

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13904  
 研究種目：基盤研究(B) (一般)  
 研究期間：2020～2022  
 課題番号：20H02115  
 研究課題名(和文) 超並列核内デリバリとスクリーニング技術の統合による高品質細胞構築システムの開発

研究課題名(英文) High-quality Cell Construction System by Integrating massively parallel intranuclear delivery and screening technology

研究代表者  
 永井 萌土 (Nagai, Moeto)  
 豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授

研究者番号：00580557  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：種々の光吸収体を利用した構造を作製し、この上に細胞を接着固定した。その後デバイス全体をレーザーで全面をスキャンして、細胞へのオプトポレーションを効率化した。またNDフィルタを搭載した電動ホイールを用いて自動化し、レーザーの出力変更を自動化した。連続照射した場合の最適な導入率が得られるレーザーの出力を調査した。  
 並列単一細胞スクリーニングのために、自動細胞カプセル化システムを開発した。画像解析ツールを用いて所望の単一細胞を選択し、必要な光重合パターンに変換した。懸濁されたHela細胞をゼラチンメタクリレート(GelMA)ハイドロゲルに封入し、多光線照射により周囲のゲルを架橋してカプセル化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
 機能を喪失した組織への再生医療、難病への細胞治療といった先進医療の普及が渴望されている。この普及を妨げる原因は、従来の細胞の機能改変・選別技術における低質(機能が不均一で不安定)細胞の混入である。そこで本研究では、(A)超並列核内デリバリと(B)スクリーニング技術を中核として、10の6乗個レベルで高品質(機能が均一かつ安定)の細胞を獲得するシステムの開発と学術体系の確立を最終目標とした。本研究を通じて、細胞改変・選別後の低質細胞の混入を防ぎ、同時に効率的な再生医療・細胞医療用品質の細胞獲得を可能とする意義がある。

研究成果の概要(英文)：Various optical absorbers were prepared on substrates. Cells were cultured on the substrates. The entire device was then scanned over its entire surface with a laser to improve the optoporation of the cells. The laser output change was automated by using a motorized wheel equipped with an ND filter. The output power of the laser that would yield the optimum introduction rate when continuously irradiated was investigated. An automated cell encapsulation system was developed for parallel single-cell screening. The desired single cells were selected using an image analysis tool and converted to the required photopolymerization pattern. Suspended Hela cells were encapsulated in gelatin methacrylate (GelMA) hydrogels and successfully encapsulated by cross-linking the surrounding hydrogel by multiple light irradiation.

研究分野：バイオマイクロシステム

キーワード：オプトポレーション 細胞スクリーニング ナノ秒パルスレーザー 多点光照射 光硬化性ゲル

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療や細胞療法などの次世代医療が実現しつつある。しかし、現在の細胞の機能改変と選別技術に基づく、治療に数ヶ月、数千万円の費用を要するので、普及が難しい。再生医療では、患者の皮膚細胞を取り出し、遺伝子導入で iPS 細胞に改変した後、移植用の  $10^4 \sim 10^5$  の網膜細胞からなるシートへと加工・培養する(理研 高橋ら, N. Engl. J. Med. 2017)。また細胞療法では、 $10^6$  個の免疫系の T 細胞を患者から採取し、がん細胞を攻撃できるようにキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞) に改変して、増殖した細胞を体内に注入する。これらの機能改変・選別後の細胞を生体内に移植するには、目的外の機能の細胞を究極的には 0 個まで減らす安全性が求められる。

目的外の細胞が混入するのは、次のような技術の未熟さに由来する。(1)細胞改変時に、細胞核内へ導入する遺伝子量がばらつく。(2)遺伝子発現量の時系列データから、大量の細胞をスクリーニングできない。このような現状で、(1)大量の細胞に対し、それぞれの細胞核内に一定数の遺伝子 (DNA プラスミド) をどのように導入するか?(2)どのように時系列データを元に、大量の細胞をスクリーニングできるのか?といった未解決問題が、本研究課題の核心をなす学術的「問い」として存在している。ここで申請者が培ってきた超並列 ( $10^6$  個以上の並列細胞処理) での単一細胞操作と細胞内デリバリ技術を適用し、さらに核内への位置選択性、時系列データの利用を確立して、「問い」への解が導き出せると考えた。

