

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	ナノニードルアレイを用いた革新的細胞分離解析技術の開発
研究機関・部局・職名	独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長
氏名	中村 史

【研究目的】

本研究では、挿入しても細胞にダメージを与えないナノスケールの針材料「ナノニードルアレイ」を用い、細胞の生体機能を損なうことなく、多数の細胞を同時に機械的に分離し、解析する全く新しい基盤技術を開発することを目的としている。

細胞分離における従来技術では、fluorescence activated cell sorting (FACS) の開発が最も進んでいるが、細胞の表面抗原のみが標的となる。細胞の全タンパク質の90%は細胞の内部にあり、細胞表層に対しておよそ10倍の種類が存在している。特に、ケラチン、ビメンチン、デスミン、ニューロフィラメント、ネスチンなどの中間径フィラメントは細胞特異性が高く、マーカーとして用いられるが、このような細胞内のタンパク質を細胞が生きたまま非破壊的に検出することは不可能であった。生きた細胞でこれらを標的とすることが出来れば、細胞分離の精度はさらに高まり、分化誘導後のiPS細胞からの目的細胞の分離など、高い細胞純度が必要な場面で威力を発揮する技術となる。

補助事業者は、原子間力顕微鏡 (AFM) の探針を直径200 nm、長さ10 μm に加工したナノニードルを用い、これに抗体を修飾し、細胞内の骨格タンパク質を検出する手法を開発した。中間径フィラメントネスチンの抗体をナノニードルに固定化し、ネスチン陽性であるマウス胚性癌細胞 P19 に

挿入すると、細胞内で抗原抗体結合が形成され、ナノニードルを引き抜く際に結合を破断するのに必要な数 nN の力が測定できる。ネスチン陰性のマウス繊維芽細胞 NIH3T3 と比較し、破断力の違いから細胞を明瞭に識別することが可能である。一方で、この手法は細胞1個1個をAFMで取り扱う手法のためスループットが低いという実用化における大きな問題があった。

通常の培養状態でP19の基板への接着力は、約40 nNである。細胞の基板に対する接着力 (Adhesion force) を減弱し、抗原抗体結合力 (Fishing force) を増大することで、抗体修飾ナノニードルでネスチン陽性細胞を釣り上げるという細胞分離方法

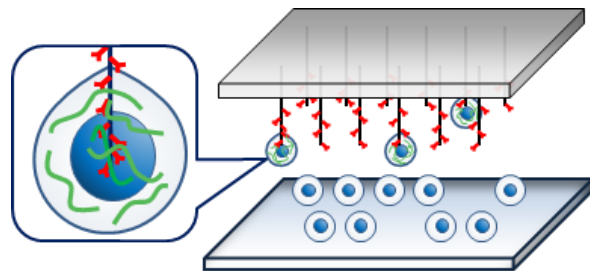


図1 ナノニードルアレイによる機械的細胞分離の概念図

を提案した (図 1)。ナノニードルを多本数配列したナノニードルアレイを作製し、大規模数の細胞に対して同時にアレイ上のナノニードルの挿入操作を行う装置を設計する。このような細胞内部のタンパク質を標的とした全く新しい細胞の分離解析技術を開発する。モデル細胞として P19、NIH3T3 を用い分離装置を開発し、最終的にはマウス iPS 細胞の分化誘導過程における陽性細胞の識別分離後の細胞種の分布解析を行う。

① ナノニードル挿入効率の最大化

本研究では多数のナノニードルを、細胞に同時に確実に挿入しなければならない。直径 200 nm のナノニードルがあらゆる細胞に 100% の効率で挿入できる方法を確立する。ナノニードルの挿入効率が最も低いマウス繊維芽細胞 BALB/3T3 を対象として検討する。

② Fishing force の最大化

細胞を効率よく釣り上げ分離するために、非特異的な相互作用を抑え、特異的な Fishing force を可能な限り増大させる。挿入されたナノニードル表面の抗体と標的タンパク質の結合数を増大させる工夫により、細胞 1 個あたり 10 nN 以上の Fishing force を達成する。

③ 細胞アレイの作製

細胞の種類によって細胞の基板への Adhesion force は大きく異なる。高接着性を原因として細胞が分離されない可能性を考慮し、あらゆる細胞の Adhesion force を 2 nN 程度に平準化することを目標にする。また、この付着制御法により 100×100 個の細胞を配列させた細胞アレイを作製する。さらに、分離した細胞を即時回収するために 20 nN 以上の Adhesion force が得られる基板を開発する。

