

「統合 1 細胞解析のための革新的基盤技術」
平成 26 年度採択研究代表者

H27 年度
実績報告書

北森 武彦

東京大学大学院工学系研究科
教授

拡張ナノ流体デバイス工学によるピコ・フェムトリットル蛋白分子プロセッシング

§ 1. 研究実施体制

(1) 「デバイス開発」グループ

① 研究代表者: 北森 武彦 (東京大学大学院工学系研究科、教授)

② 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

① 主たる共同研究者: 養田 亜希子 (理化学研究所ライフサイエンス基盤技術センター、ユニットリーダー)

② 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

① 主たる共同研究者: 吉崎 歩 (東京大学医学部附属病院、助教)

② 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. 研究実施の概要

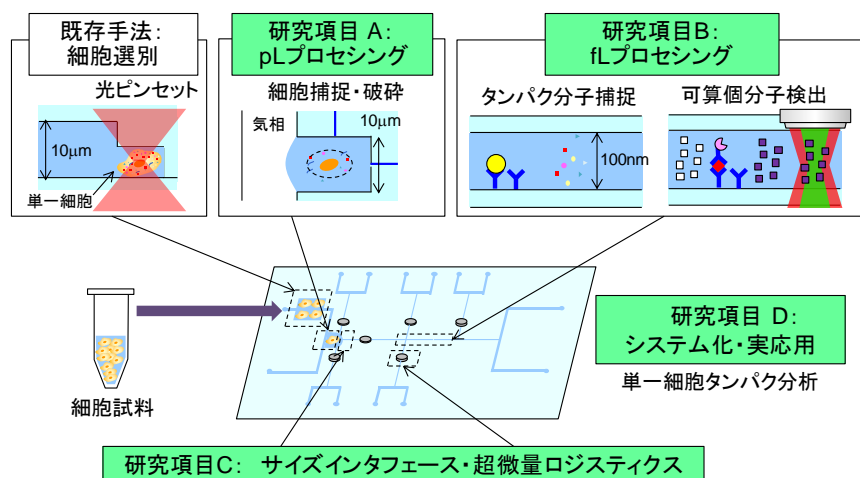


図 本研究の目標

現在単一細胞分析の方法論・機器開発における最も大きな課題は、人(ユーザー)から単一細胞だけではなく、少数分子に至るまで6桁に及ぶサイズ階層の乖離と、極微小空間における化学プロセッシングや超高感度検出の困難さである。本研究では、図に示すように、細胞プロセッシング(pL)／分子プロセッシング(fL)を、研究代表者ら独自の的方法論であるマイクロ流体デバイス／拡張ナノ流体デバイスにより実現して、乖離しているサイズ階層を接続するサイズインターフェース、さらには極微小空間で分取試料を輸送するための超微量ロジスティクスを開発する。これらをシステム化して単一細胞タンパク分析デバイスを実現し、単一 B 細胞研究に実応用することを目的としている。

平成 27 年度は、前年度に引き続き、研究期間前半の目的である単一細胞タンパク分析の要素技術開発(研究項目 A、B、C)に注力した。また、デバイスシステム開発(研究項目 D)についても、細胞選別システムの検証および免疫分析法(ELISA)によるサイトカイン定量の条件検討に取り組んだ。さらに、本年度に採択された追加予算を活用して、デバイス加工法を改良するためのナノ加工装置と、これまで世界で 1 台しかなかった独自の超高感度非蛍光分子検出システムを追加導入して研究を加速、推進した。これらの結果、単一生細胞から拡張ナノ空間への fL サンプルングをはじめて実現し、さらに拡張ナノ ELISA による可算個タンパク分子定量の再現性を検証するなど、当初計画を上回る特筆すべき成果を得た。以下、各研究項目について述べる。

研究項目 A では、親水・疎水の表面部分修飾を施した体積 pL のチャンバーへの単一細胞の捕捉と細胞溶解液の注入による細胞膜破碎を検証した。

研究項目 B では、拡張ナノ ELISA で課題となっていたタンパク分子定量における偽の信号(アーチファクト)の要因を特定し、デバイス加工法の改良および ELISA の条件検討によりこれを排除することで、可算個レベルのタンパク分子定量の再現性を検証した。

研究項目 C では、リン脂質膜の融合を利用して単一細胞と拡張ナノ空間を接続するマイクロ／拡張ナノサンプルングインターフェースを創成して、単一生細胞からの体積 39 fL のサンプルングに世

界ではじめて成功した。一方、前年度に動作原理を検証した拡張ナノ流路の開閉バルブの研究では、応力センサとアクチュエータの制御システムを実装することで、化学プロセッシングを集積化する上で不可欠な複数回のバルブ開閉操作を実現した。

研究項目 D では、光ピンセットを利用した細胞選別システムを構築して、蛍光を利用した B 細胞選別および目的細胞の捕捉・輸送を検証した。また、北森グループで方法論を確立して実用化したマイクロ ELISA を用いて、本 CREST 研究でターゲットとするサイトカイン IL-10 の測定条件を検討した。その結果、従来のプレート ELISA と比較して 200 倍低い測定下限が得られ、微小空間の ELISA がサイトカイン定量にも極めて有効であることを示した。