

細胞吸引システムのアプリケーション

Applications of an Intracellular Substance Sampling System

高井 浩典*¹ 西出 康貴*¹ 平井 智子*¹
 Hironori Takai Kouki Nishide Tomoko Hirai

横河電機はナノスプレーチップというキャピラリーを用いて細胞内物質を吸引するシステムを開発した。本システムは、当社が長年培ってきた共焦点顕微鏡技術との連携で、細胞とナノスプレーチップの相対位置を正確に把握することを可能にし、細胞内の微小な器官を狙って吸引することを実現している。近年、手技に頼った吸引による細胞内への薬物の取り込み、その代謝物の局在を質量分析で確認する手法に関しては多くの論文が提出されている。一方では、共焦点顕微鏡で狙った特定の細胞に正確にアプローチできるという当社の技術の特性を活かすことで、例えば1細胞の遺伝子解析、パッチクランプ法への応用ができ、研究開発の新たな価値や効率性は向上する。解析対象が細胞の集団から個別の細胞にシフトしている中、当社のシステムは1細胞解析において広い可能性を秘めている。本稿では、細胞吸引システムによる応用例を述べる。

Yokogawa has developed an intracellular substance sampling system with a nano spray tip made of glass capillary. By using precise location feedback from Yokogawa's confocal microscopy technology, this system calculates the position of the nano spray tip relative to the target cell, and thus can sample microscopic organelles accurately. In recent years, many academic papers have been published that address single-cell injection and single-cell metabolomics to identify the drug uptake of cells and localize metabolites by using mass spectrometry. However, most of them use manual procedures that require considerable skill and experience. Yokogawa's new system can automate these procedures and can be applied to other applications such as single-cell DNA/RNA analysis and patch-clamp techniques. The system also delivers added value and improves the efficiency of research and development. This paper describes applications of this system.

1. はじめに

個別化医療という言葉が浸透しつつあるように、近年の創薬医学研究は、ますます個々の細胞を分けて分析することに邁進している。従来は分析感度不足の問題があり、細胞集団から目的物質を濃縮精製する必要があったが、近年の分析手法の発達により、1細胞レベルでの解析が可能となってきた。分析手法が確立した後、次に必要とされるのは、正確に微量サンプルを取得するための装置である。当社で開発した細胞内物質吸引システムは、ナノスプレーチップというキャピラリーと、当社が長年培ってきた共焦点顕微鏡技術との連携で、細胞とナノスプレーチップの相対位置を正確に把握し、細胞単体やその内部の任意の一部をサンプリング（吸引）することができる。取得サンプル量がピコリットル（pL）以下と極少量なため、従来は高感度な質量分析法のアプリケーション

のみを想定していたが、その後のヒアリング結果から、質量分析法以外にも本装置を用いた様々なアプリケーションが考えられるようになった。

本システムの核心は、共焦点顕微鏡イメージング下で識別し、狙った特定の1細胞、かつその細胞の局所を正確に狙うことにある。そして、正確に狙うことに特化したシステムだからこそ、後段の分析に様々な応用が考えられるようになっている。本稿では、細胞内物質吸引システムの応用の可能性について紹介する。

なお、システムの動作原理は、本ライフサイエンス特集号の別稿⁽¹⁾を参照されたい。

2. 1 細胞遺伝子解析

図1に1細胞遺伝子解析の概要を示す。図1(a)のように、まず標的となる細胞を丸ごと捕捉する。正確に所定の細胞にアプローチすることで、その細胞や回りの細胞に与えるストレスを最小限に抑えることができる。その結果、ターゲットとなる細胞とその周囲の細胞のどちらも傷つけることなくサンプルを取得することができ、

