

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560266

研究課題名(和文)単細胞セクレトミクス技術の確立

研究課題名(英文)Establishment of single secretomics

研究代表者

渡邊 朋信(Watanabe, Tomonobu)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：00375205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞外分泌物質のオミックス技術に係る。分泌物質は培養溶液に速やかに拡散し大幅に希釈される。我々は、マイクロデバイス技術と先端光学技術を用いて、この問題点を解決し、単細胞精度での分泌液網羅解析(セクレトミクス)の確立と計測スループットの向上を目指した。

我々は、単細胞セクレトミクス技術の生物学的有効性を示すと共に、高速かつ高精度で細胞を捕捉できるマイクロウェルの開発、光(ラマン散乱分光)による分泌液分析法の開発を並行で遂行した。単細胞セクレトミクス技術により細胞の種類が同定できることが示され、実用化に向けては課題が残るものの、スループットの向上が見込める結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was establishment of novel omics-technology to comprehensively analyse secretory of a single cell. The critical problem was a fact that the secretory immediately diffuses into medium after the cell released it. We had tried to achieve the establishment and the throughput improvement of the single cell secretomics by using microdevice technologies and advanced optical microscopy.

First, we indicated that the cell state/kind can be identified with the information of secretory by using our present techniques. Second, we developed a new-shaped micro-well to trap individual single cells.

Third, we developed an analytical method of secretory by using Raman-spectroscopy. In this study, we could obtain the sufficient result to indicate the future throughput improvement and the effectiveness of the present technique in biology even the some problem are remained for practical use.

研究分野：生物物理学

キーワード：オミックス技術 分泌液分析 単細胞解析

1. 研究開始当初の背景

オーダーメイド医療の実現など、高精度にゲノムが解析できれば医療に大きな進歩が起こると期待され、2003年にヒトのもつDNA配列の全体を網羅的に解読するヒトゲノム計画が開始された。ヒトゲノム計画が完了してから10年が経過した現在は、マイクロアレイ技術や次世代シーケンサを用いて、試料内の3万を超す遺伝子種の存在量や、RNA・DNA-タンパク質相互作用、DNA塩基修飾、蛋白質発現など様々な情報を網羅的に計測できる。これらの網羅的計測技術は、オミックス技術と呼ばれ、医学・生命科学において基盤技術となりつつある。

現在のオミックス技術のほぼ全てが、細胞内をターゲットとしている。我々は、細胞外の情報をターゲットとしたオミックス技術、細胞分泌液網羅計測(セクレトミクス)技術の開発を行ってきた。細胞は代謝産物やサイトカイン・ケモカインなどのシグナル分子を分泌する。汗、血液、尿、穿刺液などの分泌液に含まれる細胞が分泌する化学物質を定量的に分析することで、病態の診断、治療、経過観察が行われている。病態の指標となる化学物質は、細胞から細胞外に放出され、溶液中に拡散してしまう。そのため、分泌液内の化学物質の検出濃度は低い。例えば、がん細胞が分泌した腫瘍マーカーは、血液中に入ると大量の血液により希釈されてしまうため、末梢血を採取し分析しても、がん早期には検出されない。がんの超早期検出などのためにも、超感度(単細胞レベル)で分泌液が定量分析できる技術が待たれている。

我々は、これまでに、細胞ひとつを、オイルで仕切られた小さなマイクロウェルに閉じ込めることで、分泌液の溶液拡散を制限し、単細胞から分泌された化学物質の質量分析に成功している(図1)。しかし、各ウェルへの細胞の配置は確率的であるため、計測のスループット向上が見込めない。また、質量分析器による解析も時間コストが高い。本研究課題では、この新しいセクレトミクス技術を用いた応用例を増やし技術として確立すると共に、その実用化に向けてスループットの向上を行った。

