

# 研究報告書

## 「シングルセル分解計測へ向けた細胞空間分画技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 寺尾 京平

### 1. 研究のねらい

本研究は、半導体微細加工技術と微小物体操作技術を組み合わせることで、シングルセルを複数のサブセル領域に、また、組織をシングルセルサイズに区画化して、物理的に一括で切断する「細胞空間分画技術」と呼ぶ新たな細胞加工技術を提案する。本技術を生体分子の計測技術と一体化することで、細胞内部あるいは組織内部の分子の空間分布が定量的に計測できるようになることが期待される。期間内に必要な要素技術の開発に取り組み、細胞分画装置の実用化に向けたプロトタイプの実現を目指す。

生体分子の種類と数は細胞内の部位によって、さらに組織内の個々の細胞毎によって異なり、その空間分布が生命機能に重要な役割を果たしている。シングルセルを真に解析するためには、生体分子の種類・量に関する情報と細胞内あるいは組織内の空間情報を結びつけることが強く求められる。そのため、細胞内・組織内の空間情報を保持した状態で、生体分子を物理的に抽出して計測することが本研究の目的である。

本研究のコア技術である微細な刃状構造体を並べたナノブレードアレイデバイスを用いて、個々の細胞や組織スライスを培養・観察している「その場」でナノ・マイクロサイズの微小領域に細かく物理的に分割し、なおかつ分割した部位が散逸することなく、空間情報を有した状態で保持できる空間分画技術の確立を行う。さらに、薬液処理と定量的な計測を一体化した解析手法として構築することにより、細胞や組織を「分解」し、分子の空間分布の定量的取得を行う。

本研究は、これまでに代表者が開発してきたナノマイクロデバイス技術をベースに、次の4つの要素技術に関して、装置及び手法の開発を行う。(A) 単層培養した細胞を空間分画するためのナノブレードアレイデバイスの開発と、顕微鏡観察しながら高精度な分画操作を可能にする押圧機構の構築を行う。(B) アドレス化された各画分に対する計測手法の検討を進めるとともに、薬液処理を行う機構をナノブレードアレイデバイス内に開発し、画分集団に対するバイオ計測に繋げる。(C) 空間分画後の画分を回収する手法を開発する。(D) 臓器組織スライスを空間分画するための装置の設計と実証実験を行う。以上の要素技術の開発を通じて、汎用的な細胞解析前処理ツールとして確立することを目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究は、ナノブレードアレイデバイスによる細胞空間分画をコア技術として、二つのターゲット「シングルセル空間分画」と「組織空間分画」に取り組んだ。本提案を構成する要素技術として、A. ナノブレードアレイデバイスおよび押圧機構、B. 計測に向けた前処理技術、C. 細胞画分回収・操作機構、の開発に加えて、D. 組織空間分画への展開を行った。

結果として2つのターゲットで要求を満たすよう要素技術を開発したため、複数のバリエーションを持ったデバイスや操作技術を提案するに至った。研究成果として開発ステージには違いがあるものの、いずれも原理実証の段階は達成された。具体的には、シングルセル空間分画については、シングルセルのナノサイズ区画への分割、ブレード表面のリガンド固定によるセンサ化、周辺技術として光操作・細胞操作マイクロ流体デバイスの開発を実現した。組織空間分画については、貫通孔型ブレードアレイデバイスの作製、マイクロマニピュレータとのシステム化による画分逐次回収、マウス脳スライスを使った切断実証を実現した。今後は、これらの要素技術の統合を進め、さらにハイスループットな網羅解析技術と統合することが課題である。本技術の統合が実現できれば、組織を物理的に切断区画化するというシンプルな手法で、空間分解能を有した組織スライスからのトランスクリプトーム・プロテオーム解析が可能になることが期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「ナノブレードアレイデバイスおよび押圧機構の開発」

用途に応じて使い分けられるよう2種類の押圧機構システムを開発した(図1)。一つはシングルセルをさらに細かいサブセル領域に分割するためのナノメートルの高精度位置決め機構を有した「シングルセル空間分画装置」であり、もう一つは組織スライスをシングルセルサイズに分割するための小型かつ簡易な「組織空間分画装置」である。テーマ A ではシングルセル空間分画装置について説明し、後者についてはテーマ D に記述する。

