ナノニードル技術を用いた単一細胞の操作・計測

山岸彩奈¹, 中村 史^{1,2}

¹国立研究開発法人産業技術総合研究所

²東京農工大学大学院工学府

1. はじめに

細胞の性質や機能を正しく理解するためには、細胞表面と細胞内部の双方を解析する必要がある。細胞内部を解析する際に細胞を殺すことなく生きたまま解析を行うことができれば、細胞の変化を連続的に追跡調査することも可能である。細胞内部を解析するためには解析のためのプローブ分子を細胞内に導入する、あるいはセンサー素子を導入するなどの方法が第一に必要となる。しかし、細胞に対する低い物質導入効率や、物質導入手段の高い侵襲性は、細胞解析技術において大きな問題点となっている。外部環境と細胞内部を隔て、保護する役割を担う細胞膜は、外来物質が細胞内へ侵入することを制限しており、2つの問題点の根本的な原因となっている。

そこで近年、ナノ針状材料を単一細胞操作用ツールに応用した研究が進められている。ナノファイバー、ナノチューブ、ナノワイヤなどと呼ばれる材料は、直径が数 100 nm 未満、長さ数 10 μm と非常に小さな針状であり、細胞操作に有利な構造的な特徴をもっている。細胞膜を貫通しナノ針状材料を細胞内部に到達させるためにはいくつかの条件がある。例えば細胞をナノ針状材料が配列したアレイ上に播種した場合には、88% の針状材料は細胞膜を貫通できない¹⁾。このことは、細胞の自然沈降では衝突速度が十分でなく細胞膜の流動性により針状材料が膜に陥入することを示している。細胞内にナノ針状材料を正しく挿入した例では、エレクトロポレーションによる細胞膜の穿孔や、ナノ針状材料を遠心することで荷重をかけるなど、細胞膜を機械的に破断するために物理的な操作を行う工夫がなされている。

我々は原子間力顕微鏡 (AFM) と AFM カンチレバーを集束イオンビームにより針状に加工したナノニードルを用いることで生きた細胞を低侵襲に操作する技術

を開発してきた²⁾。このナノニードルの直径は、最小で 100 nm 程度まで小さくすることができるが、通常は 200 ~ 300 nm に調整して使用する。細胞の 100 ~ 1000 分の 1 程度であるため、その挿入は細胞の増殖に全く影響を及ぼすことがなく³⁾、生きた細胞内部での解析や操作が可能である。例えば、プラスミド DNA の細胞への導入ではリポフェクション試薬が用いられるが、細胞へのダメージが大きいことや細胞のエンドサイトーシス経路に依存するため、エンドソームからの脱出とそれに続く核移行が必要となる。本手法ではナノニードル表面にプラスミド DNA を吸着させ、これを核に直接挿入するため、余計な外来物質が細胞に導入されず、少量のプラスミド DNA を効率よく発現させることができる⁴⁾。本稿では AFM を利用してこのナノニードルを細胞膜に効率的に挿入する技術の開発、及びこれを細胞内のタンパク質の検出に応用した例について紹介する。

2. AFM を用いたナノニードルの細胞内挿入

ナノニードル (図 1a) は AFM を用いて操作するため、細胞への挿入と抜去の過程における力学応答の計測が可能である。このナノニードルを細胞に挿入、抜去した際に得られる Force-extension カーブ (X 軸はナノニードルの細胞圧入距離、Y 軸はナノニードルにかかる力、以降フォースカーブと表記) は図 1b のようになる。青はナノニードルが細胞に接近した際、赤は抜去時のカーブを示しており、ニードルが細胞に接触すると斥力の上昇が観察される。加工前のピラミッド型カンチレバーを細胞に接触させたときに得られるフォースカーブでは連続的な斥力の上昇が見られるのに対し、ナノニードルを接近させた場合は急激な斥力の緩和が観察される。これはナノニードルが細胞膜を貫通した瞬間を示していると考えられ、実際に蛍光色素を修飾したナノニードルの挿入を共焦点蛍光顕

