

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20360371

研究課題名(和文) 磁力を利用した液滴ハンドリングによる一細胞デジタルPCRの開発

研究課題名(英文) MAGNETIC FORCE-BASED-DROPLET-HANDLING SYSTEM FOR SINGLE CELL DIGITAL PCR ANALYSIS

研究代表者：

大河内 美奈 (OKOCHI MINA)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70313301

研究成果の概要(和文)：磁力を駆動力として用いた液滴搬送システム(MAG-LOC; Magnetic force-based Lab-on-a-Chip)により、一細胞レベルで細胞群の挙動を計測する解析システムを開発した。磁性粒子を液滴内に懸濁して液滴間の合一反応の搬送子として用いてオイル相中で磁力制御により操作することで、一細胞の分離・細胞溶解・逆転写・PCR増幅といった各単位操作を一枚のアレイ上に集積化し、がん細胞の検出などに適用した。

研究成果の概要(英文)：A droplet-based single cell analysis system was developed employing magnetic force-based droplet-handling system. The droplets containing magnetic beads were magnetically controlled and coalesced with another droplet in the oil phase, and all the reactions for RT-PCR including single cell manipulation, cell lysis, cDNA synthesis, and PCR amplification steps were integrated on-chip and applied for detection of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：バイオセンサ、一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

細胞は増殖因子やサイトカインなどの可溶性因子をはじめ、細胞外マトリクスや細胞間相互作用、シヤーストレスなど様々な細胞外刺激により刺激を受ける。刺激を受けた細胞群の挙動を一細胞レベルで計測し、その分布等を組織レベルで解析することは、細胞生物学の目標の一つである。例えば、目的遺伝子の mRNA 発現量を一細胞ごとに測定し、その分布を調べることは、ヘテロな変異が蓄積されたがん等においてもその挙動を理解する上で重要となる。したがって、一細胞レベルでの遺伝子解析を簡便に一括解析するシステムを開発することは、早期に疾患を捉

え、その進行を理解する上で有用となる。

ナノバイオテクノロジーの進展に伴い、マイクロチップ上に一連の操作を集積化した Lab-on-a-Chip や μ TAS (micro Total Analysis System) と呼ばれる様々なセンシングデバイスが開発されている。一細胞レベルでの遺伝子解析を可能とするマイクロ・ナノ流路デバイスの進展も目覚しく、遺伝子解析に必要な一連の操作を一枚のチップ上に高度に集積化した SNP(Single nucleotide polymorphism)解析や発現量測定用チップの開発が進められている。しかし、多数の反応操作を必要とする遺伝子解析をマイクロ流路デバイスで実現するには、各単位操作を一

枚のデバイス上に集積化することが必要となり、その連結が問題となっていた。また、多数のポンプやバルブを利用し、これらを精巧にコントロールする必要があることから、解析システム全体の小型化は難しいなどの問題点もあった。以上のことから、一細胞レベルでの遺伝子解析を多数の細胞において一括解析するシステムを構築することは依然として困難であった。

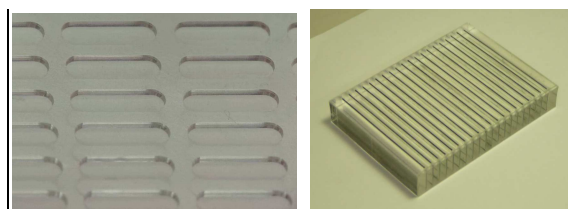
2. 研究の目的

磁性粒子は、生体サンプルからの目的とする細胞や生体分子の分離、精製、濃縮を可能とする特性を有する他、反応場である液滴間の搬送子として利用でき、磁力を駆動力として用いた解析システム全体の小型・携帯化を実現する上で優れた特性を有する。我々は、磁力を駆動力とした液滴搬送法を提案しており、磁性粒子を含む液滴をオイル相中で操作することで液滴を利用した遺伝子解析、酵素活性測定、抗原抗体反応に基づいた腫瘍マーカーの検出を行ってきた。また、磁性ナノ粒子を細胞に多数取り込ませることで、外部設置の永久磁石の磁力で細胞をハンドリングし、配置させる細胞アレイ化法を開発した。本方法では、通常の培養基材表面において細胞をアレイ上に配置することができるため、細胞の接着、伸展、増殖、移動などの挙動観察に最適である。がん細胞の三次元パターンニングによる浸潤評価についても検討しており、生体環境を模倣した三次元環境下において細胞挙動を解析した。

