

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：32690  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21510127  
 研究課題名（和文） ラボディスクのハイスループット単一細胞発現遺伝子プロファイリングへの応用  
 研究課題名（英文） Application of Lab-Disk to high-throughput genomic profiling of single cells  
 研究代表者  
 久保 いづみ （KUBO IZUMI）  
 創価大学・工学部・教授  
 研究者番号：40214986

## 研究成果の概要（和文）：

本研究ではハイスループットに細胞を単一分離するためのラボディスクを考案、作製し、これを用いて、サルモネラ菌やヒト白血球 T 細胞株（Jurkat Cell）を単一分離し、これらの細胞が有する遺伝子や、発現遺伝子を Polymerase Chain Reaction(PCR)や逆転写 PCR(RT-PCR)法によりラボディスク上で増幅する方法を開発した。実際に単一分離、遺伝子増幅されたサルモネラ菌や Jurkat Cell の細胞をラボディスク上で、蛍光プローブを用いて検出できることを示した。検出された蛍光シグナルは細胞数に応じて変化しており、遺伝子量を反映していることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

We have developed a CD-shaped device (Lab-disk) to isolate single cell from a large number of cells simply and rapidly. In order to perform PCR or RT-PCR on the device, the device was fabricated from silicon and glass not to evaporate the entrapped solution in the microchambers in this study. Amplification of *Salmonella* specific *invA* gene from single cell was confirmed on the disk at 200 cells/ $\mu$ l of *Salmonella enterica* after single cell isolation and PCR. To realize q-PCR of Jurkat cell, hot cell-direct RT-PCR was enabled by using Tth DNA Polymerase, which is a thermo-stable polymerase and has high reverse transcription activity. After cell isolation and successive hot cell-direct RT-PCR on the device, fluorescent signals from RT-PCR products for single cells were detected at 200 cells/ $\mu$ l of Jurkat cell or less.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科 ナノ・マイクロ科学・細目：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロセンサー、ハイスループット、ラボディスク、Jurkat Cell, GAPDH, Hot Cell Direct RT-PCR, ナノリッターPCR, 蛍光プローブ、単一細胞分離、マイクロチャンバー

## 1. 研究開始当初の背景

これまで細胞のプロファイリングは組織や

培養細胞など、均一な条件に存在する 104 個から 106 個程度の細胞集団を、もとに解析が行われていたが、個々の細胞による違いは解析が困難であった。これは細胞を 1 個ずつに単離することが容易でなかったためである。我々の研究グループでは迅速かつ簡便な単一細胞分離を実現するために、遠心力によって送液が可能な細胞単離用ラボディスクデバイスを考案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、迅速に多数の細胞を単離し、ハイスループットに遺伝子検出、プロファイリングする方法を開発した。1000 個以上の細胞を 30 秒で 1 個 1 個、液量 1 nL のチャンバーに単離できるラボディスクを用い、単離後の細胞をチャンバー内でそのまま壊し、細胞内に発現している mRNA を RT-PCR することを目的として研究を行う。微量のチャンバー中で PCR される DNA や mRNA から単一細胞の検出ができるようにする。これにより、これまで細胞集団の平均化された情報としてしか、捉えることができなかった遺伝子の発現量に関するプロファイリングを多数の細胞について、個々の情報として取得することが可能となる方法を開発することを目的とする。細胞として原核細胞のサルモネラ菌や大腸菌、真核細胞ヒト白血病 T 細胞 Jurkat Cell を対象として単一細胞内の発現遺伝子プロファイリングを行う。

## 3. 研究の方法

迅速かつ簡便な単一細胞分離を実現するために、遠心力によって送液が可能なラボディスクを作製した。ラボディスクの直径は約 10cm で、中心から外側にかけてジグザグにマイクロ流路を設けてある。このマイクロ流路の円周方向に対して多数のマイクロチャンバーを配置した。ラボディスクの中心付近の inlet に粒子懸濁液 1 $\mu$ L を入れ、ラボディスクを回転させる事で、粒子懸濁液がマイクロチャンバーに分離され、それに伴ってビーズや細胞等の粒子を単離する事が可能である (Fig. 1 (A))。