図 1

AFM 探針を加工して作製したナノニードル (a), 細胞に対してナノニードルを挿入したときに得られるフォースカーブ (b), 異なる直径, 形状のナノニードル及びヒト表皮メラノサイトにおける挿入効率 (c) (文献 3 より一部改変)。

顕微鏡で観察すると斥力緩和が観察される際にはニードルの膜貫通が必ず観察されることを確認した²⁾。このことは、無標識でナノニードルの細胞挿入をリアルタイムに判断することが可能であることを示している。我々は 500 pN 以上の斥力緩和が観察された場合に挿入成功と見なすこととし、挿入効率の算出に利用している。

ナノニードルを用いた細胞操作あるいは細胞内部の解析では、ニードルの挿入効率は可能な限り高く、かつ細胞にダメージを与えないことが望ましい。そこでナノニードル先端が円柱型もしくは円錐型の二種類の形状で、200 nm もしくは 800 nm の直径となるようナノニードルを作製し、針直径及び形状の検討を行ったところ、直径 200 nm の円柱型ナノニードルが最も高効率に細胞へ挿入できることがわかった (図 1c)⁵⁾。円錐型に比べて円柱型の挿入効率が高いのは、圧入体積が大きいほど細胞膜の破断力が増大するためと推察している。また直径 200 nm のナノニードルを挿入した細胞の倍加時間を評価したところ、50 回の挿入操作を行っても倍加時間に変化がないことを確認しており³⁾、ニードルの直径及び形状を最適化することで高効率かつ低侵襲に細胞に挿入できることを明らかにした。

3. ナノニードルの細胞挿入に寄与する細胞構造

ナノニードルの細胞への挿入効率はニードルの直径及び形状に依存することがわかったが、我々は細胞の種類によって挿入効率も変化することも確認している⁶⁾。表 1 に示すように複数の細胞を用いてナノニードルの挿入を行ったところ、その効率はヒト膀胱癌細胞

表 1

異なる細胞におけるヤング率及びナノニードルの挿入効率 (文献 5 より一部改変)

	liposome	JM	T24	FRSK	HeLa	NRK
ヤング率 (kPa)	1.3 ± 0.6	4.7 ± 3.5	8.7 ± 1.3	9.7 ± 9.2	10 ± 3.4	16 ± 11
挿入確率 (%)	0	73 ± 19	36 ± 6.3	94 ± 4.3	74 ± 19	75 ± 11

JM: ヒト T 細胞, T24: ヒト膀胱癌細胞, FRSK: ラット表皮角化細胞, HeLa: ヒト子宮頸部癌細胞, NRK: ラット正常腎臓由来繊維芽細胞

細胞 T24 で最も低く 36% であるのに対し、他の細胞は 70 ~ 90% の効率で挿入に成功した。細胞種によって特徴的な物性が挿入効率に反映されていると推察し、ナノニードル挿入の成否に重要な要因が何かを解析することとした。そこでまず細胞の弾性率が挿入効率に与える影響を検討した。ナノニードルの膜貫通を示す斥力緩和が生じるまでのフォースカーブを Hertz モデルによりフィッティングすることで細胞のヤング率を算出した。その結果、最も弾性率の高いラット正常腎臓由来繊維芽細胞 NRK (16 kPa) と最も柔らかいヒト T 細胞 JM (4.7 kPa) における挿入効率はそれぞれ 75% 及び 73% であり、細胞弾性率と挿入効率の間に強い相関はないと推察された (表 1)。

一方、ホスファチジルコリンからなるジャイアントリポソームにナノニードルを接近させた際には、斥力緩和は観察されず、蛍光像 (図 2) からナノニードルがリポソームに全く挿入されないことが明らかになった⁶⁾。細胞とリポソームの大きな構造上の違いとして、細胞膜直下に存在するアクチン繊維からなる裏打ち構造がある。実際に、アクチン繊維形成を阻害する Cytochalasin D で処理した JM 細胞に対してナノニードルの挿入を試みたところ、挿入効率は 73% から 7% まで減少した。共焦点蛍光顕微鏡によりアクチン繊維を脱重合した細胞を観察すると、リポソームと同様にナノニードルが膜に陥入し挿入できないことがわかった。