シングルセル空間分画装置は主に単層培養した接着細胞をターゲットとし、xyz3軸でナノメートル精度の位置決め機能を兼ねた押圧機構と、押圧開始点と細胞とデバイスの接触状態を把握するため、 $\cdot N$  オーダーの検出感度をもつ微小力検出能を有したシステムを開発した。

シングルセル空間分画に用いるナノブレードデバイスは Si 微細加工によって作製され、期間内に作製条件を検討し、ブレード幅約 340 nm、区画深さ 10  $\cdot m$ 、区画の一辺の幅は最小で 500 nm のデバイスを安定に作製することが可能になった。通常の光学顕微鏡で観察が困難であるが、さらに微細な加工が可能である。接着性細胞である Hela 細胞を用いた評価実験により、区画サイズに応じてシングルセルを数区画~150 区画に分割した(図2)。蛍光染色した細胞核の観察結果から形状が分画前後で大きく変化していないことから、細胞内の位置情報を保持した状態で物理的に切断されていると考えられる(登録特許:特許第 6238397 号 細胞空間分画装置および微細構造刃)。

### 研究テーマ B「バイオ計測に向けた前処理技術の開発」

細胞画分を計測に繋げるため、種々の前処理技術を開発した。まずシングルセル空間分画について、分画した状態では閉空間に極微小サンプルが閉じ込められるため、外部からアクセスができない。そのため、ナノブレードアレイの表面に予め特定の生体分子を捕捉するリガンド分子を固定することで、分画と同時に細胞膜が破壊され、細胞内に存在していた標的分子をブレード表面に回収し、その後デバイス上でまとめて検出用試薬によって計測する手法を考案した。微細構造へのリガンド固定のため、複数のクロスリンク法を試験し、抗体抗原反応によって標的タンパク質の検出を確認した。また直接的成果ではないが、微細構

造間でのセンシング法、および電界による操作について実証した(論文1、特許1)。しかし、本手法では特定のターゲット分子を検出できるが、網羅解析には不適であることから、組織スライスを対象にした空間分画については異なるアプローチを採用した。具体的にはナノブレードアレイを貫通孔タイプにすることで、空間分画後、デバイスの背面からアクセス可能にする。シングルセル空間分画では貫通孔タイプの作製は区画サイズが小さいため達成できていないが、組織スライスをターゲットにした組織空間分画については、区画が比較的大きいことから貫通孔型の開発に取り組み、成功した。

貫通孔タイプについては、分画後の顕微鏡ステージ上で、背面の各区画の開口部から微量吸引吐出が可能なガラスマイクロピペットによって薬液処理と回収ができるシステム開発を行った。本システムにより、狙った画分内(容量: ~1 nL)のみへの溶液の吐出・吸引を達成し、特定区画の細胞回収を実現した。また、画各分間にはリークがないことが確認された。

