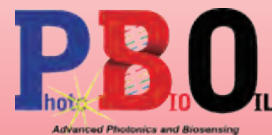


国立研究開発法人 産業技術総合研究所
先端フォトニクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリ



PhotoBIO ニュース

2020年 3月3日
第4号



Contents

- OIL、One Stop Service、One Team
- ・免疫1細胞機能解析チップの開発
～医療診断への応用を目指して～
・単一細胞サイトカイン分泌を検出
するためのバイオセンサーの開発
- 学会報告
・国際シンポジウム
「Biomedical Raman Imaging 2019」
- 第9回・第10回PhotoBIOワークショップ開催報告

OIL、One Stop Service、One Team

産業技術総合研究所 関西センター 研究業務推進部 審議役
 (兼務) 産学官連携推進室長
 (兼務) 先端フォトニクス・バイオセンシング OIL

中村 徳幸

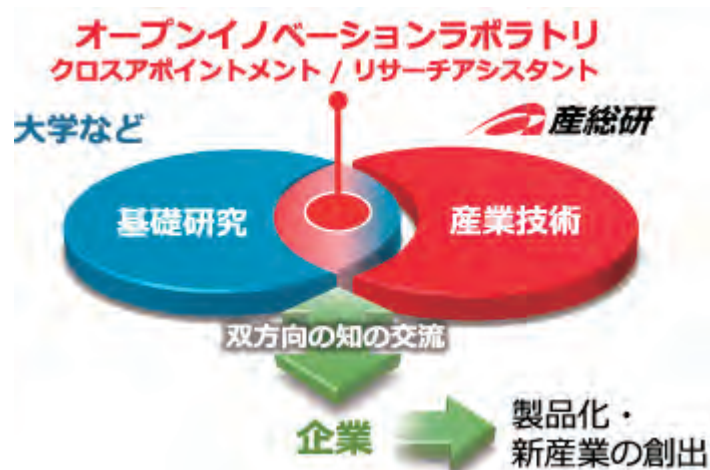


3つのOが並び、大喜利風なタイトルとなりましたが、お目通しいただければ幸いです。さて、経済産業省の進める「オープンイノベーションアリーナ構想」の一環として、2016年度から産総研は大学等のキャンパス内に設置する産学官連携研究拠点「オープンイノベーションラボラトリ」、通称「OIL」に取り組んでおり、現在までに9大学に10拠点を設置しています。先端フォトニクス・バイオセンシング OILは、2017年1月に5番目に設置され(近畿圏初)¹⁾、4年目を迎えたところです。

このような中で、産学官連携は文部科学省によって、次の5つに類型化されています。

1. 企業と大学、研究機関等との共同研究、受託研究など研究面での活動
2. 企業でのインターンシップ、教育プログラム共同開発など教育面での連携
3. TLO (Technology Licensing Organization: 技術移転機関)の活動など研究成果に関する技術移転活動
4. 兼業制度に基づく技術指導など研究者によるコンサルタント活動
5. 研究成果や人的資源等に基づいた起業

ただし、実際の産学官連携においては、このような活動が相互に密接に関連しており、例えば「技術相談」活動が、「技術移転」と「コンサルタント」の両方の要素を含むように、産学官連携が同時に複数の側面を構成することもあり得ます。この他、教育・研究情報の発信、人材交流など、本格的な産学官連携の前段階ともいえる諸活動や企業等からの大学等への寄附講座等の整備、企業の産学交流施設の大学敷地内への建設等の支援措置も、広い意味での産学官連携に含めることができるとも記されています。



これらを鑑みると、先端フォトニクス・バイオセンシング OILは、フォトバイオ協議会メンバーの方々を始めとする企業の皆様にとって、ほぼ One Stop Service な場であるとともに、フォトバイオ協議会ワークショップなど、他のOILには類を見ないイベントも開催されています。基礎研究から応用技術開発まで網羅している活動がうかがえ、関西センターとしても、ラグビーW杯での日本代表のチームスローガンである One Team になるよう、サポートする所存です。

小生の研究分野が細胞工学やバイオセンシングといったことで民谷ラボ長と旧知の仲であったことから、関西センター着任後に、角口所長からOILの支援を依頼され、フォトバイオ協議会幹事として設立時より、携わっていた経緯や、連携をより深めようということで、昨年8月より、OIL付の兼務となりました。先端フォトニクス・バイオセンシング OIL、あるいは関西ならではの、といった飛び抜けた(または、何かおもしろい!)研究が展開されるよう、重ねてのお力添えをお願い申し上げます。