### 2. 研究の目的

均一かつ安定な性質の細胞を得る「未踏領域」に対し、申請者の有する超並列単一細胞操作技術をベースに細胞核内への選択性、時系列データ

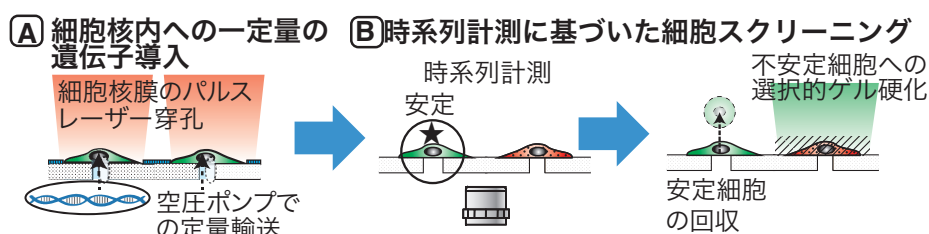


図 1 高品質細胞構築システムの中核技術 (A), (B) での処理工程の模式図

タの利用の課題を解決し、次の研究成果をもたらす(図 1)。

(A) ゲルを用いた細胞核の位置制御、ナノ秒パルス光での細胞核穿孔と空圧ポンプでの定量輸送を組み合わせ、一定量の遺伝子 (プラスミド DNA) を導入する技術「超並列細胞核内デリバリ」を創造する。

(B) 時系列の発現量を計測し、マッピングした後に超並列的に光硬化で細胞を取り出す技術「安定細胞スクリーニング」を確立する。

(C) これら(A), (B)を統合し、高品質 (機能が均一かつ安定) 細胞を構築する技術を創出する。微細加工技術での構造作製、メカトロニクス技術を元にした操作と観察を複合して、 $10^6$  個の単一細胞を処理し、医学・生物学に貢献する学術基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

オプトポレーションのための光吸収体として、カラーレジスト基板を準備した。なお今回はポンプを省いて実験を進めることにした。ガラスウェハ上に SU-8 フォトリソグロフと有機顔料 PigmentRed254 を混合したカラーレジストを用いたフォトリソグラフィにより、光吸収体デバイスを作製した。作製したデバイス上に HeLa 細胞を播種、接着させた。細胞接着後は、デバイスに FITC-Dextran(4kDa)と Opti-MEM を混合した試薬を滴下した。滴下後にデバイスに対し、レーザ走査を実施した。このレーザ走査によりデバイス上のカラーレジストがエネルギーを吸収し、プラズマ化する。この発生したプラズマによって衝撃波が発生し、細胞にせん断力が加わる。このせん断力によって細胞膜は穿孔され、細胞周囲の FITC-dextran が導入される。レーザ照射による穿孔後は、試薬導入促進のためにインキュベーションした。その後、全細胞数と死細胞数をカウントするために、Hoechst と PI で核染色を行った。染色後に蛍光観察を行い、得られた蛍光画像から分子導入率と細胞生存率を評価した。

デジタルマイクロミラーデバイス (DMD) を使った多点光照射を使い、光硬化性ゲル内に細胞を捕獲する方法を細胞スクリーニングに用いた。主にデータ転送の自動化と画像処理の 2 つの実験を行った。まず、DMD を制御する PC (BeagleBone Black, BBB) へのデータ転送の最適な方法を検討した。狙った単細胞のアライメント誤差も測定した。この実験では、光硬化工程の時間を短縮することで、望ましい単細胞を硬化させる精度を高めることを目的とした。次に、望ましい単細胞の画像処理も行い、欲しい単細胞だけを単離するようにしました。最後に、直径を基準に単細胞を選別し、より広い範囲で光硬化させることを目指した。