*1 計測事業本部 新事業開発センター

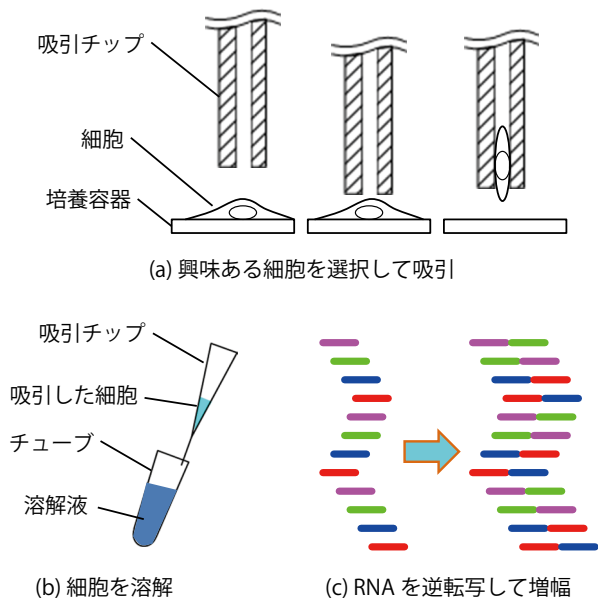


図 1 細胞遺伝子解析の流れ

細胞の破壊によるターゲット以外の遺伝子の混入を防ぐことができる。取得した細胞は図 1 (b) のように、チューブの中に吸引チップを挿入させ速やかに細胞を溶解し、サンプル取得時の遺伝子状態をそのまま保存する。次に、図 1 (c) のように、1 本鎖の RNA (RiboNucleic Acid: リボ核酸) から逆転写を行い、得られた 2 本鎖 DNA を増幅すれば、PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) やシーケンサーでの解析が可能となる。

1 細胞遺伝子解析については、既にサンプル取得用の製品が販売されている。しかし、その多くはプレートに接着している細胞を直接取得することができず、細胞を液中に懸濁（分散）させる必要がある。癌細胞は一般的に、接着状態と懸濁状態で代謝活性が異なると報告されている。また、懸濁してからの細胞の取得においても、狙って特定した有意義である細胞を取得することはできず、確率的にたまたま捕捉した細胞を取得しているに過ぎない。一方、本システムは、接着状態でも懸濁状態でも、意図的に狙った細胞を取得して解析できるというメリットがある。さらに、顕微鏡観察で細胞を確認することができるため、細胞の状態と位置情報を遺伝子解析の結果とリンクさせることも可能にしている。

本システムの特徴を、以下に示す。

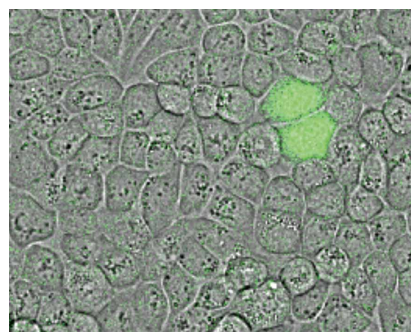
- ・プレートに接着している細胞を取得できる
- ・細胞の位置情報を持つ
- ・サンプル取得時の状態を確認できる
- ・隣接する細胞群から狙った 1 個の細胞を取得できる
- ・周囲の細胞へダメージを与えない
- ・インキュベータ機能を搭載している
- ・タイムラプス撮影により、経時変化を捉えてサンプル取得できる

近年、1 細胞遺伝子解析が注目されるようになり、関連する論文の投稿は年々増えている。特に遺伝子解析の手法に関する進展は目覚ましく、1 細胞遺伝子解析のための試薬も、新しい商品が次々と市場に出ている。

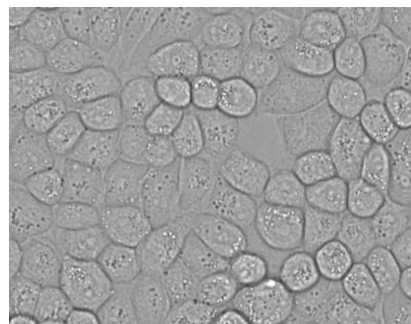
これまで細胞集団の平均値でしか比較できなかった遺伝子発現の変化を、1 細胞遺伝子解析では 1 個の細胞レベルで比較できるようになった。細胞集団の不均一性が、がん化やがん組織での薬の作用の違いに影響を与えていると考えるならば、個々の細胞の比較は、今後の抗がん剤の開発において重要な役割を果たすことになるだろう。雑多な細胞集団から鍵となる細胞を見付け出し、分析・検証を行う実験系において、本システムは非常に有効な機能を有している。

本システムを利用した 1 細胞遺伝子解析の実験例として、細胞競合のアプリケーションを紹介する。細胞競合は、異常細胞を囲んだ正常細胞が異常細胞を排除する現象で、がんの分野でよく研究されている。本実験では、異常細胞に隣接する正常細胞が研究の対象であるため、細胞の位置情報を把握することが重要である。

実験では、予め通常の MDCK (Madin-Darby Canine Kidney: イヌ腎臓尿細管上皮) 細胞と、異常のある MDCK 細胞 (異常細胞) を 50:1 で共培養する。この際、異常細胞を緑色の蛍光タンパク質で標識し、緑色に光る細胞に隣接する細胞を吸引して分析にかける。図 2 に、異常細胞に隣接する正常細胞の 1 つのみを精確に吸引した例を示す。



(a) 吸引前 (緑色細胞の左が対象)



