

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「統合 1 細胞解析のための革新的技術基
盤」
研究課題「拡張ナノ流体デバイス工学によるピコ・フ
ェムリットル蛋白分子プロセッシング」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者：北森 武彦
(東京大学大学院工学系研究科、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、研究代表者ら独自のマイクロ／拡張ナノ流体デバイス技術により、核酸とは異なり容易に増幅ができないタンパクに対して単一細胞レベルでの分析を実現することを目的としている。バイオ・医療分野の共同研究ユーザーと連携して、以下の4つの研究項目を推進した。

- (A) pL(マイクロ空間)プロセッシング法の開発
- (B) fL(拡張ナノ空間)プロセッシング法の開発
- (C) サイズインターフェース・超微量ロジスティクスの開発
- (D) システム化・実応用

研究項目 A では細胞分析において不可欠である細胞の前処理を単一細胞スケールで実現した。通常はマイクロチューブやピペットなどを用いた方法が一般的であるが、これらのツールは体積 μL ~ mL と細胞(体積 pL)より6桁以上も大きいため、これらを単一細胞分析に用いても目的分子が分散・損失してしまい分析が困難である。そこで、研究代表者ら独自のマイクロ流体デバイス技術により、細胞試料から特定の単一細胞を取り出し、細胞と同程度の大きさ 10 μm 、体積 pL のチャンバー内に確実に捕捉・隔離して前処理する方法を開発した。通常の細胞分析の単位操作に対応するマイクロ単位操作を開発し、これらを集積化して、pL チャンバー内で単一細胞の前処理プロセッシングを実現した。

研究項目 B では、単一細胞分析において求められる、目的タンパク分子を単一・可算個分子レベルで定量する極限分析を実現した。研究代表者らが開発してきた拡張ナノ空間を用いた免疫分析法(ELISA)では、拡散により分子が 1000 回/秒表面と衝突することを利用して目的タンパク分子を拡張ナノ空間の fL 反応場に 100%捕捉し、酵素反応による化学増幅と当グループ独自の超高感度検出法である微分干渉熱レンズ顕微鏡(DIC-TLM, Shimizu & Kitamori et al., Anal. Chem., 2009)により目的分子を検出・定量する。しかし、単一・可算個分子分析を実現するには、モル(天文学的数字)の分子数を対象とする従来 ELISA では問題とならなかった単一分子レベルのアーチファクト(偽の信号)や脱離(検出効率に影響)を考慮する必要があり、単一分子レベルのアーチファクトをゼロにまで抑制するための加工法や実験条件を見出し、単一・可算個分子レベルでの目的分子捕捉と分析を実現した。

研究項目 C では、細胞プロセッシングを行う体積 pL のマイクロ空間と目的分子のプロセッシング・検出を行う体積 fL の拡張ナノ空間をつなぐサイズインターフェースと、微小空間で目的分子や試薬を分散させることなく輸送する超微量ロジスティクスを実現した。具体的には、マイクロ空間と拡張ナノ空間を接続する pL→fL インターフェースを開発し、それを用いて単一生細胞から体積 39 fL の細胞試料のサンプリング、ナノピラーアレイによる細胞核・残渣のフィルタリングに成功した。また、ガラスの微小変形を利用した拡張ナノ流路開閉バルブをはじめて実現し、これを用いることで fL/s オーダーの流量制御を実現した。

研究項目 D では、研究項目 A、B、C で開発した要素技術を統合集積化し、本 CREST 研究で目標とする単一生細胞タンパク分析をはじめて実現した。具体的には、研究代表者ら独自の的方法論にもとづき、pL スケールの細胞プロセッシング・fL スケールの分子プロセッシング全てを 1 つのデバイスに集積化し、単一生細胞(モデル細胞)を 6 時間孤立化・刺激し、刺激に応答して産生するサイトカイン IL-6 の定量をはじめて成功した。これにより、バイオ・医療分野の研究者が切望する単一細胞タンパク分析システムの原理検証をはじめて成功した。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1.

概要:

単一細胞分析は試料体積 pL、目的分子数 1000 分子以下の極限分析となる。そのため現状は増幅可能な核酸でしか実現しておらず、増幅不可能なタンパクでは難しかった。そこで本研究では、研究代表者ら独自の的方法論にもとづき、pL スケール(マイクロ空間)の細胞プロセッシング・fL スケール(拡張ナノ空間; 10^2 nm)の分子プロセッシング全てを1つのデバイスに集積化し、単一生細胞タンパク分析を世界ではじめて実現した。本成果は本分野最大の国際会議 MicroTAS2018 の口頭発表(採択率 10%)に採択されるなど、非常に注目されている。

2.