図 2

IC3-PE 標識ナノニードル (赤) を挿入した JM, Cytochalasin D 処理した JM, 及びリポソームの共焦点蛍光顕微鏡画像。緑: DiO 標識脂質膜, Scale bar: 3 μm (文献 5 より一部改変)。

た(図2)。これらの結果はアクチン繊維からなる裏打ち構造がナノニードルの細胞膜貫通において必須であることを示している。さらに、アクチン繊維からなる裏打ち構造の網目の大きさが異なるFRSK (41 nm), HeLa (68 nm), T24 (110 nm) の3種の細胞⁷⁾に対してナノニードルの挿入を行ったところ、網目が小さい細胞ほど挿入効率が高いことがわかった。この網目の大きさよりも我々のナノニードルの直径が少し大きいサイズであることも膜の破断・貫通に重要な要素であると我々は考えている。一方、アクチン繊維の一種であるストレスファイバーの発達度が高いほど挿入効率が高いことも判明している。これらの結果は、細胞は脂質二重膜の下支えとなるアクチン繊維からなる膜骨格構造を有しているからこそナノニードルの機械的な挿入が可能であり、細胞ごとに異なるアクチン繊維の構造が挿入効率の支配的要素であることを示している。

4. ナノニードルの挿入条件の検討

既に述べてきたようにナノニードルの挿入に失敗する際は、細胞膜が陥入しニードルを覆ってしまうために細胞膜を破断できないことがわかった。細胞膜を構成する脂質二重膜は室温あるいは37°Cでは流動性が高いため、挿入を困難にしていると考えられる。そこで、ナノニードルの膜との衝突時の速度に対する挿入効率の依存性について調査した⁸⁾。ここでは斥力緩和ではなく、次節で詳細を説明する中間径フィラメントの検出頻度により挿入効率を評価している。ナノニードルを1, 10, 1000 $\mu\text{m s}^{-1}$ の速度で挿入した場合、1 $\mu\text{m s}^{-1}$ で著しく挿入効率が低下する結果を得た。この結果は、膜貫通を達成するための接近速度に下限が存在することを示しており、細胞の自然沈降では挿入が困難であるという既報の結果に矛盾しない¹⁾。一方で我々が一般的に用いる条件である10 $\mu\text{m s}^{-1}$ から1000 $\mu\text{m s}^{-1}$ に接近速度を上げても挿入効率に有意な上昇は認められず、条件としては10 $\mu\text{m s}^{-1}$ で十分であることがわかった。

次に、低温条件での挿入を行い、脂質二重膜の相転移による流動性低下の効果を検証した。細胞膜を構成する主たるリン脂質であるホスファチジルコリンの相転移温度は19.6°Cである。37°Cから4°Cへと培地温度を低下させると、ビメンチン検出効率は30%から46.7%に上昇した⁸⁾。以上より、細胞膜の相転移温度以下の低温条件で操作を行うことで、高効率なナノニードルの挿入が可能であることが明らかとなった。

5. ナノニードルを利用した生細胞のタンパク質検出

これまでにAFMカンチレバーから作製したナノニードル表面に様々な生体分子を修飾することで、細胞内部への物質導入及び細胞内部の解析技術に応用してきた。例えばプラスミドDNAを静電的に吸着させたナノニードルを細胞に対して挿入し、高効率にプラスミドDNAを導入することに成功している⁴⁾。また、核酸検出プローブであるモレキュラービーコンを修飾したナノニードルを用いることで、単一細胞レベルでのmRNAの*in situ*検出が可能であることを示した⁹⁾。