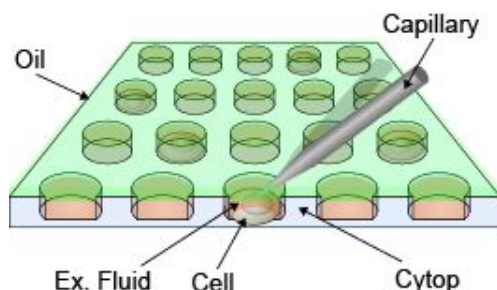


図1. 単細胞分泌液質量分析法の概略図

2. 研究の目的

本研究では、マイクロウェルプレートの開発や光学技術の融合によりスループットを向上させ、実用可能な単細胞セクレトミクス技術を開発・確立することを目的とした。具体的には、以下の三つを研究期間内の目標とした。

- (1)1000個の細胞を5分以内に整列可能なマイクロウェルアレイプレートの設計。
- (2)単細胞分泌液質量分析法とラマン散乱分光法の融合。
- (3)少なくとも10種類の細胞の単細胞分泌液質量分析データの収集および解析。

3. 研究の方法

- (1)1000個の細胞を5分以内に整列可能なマイクロウェルアレイプレートの設計。

細胞が自動配列され、かつ、細胞それぞれが隔離されるマイクロウェルプレートを開発し、スループットの向上を行った。後に、光による計測を行うため、マイクロウェルの材料は、ガラスである。

- (2)単細胞分泌液質量分析法とラマン散乱分光法の融合。

溶液内の構成要素が既知であり、その濃度のみを計測したい場合には、質量分析器を用いる必要性はない。さらなるスループット向上のために、質量分析器の代わりにラマン散乱分光法を応用した。ラマン散乱分光法は、光学技術であるため溶液の採取が必要ない。質量分析で得られるマススペクトルとラマン散乱分光スペクトルとを同時に扱うための数学的手法の開発も併せて行った。

- (3)少なくとも10種類の細胞の単細胞分泌液質量分析データの収集および解析。

本手法である単細胞セクレトミクス技術の生物学・医学的な有効性を示すために、様々な種類の細胞の分泌液情報を取得、比較、検討した。

4. 研究成果

- (1)1000個の細胞を5分以内に整列可能なマイクロウェルアレイプレートの設計。

我々は、まず、マイクロ流路による細胞捕捉技術の適応を試行した(図2)。マイクロ流路には、シリンジポンプ等を用いて、直径10~100ミクロンのチューブから、細胞を含む溶液を供給する。この作業過程において、細胞はひとつひとつ十分に単離されている(細胞同士がくっついていない)ことが前提である。しかし実用上において、この前提は、必ずしも成立しない。しかし、表面活性剤等の添加などの薬品処理は、細胞に損傷を与える可能性が強く、回避したい。実用を過程した条件(細胞培養継代時に細胞をディッシュから剥離する条件)での、実施テストを行ったところ、接着性の強い細胞を用いた場合には、

残念ながら、マイクロ流路内に細胞が凝集し、流路が機能しなかった。



図 2. 作製した細胞捕捉用マイクロ流路

そこで我々は、代替案である、しゃもじ型のマイクロウェルの作製(三次製作)を行った(図 3)。しゃもじ型のマイクロウェル上に細胞を含む培養液を載せた後に、マイクロウェル基盤全体を遠心することにより、細胞がウェル内に配置される。細胞捕捉効率は遠心速度に依存し、3 分間の遠心操作により 93%のウェルに細胞が捕捉され、細胞培養液の注入時間を加えても、計 5 分以内で 1000 細胞以上を単離捕捉することに成功し、一応の数値目標の達成に至った。

