

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 6月 8日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710122

研究課題名（和文）

一細胞遺伝子発現解析のためのチッププラットフォームの構築

研究課題名（英文）

Development of the on chip microchamber array device for single cell gene analysis.

研究代表者

斉藤 真人 (SAITO MASATO)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80457001

研究成果の概要（和文）：

単一の細胞やその遺伝子情報の解析・評価を行うため、微細加工技術を用いて微小反応場（33.7～50 nL）を有するマイクロチャンバーアレイチップを作製した。熱伝導性に適したシリコン製マイクロチャンバーや細胞観察に適した透明なポリスチレン製マイクロチャンバーアレイを作製した。オンチップ PCR 諸条件の検討を行い、遺伝子検出が行えることを確認した後、単一細胞を分離・配置し、PCR および RT-PCR を試みたところ、DNA 増幅による遺伝子検出が行えることを確かめた。

研究成果の概要（英文）：

For analyzing a single cell contents or gene information, we have fabricated the microchamber array chip which has microscale reaction fields. One of chip substrate material was silicon and other one was polystylen polymer. After evaluation and optimization of the on-chip PCR conditions, DNA amplification from a single cell in the microchamber, was attempted. A single cells were placed in each microchambers by micromanipulating. As a result, we could successfully observed the fluorescence which was associated with DNA amplification from a single cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：バイオセンサー、バイオチップ、生物工学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：シングルセル、PCR、RT-PCR、マイクロチャンバー

1. 研究開始当初の背景

細胞解析の場合、従来のバルクスケールの実験アプローチでは、目的としない細胞を含んだ平均的な値が得られてしまう。これは細胞単位では個々の細胞活性が異なるため、特に免疫細胞においては顕著で、例えば刺激

に対する単一 B 細胞の免疫応答差が示されている [S. Yamamura, et al, Anal. Chem., 77, 8050-8056, 2005]。また、極少量の細胞サンプルあるいは希少なサンプルの評価・診断などにおいて、例えば、妊娠時の母体・胎児の健康維持を目的とした胎児診断におい

て、母体血にわずかに含まれる胎児有核赤血球の遺伝子診断が研究されている [高林晴夫ら、日本新生児学会誌 H15, 39(4), 639-46]。つまり、ある細胞集団の中にごく稀に存在する細胞を選択的に解析することが求められている。そのため、一細胞や 1 分子 DNA レベルからの効率的な DNA 増幅技術の開発が求められる。こうした解析手法を展開するには、従来型のチューブ (バルク) スケールでは、細胞間の個体差を明らかにできない点や、一細胞操作の不確定さ、検出感度などが問題となるが、これに対し、微細加工技術により可能となったマイクロ・ナノスケールの微小反応場を有するマイクロチャンバー構造を作製することで、低濃度の鋳型 DNA からの増幅後の単位体積あたりの増幅 DNA 濃度 (DNA 増幅に伴う蛍光強度) が高くなるため、高感度化が期待される

一方、研究代表者は微細加工技術を用いたマイクロ・ナノスケールの反応場を有するバイオチップの作製と応用に関する研究に取り組んできた。このような技術的素地を活かし、マイクロチャンバーアレイを用いたオンチップ PCR および RT-PCR 法を確立させ、一細胞研究に適したプラットフォームを構築を目指す。これにより、一細胞発現情報などの分子生物学的な知見に加え、オーダーメイド抗体医薬や診断医療などへの応用、広範な分野への展開・貢献を目指す。

2. 研究の目的

生体情報の中心となる DNA・RNA 群を、血漿中から抽出、あるいは一細胞のみを取り出し、1~数遺伝子コピーレベルで解析する手法の開発が求められている。特に、一細胞・一分子レベルでの DNA・RNA 発現解析法の開発では、従来のバルク的な手法つまり平均値的情報からでは得られない、単一の細胞や遺伝子情報の解析・評価を可能にすることが求められている。そこで、微細加工技術を用いて微小反応場を作製し、これに単一細胞を分離・配置し、PCR 法などを組み込んだ一細胞・一分子 DNA レベルの解析手法を開発・確立させ、さらには、希少細胞を用いた単一細胞医療診断や抗体医薬開発の基盤技術へと発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