さらに我々はナノニードルに抗体を修飾し、細胞内に挿入することでタンパク質を検出する技術に利用することを着想した。現在、生きた細胞を識別し分離する技術としてはFACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) が一般的だが、細胞表面の抗原しか標的にすることはできない。FACSでは対象にできない細胞内部のタンパク質を生きた細胞で検出できれば、細胞種の判定精度の向上に繋がり、また細胞状態の詳細な解析が可能になる。

そこでAFMを用いて抗体を修飾したナノニードルを細胞に挿入し、抗体と細胞内の標的タンパク質の複合体を形成させ、針の抜去により抗原抗体複合体を強制的に解離することを試みた(図3a)。中間径フィラメントネスチンを抗体修飾ナノニードルで検出した際に得られるフォースカーブを見ると、挿入過程では斥力の緩和が観察され、抜去過程ではベースラインを下回る引力側に変位が観察される(図3b)。これは、ナノニードル挿入時に抗原抗体複合体が形成され、その破断に必要な力を示している。抗原ペプチドであらかじめ抗体をブロッキングすると引力側の力は非特異的な相互作用のレベルまで低下することから、特異的に標的タンパク質を検出していると言える。

図3 抗体修飾ナノニードルを用いた細胞内骨格タンパク質の検出 (a) (文献4より一部改変)、ニードル挿入・抜去時に得られるフォースカーブ (b)。

フォースカーブの引力側を積分した値は全ての抗原抗体結合の破断にかかる仕事量を意味している。この仕事量は引力側の力のピーク値と相関を示すことが確認されており、我々はこのピーク値を Fishing force と命名した。また、中間径フィラメントのネスチンの発現レベルが異なる3種のマウス乳癌細胞に対して測定を行い、Fishing Force とネスチン発現量が相関することを確認した³⁾。そこで我々はこの Fishing force を解析することによって、細胞内における標的抗原タンパク質の有無を判定することとした。この技術により現在までにアクチン¹⁰⁾、微小管¹¹⁾、中間径フィラメント³⁾の検出に成功しており、ほぼ全ての骨格タンパク質を検出可能であると考えている。FACS のように細胞に対して標識をせず、外来分子の残存の可能性が極めて小さいため、医療分野など清浄性が要求される細胞の識別に有力な手法であると期待される。

実際の抗体修飾ナノニードルを用いたマーカータンパク質検出による細胞識別においては、標的タンパク質を発現しない細胞に挿入した際の Fishing force の平均値 +4SD の値を細胞識別の閾値として設けた。挿入箇所を変えた10回の挿入操作で1回でも閾値を超える Fishing force が検出された場合に標的タンパク質陽性であると判定することとした。ラット胎児海馬組織由来の初代培養細胞において、神経前駆細胞あるいは神経系幹細胞のマーカーである中間径フィラメントのネスチンと、分化が進行した神経細胞ニューロンのマーカーであるニューロフィラメントを対象に抗体修飾ナノニードルによる検出を行った(図4)³⁾。中間径

フィラメントのネスチン陽性である細胞2, 4はニューロフィラメント陰性である一方、ネスチン陰性である細胞1, 3, 5はニューロフィラメント陽性であり、それぞれがニューロンへの分化前後の細胞であることがわかる。ネスチンの閾値が小さかったためかあるいは少量のネスチンが残存しているため細胞1, 3, 5でも閾値を上回る値が確認されたが、未分化の細胞2, 4との差は明白である。このように本手法では1つの細胞内部の複数のマーカーを検出することが可能である。