1) https://www.aist.go.jp/aist_j/information/organization/oil/index.html

免疫 1 細胞機能解析チップの開発 ～医療診断への応用を目指して～

大阪大学大学院工学研究科 助教/産総研 客員研究員 齋藤 真人

自己免疫疾患や微小がん組織において、各種免疫細胞のヘテロジェネイティを捉えることが重要と考えられる。例えば SLE という自己免疫疾患を見てみると、患者や患者群のなかでも血球細胞の IFN 応答やミエロイド系統に違いがあることが示されており[1]、同じ疾患でも個人により分子レベルの違いがあることが示されている。一方、従来の多数の細胞を扱うバルク計測・解析においては、得られる結果としては平均値が示される、つまり希少な細胞の出す信号が埋もれてしまう。そのため、従来技術ではさらに踏み込んだ細胞機能解析を行うことは難しいと考えられている[2]。つまり、細胞の機能やヘテロジェネイティの解明およびその応用には、個々の 1 細胞の応答を直接とらえるような計測デバイス・技術の創出が必要である。そのような中、我々は、マイクロ流体技術を駆使し、1細胞ずつ配置されたその場で”生きた状態”でレセプタータンパクや因子分泌のダイナミクスを捉えるための 1細胞解析技術の創成を目指している。とくに、阪大医学部の高松先生らのグループと共同で、先の腫瘍や自己免疫疾患などを中心として、病的細胞への攻撃能や遊走能、認識能の解析と統合的な評価・理解によって、個々の病因・病態の理解に資することや治療効果向上への展開を目指している。その取り組みについていくつか紹介したい。

抗原非特異的な自然免疫系 NK 細胞も抗原特異的な獲得免疫系 T 細胞も癌細胞攻撃の際にはプロテアーゼの 1 種である Granzyme B を用いていることが知られていて、各種免疫細胞の Granzyme B 生産量や活性を評価することが、抗腫瘍活性の状態を理解するうえで重要である。

そこで、1 細胞を捕捉して、かつ周囲から独立した微小空間を形成し、1 細胞より分泌される Granzyme B を定量可能とするデバイスチップを設計・作製した。細胞捕捉ギャップ 4 μm 、PDMS 薄膜バルブによる分離空間 $\Phi 30 \mu\text{m}$ 、1080 個の 1 細胞分析場を有する(図 1 右)。作成したチップを用いた 1細胞捕捉やグランザイム B 計測にかかる諸条件最適化した後、PD-1 抗体治療を行なった肺癌患者の末梢血液(PBMC)を用いてリンパ細胞の 1細胞ずつでの比較を行なった。その結果、図 1 左に示すように、治療を行った患者検体にはキラー活性を強くもつ細胞が多く認められ、特に PD-1 抗体が作用している細胞についてより顕著であった。これは、ある程度治療効果を予測できる可能性を示すもので、将来的に安価で強力な診断キットになりうるものと期待できる。今後、臨床評価や実用性について検証を進めるとともに、細胞間のキラー活性差にどのような性質の違いがあるのかなど、細胞間差の原因調査も併せて進めていきたい。

そのほか、これまでに T 細胞-抗原提示細胞(APC)相互作用(認識能)検出[4]、腫瘍へのアプローチ機能としての遊走能評価のためのケモカイン応答計測チップ[5]、シグナル因子(IL-6)分泌計測[6]、血管炎の原因となる好中球 NETsis 計測[7]、レセプタータンパク計測チップ[8]など、総合的な免疫機能の理解を深められるよう各種機能計測・解析するためのチップの開発も進めている。今後、これらを用いた医療診断へ実用展開できるよう検討も進めていきたい。

1. *Cell* 165, 551, 2016
2. *Nature Immunology* 15, 128-135, 2014
3. J.C. Briones, M. Saito, et al, *Theranostics* 2020; 10(1):123-132. (Open access)
4. H. Ide, M. Saito, et al, $\mu\text{TAS}2019$, Basel, 480
5. T. Toma, M. Saito, et al, $\mu\text{TAS}2018$, Taiwan, 2377.
6. C. Zhu, M. Saito, et al, *Micromachines* 2020, 11(1), 107 (Open access)
7. R. A. Mohamed Ali, M. Saito, et al, *Micromachines* 2020, 11(1), 52 (Open access)
8. C. Zhu, M. Saito, et al, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2019