微細加工技術を用いて微小反応場を作製し、これに単一細胞を分離・配置し、PCR 法などを組み込んだ一細胞・一分子 DNA レベルの解析手法を開発・確立させることを目指す。

シリコン製マイクロチャンバーアレイを用いて、一細胞 PCR、RT-PCR にかかる諸条件の検討を行い、基礎的な素地を固める。マイクロチャンバーの作製は、微細加工技術に

基づいて行う。酸化シリコン (SiO₂) / シリコン (Si) 基板上にフォトレジスト (OFPR800 等) を塗布し、フォトマスクパターンを通して露光と現像を行う。形成させたレジストパターンをもとに、酸化膜をエッチングにより取り除く。形成させた酸化膜パターンをもとに、異方性エッチングを行うことでマイクロチャンバーを形成する。また、基板材質の選択として、シリコンは熱伝導性がよく、熱に伴う変形もほとんどないため、オンチップ PCR に使用する材料として適していると考えられる。一方、チャンバー内に導入した細胞の観察が行えるよう、透明なプラスチック樹脂製のマイクロチャンバーも検討する。

マイクロチャンバーへの一細胞の配置には、ナノピンセットやガラスニードル、マイクロマニピュレーターを用いて正確に行う。これは、細胞溶液をマイクロチャンバーに展開した場合、細胞の破碎などによって溶液中に放出されたゲノム DNA や RNA がコンタミネーションの原因になるためである。また、従来の PCR チューブを用いた手法では、チューブ内に配置された細胞の有無を確認するすべは無く、実験の不確実性の一因となっている。これに対し、マイクロチャンバーを用いた場合、チャンバー内に配置された細胞を観察によって確認し、一細胞 PCR の諸条件の検討を効率よく行うことが可能となる。また、マイクロチャンバーへの PCR 溶液の導入は、ナノリッターディスペンサーを用いることで迅速、正確、均一に導入することが可能である。チャンバーチップ上にあらかじめミネラルオイルを積層しておくことで、ディスペンサーから吐出された PCR 溶液が、オイル層を貫通してチャンバー内に導入され、蒸発を防ぐことができる。

最適化した条件をもとに、内在性コントロールなどを用いて一細胞 RT-PCR を行い、細胞間の発現量などのゆらぎを評価する。また、マイクロ流路の組み込みを検討し、マイクロフロー・マイクロアレイ一体型一細胞チップの開発も検討する。これにより汎用性の高いチッププラットフォームの構築を目指し、一細胞診断や抗体医薬などの医療分野、一細胞研究領域などの生化学分野への研究用ツールとしての展開を目指す。

4. 研究成果

一細胞を分離・配置し、細胞の様態観察と遺伝子発現を評価するため、透明な樹脂製マイクロチャンバーアレイの作製を行った。ニッケル電鍍により金型を作製し、射出成型によりポリスチレン製マイクロチャンバーアレイを作製した (図 1)。成型された各チャンバーサイズは 540×540×210 μm (容量 33.7 nL) で、これを 1 枚のチップ上に 1248 (24×52) 個配列させている。内在性コントロー

ル遺伝子を標的にし、PCR 酵素量、サーマルサイクル反応時間などの検討を行い、オンチップ RT-PCR にかかる諸条件の最適化を行うとともに、DNA 増幅法を利用した遺伝子検出が行えることを確かめた。なお、RNA から DNA への逆転写反応と DNA 増幅反応を連続的に行える 1 ステップ RT-PCR 法を利用した。