6. おわりに

針状材料を挿入するという一見すると簡単な操作が、細胞が膜構造を有している故に達成できるということが明らかとなり、細胞膜を貫通し細胞内部に針状材料を到達させるためには針状材料自体の検討だけでなく細胞膜の物性及び構造的な特徴に着目することでその挿入効率をさらに向上させることが可能であることを示した。また、このナノニードルの応用例として、抗体修飾ナノニードルを用いフォースカーブから細胞内タンパク質を無標識に検出できることを示した。本手法では当然のことながら、細胞内の可溶性タンパク質の抽出も可能である。その有無は細胞外で蛍光標識二次抗体等を用いることで確認することができると考えられる。しかしながらこの単一のナノニードルを用いる手法ではスループットが低いという大きな問題がある。我々はシリコンウエハのナノ微細加工により、3 mm 角にナノニードルが数万本配置されたナノニードルアレイの開発に成功している¹²⁾。この材料では力学測定を行うことはできないが、多数の細胞を同時に処理することが可能であり、上記のような抽出操作、あるいは物質導入操作は可能であるため、今後ナノニードルアレイを用いた技術開発にも力を入れていきたいと考えている。

文 献

- 1) Berthing, T. *et al.* (2012) *Nanotechnology* **23**, 415102. DOI: 10.1088/0957-4484/23/41/415102.
- 2) Obataya, I. *et al.* (2005) *Nano Lett.* **5**, 27-30, DOI: 10.1021/nl0485399.
- 3) Mieda, S. *et al.* (2012) *Biosens. Bioelectron.* **31**, 323-329. DOI: 10.1016/j.bios.2011.10.039.
- 4) Han, S. *et al.* (2008) *Nanomedicine* **4**, 215-225. DOI: 10.1016/j.nano.2008.03.005.
- 5) Obataya, I. *et al.* (2005) *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1652-1655, DOI: 10.1016/j.bios.2004.07.020.
- 6) Kagiwada, H. *et al.* (2010) *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 496-503. DOI: 10.1002/cm.20460.

図4 nestin と neurofilament の力学的検出, ラット胎児脳海馬神経細胞の明視野像 (a), 細胞1~5に対して抗 nestin 抗体修飾ナノニードルと抗 neurofilament 抗体修飾ナノニードルを挿入して得られた fishing force (b) (文献4より一部改変)。

- 7) Murase, K. *et al.* (2004) Biophys. J. **86**, 4075-4093. DOI: 10.1529/biophysj.103.035717.
- 8) Kawamura, R. *et al.* (2016) J. Nanobiotechnology **14**, 74. DOI: 10.1186/s12951-016-0226-5.
- 9) Kihara, T. *et al.* (2010) Biosens. Bioelectron. **26**, 1449-1454. DOI: 10.1016/j.bios.2010.07.079.
- 10) Silberberg, Y. R. *et al.* (2013) Biosens. Bioelectron. **40**, 3-9, DOI: 10.1016/j.bios.2012.06.044.
- 11) Silberberg, Y. R. *et al.* (2014) J. Biosci. Bioeng. **117**, 107-112, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.019.
- 12) Matsumoto, D. *et al.* (2015) Sci. Rep. **5**, 15325. DOI: 10.1038/srep15325.

山岸彩奈

山岸彩奈 (やまぎし あやな)

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門セルメカニクス研究グループ研究員

2015年東京農工大学大学院工学府博士後期課程修了, 博士(工学). 15年東京農工大学産学官連携研究員. 16年産業技術総合研究所特別研究員, 現在に至る.

研究内容: 高転移性乳癌細胞株における中間径フィラメントネスチンの機能解明

連絡先: 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 つくば中央第5

E-mail: a-yamagishi@aist.go.jp

中村 史

中村 史 (なかむら ちかし)

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門セルメカニクス研究グループグループ長, 東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻客員教授(併任)

1995年東京農工大学大学院工学研究科博士後期課程修了, 博士(工学). 95年通商産業省工業技術院産業技術融合領域研究所バイオニックデザイングループ研究員. 99年通商産業省工業技術院産業技術融合領域研究所バイオモレキュラー研究グループ主任研究員. 2001年東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻客員准教授(併任). 08年独立行政法人産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門遺伝子応用技術研究グループグループ長. 09年東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻客員教授(併任). 10年現職に就任, 現在に至る.

研究内容: 機能化ナノニードルを用いた生細胞の *in situ* 解析

連絡先: 同上

E-mail: chikashi-nakamura@aist.go.jp

URL: <https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-cme/>