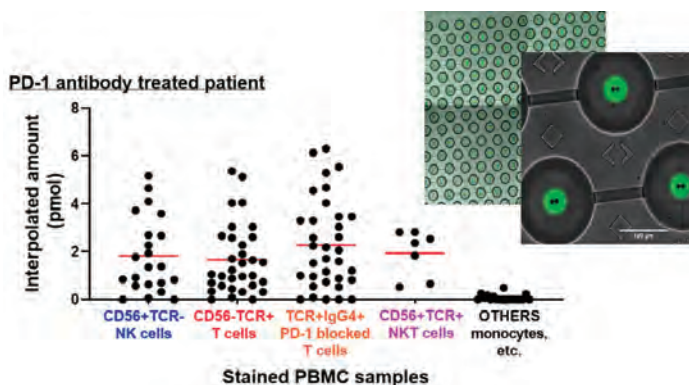


図 1. 臨床検体を用いた 1 細胞グランザイム B 活性評価

単一細胞サイトカイン分泌を検出するためのバイオセンサーの開発

産総研・阪大 OIL 産総研特別研究員／大阪大学 招へい研究員 羅 希

サイトカインは、様々な免疫細胞から分泌されたタンパク質で、細胞の機能とシグナル伝達に関与し、生体において多くの疾患の原因分子として注目されている。単一細胞レベルでのサイトカイン分泌の解析は、新規治療標的の探索、疾患層別化、疾患増悪誘導細胞の同定、病的機能細胞の特性の同定などに繋がっている。しかし、従来の実験方法では細胞性質の平均値しか得られないため、細胞個々の性質を把握するのは困難であった。

一方、局在型表面プラズモン共鳴 (LSPR) 技術は、金属ナノ構造の表面近傍に局在したプラズモンが生じ、非常に狭い領域での変化 (分子の結合) を検出できる。我々は、単一細胞分泌したサイトカインのリアルタイム測定に着目し、マイクロウェルにトラップした細胞の情報を、LSPR により in-situ で測定するデバイスの開発に取り組んできた。

デバイスは、図1に示すように、(A) LSPR 検出用のセンサチップと、(B) 単一細胞トラッピング用のマイクロウェルアレイで構成された。材質は、生体分子の吸着性が非常に低いシクロオレフィン (COP) を用いた。(A) は、188 μm 厚の COP を用いて、後述するカリフラワーのようなナノピラーを形成した。(B) は、2mm厚の COP を用いて、直径13 μm 、深さ20 μm のチャンバーを4900 (70 \times 70) 個配列した。(B) の上に (A) を配置し、トラップされた単一細胞を効率よく観察し、単一細胞から分泌したサイトカインを検出することができた^[1, 2]。

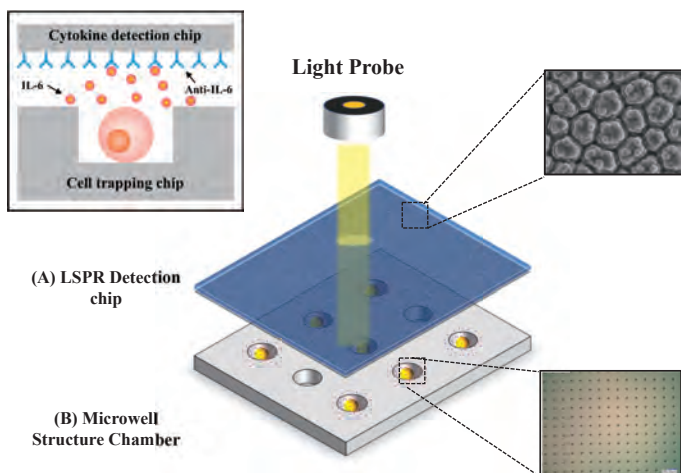


図1. 単一細胞トラッピングとサイトカイン検出するためのバイオセンサーの概要

一方、LSPR センサチップの高感度化について検討を行っている。既存のマイクロおよびナノ加工技術として、電子ビームリソグラフィ (EBL) や集束イオンビーム (FIB) など直接描画できる技術があるが、プロセスの時間やチップ作製のコストの問題があった。これに対し、ナノインプリント技術は、微細パターン転写技術であり、原版となる金型を用い、マイクロおよびナノ構造を安価に、かつ、大量に作製することが可能である。

そこで、我々は、熱ナノインプリント技術にドライエッチングを加えた手法により、カリフラワーのようなナノピラー (cauliflower-like gold nanopillar) を有する構造を作製した。その結果、LSPR センサチップの屈折率感度が増強され、実際のサンプルを測定した結果、図2に示すように、センサチップの高感度化とサイトカインの検出に成功した。