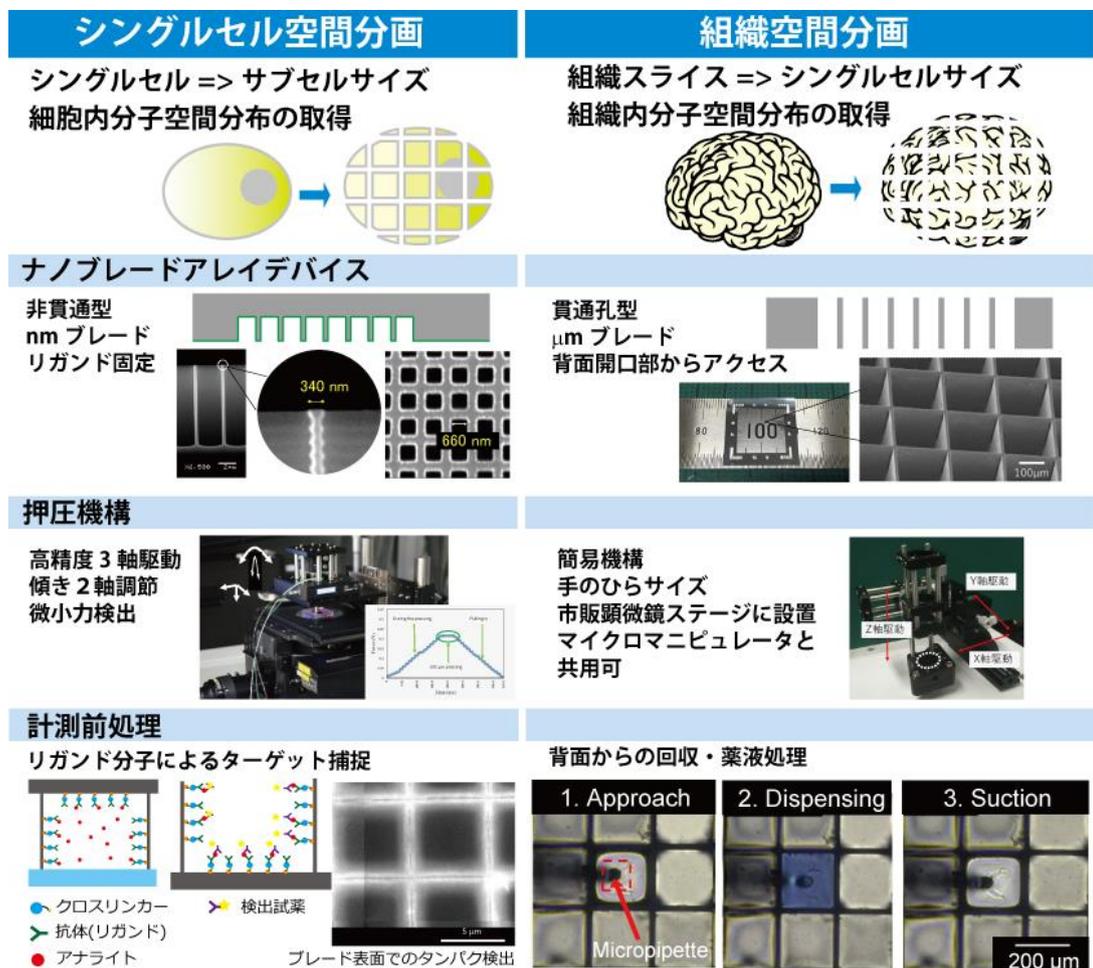


図1. 細胞空間分画の要素技術と機能

研究テーマ C「細胞画分回収・操作機構の開発」

シングルセル空間分画後の回収について、細胞膜が破壊されずに分画される場合があり、それぞれの画分を光操作あるいはマイクロ流体デバイスで回収できる可能性があることから周辺技術として開発に取り組み、光操作手法について基本的な特性(微細加工精度・

収率、発生力、操作性等)を得た(論文2)。またマイクロ流路については直接的な成果ではないが複数の細胞を生きたままトラップし、薬剤を導入できるデバイスを開発した(論文3)。本手法は回収サンプルへの解析前工程に必要な薬液処理に利用できる可能性がある。

組織空間分画の画分回収は、貫通孔型ナノブレードアレイデバイスを用いることでマイクロピペットを用いた逐次回収が可能になるため、平成28年度からテーマBの研究開発と一体化して行った。原理実証として分画した培養細胞株の特定区画の回収に成功した。

#### 研究テーマD「臓器スライス空間分画技術の開発」

組織スライスの空間分画に向けて、マウス脳スライスをターゲットにした貫通孔型ナノブレードアレイデバイスを開発した。ブレード領域は 25mm 角であり、脳スライス1枚を一括で分画することができる。ブレード幅は最小 5・m、区画サイズは最小 50・m であり、300・m 厚さの Si ウェハを貫通させることで作製した。組織分画に向けて、臓器スライスを設置する下地基板の検討を行い、柔軟なゲル素材上で分画することで、確実な押圧による切断を可能とした。本デバイスを用いることでマウス脳スライスの切断区画化を実証した。

組織空間分画装置は、シングルセル分画のような高精度の位置決めは不要なことから、機構を簡素化し、手のひらサイズの小型システムを開発した。これは、多くの市販の培養用顕微鏡に干渉することなく取り付けが可能である。さらに、ガラスマイクロピペットを有したマイクロマニピュレータを同時に取り付けることで、組織を分画したその場で、デバイス背面から画分を逐次回収できる機構とした。サンプルはチューブやウェルプレートに回収することができるため、qPCR や次世代シーケンサなどの解析の前処理に利用できると見込まれる。

