

二国間交流事業 共同研究報告書

令和4年4月1日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[代表者所属機関・部局] 国立研究開発法人
産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門
[職・氏名] 主任研究員・金 賢徹

[課題番号]
JPJSBP1 20198836

1. 事業名 相手国: 韓国 (振興会対応機関: NRF)との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 1細胞分泌物計測を目指したカップ形状新規バイオセンサの開発

(英文) Development of a novel cup-shaped biosensor for measurements of secretion molecules in single cell level

3. 共同研究全実施期間 2019年4月1日 ~ 2022年3月31日 (3年0ヶ月)

4. 相手国代表者(所属機関・職・氏名【全て英文】)

Korea University・Professor・Man Bock Gu

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		2,262,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,122,000 円
	2年度目執行経費	1,140,000 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究全実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	8名
相手国側参加者等	7名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	4	0	1(0)
2年度目	0	0	0(0)
3年度目	0	0	0(0)
4年度目			()

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

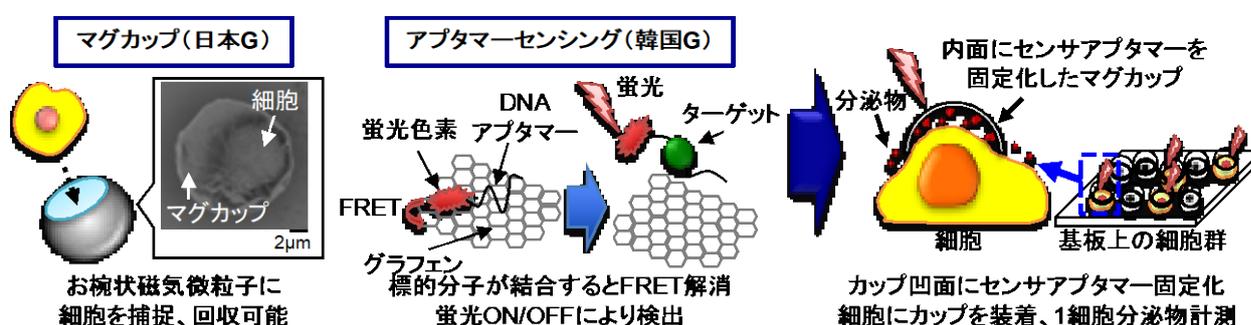
派遣:本委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は本委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流実績の概要・成果等

(1)研究交流実績概要(全期間を通じた研究交流の目的・研究交流計画の実施状況等)

本研究は、日本側グループが有する、細胞を捕捉回収することが可能なマグカップ技術を、韓国 Korea 大 Gu 教授グループが有する、標的分子に結合した場合のみ蛍光が生じるアプタマーセンシング技術と組み合わせることで、1 細胞単位での分泌物計測を可能とするカップ型細胞計測センサを新たに開発することを目的とした(図 1)。具体的には、標的となる細胞分泌物を捕捉すると蛍光を発するセンサアプタマーをマグカップ凹面に固定化し、計測対象となる基板上的の個々の細胞にこのカップを装着し、各細胞から分泌される標的分子を蛍光シグナルとして検出する技術開発を推進した。本研究推進により、ヒトの脳機能をヘッドギアで計測するが如く、細胞が分泌するマーカー分子を 1 細胞単位で高感度検出することが可能な、新規マイクロセンシング技術を国際共同開発することを目指した。



