

西澤松彦

東北大学大学院工学研究科・教授

電気化学的な異種材料ナノ集積化技術の開拓とバイオデバイス応用

§1. 研究実施体制

(1)「西澤」グループ(東北大学 I)

① 研究代表者: 西澤 松彦 (東北大学工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・オンデマンドバイオ操作システムの開発
- ・細胞アッセイシステムの開発
- ・バイオ電池の開発と応用

(2)「神崎」グループ(東北大学 II)

① 主たる共同研究者: 神崎 展 (東北大学医工学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・収縮型筋管細胞のマイクロ培養システムの開発
- ・2型糖尿病の薬剤スクリーニング系の開発
- ・ヒト由来細胞を用いる収縮型筋細胞の作製と応用

(3)「安川」グループ(兵庫県立大学)

① 主たる共同研究者: 安川 智之 (兵庫県立大学物質理学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・誘電泳動による細胞および微粒子の配列
- ・細胞の代謝活性評価用センサの開発

§ 2. 研究実施内容

本研究課題の目的は、タンパク質や細胞の接着、有機・無機材料の析出、といった界面の組織化現象を局所に誘導する技術の開発と、それによる異種材料の融合・集積化による、(1)オンデマンド集積流路型バイオシステム、(2)ハイブリッド細胞チップ、(3)バイオ有機電子素子の開発である。平成 24 年度における (1)~(3)それぞれの進捗のポイントは以下であった。

- (1)流路内で行う細胞の選別補足操作の効率が、配列化細胞の swing 法によって大幅に向上した。
- (2)ハイドロゲル表面に金属のマイクロ電極を形成可能とし、付着細胞への直接エレクトロポレーションによる遺伝子導入を可能とした。また、培養筋管細胞を用いたアッセイによって、高グルコース(高血糖病態モデル)条件下における収縮依存性 IL-6 発現の有意な抑制を確認できた。「蛍光ナノ粒子(Qdot)による GLUT4 挙動解析手法」の利用によって、GLUT4 膜移行の律速ステップ(分子繫留状態からの解放)の制御機構の解析が進んだ。
- (3)果実や動物が内包するバイオ燃料(果糖や血糖)で発電する刺入タイプの小型バイオ電池を、畠グループ(産総研)との共同研究で実現した酵素/CNTF 電極を利用して作製した。

(1) オンデマンドバイオ集積・流路型バイオチップシステム

①高感度迅速なイムノアッセイシステム(安川)

平成 23 年度に、流路内の誘電泳動を利用して細胞表面抗原の迅速な検出を行った。ここでは、正の誘電泳動(p-DEP)によりバンド電極にヒト骨髄球性白血病細胞(HL-60 細胞)を捕集して抗原抗体反応により固定化し、未反応細胞を負の誘電泳動(n-DEP)を用いて分離した。これにより、表面に発現する CD33 抗原発現細胞を約 2 分で識別可能となった。HL-60 細胞に発現する CD33 を蛍光染色したところ、ほとんどすべての細胞に CD33 が発現していた。しかし、誘電泳動デバイスによる捕捉率は約 50%であった。そこで、平成 24 年度はこの捕捉率の向上を目指

