

研究成果（小テーマにつき2ページ以内でまとめてください）

<p>サブテーマ名：ナノデバイスによる医療用検査システムデバイスの開発 小テーマ名：1-1-④ ナノデバイスを利用した細胞機能計測とイメージング材料の機能検証への利用検討</p>
<p>サブテマリーダー（所属、役職、氏名） 小寺秀俊（共同研究員・京都大学）、岩田博夫（雇用研究員・京都大学） 研究従事者（所属、役職、氏名） 黒澤 修（雇用研究員・ASTEM）、鷺津正夫（雇用研究員・東京大学）、鈴木孝明（雇用研究員・香川大学） 〔河野恵子（雇用研究員・ASTEM）、近藤科江（雇用研究員・京都大学）〕</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>① 研究の概要 浮遊系および付着系の両タイプの細胞を対象とし、チップ上に設けられたマイクロオリフィス上でのエレクトロポレーションを用い、細胞内に物質を導入し、それに対する細胞応答の計測を行う手法およびデバイスの開発を行った。</p> <p>② 研究の独自性・新規性 本研究は、細胞の大きさ・形状に依存せず、わずか数ボルトのパルス電圧でエレクトロポレーションが行えるという点において、前例のない独創的なものである。また、絶縁シート上に複数のオリフィスをアレイ状に並べることにより、大量の細胞を一括して扱うことができるのみならず、エレクトロポレーション前後の細胞をリアルタイム観察することで、細胞1個に注目した、リアルタイム経時変化解析（タイムラプス解析）も可能である。</p> <p>③ 研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） a) 本手法の有効性を理論的・実験的に実証する。 b) エレクトロポレーションにより導入した物質に対する細胞の応答計測のデモンストレーションを行う。 c) オリフィスシート上での細胞の長期培養とプラスミド導入による高収率なトランスフェクションを実現する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>a) エレクトロポレーションの有無を、生細胞膜不透過なDNA蛍光色素で細胞内の核が染色され蛍光を発するかどうかで判定した。 b) 細胞のリアルタイム応答計測の例として、単離モルモット心室筋細胞へのTCA回路基質の導入とそれに伴う細胞内NADHの輝度変化の観測を行った。 c) チップ上での長期培養が行えるように、オリフィスにゲルによる裏打ち構造を作りオリフィスに細胞が入り込まないようにした。負の電荷を持ち高分子のプラスミドは、単純な拡散では十分な量を細胞に導入することができないため、電気泳動効果を援用できるパルスの最適化を行い、MSC細胞において遺伝子発現率20-30%を得た。以上により、目標はクリアされた。現在、プラスミドを、より効率的に、核内に導入するため、より稠密なオリフィスを持つオリフィスシートを作製する方法につき検討している。</p>
<p>主な成果 具体的な成果内容： オリフィスアレイ部に吸引固定した細胞（浮遊細胞）、あるいは、あらかじめ接着培養した細胞（付着細胞）に対しエレクトロポレーションを行い、1~2Vのパルスを印加すれば、オリフィス上に存在する細胞のほとんどが蛍光を発するようになり、色素導入の収率がほぼ100%であることを示した。単離モルモット心室筋細胞に、エレクトロポレーションでTCA回路の基質を導入すると、パルス印加直後（1秒以内）から細胞内のNADHの輝度（濃度）が上昇する様子が確認された。これにより、本手法は、細胞の活性を損なうことなしに（低侵襲な状態で）物質を細胞内に導入することができ、かつ、細胞の応答計測をリアルタイムで追跡できることが示された。オリフィスシート上で細胞を培養し続けると、細胞</p>

がオリフィス内に落ち込んで細胞死に至るといった問題が生じたが、オリフィスの孔をアガロースゲルで塞ぐことにより、低コストで簡易に裏打ち構造を作ることができ、オリフィスシート上での細胞の長期培養も可能になった。オンチップエレクトロポレーションの収率と細胞の幾何学形状の関係につき、理論的考察と実験的研究を行い、細胞内にプラスミドを導入するためには、電気泳動効果を用いる必要があるが、対象とする細胞の形状が扁平であると、プラスミドが細胞をつきぬけてしまい、効率的に導入できないらしいことを明らかにした。周囲の導電率を下げ、細胞の上面にプラスミドを置いてパルスを印加することにより、導入率を改善することができ、再現性も向上することを示した。本手法を用いた場合、パルス印加時にプラスミドが直接核内に導入されることが、GFPプラスミドの導入と、GFP発現の時間経過から明らかとなった。

特許件数：2件、論文数：3件、口頭発表件数：21件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

細胞1個に注目した取り扱いが可能で、低電圧のパルスでエレクトロポレーションを行う研究に関しては、キャピラリーやMEMS構造を用いた研究などがあるが、前者は職人技を必要とし、後者はデバイスの製作プロセスが複雑で実用的ではないという問題がある。さらに、いずれの場合も、膜電圧の粒径依存性は残ったままなので、パルス条件をその都度設定しなおす必要がある。これに対して、本研究で開発したデバイスは、オリフィスシートを介して電極を配置するだけの単純な構造で、取扱いにおいても特別な技術を必要としない。また、エレクトロポレーションの有無が細胞の大きさ・形状に依存しないため、細胞に合わせたパルス条件を設定する必要がないといった点でユニークである。

2 実用化に向けた波及効果

タイミングを制御して、1細胞レベルでトレーサブルな物質導入を行うことができる手法・デバイスは、特に、iPS細胞・ES細胞等の作製や分化誘導など、高付加価値細胞にかかわる基礎・応用研究に不可欠なツールになると期待される。

残された課題と対応方針について

再生医療研究者との連携により、本手法・デバイスの応用を開発するとともに、企業との連携により、工学的バックグラウンドを持たない医学・生物学研究者に簡便に利用できるよう、ユーザーフレンドリーな形での製品化を進めていく。

残された課題と対応方針について

タイミングが制御されて1細胞レベルでトレーサブルな物質導入の手法は、特に、iPS細胞・ES細胞等の作製や分化誘導など、高付加価値細胞にかかわる基礎・応用研究に不可欠なツールである。

今後は、再生医療研究者との連携により、これらの応用を開発するとともに、企業との連携により、工学的バックグラウンドを持たない医学・生物学研究者に簡便に利用できるよう、ユーザーフレンドリーな形での製品化を進めていく。

	JST負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	小計	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	小計	
人件費				4,065	3,359	5,850	13,274				6,335	6,039	3,698	16,072	29,346
設備費	中間評価結果を受けて研究テーマの組み直しを行ったため、フェーズIについては様式1を参照されたい			2,985	5,723	0	8,708	中間評価結果を受けて研究テーマの組み直しを行ったため、フェーズIについては様式1を参照されたい			0	0	0	0	8,708
その他研究費(消耗品費、材料費等)				3,945	515	1,141	5,601				0	0	150	150	5,751
旅費				118	931	2,300	3,349				0	0	0	0	3,349
その他				208	223	385	816				317	304	185	806	1,622
小計				11,321	10,751	9,676	31,748				6,652	6,343	4,033	17,028	48,776

代表的な設備名と仕様 [既存(事業開始前)の設備含む]

JST負担による設備：顕微鏡用蛍光タイムラプスイメージングシステム1式

地域負担による設備：レシオイメージングセカンドライセンス