概要:

微小空間の流路開閉バルブは現在でも難しい技術であり、PDMS などの柔らかい材料でしか実現していない。本研究では、ガラスの微小変形を利用して 100 nm の拡張ナノ流路を開閉するバルブを開発し、動作原理をはじめて実証した。本成果はこれまで外部駆動ポンプに依存していたマイクロ流体デバイスの設計概念を根本的に変える極めて重要な成果であり、高度な流体制御により様々な化学プロセッシングの集積化を可能にすると期待される。バルブの構造とこれを用いたデバイス、化学分析装置に関する特許を出願した。

3.

概要:

数 100 nm の拡張ナノ空間に構築した体積 fL の抗原抗体反応場と独自の超高感度検出法(DIC-TLM)を利用した ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を開発し、目的タンパクを 1 分子レベルで 100%選択的に捕捉定量することにはじめて成功した。本手法は化学増幅が不可能なタンパクの 1 分子レベルでの定量をはじめて可能にする方法論であり、分析化学やバイオなど様々な分野の革新的ツールとなるものである。本 CREST 研究においても単一細胞・単一分子分析を実現する上での重要なブレイクスルーである。本成果は、分析化学の国際学術誌 *Analyst* に掲載された。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:

本 CREST 研究で開発する拡張ナノ ELISA の方法論を応用して、マイクロ流路を幅 mm、深さ μm に薄層化した高 S/V 比の空間を反応場とする薄層液体 ELISA を開発して、試料体積 μL 、検出分子数 zmol のタンパク分析を原理検証した。さらに、この ELISA デバイスをディスポーザブルとするプロトタイプ分析システムを試作した。本手法により簡便で短時間になおかつ高感度なタンパク分析を実現でき、医療診断に革新的な方法を与えるとともに、医療現場で広く利用してもらえる診断システムを提供できると期待される。

2.

概要:

従来の液体クロマトグラフィーでは多孔質粒子のもつ拡張ナノサイズの細孔を用いて分離していたが、拡張ナノ流路そのものを分離場として用いるという発想の大きな転換により、これまで桁では性能が向上しなかった液体クロマトグラフィーに対して、革新的な性能向上をもたらした。グラジエントモードの導入によって試料体積 fL という単一細胞よりも圧倒的に少ない試料量の細胞溶解試料のタンパク分離分析をはじめて実現した。現在、プロテオミクス分野では単一細胞レベルの分離分析の要望が高いものの、最低 nL の試料量を必要とし分離効率が悪いのが現状である。そこで本法を単一細胞プロテオミクスに展開することで、従来の分析法・機器を

凌駕する分析機器市場を開拓できると考えられる。

< 代表的な論文 >

1. Tatsuro Nakao, Yutaka Kazoe, Kyojiro Morikawa, Ayumi Yoshizaki, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori, "MICRO/NANO-INTEGRATED FLUIDIC DEVICE FOR LIVING SINGLE-CELL PROTEIN ANALYSIS", The Proceedings of mTAS 2018, pp.132-133, 2018
2. Yutaka Kazoe, Yuriy Pihosh, Hitomi Takahashi, Takeshi Ohyama, Hiroki Sano, Kyojiro Morikawa, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori, "Femtoliter Nanofluidic Valve Utilizing Glass Deformation", Lab on a Chip, 19, pp.1686-1694, 2019
3. Kentaro Shirai, Kazuma Mawatari, Ryoichi Ohta, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori, "Single-Molecule ELISA Device utilizing Nanofluidics", Analyst (cover),143, 943-948, 2018

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「デバイス開発」グループ

研究代表者: 北森 武彦 (東京大学大学院工学系研究科 教授)

研究項目

- ・ pL 空間を用いた細胞プロセッシング法、fL 空間を用いた分子プロセッシング法、サイズインターフェース・超微量ロジスティクスなど、要素技術の開発
- ・ 単一細胞タンパク分析システムの開発
- ・ 研究全体の統括

②「化学プロセス設計」グループ

主たる共同研究者: 蓑田 亜希子 (理化学研究所生命医科学研究センター ユニットリーダー)

研究項目

- ・ 単一細胞タンパク分析の化学プロセスの設計
- ・ pL 空間を用いた単一細胞捕捉、細胞膜破碎・核破碎の検証
- ・ fL 空間を用いた目的タンパク分子捕捉の検証

③「デバイス実応用」グループ

主たる共同研究者: 吉崎 歩 (東京大学医学部附属病院 講師)

研究項目

- ・ 単一細胞タンパク分析システムの実応用
- ・ 自己反応性 B 細胞の機能解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

日本学術振興会の先端研究拠点事業「最先端マイクロ・ナノ化学国際研究拠点形成」において形成したネットワークを引き継ぐ形でスウェーデン、スイス、オーストラリア、アメリカ、シンガポールの研究者と協調して研究を推進した。また、産業界ではマイクロ化学技研株式会社と共同で免疫分析デバイスの実用展開などを推進している。