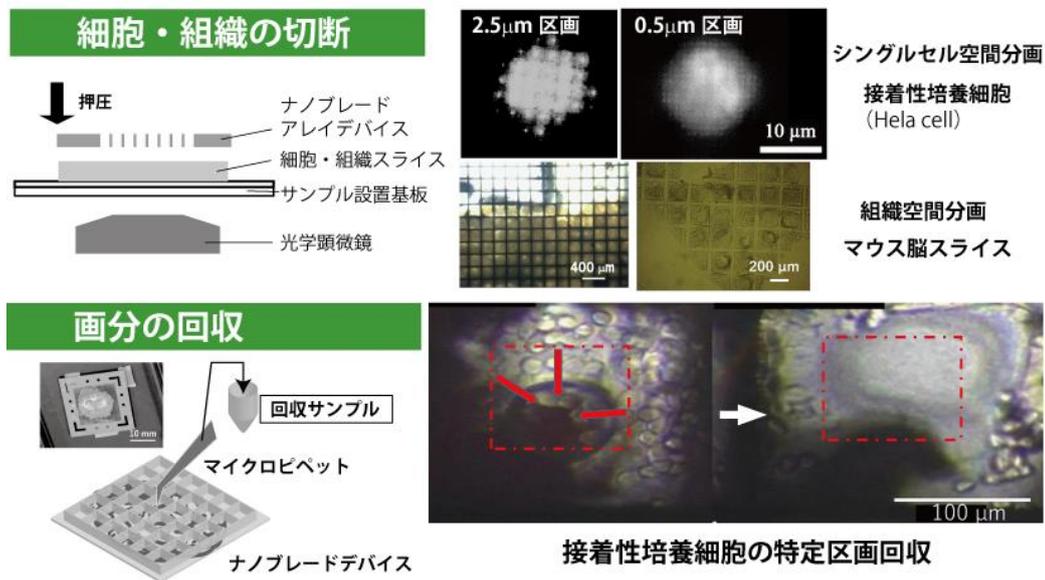


図2. 細胞分画と画分回収

### 3. 今後の展開

研究成果として2つの細胞空間分画技術、「シングルセル空間分画」と「組織空間分画」の原理実証を行った。それぞれについて以下の展開を計画している。

シングルセル空間分画については、ナノサイズの領域への分割とリガンド分子の固定化が実現されたことから、それらを組み合わせた生体分子検出技術を計画している。また、画分毎の回収機構が実現されれば、サブセル領域の空間情報を有した網羅解析が可能となり、より詳細なシングルセル解析に繋がるのが期待される。

組織空間分画については、まず逐次回収機構を実用化し、トランスクリプトーム・プロテオーム解析に繋げることを計画している。それによって、臓器内の空間情報を有した網羅解析が可能になることが期待される。さらに現状ではスループットが限定されることからマイクロアレイ基板との統合によるハイスループット化が重要な課題になると考えている。また、最終的には現状の組織スライスの2次元空間情報から発展させて、3次元組織を立体的に空間分画する技術を計画している。これらの取り組みを通じて、細胞空間分画技術が様々な生体サンプルに利用可能な汎用的な技術に発展することが期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

さきがけ研究の支援を受けることで、細胞空間分画という新しい技術コンセプトの具現化ができた。当初計画のシングルセル空間分画に加え、総括と領域アドバイザーの提案を受け、組織スライスの空間分画技術を新たに進めたことは、生命科学研究におけるニーズ(空間情報を有した組織内シングルセル解析)に基づいた技術シーズを生み出し、領域内外・産業界との様々な連携に繋がった。当初目的としていた空間分画技術の原理検証と要素技術についてはほぼ達成できたと考えているが、それらのシステム化と実用化については未だ途上である。特に次世代シーケンサ等の網羅解析手法との統合については今後早急に実現すべき課題と考えている。一方で、貫通孔タイプのデバイスと逐次回収機構は企業との共同研究に基づきプロトタイプが最終年度に完成の見込みであることから、実用化に向けたステップが示せたと考えている。

