

脱顆粒の免疫学的機序に関する電気化学計測システムの創製

Development of electrochemical measurement systems for degranulation monitoring on immunological mechanism

2151024



研究代表者

東京医科歯科大学
生体材料工学研究所日本学術振興会特別
研究員 (PD)

田 畑 美 幸

[研究の目的]

一連のアレルギー反応における物質移動の既存の解析としては、カルシウムイオン選択的蛍光イメージングプローブや、顆粒内が酸性環境であることを利用した酸性蛍光イメージングプローブを用いた細胞工学的イメージング法が用いられている。これらの方法は多段階の操作によって行われ、専門の手法や専用の検出デバイスを必要とする課題がある。一方で、電気的な計測法は非標識でラベリ化剤を必要としない計測が可能であるため、光学的な検出デバイスが不要でありシステムの小型化に有利である。また半導体技術や微細加工技術との親和性からセンサ部分の並列化が容易であり、高感度検出を実現する。

最近では医療・創薬研究分野において様々な動物実験代替法が提唱されており、培養細胞を用いた解析技術が評価法として大きな役割を担っている。培養細胞を用いた解析では、微量の試料でも解析可能であることが望ましく、反応場、検出場の微小化が必要であり、トランジスタと組み合わせた評価デバイスの利点と合致する。

そのため本研究では、アレルギー反応を誘発する脱顆粒現象についてラベルフリーでリアルタイムモニタリングを実現する電気化学的計測法を用いて従来法とは異なるアプローチを行う

ことにより、細胞外におけるプロトンの動態を簡便に調査し、将来的に診断や創薬に貢献する知見を得るデバイス開発の基盤技術を確立することを目指し、プロトン応答 ISFET 上での細胞培養法の確立、リアルタイムモニタリング用のサンプル溶液フローシステムの構築に取り組んだ。本研究で提案する細胞ートランジスタデバイスは特に脱顆粒の生体分子動態に着目しているが、アレルギー・自己免疫疾患の発症および抑制の仕組みは今現在も活発に研究がなされている領域であり、今後、免疫性疾患の複雑な制御機構を簡便・迅速に解明し、医療変革を支える新たなプラットフォーム技術へ大きく貢献すると考えられる。

[研究の内容、成果]

I 型アレルギー反応は、組織中の肥満細胞や血液細胞中の好塩基球の細胞膜上にあるレセプターの $Fc\epsilon R$ I に IgE 抗体 (イムノグロブリン E) が結合し、小胞体から Ca^{2+} が一過性に放出され、枯渇後さらにカルシウムチャネルが活性化されることにより細胞外から Ca^{2+} が流入することが知られている。細胞内の Ca^{2+} 濃度が $1\ \mu M$ 以上になると脱顆粒現象により顆粒と細胞膜が融合し酵素やヒスタミンが細胞外に放出さる。また、顆粒内 pH は 5 程度に維持されており、脱顆粒現象により細胞外の pH (7.4)

が局所的に低下することが知られている。よって脱顆粒のモニタリングには酸性蛍光イメージングプローブを用いた細胞工学的イメージング法が用いられているが、先に述べたように煩雑で専門的な操作を必要とするため簡便な解析方法が必要とされている。本研究では細胞外プロトンセンシングデバイスの創製とフローシステムの構築を行い、脱顆粒現象のリアルタイムモニタリングを行った。具体的には、アレルギー関連細胞であるラット好塩基性白血球由来マスト細胞株（RBL-2H3）について、細胞膜近傍で生じた pH 変動を捉えることが可能な ISFET の測定条件を最適化し、刺激剤であるイオノマイシンを作用させ、脱顆粒モニタリングを電気化学的に捉えることを試みた。

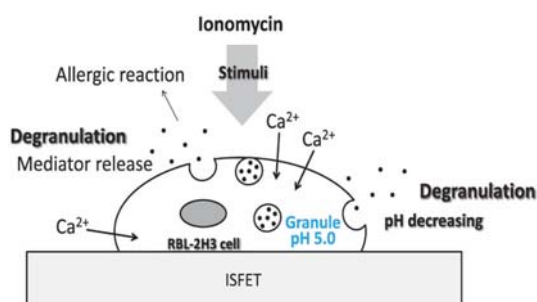
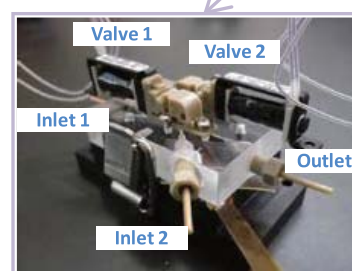
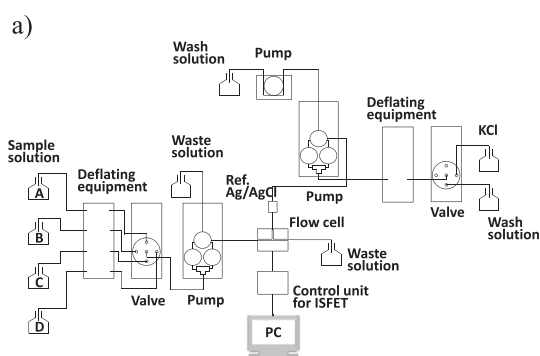