そこで、本研究では、これらの細胞の遺伝子発現解析を実現するため、磁性微粒子と磁力を利用した液滴搬送システムによる一細胞での遺伝子発現解析システムの構築を目的とし、一細胞 PCR について基盤技術を開発した。一細胞レベルでの遺伝子発現を解析するため、細胞溶解、逆転写、PCR 反応といった一連の反応操作をアレイ上に集積化したマイクロチャンバーアレイを設計・試作すると共に、各チャンバーに合わせた磁力操作デバイスを作製した。本手法は、オイル、反応液、磁性粒子など簡易な要素の組み合わせから構築されており、反応液量の変化などに柔軟に対応できる他、反応場として液滴を利用することで非特異吸着などによるサンプルロスを回避できるなど、少量サンプルの解析に優れた特徴を有する。

3. 研究の方法

磁性微粒子と磁力を利用した液滴搬送システムを試作し、細胞溶解、RT-PCR の一連の操作を行った。鋳型には、アルミニウム板を使用し、直径 0.5 mm のエンドミル加工した。



(A) マイクロチャンバーアレイ (B) 液滴操作デバイス
図1 磁性粒子を用いた液滴搬送解析システム

フッ素ガードにより離型処理を行い、ポリジメチルシロキサン (PDMS, SILPOT184, Dow Corning Toray Co. Ltd) によりマイクロチャンバーアレイを作製した (図 1A)。表面を疎水化するため、化学気相成長法

(Chemical Vapor Deposition, CVD) によりパリレン C

(Parylene Japan K. K.) コーティングを行った。液滴操作デバイスは、アクリル板にレーザービームで溝を彫り、SK 材の粉末

を充填した後、シーリングを行うことで作製した (図 1B)。図 2 に液滴操作デバイスを用いて多数の液滴を同時に搬送する様子を示す。液滴中に懸濁する磁性粒子は、常磁性マグネタイトを用い、アミノ基修飾粒子に負電荷ポリマーをコートすることにより PCR 阻害を回避した。

遺伝子発現解析に用いる浮遊系細胞としては、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を使用した。一液滴中に一細胞が混入されるように細胞濃度を調整し、細胞封入液を作製した。K562 細胞では、白血病のマーカーとして用いられている WT1 の発現量を解析した。また、付着性細胞としては、マウス線維芽細胞 BALB/3T3 およびそのがんモデルである BALB/3T3/v-src を用いた。浮遊系細胞の解析には、組織培養で実績のあるマイクロキャリアを磁性化し、各マイクロキャリア当たり一細胞を接着させ、トリプシンを用いない *in situ* 遺伝子発現解析を行った。v-src の下流に存在し細胞移動関連の Rac-1 遺伝子に着目した。細胞封入液、細胞溶解液、RT-PCR 溶液の 3 液滴をミネラルオイルを満たしたマイクロチャンバーアレイに挿入し、液滴搬送デバイスを用いて磁気誘導により液滴搬送を行い、各反応を進行させた。



Scale bar 500 μm

図2 液滴操作デバイスによるオイル相中の液滴合一反応

4. 研究成果

まず、HeLa total RNA を鋳型として、 β -actin 遺伝子の mRNA の遺伝子増幅を行った。磁性ナノ粒子の存在下においても PCR 阻害がなく、100 から 2000 コピー程度の量で RT-PCR が定量できた。ついで、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 (K562 : RIKEN CELL BANK) を使用し、がんマーカーである WT1 の検出を行った。WT1 遺伝子は当初、小児の腎がん、ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として見つかり、現在では白血病の的確な診断や治療、病態把握に不可欠なマーカーとして注目されている。反応前に細胞数を顕微鏡により確認した後、実験に用いた。液滴操作により細胞溶解、逆転写反応、PCR を進行させた後、蛍光強度を定量した。その結果、細胞数と蛍光強度の相関が得られた他、40、50 サイクルにおいて 1 細胞解析が可能となり、正常な T 細胞との識別も可能であった (図 3)。線維芽細胞については、磁性化マイクロキャリア上に細胞を接着させて、直接細胞溶解し、RT-PCR により Rac-1 を解析したところ、*v-src* を高発現させたがん化モデル細胞では、10 倍以上増加した (図 4)。また、細胞をトリプシン処理後に解析したところ、直接細胞溶解した時と比較して 2 倍以上の発現が見られ、液滴系による *in situ* 解析の重要性を確認できた。さらに、1 マイクロキャリア上に 10 細胞を接着した系でも解析した結果、10 細胞中に 1 細胞でもがん化細胞が存在すると蛍光強度の差が確認でき、変