はじめに、内面がナノカーボン膜(NC 膜)、外面がニッケルで構成された 2 層構造のマグカップを日本側グループが作製した。マグカップの作製においては、環境中の酸素を極力除去した条件で作製することで、細胞捕捉時に磁場印加に対して敏感に応答するマグカップを作製することに成功した。カップ内面を構成する NC 膜は sp^2 結合と sp^3 結合領域が混在した薄膜で、 sp^2 結合領域で π - π 相互作用を介してピレンのような環状構造分子を固定化でき、また sp^2 結合と sp^3 結合が混在するためカップ凹面のような湾曲面にも薄膜を形成できる。この表面物性を利用するため、片側末端にピレン基、もう一方の末端に蛍光色素(Cy3)を取り付けた DNA センサアプタマーを合成し、作製したマグカップの内面(NC 膜)にピレンと NC 膜の π - π 相互作用を介して固定化した。アプタマーが結合する標的分子としては、ODAM(Odontogenic ameloblast-associated protein)をモデルとして定め、その配列情報を韓国側グループが提供した。ODAM は歯周病マーカー分子のひとつであると共に、近年ではがん細胞での発現も指摘されているがその役割については解明されておらず、新たながん細胞マーカーとして期待される。本センサアプタマーは、通常時は DNA 主鎖の NC 膜に対する親和性のため膜上に吸着し(分子が寝る)、蛍光色素と NC 膜間での FRET により蛍光が生じないが、この親和性はさほど強くなく標的分子(ODAM)と結合可能で、標的分子が結合すると NC 膜に対する吸着が解消され(分子が起きる)蛍光色素が NC 膜から離れ、蛍光が生じることが期待される。この実証に日本側グループと韓国側グループが共同で取り組み、センサアプタマーを固定化したマグカップに対して ODAM 分子を分散させた溶液を滴下したところ、カップ内部の蛍光輝度が上昇した(図 2)。この結果は、ODAM 分子の存在有無を蛍光 ON/OFF により検出可能であることを示しており、即ち本研究コンセプトの核となる、細胞から分泌される標的分子をセンサアプタマー固定化マグカップにより検出できる原理証明に成功した。

研究交流としては、共同研究開始直後の 4 月に産総研メンバー 3 名が韓国 Korea 大を訪問し、同大にて産総研-Korea 大合同ワークショップを共同開催した(図 3)。その後、Korea 大メンバー 1 名が約 1 ヶ月間、産総研に滞在した上で研究を推進し、センサアプタマー固定化マグカップの蛍光 ON/OFF による標的分子検出に関する

る原理検証実験を行った。研究第 1 年度末以降は COVID-19 蔓延の影響で相互の物理的な往来が困難になってしまったため、オンラインによる研究交流を定期的に行った。特に、第 3 年度の 2 月に第 2 回目となる産総研-Korea 大合同ワークショップを共同開催し(図 4)、相互の研究者に加えて国内外の一流研究者を招待した上でバイオセンシング分野での最新研究動向に関する発表をいただき、多くの若手研究者に対する教育と人材育成に貢献した。以上のように、研究に加えて双方のメンバーが人的交流を積極的に行うことで、若手研究者の国際的素養の蓄積、研究業績と交流経験の蓄積による人材育成に貢献した。

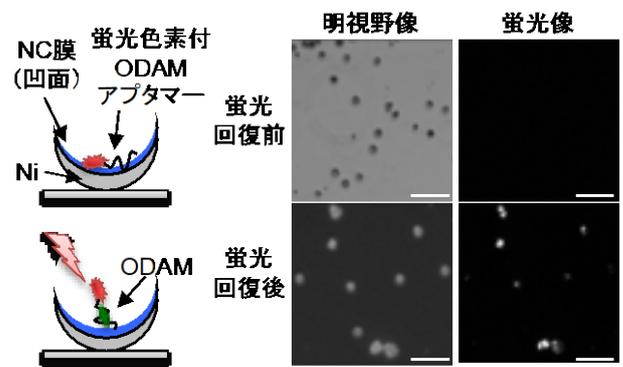


図2 凹面がNC膜の直径15 μ mマグカップを用いた、蛍光ON/OFF実験。凹面にODAMアプタマーを固定化すると、アプタマーのDNA鎖がNC膜に吸着し蛍光が消光するが、ODAMを加えるとアプタマーがNC膜から解離し、蛍光が回復した。(Bars = 200 μ m)