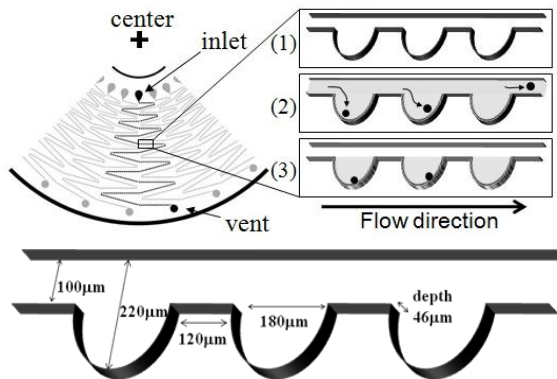


Fig. 1 (A) Design of a Lab Disk and the scheme of the single cell isolation, (B) Details of micro-channels and chambers of the Disk

PCR 用には、このディスクは直径 4 インチのシリコンウェファーを反応性イオンエッチング

(Deep-RIE) により、マイクロ流路形成し、これをガラス板と陽極接合して作製し、使用した。

## 4. 研究成果

### (1) サルモネラ菌のプロファイリング

ラボディスクで分離されたチャンバー内で PCR によって細胞の持つ特異遺伝子を増幅し、サイクリングプローブ法により検出が可能か検討した。シングルセル PCR のモデルとして、食中毒の原因菌の一種のサルモネラ菌を分離し、その特異遺伝子である *invA* を検出した。PCR による増幅産物の蛍光検出にはサイクリングプローブ法を使用した。PCR 後、増幅産物の検出をイメージングアナライザーでチャンバーの蛍光強度測定することにより行った。

サルモネラ菌を 400 cells/ $\mu$ L 及び 200 cells/ $\mu$ L の濃度で PCR 試薬中に懸濁し、PCR 用ラボディスク上で細胞単離後、そのままシングルセル PCR を行った。PCR 後、マイクロチャンバーの蛍光強度を測定し、それぞれの蛍光強度ごとにヒストグラムにまとめたものが Fig. 2 である。

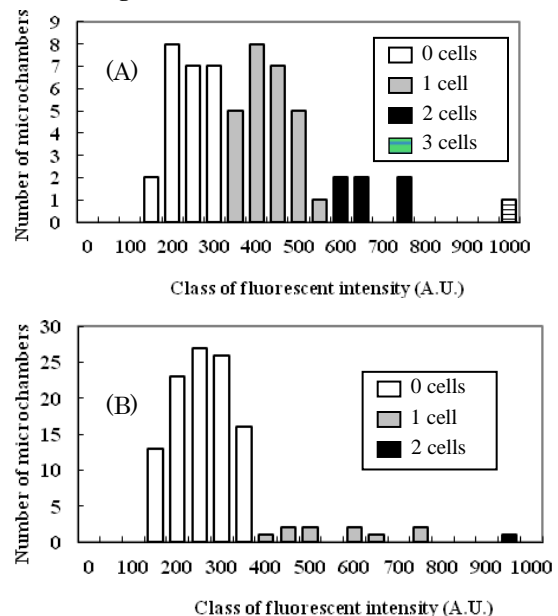


Fig. 2 Histograms of fluorescence intensities for different densities of *S. enterica*. The density of *S. enterica* was: (A) 400 cells/ $\mu$ L, (B) 200 cells/ $\mu$ L. The white, gray, black, and striped bars indicate 0, 1, 2, and 3 cells, respectively.

蛍光強度の分布は 400 cells/ $\mu$ L では、蛍光強度の 4 つグループがあり、蛍光強度は *invA* 遺伝子の初期濃度に依存する事から、それぞれサルモネラ菌が 0、1、2、3 個ずつ入っていたと考えられる。同様に 200 cells/ $\mu$ L では、蛍光強度の 3 つのグループが確認され、それぞれサルモネラ菌が 0、1、2 個入っていたと考えられる。さらに、200 cells/ $\mu$ L の場合では

400 cells/ $\mu\text{l}$  の場合に見られた、0 個と 1 個の間の分布の重なりが見られなかったので、200 cells/ $\mu\text{l}$  以下の濃度ではサルモネラ菌の入っていないチャンパーと 1 つ入っていたチャンパーとの区別が可能であった。以上の事から、ラボディスク上で、細胞単離後、そのままシングルセル PCR が可能であることが確認された。