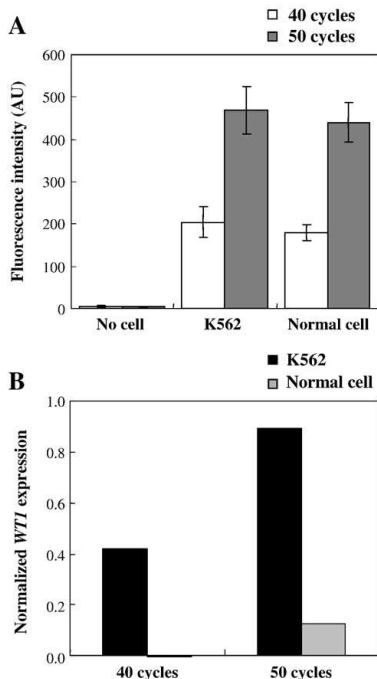


図 3 がんマーカー WT1 遺伝子の検出

1 細胞において β アクチンの発現解析を行い、ハウスキーピング遺伝子として利用できることを確認した (A)。腫瘍マーカーである WT1 遺伝子の発現量を調べた (B)。

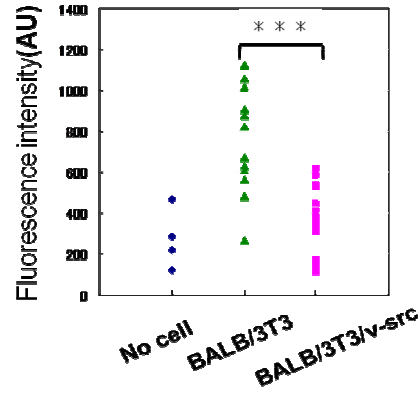


図 4 磁性化マイクロキャリアを利用した 1 細胞遺伝子発現 (Rac-1) 解析の結果 ($p < 0.001$)

異細胞の検出といった点から、有用な検出系となることが示唆された。以上より、磁力応答型の液滴搬送法を利用し、一細胞レベルでの遺伝子発現解析システムを構築することができた。

液滴内に磁性微粒子を封入する液滴搬送システムは、駆動力として磁石を動かすモーターのみが必要となることから、本解析法の原理を利用し、免疫アッセイや酵素活性測定など様々な簡易小型解析システムを開発した。また、蛍光検出のみならず電気化学検出法についても検討し、分析診断に利用するための基盤を構築できた。

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 16 件)

- ① Shikida M., Inagaki N., Okochi M., Honda H., Sato K. Droplet introduction into a pen-shaped portable reaction system by gravity and interfacial forces. *Micro & Nano Letters*, 6, 253–256 (2011). (査読有)
- ② Shikida M., Inagaki N., Okochi M., Honda H., Sato K. Fabrication of a pen-shaped portable biochemical reaction system based on magnetic bead manipulation *J. Micromech. Microeng.* (in press) (査読有)
- ③ Okochi M., Ogawa M., Kaga C., Sugita T., Tomita T., Kato R., Honda H. Screening of ZnO-high affinity peptide using spot-synthesized peptide arrays and computational analysis, *Acta Biomaterialia*, 6, 2301-2306 (2010). (査読有)
- ④ Okochi M., Tomoya Sugita, Seiji

