

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「多チャンネルプレーナ技術による生体  
組織分子解析とその神経疾患応用」

## 研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年 3月

研究代表者：高村 禅  
(北陸先端科学技術大学院大学  
先端科学技術研究科、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究では、組織表面や切片、培養細胞ネットワーク等、2次元面にある個々の細胞中の mRNA や代謝物を、細胞の位置情報を保ったまま抽出し、次世代シーケンサや質量分析機により1分子レベルで解析可能とするデバイスの作成を目的としている。細胞培養プレート上に、約 $2\mu\text{m}$ の貫通孔群を設け、チャンネル電流等をモニターしつつ、必要な時に内容物を孔より吸引して回収、位置情報を付加して NGS に渡す機能を持つデバイスを開発する。類似研究として組織を open space で切断、穿孔、あるいは溶解し、位置情報と共に RNA-Seq 解析する例はあるが、分子は近隣細胞と混ざり、1細胞の位置帰属は喪失する。本研究では、孔回収で、1細胞への帰属が保証でき、かつ良質(高回収率、低コンタミ)のサンプルが得られること、生きた細胞を観察しながら解析が可能な点で有利である。

本研究の実施に当たり、微細貫通孔培養プレートの作成は宇理須グループが、バルブ弁機構の開発は主に高村グループが、神経疾患モデルの開発は石垣グループが、細胞播種、培養、ネットワーク形成技術の開発は宇理須グループが、チャンネル電流の測定は宇理須グループが、得られた mRNA データの解析は川原グループが行っている。

空気圧制御の第1世代デバイス(図1)では、ヒト由来の1細胞を用いて14000以上の遺伝子の RNA-Seq に成功し、また1細胞の外部からの mRNA の混入は非常に少ないことを証明し本法の有利な点を確認した。

このデバイスを神経疾患に応用するために、神経疾患モデル細胞の構築と、測定チップ上での神経細胞ネットワークの構築技術開発を行った。石垣らは、経疾患モデル細胞として FUS 抑制マウスモデルを構築し、高次機能解析および FUS とタウの関連性についてそのメカニズムの詳細を明らかにした。宇理須らは、測定チップ上への指定されたケージの直上に神経細胞を播種し、長期培養し、測定に適した密度の神経細胞ネットワークの構築に成功した(図2)。さらに宇理須らはその平面上の測定点から、神経細胞ネットワークの良質なパッチクランプ信号を得ることに成功した(図3)。また、溶液回収型の単一細胞 mRNA 解析とイオンチャンネル計測を組み合わせた4点の解析点を持つチップ、およびその制御装置を開発、プロトタイプ機として完成させた(図4)。さらに、これらを用いて実際の神経細胞の mRNA 解析を試みた。ケージ内に播種、培養した神経細胞ネットワークの1細胞から mRNA を回収し、次世代シーケンサーによるプロファイル解析を行った結果、培養日数による発現パターンの変化等をとらえており、ある程度の解析が可能であることを実証した。

より、高密度デバイスの開発も進んでいる。空圧論理回路を用いた $8\times 8$ 溶液回収部の開発に成功した(浮田)。また $450^{\circ}\text{C}$ 以下の低温で PZT 圧電膜を結晶化させるプロセス開発に成功し(高村)、第2世代用のアクティブマトリクス PZT アクチュエータアレイの作成に成功した(図5)。この技術をもとに、9倍密度の576測定点を持つ第3世代デバイス用アクティブマトリクス PZT アクチュエータアレイを開発し、その単体動作を確認した。これらを用いた mRNA 解析結果が待たれる。