上記の通り、当初計画に加えて組織サンプルをターゲットにした実用化に向けた技術課題の解決に力を割いて取り組んだことから、原著論文に十分繋げることができていないが、今後は、本さきがけ・CREST 領域を導入として生命科学分野の研究者へ技術提供ができるよう開発を行い、現在未発表の技術も含め知財確保・成果発表をすすめ、世界初・我が国発のシングルセル研究の基盤技術の実装に取り組みたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

微細な刃状構造体が並んだ「ナノブレードアレイデバイス」を細胞に押しつけて切断することで、細胞をサブセルサイズに位置情報を保持したまま分画する「シングルセル空間分画技術」を開発しました。さらにブレード表面のリガンド固定によるセンサ化を実現しました。また、さきがけ領域会議における生物学系の研究者との討論を通じて、組織スライスをシングルセルサイズに分画する「組織空間分画」へのニーズが大きいことを自覚しこれに柔軟に対応し

て、この技術の開発に取り組み、貫通孔型ブレードアレイデバイスの作製、マイクロマニピュレータによる画分逐次回収、さらにはマウス脳スライスの簡便切断を実証しました。

これらの要素技術と既存の網羅解析技術を統合することができれば、シンプルな手法で、シングルセルレベル、もしくはサブセルレベルの空間分解能を有した細胞や組織スライスのおミックス解析が可能になると期待されます。また知財の確保や論文発表も期待しています。

ナノブレードアレイを用いて細胞を細かく分画するという発想は、工学研究者ならではの発想で、生物学者ではなかなか思いつかないものです。このような研究は、工学研究者の独りよがりな発想からのスタートであっても、ユーザーとなる生物・医学系研究者と緊密に連携することで大きく飛躍する可能性を秘めています。潜在的なユーザーに広く技術紹介する機会を持つよち、そのニーズに柔軟に対応して技術・材料を進化させることをこれからも心掛けてください。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. K. Terao, S. Hiramatsu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, and F. Oohira, Fast protein detection from raw blood by size-exclusion SPR sensing, <i>Analytical Methods</i> , 7, 6483-6488, 2015 (表紙掲載)   |
| 2. K. Terao, C. Masuda, R. Inukai, M. Gel, H. Oana, M. Washizu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, and F. Oohira, Characterization of optically-driven microstructures for manipulating single DNA molecules under a fluorescence microscope, <i>IET Nanobiotechnology</i> , 10(3), 124-128, 2017 |
| 3. 田尾祐一, 福田健太, 高尾英邦, 下川房男, 寺尾京平, 液性細胞間相互作用観察に向けたマイクロ流体デバイスの開発, <i>電気学会E部門論文誌</i> , 137(5), 128-133, 2017  |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 寺尾 京平、近藤 翔平

発明の名称: 櫛歯電極型表面プラズモン共鳴センサチップ

出 願 人: 国立大学法人香川大学

出 願 日: 2015/9/18

出 願 番 号: 特願 2015-184697

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. D. Dohi, K. Hirano, and K. Terao, "Molecular Quaits in Microfluidic Channel for Imaging Dynamics of Single Circular DNA Molecules", 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), Dublin, 2016/10/9-13
2. R. Inukai, H. Takao, F. Shimokawa, and K. Terao, "On-Site Manipulation of Single DNA Molecules Using Optically-Driven Microchopsticks", 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2017), Las Vegas, 2017/1/22-26

3. D. Kagawa, M. Kusumoto, Y. Takemura, H. Takao, F. Shimokawa, and K. Terao, “Nanoblade Array for Spatial Dissection of Single Cells and Tissues”, 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2017), Las Vegas, 2017/1/22–26
4. K. Terao, K. Imai, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, S. Matsuoka, and H. Kotera, “Microfluidic Chemical Stimulation for Imaging Inter/Intracellular Response”, Flow17, Paris, 2017/7/3–5
5. A. Masuda, H. Takao, F. Shimokawa, and K. Terao, “Laser–Manipulated Microtool with Enzyme–Functionalized Surface for On Site Molecular Processing”, 21th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) , Savannah, 2017/10/22–27