- Furusawa, Mitsuo Umetsu, Adschiri T., Honda H., Peptide Array-Based Characterization and Design of ZnO-High Affinity Peptides., *Biotechnol. Bioeng.* 106, 845-851 (2010). (査読有)
- ⑤ Nakashima Y., Ohno Y., Kishimoto S., Okochi M., Honda H., Mizutani T. Fabrication process of carbon nanotube field effect transistors using atomic layer deposition passivation for biosensors. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10:3805-3809 (2010). (査読有)
- ⑥ Okochi M., Tsuchiya H., Kumazawa F., Shikida M., Honda H. Droplet-based gene expression analysis using a device with magnetic force-based droplet-handling system *J. Biosci. Bioeng.* 109, 193-197 (2010). (査読有)
- ⑦ Okochi M., Takano S., Isaji Y., Senga T., Hamaguchi M., Honda H. Three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning for analysis of invasive capacity of BALB/3T3/v-src. *Lab. Chip*, 9, 3378-3384 (2009). (査読有)
- ⑧ Shikida M., Koyama M., Nagao N., Imai R., Honda H., Okochi M., Tsuchiya H., Kazuo Sato. Agitation of magnetic beads by multi-layered flat coils. *Sens. Actuatur-B: Chemical* 137, 774-780 (2009). (査読有)
- ⑨ Okochi M., Tsuchiya H., Kumazawa F., Shikida M., Honda H. Magnetic force-based lab-on-a-chip for single cell analysis in a droplet. *ECS Transactions*, 16 (17) 15-20 (2009). (査読有)
- ⑩ Kiode H., Isaji Y., Okochi M., Honda H. Preparation of L929 cell array by magnetic cell labeling method with unmodified colloidal magnetite nanoparticles for single cell detection of cell response induced by TNF- α . *J. Chem. Eng. Jpn.* 42(4) (2009). (査読有)
- ⑪ Okochi M., Takano S., Isaji Y., Senga T., Hamaguchi M., Honda H. Three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning for analysis of invasive capacity of BALB/3T3/v-src. *Lab. Chip*, 9, 3378-3384 (2009). (査読有)
- ⑫ Kojima, Y., Kishimoto S., Okochi M., Honda H., Mizutani T. Fabrication of vertically-aligned carbon nanotube electrodes using grid-inserted plasma-enhanced chemical vapor deposition for chemical sensors. *Jpn J. Appl. Phys.* 47, 2028-2031 (2008). (査読有)
- ⑬ Ino K., Okochi M., Honda H. Application of magnetic force-based cell patterning for controlling cell-cell interactions in angiogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 882-890 (2009). (査読有)
- ⑭ Shikida M., Nagao N., Imai R., Honda H., Okochi M., Ito H., Sato K. A palm-top-sized rotary-drive-type biochemical analysis system by magnetic bead handling. *J. Micromech. Microeng.* 18: 035034-035042 (2008). (査読有)
- ⑮ Ino K., Okochi M., Konishi N., Nakatochi M., Imai R., Shikida M., Ito A., Honda H. Cell culture arrays using magnetic force-based cell patterning for dynamic single cell analysis. *Lab. Chip*. 8: 134-142 (2008). (査読有)
- ⑯ Tsuchiya H., Okochi M., Nagao N., Shikida M., Honda H. On-chip polymerase chain reaction microdevice employing a magnetic droplet-manipulation system. *Sens. Actuatur B-Chem.* 130:583-588 (2008). (査読有)
- [学会発表] (計 23 件)
- ① Okochi M., Matumura T., Honda H. Evaluation of invasive capacity of tumor cells using magnetically micropatterned multicellular spheroid, 5th International workshop on single cell analysis, 2011.3.4, The University of Tokyo
- ② Okochi M., Honda H. Three dimensional cell culture system using magnetic force-based cell patterning for analysis of invasive capacity of tumor cells, 4th International Symposium on Nanomedicine, 2010.11.30, 岡崎分子科学研究所
- ③ 大河内美奈, 熊澤史貴, 手島翠, 古池真司, 本多裕之, マイクロウェルチャンバーを用いた磁性液滴搬送デバイスによる細胞解析, 日本生物工学会 2010 年度大会 2010.10.29, 宮崎シーガイア
- ④ 松村拓, 小出寛展, 大河内美奈, 本多裕之, 磁気細胞パターンニング法を用いた生体模倣条件下でのがん細胞挙動評価, 化学工学会第 42 回秋季大会 2010.9.6 京都大学
- ⑤ 小出寛展, 伊佐治弥生, 大河内美奈, 本多裕之, 磁気剣山状デバイスを用いた単一細胞機能解析, 化学工学会第 42 回秋季大会 2010.9.6 京都大学
- ⑥ 大河内美奈, 本多裕之, 磁性粒子を用い

