

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

氏名： 中村史

機関名： 独立行政法人産業技術総合研究所

1. 研究の背景

様々な種類の細胞に分化する性質を持った幹細胞を用い、組織等を創製する再生医療は、難治性疾患の治療等を目指す重要な分野である。日本発のiPS細胞は最も注目を集める幹細胞であるが、未分化細胞による腫瘍形成や免疫原性などの問題もあり、その実用化においては目的の分化細胞を正確に判定し、分離することが重要な技術課題である。

現在の技術では、フローサイトメトリーと呼ばれる細胞を蛍光標識し分離する手法が最も一般的である。この方法では、目的の細胞に特異的な細胞表面のタンパク質をマーカーとして、細胞の標識と分離が行われる。細胞表面に対して、細胞内部にはより多くの種類のタンパク質が存在しており、数多くのマーカータンパク質も存在するが、遺伝子組換え等を行わない自然な細胞で、細胞内マーカータンパク質をフローサイトメトリーに適用することは出来なかった。

2. 研究の目標

本研究では、細胞内のマーカータンパク質を標的として細胞分離を行う新しい技術を開発する。直径200ナノメートルの針「ナノニードル」を細胞に挿入し、細胞内部のタンパク質を結合し、この結合力によって基板上の細胞を機械的に釣り上げることにより分離する革新的技術を開発する。針が1万本配列されたナノニードルアレイを作製し、細胞群に対して同時に挿入・分離処理できる装置を開発する。

3. 研究の特色

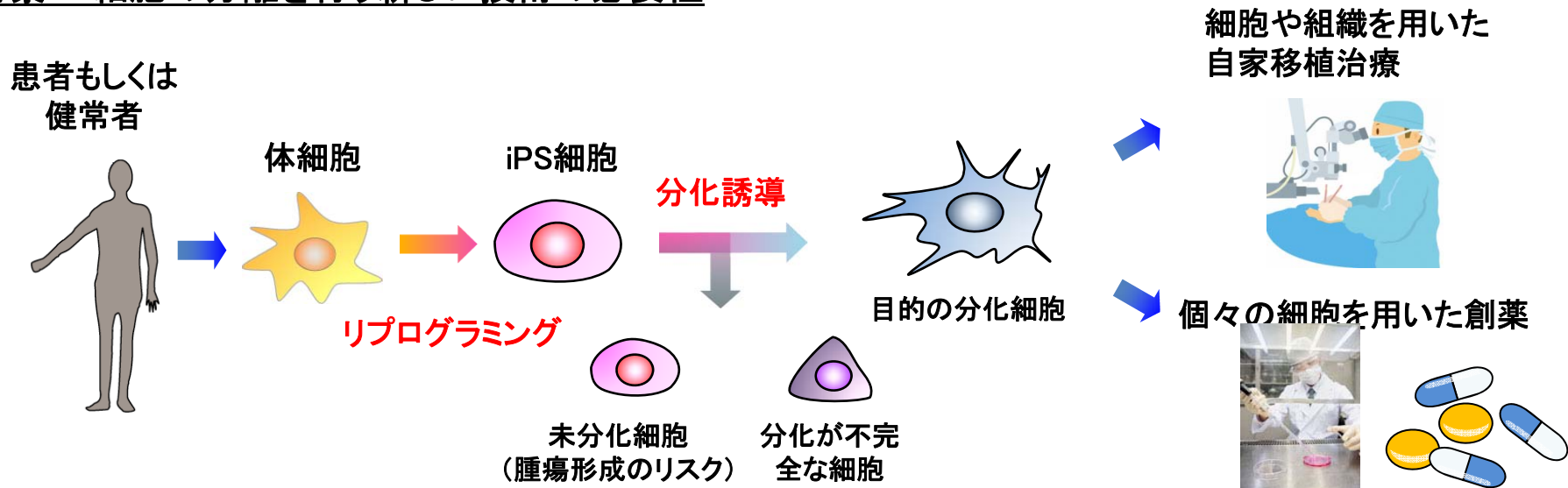
研究代表者は、細胞にナノニードルを挿入する外科手術的なこの操作技術をセルサージェリーと名付け、独自に開発を行ってきた。一見、乱暴な技術に見えるが、ナノニードルは100回以上細胞に挿入しても細胞の分裂速度が変わらず、挿入により出来た孔からイオンが出入りすることもなく、生物学的な活性に影響を与えずに、安全な細胞操作を行うことが可能であることを証明している。細胞にダメージのないナノニードルを用いることで、細胞内部のタンパク質に直接操作を行うことが本技術の特長である。