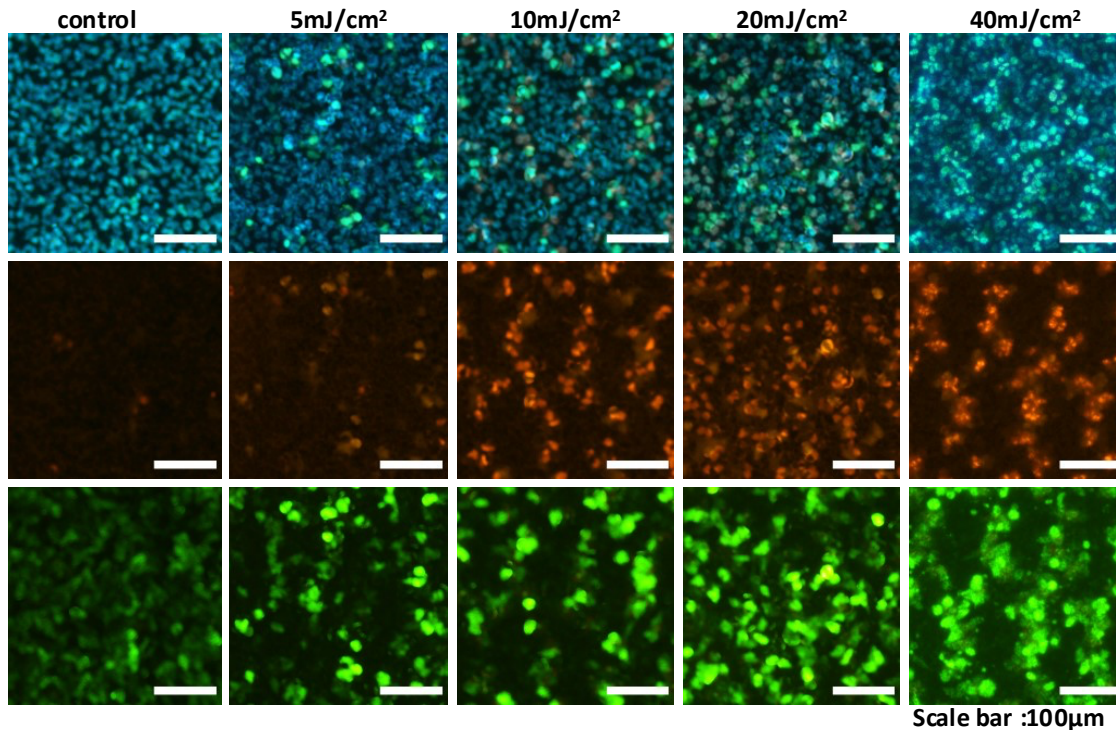


図 2 HeLa細胞を用いたレーザースキャン実験の観察画像  
上段 細胞核, 中段 死細胞, 下段 導入細胞

#### 4. 研究成果

レーザースキャンを施したカラーレジスト基板の蛍光画像から各細胞数をカウントし、分子導入率と細胞生存率を解析した。図 2 のそれぞれ青色蛍光は細胞核、赤色蛍光は死細胞核、緑色蛍光は分子が導入された細胞を示し、オプトポレーションにより物質 (FITC-Dextran) を細胞内に導入した。この結果より、分子導入率はレーザー出力が  $20\text{mJ}/\text{cm}^2$  で最大となった。この時の分子導入率は、(分子が導入された細胞数/細胞核数) で求めた。グラフには複数の視野(N=15)の平均値をプロットしている。レーザースキャンによって HeLa 細胞へ分子導入を行い、分子導入率が最大で 68%となった。またレーザーフルエンスが  $20\text{mJ}/\text{cm}^2$  を境に、分子導入率は低下した。これは蛍光画像の背景であるカラーレジストが分子切断後に蛍光を示し、背景と細胞の境界が曖昧になったことが原因である。よって見かけの導入率低下を防ぐには、蛍光プローブか光吸収体を変更する必要がある。細胞生存率は、{(細胞核数-死細胞数) / 細胞核数} から求めた。またグラフには分子導入率と同様に複数の視野の平均値をプロットした。細胞生存率はレーザー出力が上昇するに従って低下した。

以上の結果から、細胞生存率と分子導入率の両方を 50%以上にするには、レーザー出力  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$  付近の探索が有意義である。また今後はレーザースポット径の大径化、スキャン速度の変更をすることで更なる導入細胞の大量生産を目指す。

細胞スクリーニングを行うために、DMD にデータ転送を自動的に行った。この方法では、BBB への画像転送だけでなく、処理後の画像を DMD で投影するのにも 10 秒しか要していない。PAD が最も短いのは、画像を自動的に転送するだけでなく、DMD を制御して転送した画像を自動的に投影することができるからである。さらに、転送時間の短縮により、セルが元の位置に比べてわずかに動くだけなので、平均で  $6.24\mu\text{m}$  という小さなアライメント誤差しか生じない。つまり、PAD を使用することで、自動データ転送が可能になり、データ転送時間の短縮とアライメントエラーを最小限に抑えることができた。

この実験では、元の細胞の顕微鏡画像のコントラストカーブを調整し、 $30\sim 35^\circ$  を加えることで、最適な画質を得られた。背景が消え、細胞の輪郭を得た。このコントラスト調整により、単細胞の検出率に対して 97%の効率が得られた。次に、この最適な画質を用いて、光照射した単細胞の数と、LabVIEW の粒子解析で検出した単細胞の数が一致することを確認した。この結果から、単細胞を大きさに応じて選別する画像処理精度が確認された。