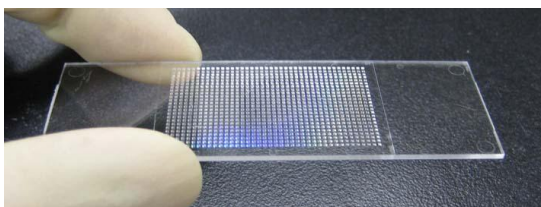


図 1. PS 製マイクロチャンバーアレイ

一方、網膜色素変性症など視力の回復において、培養細胞による網膜細胞シートを作製し、移植・再生を試みる手法に期待が寄せられている。このとき網膜細胞の分化状態を遺伝子レベルで評価を行うことができれば、人工再生組織開発の一助となるものと考えられる。そこで、網膜細胞の色素沈着に伴う成熟度を一細胞ごとに遺伝子発現評価するため、作製したポリスチレン製マイクロチャンバーアレイを利用し、一細胞からの遺伝子検出を試みた。ガラス針を用いて、網膜細胞一細胞をマイクロチャンバー内に配置可能であった。さらに光学顕微鏡観察下において、色素沈着前と沈着後の網膜細胞を判定することも可能であった (図 2)。

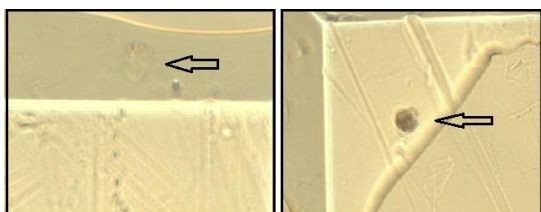


図 2. チャンバー内に配置した網膜色素細胞 (左: 白色細胞、右: 黒色細胞)

色素関連遺伝子である RPE65 領域のプライマーを用いて、チャンバー内に配置された一細胞から RT-PCR 増幅を行った。DNA 増幅に伴い蛍光強度が上昇する SYBR GI 蛍光検出法を利用した。その結果、色素沈着後細胞よりも前細胞のほうが蛍光量が強く、つまり細胞からの遺伝子発現量の多い結果となった (図 3)。今後、統計的検証などの課題はあるが、オンチップ RT-PCR による一細胞からの遺伝子発現検出が可能であることを示すことができた。

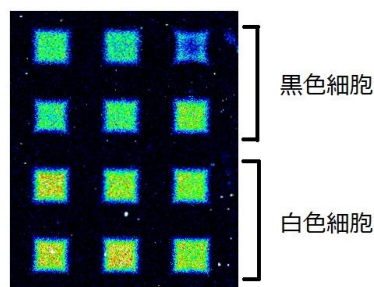


図 3. 一細胞オンチップ RT-PCR 後の各チャンバーの蛍光像

一方、上述の 1 ステップ RT-PCR だけでなく、より汎用的な 2 ステップ RT-PCR を行えるよう、2 段構造のマイクロチャンバーアレイも設計作製した。2 ステップ RT-PCR では、ランダムプライマーを用いてすべての mRNA から DNA へ逆転写され、その DNA を含む反応液の一部と目的とする増幅領域のプライマーを用いて DNA 増幅が行われる。1 ステップ RT-PCR では mRNA 特異的プライマーが用いられるが、mRNA とゲノム DNA との配列の関係からプライマー設計が難しく、一般的には 2 ステップ RT-PCR が汎用的に利用されている。2 ステップ RT-PCR を同一チャンバー内で行えるようにするため、600x600x100 μ m サイズのチャンバー (1 段目) の上に、1200x1200x200 μ m サイズのチャンバー (2 段目) を有する構造となっている (図 4)。シリコン表面への酸化膜形成とレジストパターンニング、および TMAH 溶液を用いたシリコン異方性エッチングの組み合わせにより、シリコン基板上への 2 段構造チャンバーの形成を行った。

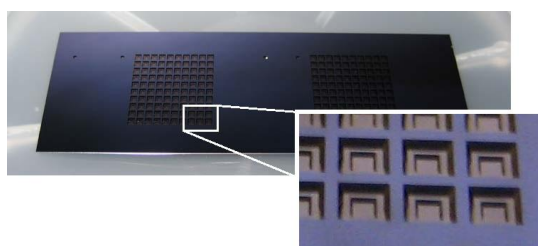


図 4. シリコン製 2 段マイクロチャンバー

β 2 イムノグロブリン (B2M) 遺伝子を指標に、1 段目チャンバーに B2M プライマー、total RNA および逆転写酵素を導入し、一旦、逆転写反応を行った後、続けて 2 段目チャンバーに PCR 溶液を導入し、PCR 反応を行った。その結果、B2M 遺伝子を含むチャンバーと含まないチャンバーで DNA 増幅に伴う蛍光強度に差が見られた (図 5)。このことからオンチップ 2 ステップ RT-PCR も可能であることが確かめられた。