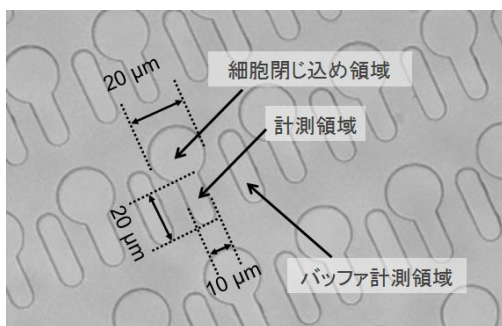


図 3. 作製したしゃもじ型マイクロウェル

(2)単細胞分泌液質量分析法とラマン散乱分光法の融合。

しゃもじ型のウェルを採用したことにより、光(ラマン散乱光)による分泌液分析技術の開発は、比較的容易となった。細胞はしゃもじの円形部分に捕捉されるため、その分泌液は柄の部分に拡散する。しゃもじ型の柄の部分を通り、捕捉された細胞からの距離に応じたラマン散乱スペクトルの変化を計測することで、分泌液の拡散を光で確認することができた。しかしながら、細胞を単離するために使用するオイル(ウェルに蓋をする)から発せられるラマン散乱スペクトルが、計測結果にノイズとして含まれてしまい、計測のシグナルノイズ比の低下の原因となっている。上記問題点を解決するため、現在、ノイズの少ないオイルの探索を行っている。

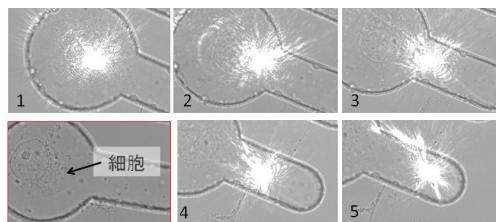


図 3. 作製したしゃもじ型マイクロウェル

(3)少なくとも 10 種類の細胞の単細胞分泌液質量分析データの収集および解析。

様々な細胞の単細胞分泌液質量分析データの収集および解析については、光ではなく質量分析器による解析を用いて行った。免疫細胞(T 細胞,B 細胞)、胚性幹細胞、人工多能性細胞(iPS 細胞)や神経分化前後の細胞について、その分泌液のデータを取得した。

本技術を用いて、分化した神経細胞が神経活性物質であるドーパミンを分泌している様子が単細胞精度で確認できた(図 4)。また、iPS 細胞の解析では、完全にリプログラミングされた iPS 細胞と不完全な iPS 細胞とで、僅かではあるが、確実に異なる分泌物質が発見された。このことから、本技術は、細胞の種類や状態を単細胞精度で同定する技術として有効であることが示された。

本研究期間内で把握された問題点を、今後解決することで、本技術は、生物・医学研究における基盤技術となると期待される。

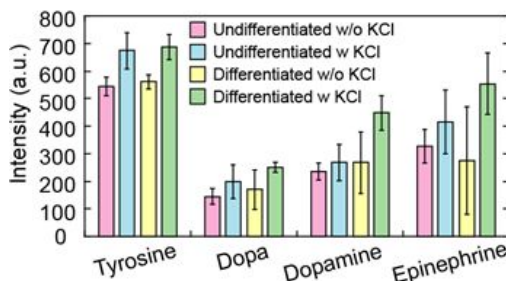
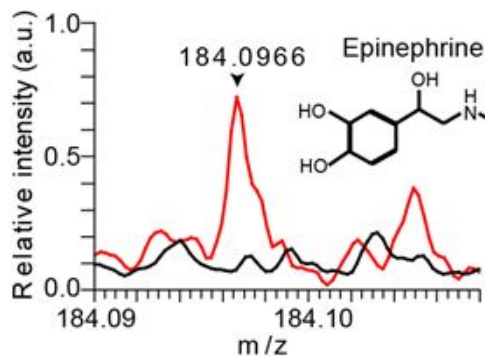


図 4. 単細胞から発せられたドーパミンを示すマススペクトルピーク(赤, 分化後; 黒, 分化前)とその他の分泌液比較(下)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujita H, Esaki T, Masujima T, Hotta A, Kim SH, Noji H, Watanabe TM.

Comprehensive chemical secretory measurement of single cells trapped in a micro-droplet array with mass spectrometry.

RSC Adv., 2015,5, 16968-16971.

DOI: 10.1039/C4RA12021C

〔学会発表〕(計 1 件)

渡邊朋信, 『単一』にこだわる計測技術
高速バイオセンブラ若手シンポジウム
0703/2015, 大阪大学(大阪吹田市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 朋信 (Tomonobu Watanabe)

(国)理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：00375205

(2)研究分担者

該当なし。

研究者番号：

(3)連携研究者

藤田 英明 (Hideaki Fujita)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：50318804