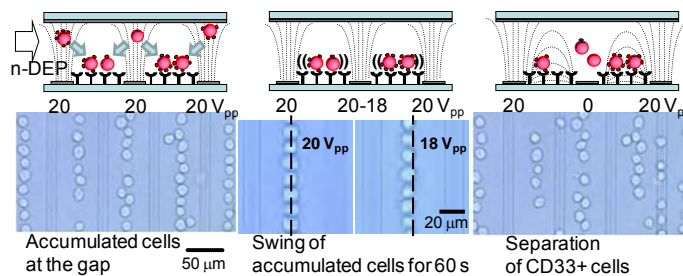


図 1 誘電泳動と swing 法を組み合わせた免疫反応による抗原発現細胞の捕捉。

した。免疫反応効率を向上させるために高導電率(400 mS/m)の溶液を用いることとした。しかし、高導電率溶液中では p-DEP が作用しない。そこで、n-DEP を用いて可逆的に 2 種類のパターン作製が可能な手法を開発した¹⁰。抗体固定化バンド電極の電極間ギャップに n-DEP を用いて細胞を配列して免疫捕捉する(図左)。その後、片方のバンド電極への印加電圧をゼロとすると未反応細胞は、バンド電極上へと分離される。この手法を用いると 70%程度の細胞を捕捉できた。さらに、この配列化細胞を swing させた。片側の印加電圧強度を 5 秒ごとに 20 Vpp から 18 Vpp へと減少させた。すると、細胞の配列化位置がわずかにシフトした(図中)。その後、電圧をゼロにするとほとんどの細胞が免疫捕捉された。捕捉率は、84%に向上した。この swing 法については、特

許出願を行った。

(2) ハイブリッド細胞チップ

①ハイドロゲルへの電極作製(西澤・長峯)

平成 23 年度までに、ハイドロゲルの表面に、導電性高分子 PEDOT による電極を作製する新手法を開発し、培養筋肉細胞の収縮を誘起するための刺激電極として有用であることを示した。導電性の改善も進み、 $50 \Omega/\square$ 程度と実用に耐える電極が作製できている。しかし、電気刺激の強度を厳密に制御し、鋭い電気パルスを印加するには、抵抗(と容量)が大き過ぎることが分かってきた。そこで平成 24 年度は、金属の電極をハイドロゲル基板に固定化する方法を検討し、図 2 に示すプロセスを開発した。Au 電極とゲルが PEDOT で接着された構造である。これを用いると、培養細胞に直接貼りつけて電気パルスによる遺伝子導入が可能であった。ヒト iPS 細胞への遺伝子導入にも成功している(特許出願済、論文投稿中)。

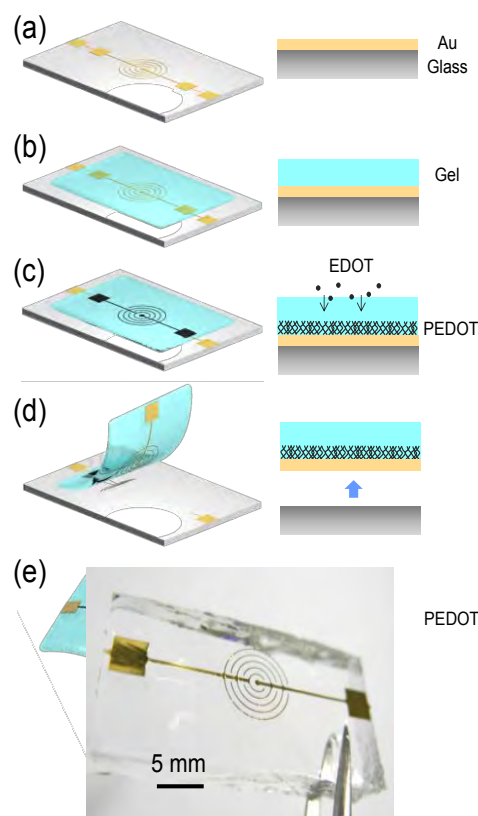


図 2 ハイドロゲルへの Au 電極形成

②筋機能の発達と改善をもたらす運動効果の新規調節機序とその応用展開 (神崎)

②-(a)マイオカイン(インターロイキン6: IL-6)の発現制御

本特殊培養系を用いて、収縮刺激依存性に分泌亢進する IL-6 の発現調節機構を解析した。IL-6 発現亢進には Ca^{2+} /calcineurin 経路の活性化が関与することを明らかにし、さらに、高グルコース(高血糖病態モデル)条件下では収縮依存性の IL-6 発現が有意に抑制されることも見いだした⁵。各種病態環境を容易に再現できる培養系のメリットを生かすことにより、運動による治療効果と薬剤の複合的効果を正確に評価できるアッセイ系へと展開する。