4. 将来的に期待される効果や応用分野

開発される技術により、患者個人のiPS細胞から分化誘導された細胞群から、目的の細胞のみを正確に分離することが可能になる。これにより、腫瘍形成、副作用が無く、安全で、かつ治療効果が高い自家細胞移植治療を実現することが出来る。

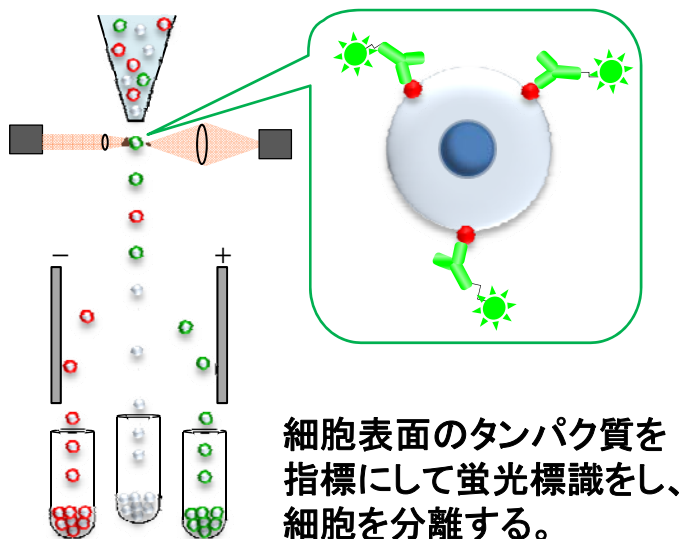
また、様々な疾患関連のiPS細胞や免疫適合性の異なるiPS細胞から、正確に誘導された細胞を選別することが出来るので、細胞特性に則した効果の高い創薬に貢献することが出来る。

背景：細胞の分離を行う新しい技術の必要性



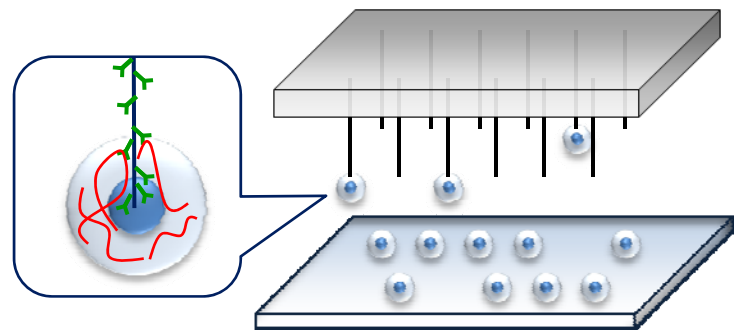
幹細胞から分化誘導によって得られる細胞は、様々な細胞が混在する細胞集団であり、精密に目的細胞を選別する技術が望まれる。

従来技術： フローサイトメトリー



開発する技術： ナノニードルアレイを用いた機械的細胞分離技術

細胞の内部のタンパク質も標的にしたい

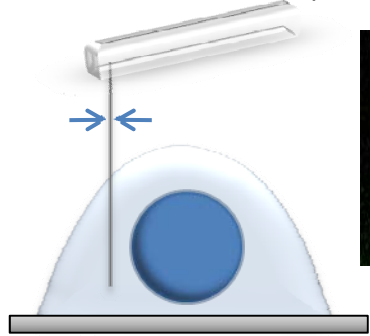


細胞にダメージのないナノニードルを挿入し、細胞内のタンパク質を抗体で結合して機械的に細胞を釣り上げ分離する。

研究代表者のこれまでの研究： ナノニードルを用いた細胞操作技術「セルサージェリー」

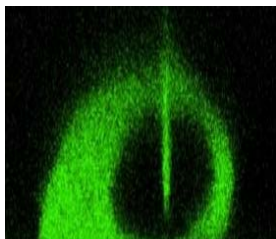
原子間力顕微鏡AFMを用い、ナノニードルの挿入により細胞内部を解析・操作する手法