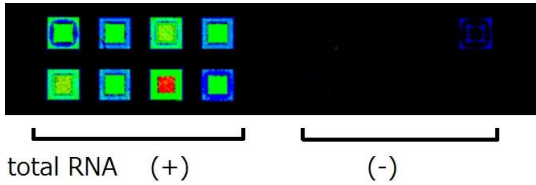


図 5. オンチップ 2 ステップ RT-PCR 後のチャ
ンバー内の蛍光像

また、マイクロ流路内での生化学反応が可
能か検証するため、マイクロ流路型反応場を
利用した DNA 増幅も検討した。流路幅を 300
~50 μ m、深さを 200~50 μ m とする PDMS/ガラ
ス製マイクロ流路チップを作製した。シリコ
ンウェハ上に SU-8 レジストパターンニングを
行い、これを鋳型として PDMS 樹脂へ転写成
型した。離形した PDMS をガラス基板へ接合し
PDMS/ガラス製マイクロ流路チップとした
(図 6)。作製したチップ面に 2 つの温度のヒ
ーターをそれぞれ接触させ、流路中の PCR 溶
液が各ヒーター上を交互に通過することで
熱交換が行われる。PDMS はガス透過性が高い
ため、PCR 反応時の高温部で気泡が発生し、
PCR 溶液の流れを乱す原因となる。そこで、
PDMS 流路内壁をミネラルオイルでコーティ
ングすることでガス発生を防ぐことができ
た。さらに流路長やヒーター温度等を検討し
た後、*B. subtilis* 168 をモデル細胞として
16S rDNA 領域特異的な DNA 増幅 (381 bp) を
試みた。流路中を通過してきた反応液を回収
し、電気泳動により確認したところ、目的と
する DNA を観察することができた (図 7)。こ
れによりマイクロ流路による PCR が可能で
ることが確かめられた。

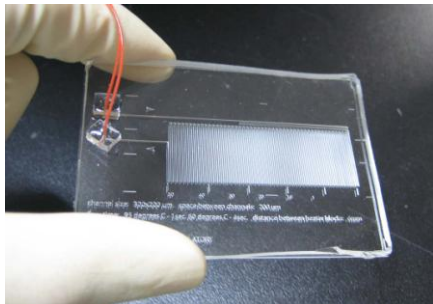


図 6. PDMS 製流路型チップ

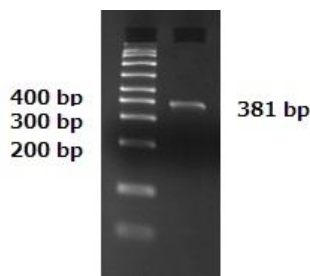


図 7. 増幅産物の電気泳動

以上、マイクロ流路とマイクロアレイの統
合までは至ることができなかったが、マイク
ロ反応場における一細胞遺伝子増幅が可能
であることを示すことができ、チッププラッ
トフォームの基礎を築くことができた。今後
は、統合化・複合化をすることで医療分野や
一細胞研究領域などの生化学分野への研究
用ツールとして発展することが期待できる。

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 8 件)