②-(b)インスリン応答性の GLUT4 膜移行改善をもたらす分子機序

新概念に基づく「蛍光ナノ粒子(Qdot)による GLUT4 挙動解析手法」を利用して、GLUT4 膜移行の律速ステップ(分子繫留状態からの解放)の制御機構を解析した。細胞内分子動態をナノ計測する本技術革新により、Tbc1d ファミリーに属する RabGTP 水解促進蛋白(Tbc1d1 と Tbc1d4)が GLUT4 膜移行の最重要ポイントを制御していることを明らかにした。特に Tbc1d1 による GLUT4 解放は、運動刺激とインスリン刺激による複合的制御を受けており、疑似運動刺激(エネルギー消費や Ca^{2+} transients)は、Tbc1d1 のインスリン応答性を有意に改善する能力があることを見いだした(下図)。さらに、超肥満患者にて同定された遺伝子変異 Tbc1d1(R125W)では、この運動効果の獲得(インスリン反応性改善)が完全に欠落していることを明らかにした⁶。

将来的には、この分子基盤を治療標的とした新規の薬効評価アッセイ系を構築できる。

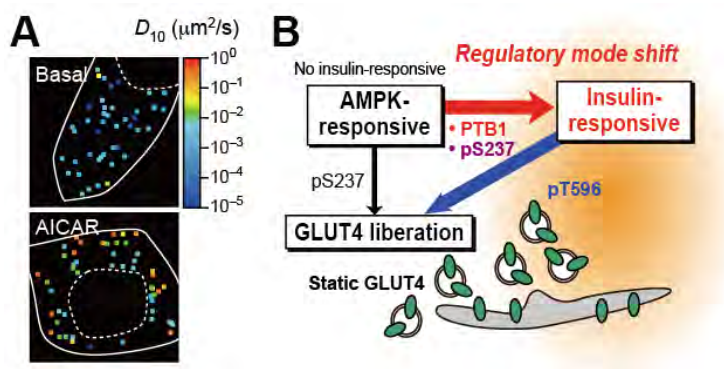


図 3 (A)分子挙動の視覚化ナノ計測技術によって作成された細胞内 GLUT4 輸送活性マップ。
(B)本新技術によりはじめて解明された運動効果の分子基盤。Tbc1d1 はその PTB1 領域に依存した「制御モードシフト」機構によってインスリン応答性を獲得できる。

(3) バイオ有機電子素子の開発

①カーボンナノチューブフォレスト(CNTF)によるフレキシブル酵素電極

(西澤・三宅(東北大)、畠・山田(産総研))

産総研グループが作製した CNTF(チューブ間隔 16nm)に酵素溶液を染み込ませてから乾燥収縮させる方法で、高密度で酵素が内包された酵素電極が作製可能である。平成 23 年度までに、直接電子移動が可能なフルクトースデヒドロゲナーゼとラッカーゼの内包に成功して果糖水溶液から世界最高の出力密度で発電できた。本年度はさらに、メディエータ分子を共内包するプロセスの開発に取り組み、グルコースオキシダーゼを高効率で働かせることができるようになり、 $50\text{mA}/\text{cm}^2$ を超える圧倒的な高電流密度が得られるようになった³。この酵素電極フィルムを LED デバイスの先端に貼付し、ブドウに挿入して自己発電型の糖度計を構成した(図 4)。これの製品化の検討を企業と協力して進めている。

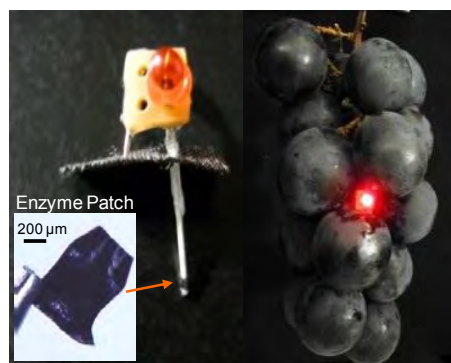


図 4 刺入型の酵素バイオ電池
(自己発電式の糖度計)