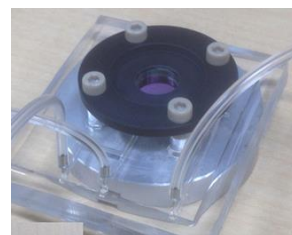


図1. 第1世代デバイス

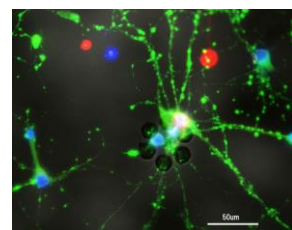


図2. 測定チップ上に形成した神経ネットワーク

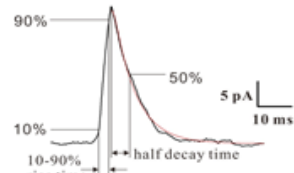


図3. 開発デバイスによるチャンネル電流測定例

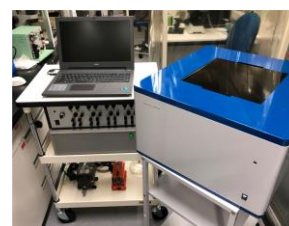


図4. mRNA 解析とイオンチャンネル電流計測が可能なたプロトタイプ

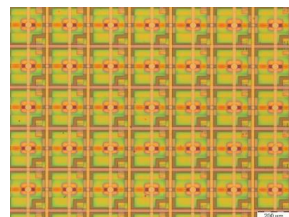


図5. Active matrix PZT actuator array

## (2) 顕著な成果

### < 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1. 微細孔貫通培養プレートによる1細胞 mRNA の高品質解析

##### 概要:

一細胞中の mRNA をプレート上に設けた微細貫通孔より回収し、次世代シーケンサで解析できるデバイスおよび一連の手法を開発した。これにより2次元面上の1細胞中の mRNA を、培地や隣の細胞からの混入が極力少ない状態で高品質に解析可能となった。HEK293 一細胞から回収した例では14000以上の遺伝子を確認でき、これは類似の研究のなかでも良い方である。基本技術については特許を出願し、位置情報の付加や、高密度化のおおよそそのめどもついた。

#### 2. プレーナパッチクランプ技術の確立

##### 概要:

ピペットパッチクランプは細胞特に神経細胞の生理機能を極めて精密に明らかにできる技術であるが、多点同時計測ができないため、極めてヘテロな神経細胞ネットワークの機能を精密に解明することができない。そのため、複雑な神経難病の病態を明らかにできないほか、これら疾患の治療薬の創薬スクリーニングに利用できないなどの問題があったが、本研究により、プレーナパッチクランプに培養機能を付与し、世界で初めて、ピペットパッチクランプレベルの性能で多点同時計測を可能とした。

#### 3. ALS モデル細胞としての FUS 抑制初代培養神経細胞の構築

##### 概要:

FUS の機能低下が情動を中心とする高次機能障害を引き起こすことを、マウスモデルを用いて明らかにし、FUS の機能が ALS/FTLD の病態に強く関わることを明らかにした (Udagawa et al., 2015, Ishigaki et al., 2017, Yokoi et al., 2017)。また進行性核上性麻痺 (PSP) など広義の FTLD スペクトラムに含まれる疾患脳においても FUS の核内での機能喪失が認められることを見出した (Ishigaki et al., in press)。

### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1. イオンチャネル電流計測と mRNA 解析を両立するチップ・装置のプロトタイプ作成

##### 概要:

培養型プレーナパッチクランプ技術によるイオンチャネル電流計測と1細胞からの mRNA 解析を両立できるチップおよびその制御装置を開発し、4チャンネルのプロトタイプ機として完成させ、この技術の実用化を大きく進めた。脳神経科学のイノベーションを示唆した。また、既に企業と連携しており、外部提供や色々な細胞系を用いた様々な評価の準備は整っている。

#### 2. 溶液からの PZT 厚膜低温成膜・パターン化プロセスの開発

##### 概要:

圧電材料であるチタン酸ジルコン酸鉛 (PZT) ペロブスカイト相を結晶化させるには、従来 700°C 程度の高温処理が必要で、トランジスタ等他の素子との集積化を妨げていた。今回、オゾン雰囲気中で紫外線をあてながら熱処理を行うことで、アクチュエータに用いることのできる高品質の PZT ペロブスカイト膜を 450°C 以下で得ることに成功した。これは、本プロジェクトのみならず、