(b) 吸引後

図 2 特定細胞の吸引

その後、吸引した細胞をリアルタイム PCR 法で分析した結果を、**図 3** に示す。リアルタイム PCR 法は、温度変化 1 サイクルごとに DNA を 2 倍ずつ指数関数的に増幅し、リアルタイムでモニタリングできる。グラフの横軸は PCR サイクル数を示し、縦軸は DNA 濃度(増幅産物量)を示している。**図 3 (a)** は共培養の環境で、異常細胞に隣接する正常細胞のある遺伝子 X を増幅した増幅曲線で、**図 3 (b)** は比較のため、正常細胞のみの単一培養の正常細胞の遺伝子 X を増幅した増幅曲線である。曲線が多数あるのは、個々の細胞の増幅について示しているためである。本システムを使うことで、2つのグラフに差異が存在し、異常細胞に隣接する正常細胞と、単一培養の正常細胞の遺伝子 X の発現量に差があることがわかった。

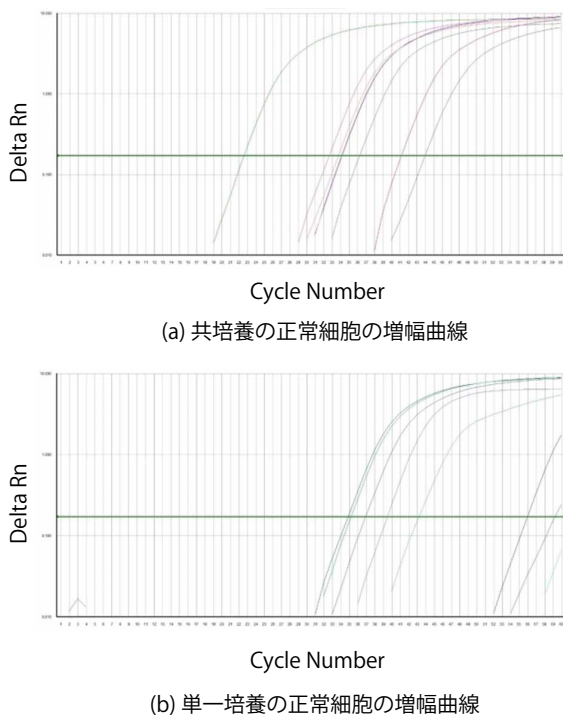


図 3 リアルタイム PCR による mRNA の解析結果

3. パッチクランプ

細胞に対してキャピラリーでアプローチする手法は他にも存在し、1例としてパッチクランプ法は電気生理信号、つまり細胞内外のイオンの流れを測定する手法⁽²⁾で、固定 (clamp) した電圧(もしくは電流)を印加し、電流(もしくは電圧)を測定する。**図 4** にその模式図を示す。パッチクランプ法では、測定のためにキャピラリーの他に銀線とアンプが必要となる。

パッチクランプ法は、測定する際にまずキャピラリーを細胞に接触させて、1 GΩ 以上の抵抗 (シール) を形成する必要がある。しかし、接触させるだけでシール形成に至る訳ではないため、高度な手技が必要なのが課題となる。

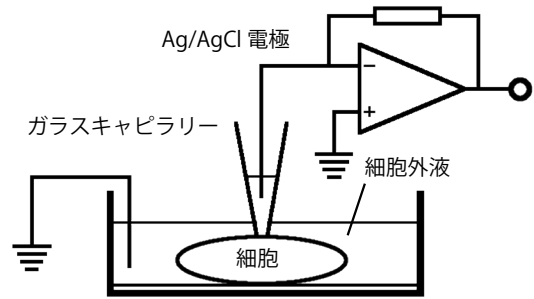


図 4 パッチクランプ法の模式図

また、シール形成後に行う処理によって様々な手法が存在する。**図 5** に、手法の 1 つである Whole-cell recording (Whole-cell patch) を示す。シール形成後にキャピラリー内に陰圧を加えることで接触した部分の細胞膜を破き、細胞内と電極内を繋げて測定する。しかし、細胞膜を破く際の圧力の制御が難しく、弱過ぎれば破れず、強過ぎると細胞が死んでしまう。

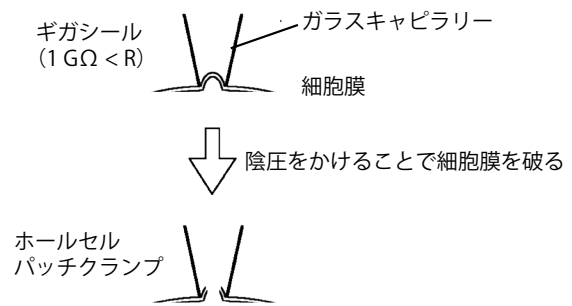


図 5 Whole-cell recording

さらに、測定する電流が pA ~ nA オーダと非常に小さいため、ノイズ対策をしなければ微弱な信号がノイズに埋もれてしまう。加えてシール形成以降は、**図 6** のように、細胞回りにコンデンサや抵抗を含んだ回路が構築される。そのため、それを考慮して印加電圧(あるいは電流)を補正しなければ、正確な測定ができない。