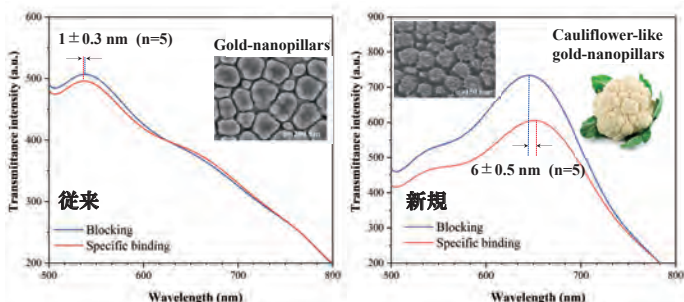


図2. サイトカイン (インターロイキン-6) 検出による LSPR センサチップの比較

現在、これら開発してきた技術を合わせ、単一細胞分泌したサイトカインをリアルタイムに可視化する研究開発を進めている。今後、単一細胞分泌のプロファイルや、単一細胞の免疫応答に関する評価などを進め、医療診断応用に繋げていきたい。

1. Chen Zhu, Xi Luo et al. "Real-Time Monitoring and Detection of Single-Cell Level Cytokine Secretion Using LSPR Technology", *Micromachines*, 2020, 11(1), 107
2. 「プラズモニクセンサ用の部材およびその製造方法」. 特願 2019-196799 (2019/10/29). 産業技術総合研究所, 大阪大学

学会報告

国際シンポジウム「Biomedical Raman Imaging 2019」

大阪大学大学院工学研究科 教授／産総研 特定フェロー 藤田 克昌

生物医学応用を見据えたラマン分光イメージング技術に関する国際会議を、大阪大学吹田キャンパス内の銀杏会館にて、2019年11月24日から25日の日程で開催した。ラマン分光イメージングに関して先駆的に技術開発と応用研究とに携わってきた研究者がアジア、ヨーロッパ、米国から集まり、これまでの技術開発の経緯と現在の課題、また技術開発および応用研究における将来展望について、幅広い議論をおこなった。シンポジウムでは、21の招待講演の他に、21の一般講演、ポスター発表があった。合計で129名の参加者があり、ラマンイメージング技術とその生物医学応用という限定的なトピック、かつ関西での開催にもかかわらず大変盛況なシンポジウムとなった。本シンポジウムは、産業技術総合研究所先端フォトニクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリ (PhotoBIO-OIL)、大阪大学フォトニクスセンターおよび日本学術振興会研究拠点形成事業 (Core-to-Core プログラム)、日本分光学会 赤外ラマン分光部会が共同で開催し、産官学の協力のもと基礎から応用まで幅広い研究討論となった。

ラマン分光法は構造化学や材料工学、また異物検出や工業製品の物性評価まで幅広く活用されている分析法であるが、試料から検出されるラマン散乱光が微弱であるため、多くの検出回数、検出点が必要となるイメージングや、微小な領域の測定が必要となるバイオ計測にはあまり利用されて来なかった。しかし、近年、ラマン散乱光の増強や分光検出の効率の技術が進み、顕微レベルでのイメージングが現実的となり、様々な手法の開発、およびラマン分光の高い分析力を生かした応用研究が進んでいる。

シンポジウムで議論されたトピックは、顕微イメージングを実現するための工夫や、分析能力を高めるための多波長測定技術の開発、また多試料観察のための高速分光イメージング技術の開発、およびそれらを利用した無標識細胞分析や組織診断への応用、それを可能とするスペクトル解析技術の開発におよび、ハードウェア、ソフトウェア、アプリケーションと幅広い分野の議論がなされた。また医

療応用を目指した機器開発などもあり、基礎研究から産業応用まで様々なステージの研究について議論があったのも印象的であった。

イメージング技術の開発には、主にコヒーレントラマン散乱に代表されるラマン効果の効率的な誘導技術、ラマン分光スペクトルの並列検出によるイメージングの高速化など、非線形光学、応用光学を駆使した手法が多く紹介された。目的や試料を見極めて、測定手法や装置を選択する必要があることが議論された。

ラマン分光イメージングの応用面では、2つの大きな方向性が示された。ひとつはラマン分光法の特徴である無標識の分子分析を活用した、細胞種や状態の分析や診断である。無標識の分子分析を活用することで、特定のタンパク質 (マーカーと呼ばれる) の発現等に限らず、試料内の分子組成を検出し、無標識での細胞種や状態の識別が可能になる。これを生かして細胞分化や活性状態など、従来の標識法で可視化できない情報を活用する道が示された。この技術の主な応用先として、術中の迅速診断について多くの議論があった。

