A COMBINATION OF NANOPORES AND MACHINE LEARNING APPROACH
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019 Conference) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬 彰秀、筒井 真楠、殿村 渉、横田 一道、安井 隆雄、嶋田 泰佑、山崎 智子、立松 健司、黒田 俊一、谷口 正輝、鷲尾 隆、川合 知二、馬場 嘉信
2. 発表標題 ナノバイオデバイスと機械学習の融合による多項目ウイルス識別
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会 (Cheminas 39)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 馬場嘉信、安井隆雄、有馬彰秀	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 12
3. 書名 医用工学ハンドブック (監: 佐久間 一郎、秋吉 一成、津本 浩平) 第2編 第5章 6 ナノバイオデバイスによる単一生体粒子分析	

1. 著者名 有馬彰秀、筒井真楠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 AI・ナノ・量子による超高感度・迅速バイオセンシング (監: 馬場嘉信、柳田 剛、加地範匡) 第III編 第10章 ナノスケールセンシングと人工知能の融合による ウィルス・細菌の変異・薬剤耐性予測システム創出の展望	

1. 著者名 有馬彰秀、筒井真楠	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善プラネット	5. 総ページ数 6
3. 書名 最先端ナノライフシステム研究 (編: 最先端ナノライフシステム研究編集委員会) 第 編 1章 ナノ・マイクロボアセンサを用いた単一生体粒子分析	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	筒井 真楠 (Tsutsui Makusu) (50546596)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関