また、大腸菌とサルモネラ菌の間で選択性の検討を行った。大腸菌のみを 200 cells/ $\mu\text{l}$  の濃度で PCR 試薬中に加えたものと、大腸菌とサルモネラ菌を 100 cells/ $\mu\text{l}$  ずつ PCR 試薬に加えたものをラボディスク上で分離し、PCR による検出を行った。その結果、大腸菌のみのもものでは蛍光強度の増加したチャンパーは確認されず、サルモネラ菌と大腸菌を混ぜたものではサルモネラ菌の入ったと思われる数だけ蛍光強度が増加したチャンパーが確認された。この結果から、このディスク上で PCR により特定の菌だけを検出できる可能性が示唆された。

## (2) Jurkat Cell のプロファイリング

PCR 用細胞単離ラボディスク上でシングルセル PCR による単一細胞内の遺伝子の検出が可能であったので、次に、RT-PCR により単一細胞の発現遺伝子の検出が可能かを検討した。シングルセル RT-PCR のモデルとして、ヒト急性白血病 T 細胞である Jurkat Cell を用いてハウスキーピング遺伝子の GAPDH をターゲットとして研究を行った。

PCR 用ディスク上でシングルセル RT-PCR を行うために、RT-PCR 試薬中に Jurkat Cell を懸濁し、細胞から直接、熱サイクルのみで RT-PCR を行う、hot cell-direct RT-PCR を考案した。一般的な逆転写酵素を用いた場合は、1 チューブ内で熱による細胞溶解と逆転写を行おうとすると、逆転写酵素が細胞溶解時の熱によって失活してしまうために逆転写できない。本研究では、逆転写活性を持つ耐熱性ポリメラーゼである Tth DNA polymerase を用いる事で 1 チューブ内での hot cell-direct RT-PCR を可能とし、蛍光プローブを用いてその増幅産物を検出する事が可能であった。

蛍光検出のためのプローブにはダブルダイプローブを用いた。このプローブはそのままではクエンチャーによって消光しているが、増幅産物に結合し、ポリメラーゼの 5' スクレアーゼ活性によって分解され、蛍光を発するようになる。

Jurkat cell のシングルセル RT-PCR にもサルモネラ菌のシングルセル PCR に用いたのと同様の PCR 用ラボディスクを用いた。このラボディスクの inlet に RT-PCR 試薬と Jurkat cell の混合溶液を 1 $\mu\text{l}$  入れ、5000rpm で 30 秒間回転させる事によって細胞単離を

行った。その後、連続的に thermal cycler を用いて細胞溶解 (95 $^{\circ}\text{C}$  10 分)、逆転写 (42 $^{\circ}\text{C}$  15 分)、PCR を行い、Jurkat cell 中の GAPDH の mRNA を増幅し、イメージングアナライザーで蛍光強度を確認した。

本研究ではまず、ラボディスク上での PCR サイクル時のアニール温度、PCR の熱サイクルの時間を最適化し、PCR サイクル毎の蛍光強度の増加を確認した。50 $^{\circ}\text{C}$  から 60 $^{\circ}\text{C}$  のアニーリング温度で検討したところ、54 $^{\circ}\text{C}$  で最も高い蛍光強度を示す事が確認された。また、PCR の熱サイクルの時間は 10 秒から 30 秒で行ったところ、20 秒で最も高い蛍光強度を示し、その時の蛍光強度はチューブ内で行った hot cell-direct RT-PCR の蛍光強度とほぼ同等の値を示した。そこで、PCR は 94 $^{\circ}\text{C}$  で 20 秒、54 $^{\circ}\text{C}$  で 20 秒、72 $^{\circ}\text{C}$  で 20 秒の熱サイクルで行うことにし、PCR サイクルによる蛍光強度の増加を測定したところ、蛍光強度は 20 サイクル目から上がり始め、30~40 サイクルで急激に増加し、40 サイクルで飽和する事が確認された。よって、本研究では、確実に細胞からの増幅産物を検出するために PCR サイクル数は 40 サイクルで行うこととした。

シングルセル RT-PCR を実現するために、Jurkat cell がラボディスク上で単一細胞分離可能か調べたところ、400~10 cells/ $\mu\text{l}$  の濃度でポアソン分布に従って分離される事が確認された (Fig. 3)。

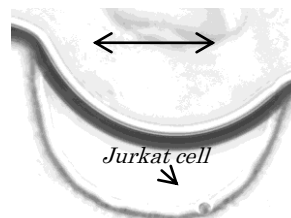


Fig. 3 The Jurkat cell was isolated on Lab Disk at 5000 rpm. Bar, 100  $\mu\text{m}$ .