もう一つの応用技術として注目されていたのはラマン散乱用の標識技術であった。ラマンタグと呼ばれるこの技術は、生体分子とは異なる微小な分子構造 (タグ) を試料内の特定の部位や物質の標識に用いる技術である。これらのタグは他の分子とは異なるラマン散乱光を生じるため、それを頼りに、標的となる分子や構造を特異的に観察できる。シンポジウムでもいくつかのラマンタグの例が示され、実際に小分子イメージングに活用されている例が多く示された。また、このようなラマンタグからの発光スペクトルは蛍光等にくらべて数十から百分の1程度と細いため、多数のタグを用いて複数の標的を同時に観察することにも利用できる。これについてもタグ開発やその特性評価、またそれらを高効率に検出するための光源、光学技術等、広い分野にわたる研究成果が報告された。

本シンポジウムにおいてラマン分光イメージングの有用性や将来展望について様々な側面から議論があったが、

そのどれにおいても分野融合による発展が不可欠という声が聞かれた。技術開発と応用研究との連携だけでなく、技術開発においても様々な分野融合によるブレークスルーが期待でき、それらにはシステム制御やスペクトル解析などのソフトウェア技術も含まれる。またラマン分光イメージングで新たなアプリケーションを開発するには、様々な手法や技術を試行錯誤しながら、計測条件の決定、データ解析を進めることができる分野融合的な拠点が必要であるという意見が複数の研究者から聞かれた。

ラマン分光イメージングには、様々な技術要素、応用展開が含まれ、それらの組み合わせを考えただけでも、将来的にもさらに発展し、他分野への影響をもたらす技術であるという印象を強く受けた。

第9回・第10回 PhotoBIO ワークショップ開催報告

令和元年9月10日に大阪大学フotonクスセンターにて、第9回 PhotoBIO ワークショップが開催され、11社、合計30名にご参加いただきました。

産総研 センシングシステム研究センター 副研究センター長 藤巻真氏から「産総研センシングシステム研究センターの取り組み」として、センター設立の目的やミッション、センシングシステムの技術指導・支援等について、産総研 健康工学研究部門 生体ナノ計測研究グループ 瀧脇雄介氏から「スマホで行う生化学検査チップと体外診断キットへの応用」として、市場や技術・商品のトレンドや POCT デバイスの利点と欠点、その場診断チップの長所と短所等について、また、産総研 創薬基盤研究部門 ステムセルバイオテクノロジー研究グループ 研究グループ長 木田泰之氏から「光操作を使った自律神経とその標的臓器の生体外再構築に迫る」として、ヒト自律神経の誘導法の開発や生体外培養システム、ヒト自律神経とヒト心筋を含む MPS 等について、最後に、大阪大学医学部 呼吸器・免疫内科 助教 高松漂太氏から「自己免疫疾患の病態解明と層別化を目指して」として、SLE 疾患の個別化医療実現に向けた戦略や層別化を可能にするレポーター細胞の確立、ベーチェット病の血清を用いた層別化や層別化の臨床への活用についてご講演いただきました。

2年後に米国で同様のシンポジウム開催に向け準備を開始し、英国の The Royal Society of Chemistry は今回のシンポジウム開催を受けて、Biomedical Raman Imaging の特集号の企画を決定した。今回のシンポジウムが国際的なコミュニティ形成と分野発展に大きく貢献すると期待している。



また、12月3日に第10回 PhotoBIO ワークショップが開催され、7社、合計32名にご参加いただきました。

大阪市立大学大学院 理学研究科 教授 細川千絵氏から「集光レーザービームの光摂動による細胞機能操作技術の開発」として、神経細胞のネットワーク操作や光ピンセットによる細胞操作や PhotoBIO-OIL が行っている革新的な細胞操作やイメージング技術の開発等について、大阪大学 先導的学際研究機構 准教授 Nicholas SMITH 氏から「Label-free phenotyping of single cells」として、ラマンイメージングによる非侵襲的な可視化技術や脂質を取り込みブランクとなったマクロファージをラマンで検出する技術等の開発についてご講演いただき、また、浜松ホトニクス株式会社 電子管事業部 電子管営業推進 長岡賢一氏から同社の高感度光センサ光電子増倍管のご紹介や、同じく牧田桂太氏から小型光電子増倍管 uPMT®に関する最新情報をご提供いただきました。最後に、大阪大学 産業科学研究所 教授 黒田俊一氏から「ヒト嗅覚受容体センサーによるヒト嗅覚情報の可視化の試み」として、ヒト嗅覚受容体センサーの開発目的や強み、既存技術との比較や今後の展開についてご講演いただきました。

各回の交流会は講師の先生方や会員企業の方々の交流を深める良い機会となりました。