スマートフォンや Virtual Reality における触感のフィードバック等、様々な産業応用が期待される。

### 3. アクティブマトリックス PZT アクチュエータアレイの作成

概要:

低温成膜 PZT からなるダイアフラム型のアクチュエータを、酸化物薄膜トランジスタ (TFT) からなるアクティブマトリックスとともに集積化できる構造、材料及びプロセスを開発し、行x列のマトリックス上のアクチュエータを個別に制御可能な、アクティブマトリックス PZT アクチュエータアレイの開発に成功した。これにより、数万個以上のバルブやポンプを備えた、大規模な微小流体デバイスが、リーズナブルなコストと期間で開発可能となり、様々なイノベーションにつながると期待される。

< 代表的な論文 >

- 1) Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, K., Watanabe, H., Katsuno, M., Inada, T., Ohno, K., Sokabe, M., Okado, H., Ishigaki S\*, and Sobue, G., FUS regulates AMPA receptor function and FTLN/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. Nat Commun 6 (2015) 7098. (\*corresponding author)
- 2) Tsuneo Urisu, Zhihong Wang, Hidetaka Uno, Yuko Kurita, Development of neuronal network diagnostic platform using incubation type planar patch clamp, Biomaterial 36 (2018) 208-213.
- 3) Phan Trong Tue, Reijiro Shimura, Tatsuya Shimoda, Yuzuru Takamura, Direct integration of piezoactuator array with active-matrix oxide thin-film transistors using a low-temperature solution process, Sensor and Actuator A,295(2019)125-132.

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「高村」グループ

- ・ 研究代表者: 高村 禪 (北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 教授)
- ・ 研究項目
  - ・ PZT アクチュエータアレイの開発
  - ・ 弁・ダイヤフラム機構開発
  - ・ アドレスタグ合成
  - ・ RNA 抽出実験

#### ②「宇理須」グループ

- ・ 主たる共同研究者: 宇理須 恒雄 (名古屋大学未来社会創造機構 客員教授)
- ・ 研究項目
  - ・ 培養貫通プレートの開発と細胞質抽出実験
  - ・ RNA 抽出実験
  - ・ 播種培養技術開発とチャンネル電流計測
  - ・ ヒト iPS から運動ニューロンや大脳皮質神経細胞ネットワークへの分化誘導技術の開発

#### ③「石垣」グループ

- ・ 主たる共同研究者: 石垣 診祐 (名古屋大学大学院医学系研究科 特任准教授)
- ・ 研究項目
  - ・ 培養組織の提供
  - ・ 病態モデル細胞の構築
  - ・ RNA 抽出実験

#### ④「川原」グループ

- ・ 研究代表者: 川原 弘三 ((株)ワールドフュージョン 代表取締役)
- ・ 研究項目
  - ・ RNA データの解析

### (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

領域内では、金沢大学橋本真一先生のグループのメンバーと、一細胞 mRNA 解析方法や、バーコードビーズの種類、次世代シーケンサ解析に関して、綿密に情報交換、ご指導を頂いている。域外では、東京大学医学系研究科、国立精神・神経医療研究センターの方々との情報交換をしている。また、名古屋大学において、祖父江元神経内科特任教授や若林俊彦脳神経外科教授など臨床医から神経細胞ネットワーク装置の開発について、随時必要なアドバイスをいただいている。また、脳神経細胞ネットワークの機能などの基礎的問題について、随時、岡崎統合バイオサイエンスセンター富永真琴教授、生理学研究所吉村由美子教授の指導を仰いでいる。また、マスクレス露光やレーザー微細加工、蛍光 X 線分析など微細加工とその評価について、分子科学研究所の高田紀子氏、中尾聡氏、上田正氏などの技術職員が協力してくださっている。また、JST の新技術説明会などの展示会を機会に、大手バイオ関連企業などとのネットワークを形成しつつある。

また、低温 PZT 成膜材料および成膜プロセスの開発、特許出願、実用化応用で、三菱マテリアルと強く連携している。