

研究終了報告書

「単一粒子バイオプシーによる膜小胞統合解析」

研究期間: 2019年4月～2022年3月

研究者: 井田 大貴

1. 研究のねらい

エクソソームなどの内因性微粒子は、内部に RNA やタンパク質などを封入しており、それらを送受することでがんの転移などの疾病や様々な細胞機能に關与する事が示唆されている。近年、超遠心や μ TAS などの精製技術の発展により、細胞外に放出された内因性微粒子の分離・評価技術が確立し、その内容物などが評価されてきた。しかし、内因性微粒子を介した細胞-細胞間コミュニケーションにおいて、始点あるいは終点である細胞内の微粒子を分離し評価する事は困難であり、未だ不明瞭な点が多い。細胞内かつ光学顕微鏡の分解能を超えたスケールの微粒子の評価には、細胞が放出した微粒子集団を対象とした従来の測定手法ではなく、細胞内の特定の微粒子を直接かつ定量的に評価できる分析技術の開発が不可欠である。

そこで、先端径がナノスケールのガラスピペット(ナノピペット)により、細胞内に存在する特定の膜小胞を回収して、内部に含まれる RNA・脂質・タンパク質を定量分析できる単一粒子計測手法を提案した。この手法の実現には、前提としてサブフェムトリットル(10^{-15} L)の微細流量制御とナノメートルスケールの位置制御技術が不可欠である。研究者は上記二つの必須技術を、電気化学を基盤にしたナノピペットの制御技術によって解決した。ピペット内部に有機電解液を充填し、水溶液中に浸漬するとピペットの内部で液-液界面が形成される。このピペットに電圧を加えると、界面の張力が変化する事によってピペット外部の溶液を吸引・吐出でき、過去には細胞質中の RNA の回収・評価に成功している。また、位置制御には走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を利用する。これはイオン流の空間的な阻害を利用して試料-ナノピペット間の距離制御を行い、表面形状を取得する技術である。以上の技術に、細胞内の膜小胞観察と位置制御の融合、回収した粒子の内容物の評価手法を付与する事で、組織レベルで行われる生検を内因性微粒子のレベルにスケールダウンした様な革新的技術を創出できるという着想に至った。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞内の特定構造の回収のため、自作の制御アルゴリズムを搭載し、共焦点レーザー走査顕微鏡と組み合わせたナノピペット制御系を設計・開発した。開発した装置は、ナノメートルスケールの微細位置制御・サブフェムトリットルの微少流量制御が可能であり、操作は半自動化されて高速かつ均一なピペット制御を実行できる。本装置を用い、CD63 を蛍光標識した HEK293T 細胞から、細胞内の微粒子を直接回収・再吐出することができた。また、ナノピペットによる回収物は蛍光顕微鏡により回収量を推定でき、回収物内の miRNA を RT-PCR により評価できた。

また、装置系は全期間中で改良し続け、振動や熱ドリフトを排除し、培養温度下での長期計測が可能な機器や、持ち運び可能な装置設計と搭載予定の高速ピエゾステージなどを開発した。

(2) 詳細

研究テーマA「微粒子回収技術の開発」

細胞内から内因性微粒子を直接回収するため、本研究では装置系の立ち上げから開始した。まず、微細な位置制御が可能な走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)とスピニングディスク式の共焦点レーザー走査顕微鏡の複合装置を開発した。本装置は、振動などによる計測部への影響を抑えるために高剛性に設計しただけでなく、mmレベルの可動域・数十nmの位置制御能を持つ慣性ピエゾアクチュエータを粗動モーターとして組み込んで、高倍率の対物レンズの使用や測定位置の高精度な変更といった取り回しへの配慮も両立した。また、LabVIEWによる制御アルゴリズムも独自開発し、試料近傍へのナノピペットの配置や、手動では誤差・変動が大きいナノピペットの刺突～引き上げまでを自動化して、200 - 500 $\mu\text{m}/\text{s}$ の高速駆動・nmレベルの位置制御・操作の均質化を実現した。