- た細胞解析法の開発、第 17 回 HAB 研究機構学術年会 2010.5.21 昭和大学
- ⑦ 小出寛展、松村拓、大河内美奈、本多裕之、3 次元細胞アレイによる腫瘍細胞の浸潤評価、化学工学会第 75 年会 2010.3.18 鹿児島大学
- ⑧ Ito H., Kato R., Okochi M., Honda H., Magnetic manipulation device for the optimization of cell processing APBioChEC2009, 2009.11.26, Kobe
- ⑨ 本多裕之、大河内美奈、伊野浩介、高野翔、小出寛展：細胞間コミュニケーションを保った細胞アレイの作成と機能解析 日本生物工学会 2009 年度大会 2009.9.25 名古屋大学
- ⑩ 小出寛展、松村拓、高野翔、千賀威、大河内美奈、本多裕之、磁化細胞アレイを用いた細胞応答の検出 日本生物工学会 2009 年度大会 2009.9.23 名古屋大学
- ⑪ 熊澤史貴、大河内美奈、式田光宏、本多裕之、磁力を用いた液滴送液システムによる 1 細胞遺伝子発現解析デバイスの開発 日本生物工学会 2009 年度大会 2009.9.23 名古屋大学
- ⑫ 伊藤博史、加藤竜司、大河内美奈、本多裕之、培養条件検討への細胞磁気マニピュレーションの導入 化学工学会第 41 回秋季大会 2009.9.17 広島大学
- ⑬ 大河内美奈、熊澤史貴、シヤムスーディンヌルヒダヤ、式田光宏、本多裕之、磁性微粒子を用いた液滴搬送システムによるイノムアッセイチップの開発、化学工学会第 41 回秋季大会 2009.9.16 広島大学
- ⑭ 熊澤史貴、大河内美奈、土屋裕義、式田光宏、本多裕之、磁性微粒子を用いた液滴ハンドリングシステムによる一細胞 RT-PCR 日本化学会第 89 年会 2009.3.29 日本大学
- ⑮ 高野翔、大河内美奈、千賀威、本多裕之、磁気細胞パターンニング法を用いた 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 2009.3.18、神奈川工科大学
- ⑯ Okochi M., Tsuchiya H., Kumazawa F., Shikida M., Honda H. Magnetic force-based droplet manipulation system for gene expression analysis. The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2008.11.30, Shibaura Institute of Technology
- ⑰ 高野翔、大河内美奈、千賀威、本多裕之、細胞アレイパターンニングを用いた 3 次元がん細胞挙動評価モデルの構築、第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2008.11.9 名古屋大学
- ⑱ 熊澤史貴、大河内美奈、式田光宏、本多裕之、磁性微粒子を用いた電気化学検出による小型簡易分析装置の開発、第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2008.11.9 名古屋大学
- ⑲ 小出寛展、伊佐治弥生、大河内美奈、本多裕之、未修飾磁性微粒子を用いた細胞磁気ラベル法の開発と 1 細胞機能計測、第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2008.11.9 名古屋大学
- ⑳ 大河内美奈、本多裕之、磁性微粒子と磁力を利用した細胞計測技術の開発、第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2008.11.8 名古屋大学
- ㉑ Okochi M., Tsuchiya H., Kumazawa F., Shikida M., Honda H., Magnetic Force-based lab-on-a-chip for single cell analysis in a droplet. Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science 2008, 2008.10.12-17, Honolulu, Hawaii
- ㉒ 高野翔、伊野浩介、清水一憲、長森英二、大河内美奈、本多裕之、磁気細胞パターンニング法を用いた細胞相互作用解析、化学工学会第 40 回秋季大会 2008.9.24 東北大学
- ㉓ 小出寛展、伊佐治弥生、大河内美奈、本多裕之、未修飾磁性微粒子を用いた L929 磁化細胞アレイの作製と TNF-alpha による細胞死の検出、日本生物工学会 2008 年度大会 2008.8.28 東北学院大学

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：がん細胞挙動評価モデル及びその用途
 発明者：本多裕之、大河内美奈、千賀威、高野翔
 権利者：国立大学法人名古屋大学
 種類：特許
 番号：特願 2008-286173
 出願年月日：2008 年 11 月 12 日
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/proc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 美奈 (OKOCHI MINA)
 名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：70313301

(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
加藤竜司 (KATO RYUJI)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：50377884
式田 光宏 (SHIKIDA MITSUHIRO)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80273291
水谷 孝 (MIZUTANI TAKASHI)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70273290

(3)連携研究者 なし