次に、Jurkat cell を 10~400 cells/ $\mu\text{l}$  の度で RT-PCR 試薬中に懸濁し、PCR 用 CD 型細胞単離デバイス上で細胞単離後、そのまま hot cell-direct RT-PCR を行う事でシングルセル RT-PCR を行った。Hot cell-direct RT-PCR 後、マイクロチャンパーの蛍光強度を測定し、それぞれの細胞濃度ごとにヒストグラムにまとめたものが Fig. 4 である。

蛍光強度は 150 付近と 500 付近に二つの分布が確認された。Jurkat cell が入っていないネガティブコントロール (NC) では蛍光強度が 350 以下を示すことから、蛍光強度 350 以上のものは Jurkat cell が入っており、GAPDH の mRNA を RT-PCR によって検出できたものと考えられる。また、蛍光強度の

増加しているチャンバーの数はポアソン分布から計算される Jurkat cell の入っているチャンバー数とほぼ一致し、相関係数は 0.9866 となった。

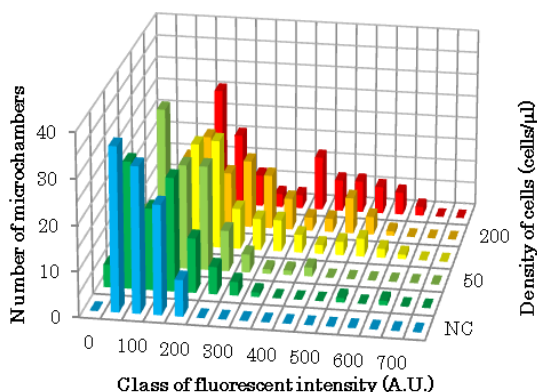


Fig. 4 Histograms of fluorescent intensity for different densities of Jurkat cells. The concentrations of Jurkat cells were 400, 200, 100, 50, 10 cells/ $\mu$ L.

さらに、200 cells/ $\mu$ L の濃度では細胞の入っているチャンバーで 95%以上が単一細胞である事から、200 cells/ $\mu$ L 以下の濃度では、蛍光強度の増加しているチャンバーの 95%以上が Jurkat cell の GAPDH 遺伝子に対してシングルセル RT-PCR が可能であった。

以上より、原核生物のサルモネラ菌に対して、PCR 用ディスクを用いて、単一細胞分離後、サルモネラ菌特異遺伝子である *invA* 遺伝子を PCR により増幅し、サイクリングプローブ法によって検出する事が可能であり、シングルセル PCR に関して、大腸菌とサルモネラ菌との間で選択性を確認する事に成功した。さらに、逆転写活性を持つ Tth DNA polymerase を使用して PCR 用ラボディスクで hot cell-direct RT-PCR を行った結果、Jurkat cell 中の GAPDH の mRNA を増幅する事に成功した。Jurkat cell をラボディスク上に単離後、そのまま hot cell-direct RT-PCR の熱サイクルをかけることによって、シングルセル RT-PCR に成功した。この PCR 用ラボディスクを用いることで、簡単かつ迅速に細胞単離を行う事ができ、多数の細胞に対して同時に RT-PCR により発現遺伝子検出できることが示された。

##### 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 10 件)

- ① I. Kubo\*, S. Furutani and H. Nagai, The Activity Determination of Single Cell by Isolation and Cultivation on a Centrifugal Flow Disk, ECS transactions, 査読有, Vol.