このように、手技に頼るのは高度な熟練度が必要とされるため、自動化された装置も世の中に出ているが、これも前述の遺伝子解析と同じく、たまたま捕捉された細胞をターゲットにしているにすぎず、複数の細胞や組織化されたものの中から意図的に狙ったものを計るための自動化装置は、皆無であった。そこで、本システムの特定の細胞を効率良くターゲットングするという機能と、電気信号を測定するパッチクランプの技術を組み合わせることで、特に iPS 細胞などに代表される幹細胞から分化誘導され成長した組織の電気生理信号を、細胞の個々を識別しながら自動計測するという、新たなアプリケーションの付加価値にも可能性が開けてきている。

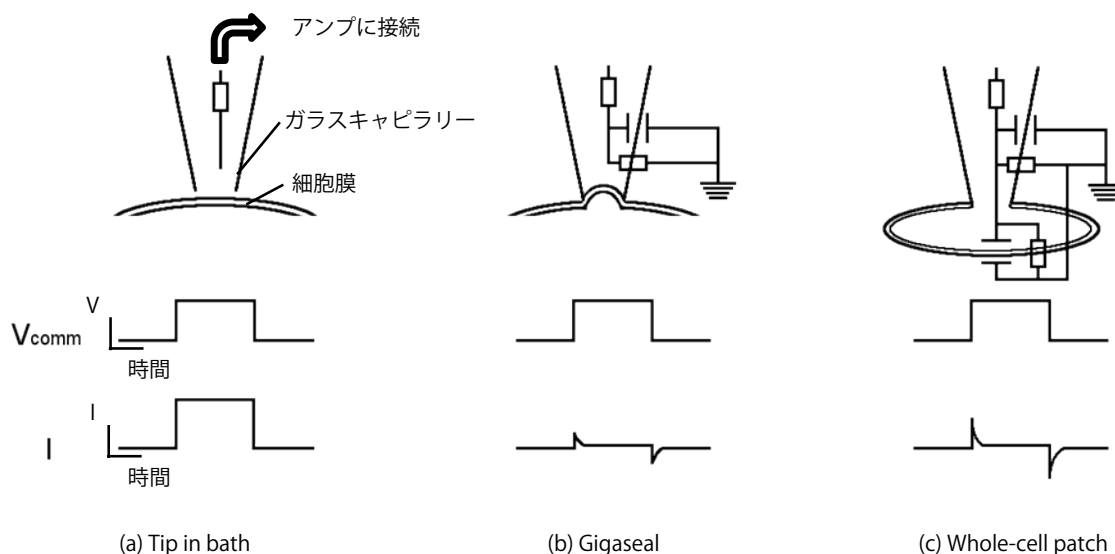


図 6 Whole-cell recording での印加電圧 (V_{comm}) と測定電流 (I) の模式図

4. インジェクション

化合物やウイルスなどを、直接細胞内へインジェクションするアプリケーションが盛んに行われている。その主な方法は、トランスフェクション、エレクトロポレーション法がある。ただし、特定細胞への導入が困難であること、また、導入量が定量ではない、という課題がある。また手動による導入も高度な熟練度が必要である。本システムは、このような課題を解決し、特定細胞に精確にアプローチが可能であるため、インジェクションの自動化、定量化に貢献できると考えられる。

5. おわりに

今回紹介したのは、考えるアプリケーションのごく一部である。特定のターゲット細胞に精確にアプローチする技術は、吸引以外にも刺激や注入を行うことにより更に多くの応用が考えられようになる。今後益々、研究

のスピードが加速していくと思われる 1 細胞研究分野において、当社システムが貢献するメリットは大きい。世界に比べるとまだまだ研究が遅れている 1 細胞研究分野において、日本発の 1 細胞研究技術として、本システムを世界にアピールしたい。また、多くの研究分野と関わりながら、より付加価値の高いシステムへと改良を重ねたいと考えている。

最後に、図 2 および図 3 に示した細胞競合実験データは、北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野 藤田恭之教授のご指導、ご協力によって得られたものである。この場を借りて、厚くお礼申し上げます。

参考文献

- (1) 景虹之, 高井浩典, 他, “細胞内物質吸引システム”, 横河技報, Vol. 60, No. 2, 2017, p. 75-80
- (2) B. Sakmann, E. Neher, “Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes,” Annual Review of Physiology, Vol. 46, 1984, pp. 455-472