ナノニードルの直径200 nm
長さ > 10 μm

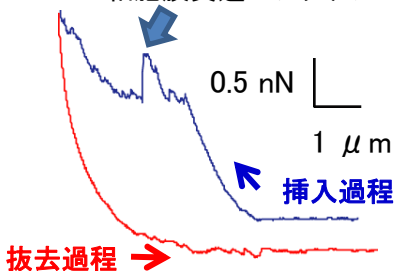


20~30 μm

ヒト細胞を含む動物細胞の大きさ



フォースカーブに現れる
斥力の急激な緩和
= 細胞膜貫通のシグナル

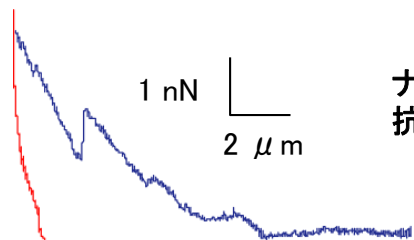
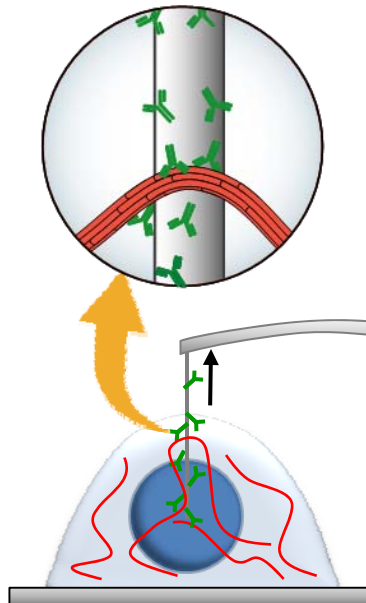


間葉系幹細胞に対するDNA導入効率

	リポフェクション	マイクロインジェクション	ナノニードル
GFP発現効率	42 %	8%	74%
導入DNA当たりの発現量	0.06	0.13	0.22

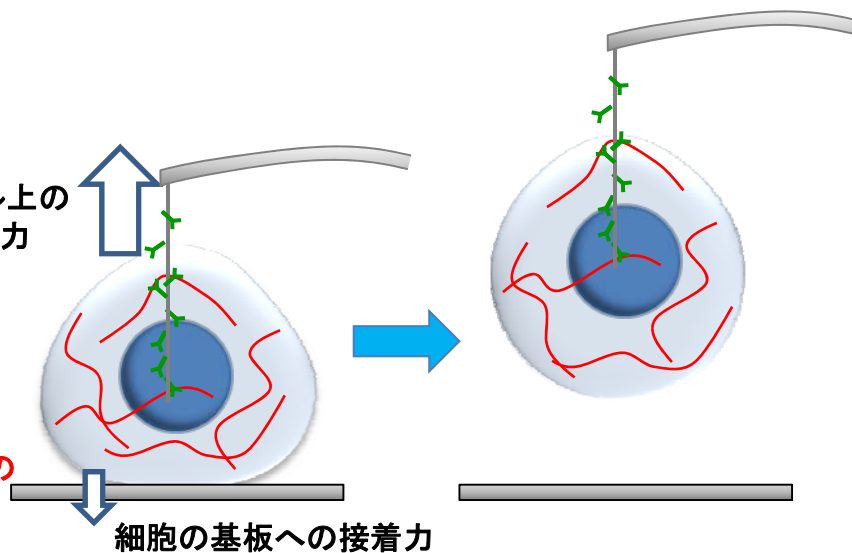
100回以上挿入を行っても分裂速度は変わらず、ダメージが非常に小さい。核への挿入が可能であるため、DNA導入では、既存法を越える効率を得られる。

開発する技術の原理



ナノニードル上の抗体の結合力

ナノニードル上の抗体の結合力



細胞の基板への接着力

AFM装置を用いて、細胞内タンパク質とナノニードル上の抗体の微小な結合力を計測できる。

細胞の基板への接着力を抗体の結合力よりも弱いレベルに調整できれば、細胞を釣り上げ、分離することが可能である。