16(17), 2009, 1-8

- ② M. Sakuragi, S. Tsuzuki, H. Hasuda, A. Wada, K. Matoba, I. Kubo, Y. Ito, Synthesis of a Photo immobilizable Histidine Polymer for Surface Modification, J. Applied Polymer Science, 査読有, Vol. 112, 2009, 315-319
- ③ S.Furutani, H. Nagai, Y. Takamura and I. Kubo\*, High Throughput Single Cell Detection by PCR on the Centrifugal Flow Device. Proc. of micro-TAS 2009. Vol. 1, 2009, 1814-1816
- ④ S. Furutani, H. Nagai, Y. Takamura and I. Kubo\*, Compact Disk (CD)-shaped device for single cell isolation and PCR of the specific gene in the isolated cell. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 査読有, Vol. 398. 2010. 2997-3004
- ⑤ M. Sakuragi, S. Tsuzuki, S. Obuse, A.Wada, K.Matoba, I. Kubo, Y. Ito, A Photo immobilizable Sulfobetaine-based polymer for a nonbiofouling surface, Materials Science and Engineering C, 査読有, Vol. 30, 2010, 316-322
- ⑥ I. KUBO, N. YOKOTA, Y. NAKANE, Y. FUCHIWAKI, The Establishment of Bisphenol A Sensing System Utilizing Molecularly Imprinted Receptor and Electrochemical Determination, International Journal of Electrochemistry, 査読有, Vol.2011, 2011  
Doi:10.4061/2011/534936
- ⑦ I. KUBO, S. FURUTANI, Y. TAKAMURA, H. NAGAI, Centrifugal Flow Disk for the Detection of the Specific Gene by PCR in the Isolated Cells, Chemical Sensors, 査読無, Vol.26, 2010, 46-48
- ⑧ I. Kubo\*, S. Furutani and K. Matoba., Use of a novel microfluidic disk in the analysis of single-cell viability and the application to Jurkat cells, J Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol.112, 2011, 98-101,  
Doi:10.1016/j.biosc.2011.030116
- ⑨ I.Kubo\*, N. Yokota and Y. Nakane, Sensing System for Bisphenol A Utilizing A Molecularly Imprinted Polymer Modified Electrode, Advanced Materials Research, 査読有, Vol. 452-453, 2012, 922-926,  
Doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.452-453.922
- ⑩ S. Furutani, H. Nagai, Y. Takamura, Y. Aoyama and I. Kubo\*, Detection of expressed gene in isolated single cells in microchambers by a novel hot cell-direct RT-PCR method, Analyst, 査読有, in press  
Doi:10.1039/c2an15866c

[学会発表] (計 件)