図3 産総研(AIST)–Korea大(KU)合同ワークショップの案内とプログラム

図4 第2回産総研(AIST)–Korea大(KU)合同ワークショップの案内とプログラム

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

生体内において細胞は様々な物質を分泌して相互コミュニケーションを行っており、分泌物による細胞間の相互刺激を *in vitro* 系で解析することは組織や臓器の恒常性、分化、疾患ではがん進展などを理解する上で重要である。しかし、従来法は分泌物の拡散のために個々の細胞がどのような物質を分泌しているかを特定することが困難であった。本研究の手法は、個々の細胞にカップを装着して分泌物の放出を蛍光 ON/OFF により検出するため、集団中の個々の細胞の分泌を解析することが可能になる。本研究では、センサアプタマーを内面に固定化したマグカップに対してモデル分泌物(ODAM)を作用させたと、カップ内部の蛍光輝度が上昇したことから、細胞からの分泌物を蛍光 ON/OFF により 1 細胞単位で検出可能であるという、本研究コンセプトの核となる部分の原理証明に成功した。これは、今後分泌物による細胞間コミュニケーションを理解することで、組織の恒常性やその破綻による疾患発症などのメカニズムを解明するための基盤となる成果である。本研究の過程で得られた知見、結果、また開発過程で改良を行ったカップ作製技術と応用方法などについては、4 件の学術論文および 15 件の講演にて発表を行い、成果を発信した。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

研究交流事業の一環として、共同研究開始直後に韓国 Korea 大にて第 1 回合同ワークショップを、共同研究

最終年度に第 2 回合同ワークショップを共同開催した。ワークショップでは両国研究グループの研究者に加えて、日本および韓国から関連分野の一流研究者を招待し、最新の研究動向に関する発表を行った。若手研究者や学生を含む多数の参加者を含めて活発な議論が為されたことから、両国研究者間の学術交流、新規共同研究の促進、若手人材の国際感覚の養成に貢献した。

また、本共同研究のテーマについては、両国メンバーが相互短期訪問を行い議論を行うことに加えて、Korea 大のメンバー1 名が約 1 ヶ月間日本側研究グループに滞在し、共同研究を推進した。本共同研究期間中、カップ内部に固定化する蛍光センサアプタマーの配列や修飾方法の最適化、細胞捕捉を行うためのカップ作製と前処理方法の開発などを行うことで、標的分子が存在する場合にカップ内部に固定化したセンサアプタマーの蛍光 ON/OFF により検出する原理技術の確立に成功した(図 2)。この結果は、カップ作製技術に関する日本側グループの知見とアプタマー作製技術に関する韓国側グループの知見を合わせることで初めて達成されたことであり、両国研究者の交流により新規技術の開発が大幅に加速された。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

分泌物を介した細胞間コミュニケーションは我々の体の恒常性やその破綻による疾患発症と密接な関係がある。例えば原発巣で発生したがん細胞は、周辺の免疫細胞に対して分泌物による刺激を行い、自身の生存や増殖に有利な微小環境を構築することが知られており、このメカニズムの理解はがんの進展抑止法を開発する上で極めて重要である。本研究を推進することで分泌物による細胞間コミュニケーションを *in vitro* で解析するための基盤技術が構築されたため、疾患メカニズムの解明による健康福祉への貢献、健康寿命の延伸への貢献を行うことができたと考えている。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取り組み、成果)

本共同研究では、相互訪問とオンライン会議を積極的に行うことで若手研究者の国際感覚養成を行った。特に韓国側メンバーが日本に滞在して研究を行った際には、日本側若手メンバーが研究の議論と実験指導のみでなく、受入手続きや日常生活のサポートまで担当することで、将来PIとなった際、国際人材を受け入れて共同研究を推進する場合に必要なスキルを磨くことができた。また、本共同研究では 2 回の合同シンポジウムを開催したが、若手研究者が研究発表と議論を行うことで国際的なアピールを行うのみでなく、会議の準備や講演者に対する連絡等も担当することで、国際会議を主催する場合に必要な経験を積むことができた。

(6)将来発展可能性(本研究交流事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本共同研究を推進した結果、個々の細胞に取り付けて標的の分泌物を 1 細胞単位で計測可能なカップ型センサを開発することができた。今後はがん進展や組織間情報伝達など、分泌物刺激が機能発揮に重要な役割を担う生体内での具体的な事例に対して *in vitro* でのモデルを構築して計測解析を行うことで、それらのメカニズム解明に貢献できると考えている。また、本研究交流事業に参加した若手研究者全員が国際交流の経験を積むことができたため、今後 PI となった際に国際的な研究の展開、海外若手研究者の受入、国際会議の主催などを行うことで日本のみに留まらず世界的に活躍する人材として羽ばたくものと考えている。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記述してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞、産業財産権の出願・取得など

本共同研究で得られた成果については、1 件の国際共同特許出願を行った。今後は学術的研究の進展に加えて、得られた成果の社会還元を視野に入れた展開を行いたいと考えている。