加えて、研究計画時から設計・加熱方式が大きく変更されたが培養温度下での SICM 計測・回収も可能となった。他にも、共同研究先などに気軽に持ち運び、技術融合を行う用の機器を設計した。

研究テーマB「微粒子回収と内部の RNA 評価」

ナノピペットを用いた溶液回収では、ピペットの先端部分の形状が最大回収量に大きく影響し、空間分解能を向上するために先端径の小さな針を単純に作製しようとすると、一般的には使用に適さないほど回収量が低下する。そこで、まずはエクソソームと同じ大きさの 100 nm 程度の先端径を有しつつ数百 fL の回収量を両立できるナノピペットの作製条件検討から始め、要求を満たすピペットを安定して作製できる条件を確立した。作製したピペットでは最大 175 fL 程度の溶液を回収でき、印加電圧の分解能から吸引量の制御能を算出した結果、単純計算ではあるが 11 aL レベルで制御可能であることが示された。

続いて、作製したナノピペットを用いて CD63 に蛍光標識した HEK293T 細胞内の微粒子を直接回収した。なお、本テーマは CREST「細胞外微粒子」領域の華山 力成教授のグループとの共同研究であり、細胞株の作製などをご協力頂いた。回収対象付近にナノピペットを設置して電圧を制御すると、ピペット周辺の蛍光が消光し、その後針を引き上げてみると円錐形に蛍光が確認できた。以上はナノピペットによる細胞内の内因性微粒子の回収を示しており、蛍光像からは回収量の推定もできた。また、回収した微粒子は負電圧をかけることによってピペット外に吐出できた。回収物の評価にも挑戦し、RT-PCR によって回収物中の miRNA の評価に成功した。

3. 今後の展開

本研究により、細胞内の特定構造をナノピペットで直接回収できるようになった。しかし、さがが

け期間中には生物学的な問いに迫る知見の獲得まで達成できなかったため、短期目標としてそれらの取得を目指す。数年以上の長期的な展開としては、本技術をより汎用的・簡便な技術として洗練させ、様々な研究者に普及して社会実装に繋がることを期待している。

4. 自己評価

細胞内から内因性微粒子を直接回収できる技術の創出という研究テーマの根幹については想定通り達成できた。また、本研究で実施した種々の技術改良によって、これまで非常に不安定かつ困難であったナノピペットによる溶液回収が想定以上に安定化し、操作の一部は自動化も達成できた。しかし、研究計画時には単一粒子の回収を目標としており、現状ではそこまでの精度・空間分解能には到達できなかった。加えて、生物系の分析手法に対する技術・知識不足から、内容物評価には想定以上に時間と予算がかかるなど、より慎重な計画策定が今後の課題となった。

一方で、本技術に対する周囲の研究者の反応は概ね良好であり、応用先については多くの意見を頂けた。今後も更に技術開発を続けることで、本技術を用いた新規知見の獲得と社会への還元が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Hiroki Ida, Yasufumi Takahashi, Akichika Kumatani, Hitoshi Shiku, Tomo Murayama, Hisaaki Hirose, Shiroh Futaki, Tomokazu Matsue, “Nanoscale Visualization of Morphological Alteration of Live-Cell Membranes by the Interaction with Oligoarginine Cell-Penetrating Peptides”, *Analytical Chemistry*, 2021, 93(13), pp 5383 - 5393

膜透過性ペプチドを添加した時の細胞表面形状変化を走査型イオンコンダクタンス顕微鏡により評価した。その結果、マクロピノサイトーシスによる膜透過性ペプチドの取込や、直接膜透過に相関する陥入構造を観察できた。

(2) 特許出願

2 件学内手続き中。

(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)

第 58 回日本生物物理学会年会 (依頼講演)

Japanese Association for Animal Cell Technology 2020 (招待講演)

第 94 回日本生化学大会

第 71 回日本細胞生物学会・若手優秀発表賞 (受賞)

シングルセル解析でなにがわかるか(第 13 章「走査型電気化学顕微鏡によるセルイメージング」)(書籍・総説) etc.