④ ナノニードルアレイの作製

シリコンを基板とし、直径 200 nm、長さ 10 μm の針状物をエッチングにより加工し、100×100 本、合計 1 万本配列したナノニードルアレイを作製する。

⑤ イメージングサイトメトリー

ナノニードルアレイを細胞アレイに対して接近させる動作装置を開発する。抗体修飾ナノニードルアレイの挿入により細胞を分離し、残存した細胞のイメージングサイトメトリーを行い、免疫染色の結果と比較することで、細胞種の分布を解析する。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】
① 総合所見
<p>細胞内部の骨格をターゲットとした全く新しい分離手法はユニークなものであり、その原理的な可能性を示したことは大きく評価できる。その一方で、複数の種類あるいは状態（たとえば分化状態）が混在した細胞集団に対して、実際にどの程度の差が見えるのか、といったことに対する検討は不足している。その一つの要因は、アレイ化するための技術的な検討にかなりのエフォートを割いていたことにあると考えられる。10,000 個の細胞に対して 10,000 本のニードルによって同条件でアクセスすることは、工学的に見てもかなり挑戦的なターゲットであったため、後半やや改善されたとはいえ、解析効率に関する目標値は少し下げた上で、もっと分離と解析の優位性を示すことにも重点を置くべきであった。</p>

② 目的の達成状況
<p>・ 所期の目的が <input checked="" type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった</p>
<p>ナノニードルの作製、Fishing Force の最大化、細胞アレイの作製を基盤としたイメージングサイトメトリーの基盤技術は開発できたと高く評価する。ナノニードル挿入効率の最大化についてはさらなる改良が必要であろう。また、そもそも全ての細胞について同一の条件でニードルを挿入することや、ニードルと中間径フィラメントとの相互作用が起きることはあり得ないので、細胞アレイ単位での計測セットアップそのものについて、条件のばらつきを考慮する必要があるのではないかと。</p> <p>最終目標である iPS の神経細胞分化系での細胞分離も、可能性は示されたものの十分達成できたとはいえない。ネスチンは神経前駆細胞から神経細胞まで広く発現しており、分離細胞が均一でない、ある分化状態の細胞をピックアップできない（条件の設定が難しい）など、実施上の検討事項は多く、triplet ナノニードルへの改良などは行っているが、細胞回収効率を上げるための更なる工夫が必要と思われる。</p>

③ 研究の成果
<p>・ これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が <input checked="" type="checkbox"/> ある ・ <input type="checkbox"/> ない</p>
<p>・ ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が <input checked="" type="checkbox"/> 創出された ・ <input type="checkbox"/> 創出されなかった</p>
<p>・ 当初の目的の他に得られた成果が (<input type="checkbox"/> ある ・ <input checked="" type="checkbox"/> ない)</p> <p>細胞内フィラメント系と特異的抗体の相互作用により、フィラメント系の発現に依存した細胞分離を行うもので、今までの細胞表面タンパク質に依存したセルソータと原理が異なり先進性が高い。特に、神経細胞など臓器特異的フィラメントが発現している細胞の分離についてはきわめて有用と考えられる。フィラメント以外のタンパク質には適用できないためその利用は限定されるものの、有用性は大きいと考えられる。同じ原理を用い細胞内可溶タンパク質量の判定は可能であり、定量後発現量の高</p>

い細胞をアレイからピックアップするプロセスを自動化できれば、今まで不可能であった細胞内タンパク質の発現によるソーティングが可能となる。このような新たな技術の創出を予感させる特筆すべき成果である。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

提案されている技術が確立できれば、細胞内部のタンパク質をターゲットとして分離することができるため、関連分野への寄与も大きいものと考えられる。まずは提案技術を実用的な技術として確立し、他の方法では行えない解析手法として広く応用を模索することが必要である。特に、神経科学の分野での貢献は極めて高いと考えられる。iPS細胞に利用されればその社会的波及効果も期待できる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

幾つかの機関が協力し、マイクロデバイスの作製、生物学的実験を行い、さらに gp5 など適切な素材の提供、試作機の作製などが効率的に行われているなど研究体制はよく組織されており、東日本大震災の影響を受けずに研究がうまく遂行できたと評価する。一方で、アレイ上の細胞に対するアクセス効率を高める工夫については、triplet ナノニードルへの改良なども行われたとはいえ、もう少し早く具体的な位置誤差の要因分析とそれを低減する方策が練られてもよかったと思われる。

雑誌論文数、特許数とも多く成果の発信は適切に行われていると考える。国民との対話にも一定の努力が払われている。