- ① Naoki Nagatani, Keiichiro Yamanaka, Hiromi Ushijima, Ritsuko Koketsu, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Masato Saito, Toshiro Miyahara and Eiichi Tamiya, Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip, *Analyst*, 査読有, 2012, DOI: 10.1039/C2AN16294F, In press
- ② Yusuke Fuchiwaki, Hidenori Nagai, Masato Saito, Eiichi Tamiya, Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure, *Biosensors and Bioelectronics*, 査読有, 27, 2011, 88-94
- ③ Keiichiro Yamanaka, Masato Saito, Kenji Kondoh, Mohammad Mosharraf Hossain, Ritsuko Koketsu, Tadahiro Sasaki, Naoki Nagatani, Kazuyoshi Ikuta and Eiichi Tamiya, Rapid detection for primary screening of influenza A virus: microfluidic RT-PCR chip and electrochemical DNA sensor, *Analyst*, 査読有, 136, 2011, 2064-2068
- ④ 遠藤達郎、栗田昌昭、金子努、齊藤真人、民谷栄一、プラズモニクナノアレイバイオチップと解析システムの開発、電気学会論文誌E (センサ・マイクロマシン部門誌)、査読有、131(12)、425-426
- ⑤ N.B. Trung, M. Saito, H. Takabayashi, P.H. Viet, E. Tamiya, Y. Takamura, Multi-chamber pcr chip with simple liquid introduction utilizing the gas permeability of polydimethylsiloxane, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読有, 149 (1), 2010, 284-290
- ⑥ Mohammad Mosharraf Hossain, Eiichi Shimizu, Masato Saito, Sathuluri Ramachandra Rao, Yoshinori Yamaguchi and Eiichi Tamiya, Non-invasive characterization of mouse embryonic stem cell derived cardiomyocytes based on the intensity variation in digital beating video,

- Analyst, 査読有, 135, 2010, 1624-1630
- ⑦ Ha Minh Hiep, Kagan Kerman, Tatsuro Endo, Masato Saito, Eiichi Tamiya, Nanostructured biochip for label-free and real-time optical detection of polymerase chain reaction, Analytica Chimica Acta, 査読有, 661(1), 2010, 111-116
- ⑧ Tsuyoshi Nakayama, Ha Minh Hiep, Satoshi Furui, Yuji Yonezawa, Masato Saito, Yuzuru Takamura, Eiichi Tamiya, An optimal design method for preventing air bubbles in high-temperature microfluidic devices, Anal Bioanal Chem, 査読有, 396(1), 2010, 457-464

[学会発表] (計 3 件)

- ① 斉藤真人、一細胞遺伝子解析のためのアレイチッププラットフォームの構築、ワークショップ 13. 細胞マイクロチップの新展開～細胞評価技術の俯瞰的理解を目指して～、第 63 回日本生物工学会大会 (招待講演)、2011 年 9 月 27 日、東京農工大学小金井キャンパス
- ② M. Saito, K. Hidari, Y. Yamaguchi, E. Tamiya, Development and optimization of the on chip microchamber array PCR and RT-PCR, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICCHEM 2010), Dec 18, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ③ E. Shimizu, M. Saito, Y. Yamaguchi, E. Tamiya, Quantitative imaging for beating frequency of ES-derived cardiomyocyte, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICCHEM 2010), Dec 18, 2010, Honolulu, Hawaii, USA

[図書] (計 4 件)

- ① 民谷栄一、斉藤真人、吉川裕之、応用物理学会、応用物理 80(3)、ナノ金属構造を用いた局在表面プラズモン/電気化学バイオセンシング、2011、p.220-225
- ② M. Saito, E. Tamiya, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 5.6 Local surface plasmon resonance and electrochemical biosensing systems for analyzing functional peptides, Volume 5 - Analysis and Function of Amino Acids and Peptides, Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Andrew B. Hughes (ed.), 2011, p211-223
- ③ 山中啓一郎、斉藤真人、シーエムシー出版、局在プラズモン共鳴バイオデバイス (第 20 章)、近接場光のセンシング・イメージング技術への応用—最新のバイオ・化学・デバイス分野への展開— (監修・民谷栄一、朝日剛)、2010、p213-220

- ④ M. Saito, H. M. Hiep, N. Nagatani, E. Tamiya, Springer, Sensors, Advances in biochemical engineering/biotechnology, Nano/Micro Biotechnology, 119 (eds. I. Endo, T. Nagamune), 2010, p231-250

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 真人 (SAITO MASATO)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 80457001