以上、PAD を用いて、データの自動転送が可能になった。データ転送時間の短縮やアライメントエラーを最小限に抑えた。また、LabVIEW の画像処理を利用し、特定の単細胞を選択するだけでなく、より広い範囲で目的の単細胞を光硬化させた。3 つのデータ転送方法を用いて、最も優れていたのは PAD を用いた方法であった。画像処理は、サイズ、形状、色などの特徴に基づいて特定の細胞を選択するために使用した。LabVIEW を用いて、大きさに応じた望ましい単細胞の画像処理を行った。最終的に、ある直径の範囲に基づいて特定の単細胞を選別し、選別した単細胞のみの周囲のゲルをより広い範囲で光硬化させることを可能にした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 MOHAN Loganathan, HATTORI Ren, ZHANG Haipeng, MATSUMURA Yuki, SANTRA Tuhin Subhra, SHIBATA Takayuki, RYU Sangjin, NAGAI Moeto	4. 巻 30
2. 論文標題 Effect of size and interparticle distance of nanoparticles on the formation of bubbles induced by nanosecond laser	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surfaces and Interfaces	6. 最初と最後の頁 101820 ~ 101820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surfin.2022.101820	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 該当する
1. 著者名 Nagai Moeto, Santra Tuhin Subhra, Shibata Takayuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Standardized Outline of PDMS Microchips with Laser-cut Stacking Mold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 43 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.142.43	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 該当する
1. 著者名 Mohan L., Kar Srabani, Ren Hattori, Ishii-Teshima Miho, Bera Parthasarathi, Roy Sounak, Santra Tuhin Subhra, Shibata Takayuki, Nagai Moeto	4. 巻 543
2. 論文標題 Can titanium oxide nanotubes facilitate intracellular delivery by laser-assisted photoporation?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Surface Science	6. 最初と最後の頁 148815 ~ 148815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apsusc.2020.148815	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 該当する
1. 著者名 Nagai Moeto, Sato Shogo, Hiratsuka Shota, Kawaharada Sho, Okamoto Shunya, Santra Tuhin Subhra, Shibata Takayuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Parallel Photothermal Coalescence of Biocompatible Photocurable PEGDA Droplets	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 49 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.143.49	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 該当する

1. 著者名 Mishra Aniket, Inaam Rafia, Okamoto Shunya, Shibata Takayuki, Santra Tuhin Subhra, Nagai Moeto	4. 巻 14
2. 論文標題 Visible Pulsed Laser-Assisted Selective Killing of Cancer Cells with PVP-Capped Plasmonic Gold Nanostars	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi14061173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Debnath Tanmay, Hattori Ren, Okamoto Shunya, Shibata Takayuki, Santra Tuhin Subhra, Nagai Moeto	4. 巻 12
2. 論文標題 Automated detection of patterned single-cells within hydrogel using deep learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22774-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Mishra Aniket;Longanathan Mohan;Yamamoto Hirofumi;Okamoto Shunya;Shibata Takayuki;Nagai Moeto
2. 発表標題 単一細胞のオプトポレーションのためのBio-Resistを用いたプラットフォーム
3. 学会等名 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部 蓮, 松村優基, Loganathan Mohan, Mishra Aniket, 山本寛文, Muhammad Aidee, 手島美帆, 岡本俊哉, 柴田隆行, 永井萌土
2. 発表標題 カラーレジストからのレーザー誘起衝撃波を用いたオプトポレーション法の開発
3. 学会等名 電気学会マグネティックス/マイクロマシン・センサシステム/バイオ・マイクロシステム 合同研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ピンカマルディンム, ハッマド, ルクマン アリフ, マータザーギュラム, パンニール セルバムクマーベンカッティユ, 岡本俊哉, 柴田隆行, 永井萌土
2. 発表標題 単一細胞スクリーニングシステムにおける光硬化の自動化手法の開発
3. 学会等名 2022年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井萌土
2. 発表標題 細胞治療のためのレーザを用いた単一細胞・ゲルのハイスループット加工
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会 電気学会 量子ビームによるナノ構造・界面形成とバイオメディカル応用技術調査専門委員会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

豊橋技術科学大学 ハイスループットマイクロ・ナノ工学研究室 <a href="https://hmn.me.tut.ac.jp/">https://hmn.me.tut.ac.jp/</a>
--

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	沼野 利佳  (Numano Rika)  (30462716)	豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授   (13904)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石田 忠  (Ishida Tadashi)  (80517607)	東京工業大学・工学院・准教授    (12608)	

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			
インド	インド工科大学マドラス校			
米国	ネブラスカ大学リンカーン校			