- (1) 久保いづみ, 古谷俊介, 松永宣行, ディスク状マイクロ流体デバイスでの抗体修飾マイクロビーズによる腫瘍マーカー CEA の測定, 電気学会 バイオ・マイクロシステム研究会, 2009 年 7 月 23 日, 東京
- (2) 久保いづみ, 古谷俊介, 高村禪, 永井秀典, 細胞単離  $\mu$  流路ディスクでのサルモネラ菌の PCR 法による検出, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 26 日, 札幌
- (3) 久保いづみ, 古谷俊介, 松永宣行, ディスク状マイクロ流路による腫瘍マーカーの高感度検出, 化学センサ研究会, 2009 年 9 月 11 日, 東京
- (4) 的場健二, 中村裕紀子, 永井秀典, 古谷俊介, 久保いづみ, ハイスループットな単一細胞分離ディスク上での Jurkat cell の生細胞検出, 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 17 日, 福岡
- (5) S. FURUTANI, H. NAGAI, Y. TAKAMURA and I. KUBO, HIGH THROUGHPUT SINGLE CELL DETECTION BY PCR ON THE CENTRIFUGAL FLOW DEVICE,  $\mu$ -TAS 2009, 2009 年 11 月 5 日, Jeju (Korea)
- (6) 久保いづみ, バイオマテリアルをベースとする高機能センシング, ナノ ICT シンポジウム 2010, 2010 年 2 月 18 日, 東京
- (7) 久保いづみ, 古谷俊介, 高村禪, 永井秀典, 単離細胞の有する遺伝子検出のための PCR 用マイクロ流路ディスク, 第 49 回化学センサ研究会, 第 49 回化学センサ研究会, 厚木
- (8) 久保いづみ, CD 型マイクロ流体デバ, イスでの腫瘍マーカーの迅速 ELISA 測定, 第 57 回臨床検査医学会学術集会, 2010 年 9 月 12 日, 東京
- (9) 伊藤啓晶, 中根優子, 古谷俊介, 久保いづみ, AFM を用いた, 細胞単離用デバイスでの微小粒子の観察, 日本分析化学会第 59 回年会, 2010 年 9 月 18 日, 仙台
- (10) 久保いづみ, 的場健二, 古谷俊介, 細胞活性評価用マイクロ流路ディスクでの細胞のトラップと評価, 日本分析化学会第 59 回年会, 2010 年 9 月 18 日, 仙台
- (11) 久保いづみ, 的場健二, 古谷俊介, 細胞活性評価用マイクロ流路ディスクでの Jurkat Cell の捕捉と生死判定, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 2010 年 9 月 26 日, 大阪
- (12) 久保いづみ, 古谷俊介, 永井秀典, 高村禪, 細胞単離マイクロ流路ディスクでの PCR によるサルモネラ菌の検出, 第 62 回生物工学会大会, 2010 年 10 月 28 日, 宮崎
- (13) S. FURUTANI, H. NAGAI, Y. TAKAMURA and I. KUBO, Single cell separation and characterization on Compact Disk (CD) shaped micro fluidic device, PACIFICHEM 2010, 2010 年 12 月 15 日, Hawaii
- (14) I. KUBO, S. FURUTANI, K. MATOBA, Novel Microfluidic Disk for Staining of Single Cell and Its Application to Jurkat Cells, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2011 年 3 月 3 日, Tokyo
- (15) S. FURUTANI, H. NAGAI, Y. TAKAMURA, I. KUBO, RT-PCR of isolated single cells on a Compact Disk (CD)-shaped device, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2011 年 3 月 3 日, Tokyo
- (16) S. FURUTANI, H. NAGAI, Y. TAKAMURA and I. KUBO, RT-PCR of GAPDH in Jurkat cells isolated on a Compact Disk (CD) shaped device, ISMM 2011, 2011 年 6 月 5 日, Seoul, Korea
- (17) 久保いづみ, 古谷俊介, 永井秀典, 高村禪, PCR 用マイクロ流路ディスクを用いた単一細胞分離と遺伝子検出, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 5 日, つくば
- (18) 伊藤啓晶, 中根優子, 古谷俊介, 久保いづみ, 原子間力顕微鏡を用いた, 細胞単離用デバイス上での大腸菌とファージの観察, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 6 日, つくば
- (19) S. FURUTANI, H. NAGAI, Y. TAKAMURA, Y. Aoyama and I. KUBO, Cell isolation and cell-direct RT-PCR on a compact disk (CD)-shaped device, Single Cell Analysis Summit, 2011 年 9 月 28 日, San Francisco, U.S.A.
- (20) Izumi KUBO, Single Cell Separation and PCR on Compact Disk Shaped Microfluidic Device, Single Cell Analysis Summit, 2011 年 9 月 28 日, San Francisco, U.S.A.
- (21) 新井一幸, 古谷俊介, 岩下香代子, 青山由利, 久保いづみ, 細胞単離ディスクを用いた *Bacillus cereus* 特異遺伝子の迅速同定法の検討, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25 日, 横浜
- (22) 古谷俊介, 永井秀典, 高村禪, 青山由利, 久保いづみ, CD 型細胞単離デバイス上での Hot cell-direct RT-PCR による単一細胞の発現遺伝子検出, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 28 日, 横浜

〔図書〕(計2件)

- ① Y . FUCHIWAKI and I. KUBO, Biometrics, Learning from Nature, A. Mukherjee Edit., In-Tech, 2010, pp.385-98(分担執筆)
- ② 久保いづみ, 先端医療に関する医療ニーズ, 技術情報協会, 2012 (分担執筆)印刷中

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：検出容器およびそれを使用する検出方法

発明者：久保いづみ、古谷俊介、的場健二  
権利者：学校法人 創価大学、タマティールオー株式会社

種類：特許

番号：特願 2010-64506

出願年月日：2010年3月19日

国内外の別：国内

名称：検出容器およびそれを使用する試料検出方法

発明者：久保いづみ、古谷俊介  
権利者：学校法人 創価大学、ミライアル株式会社

種類：特許

番号：特願 2012-15413

出願年月日：2012年1月27日

国内外の別：国内

○取得状況 (計1件)

名称：集積化したマイクロウェルアレイを用いる単離技術

発明者：永井秀典, 久保いづみ, 古谷俊介  
権利者：産業技術総合研究所, 創価大学

種類：特許

番号：第4957893号

取得年月日：2012年3月30日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.soka.ac.jp/~kubo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 いづみ (KUBO IZUMI)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：40214986

x(3) 連携研究者

永井 秀典 (NAGAI HIDENORI)