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. K. Haneda, S. Yoshino, T. Ofuji, T. Miyake and M. Nishizawa, “Sheet-Shaped Biofuel Cell Constructed from Enzyme-Modified Nanoengineered Carbon Fabric”, *Electrochim. Acta*, vol. 82, pp. 175-178, 2012. (DOI: 10.1016/j.electacta.2012.01.112)
2. T. Miyake, K. Haneda, S. Yoshino and M. Nishizawa, “Flexible, Layered Biofuel Cells”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, pp. 45-49, 2013. (DOI:10.1016/j.bios.2012.05.041)
3. S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada, K. Hata and M. Nishizawa, “Molecularly Ordered Bioelectrocatalytic Composite inside a Film of Aligned Carbon Nanotubes”, *Adv. Energy Mater.*, vol. 3, pp. 60-64, 2013. (DOI: 10.1002/aenm.201200422)
4. H. Onami, N. Nagai, H. Kaji, M. Nishizawa, Y. Sato, N. Osumi, T. Nakazawa and T. Abe, “Transscleral Sustained Vasohibin-1 Delivery by a Novel Device Suppressed Experimentally-Induced Choroidal Neovascularization”, *PLoS ONE*, in press.
5. A. Farmawati, T. Kitajima, T. Nedachi, M. Sato M, M. Kanzaki and R. Nagatomi, “Regulation of IL-6 Production by Electric Pulse stimulation in Contractile C2C12 Myotubes” *Endocrine Journal*, vol.60, pp.137-147, 2013. (DOI: 10.1507/endocrj.EJ12-0316)
6. H. Hatakeyama and M. Kanzaki, “Regulatory Mode Shift of Tbc1d1 is Required for Insulin-Responsive GLUT4 Trafficking Activity” *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, pp. 809-817.(DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0725)
7. M. Yamamoto, T. Yasukawa, M. Suzuki, S. Kosuge, H. Shiku, T. Matsue and F. Mizutani, “Patterning with Particles Using Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes with Negative Dielectrophoresis and Its Application to Simple Immunosensing”, *Electrochim. Acta*, vol. 82, pp. 35-42, 2012. (DOI: org/10.1016/j.electacta.2012.02.109)
8. T. Yasukawa, J. Yamada, H. Shiku, F. Mizutani, and T. Matsue “Negative Dielectrophoretic Particle Positioning in a Fluidic Flow”, *Intelligent Automation and Soft Computing*, vol. 18, pp. 201-211, 2012. (DOI:10.1080/10798587.2008.10643237)

9. T. Yasukawa, Y. Yoshimoto, T. Goto and F. Mizutani, “Highly-Sensitive Electrochemical Immunosensing Method Based on Dual Amplification Systems”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 37, pp. 19-23, 2012. (doi.org/10.1016/j.bios.2012.04.039)
10. T. Yasukawa H. Hatanaka, and F. Mizutani, “Simple Detection of Surface Antigens on Living Cells by Applying Distinct Cell Positioning with Negative Dielectrophoresis”, *Anal. Chem.*, vol. 84, pp. 8830-8836, 2012. (DOI: 10.1021/ac302239k)
11. Y. Kiba, Y. Otani, T. Yasukawa and F. Mizutani, “Electrochemical Detection of Redox Species Flowing in a Nitrocellulose Membrane and Application to Quantitative Immunochromatography”, *Electrochim. Acta*, vol. 81, pp. 14-19, 2012. (DOI: 10.1016/j.electacta.2012.07.074)
12. 安川智之, 山田純子, 珠玖 仁, 水谷文雄, 末永智一, “抗体スポットを用いた表面抗原発現細胞の選択的捕捉”, *表面技術*, vol. 64, pp. 52-56, 2013.
13. 菊池美加, 安川智之, 水谷文雄, “生体分子計測への応用に向けたカーボン電極への白金析出による過酸化水素の触媒還元”, *表面技術*, vol. 64, pp. 190-192, 2013.

(3-2) 知財出願

- ① 平成24年度特許出願件数(国内 4 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 8 件)