図1 脱顆粒モニタリング模式図

1. フローシステムのデザインと構築

デバイスを含む流路システム、細胞機能評価の自動化シーケンス制御、得られたデータの析システムをデザインし、マイクロ流路システムを作製した（図2）。ゲート絶縁層に五酸化タンタル（Ta₂O₅）（340 μm x 10 μm）を用いた ISFET（ISFETCOM Co. Ltd., Japan）を使用し、V_{DS}およびI_Dはそれぞれ0.8 Vと500 μAに固定した。このバイオトランジスタ計測システムを用いることで、定常時から試薬導入時における細胞挙動の非破壊・連続モニタリングを実現した。



c)

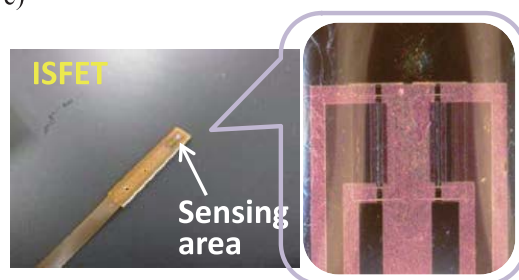


図2 計測システム a) デザインしたフローシステム, b) 構築したフローシステム, c) プロトンセンシングエリア画像

2. プロトンセンシングによる脱顆粒のラベルフリーモニタリング

ISFET センサ表面上に RBL-2H3 細胞をコンフルエントに接着させるため、センサへの細胞固定化法を検討した。1 x 10⁵個の RBL-2H3 細胞を ISFET センサ上に播種した。センサ表面は予め典型的な細胞固定化試薬である

poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, US) または BD matrigel matrix (BD Biosciences, US) で処理しておき, Tyrode's buffer を 1 時間流した後の細胞接着の様子をコーティング剤なしの条件と, 比較した結果を図 3 に示した。BD matrigel を用いた場合において, モニタリング後も十分に細胞が維持されていることが示された。このことより以降の実験には BD matrigel を用いることとした。

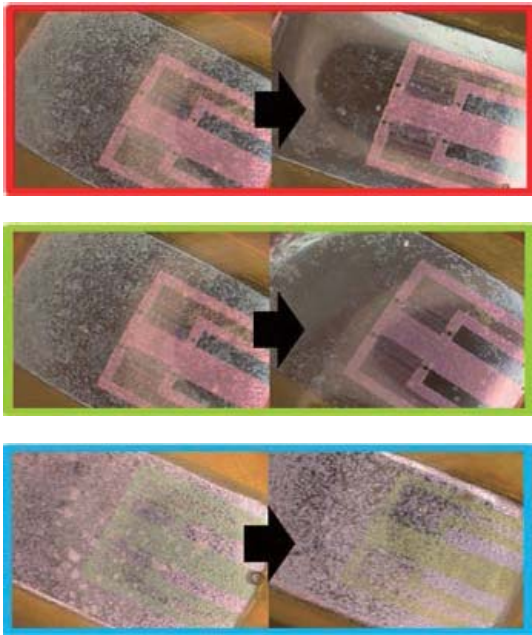


図 3 細胞接着試薬の効果 a) bare Ta₂O₅, b) Poly-L-lysine, c) BD matrigel

細胞固定化後のプロトン感度を評価するため, pH4, 7, 9 の標準緩衝溶液に 1 分ずつ暴露し, 出力電位のモニタリングを行った。Ta₂O₅ のプロトン応答はネルンスト式に従う。

$$E = E_0 + (RT/zF) \ln a_{ox}/a_{red} \quad (1)$$

ここで, E は電極電位, E_0 は標準電極電位, R は気体定数, T は温度, z は移動電子数, F はファラデー定数, a は活量それぞれ示す。細胞がない場合の典型的なプロトン感度は -58.0 mV/pH[1] であるのに対して, 細胞固定化後は -53.1 mV/pH (with $R^2=0.994$) であった。これらの値は Nernst の傾き (-59.2 mV/pH

at 25°C) に近く, 細胞固定化後も十分な pH 感度を有していることが示された。

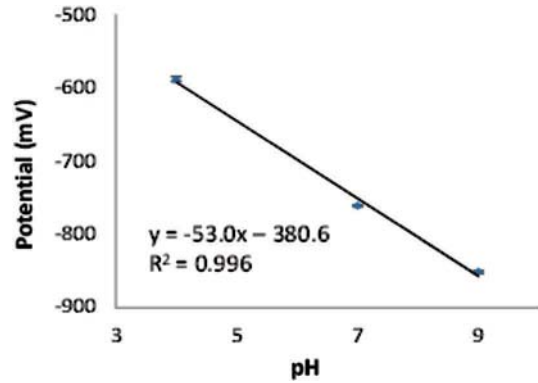


図 4 RBL-2H3 細胞固定化後の ISFET の pH 感度

Tyrode's buffer に溶解したイオノマイシンを RBL-2H3 に暴露し, 細胞膜近傍で生じた pH 変化を電位変化としてモニタリングした。参照電極には Ag/AgCl を用いた。また, ISFET での測定から得られたイオノマイシンにより誘起される脱顆粒の挙動は, 従来法である蛍光定量法と比較した。図 5a) に, $1 \mu\text{M}$ イオノマイシンを RBL-2H3 に 1 時間暴露したときの電位測定の結果を示した。ISFET 上の RBL-2H3 にイオノマイシンを作用させると, 30 分程度緩やかな電位の上昇が続いた。一方で, 細胞のない系では電位の上昇は確認されなかった。ISFET において電位の上昇はプロトン濃度の上昇を示すため, イオノマイシンにより脱顆粒が誘起されたことで細胞外の pH が酸性側にシフトしたことを捉えた結果だと示唆される。また, pH 変化に依存して蛍光を発する RBL-2H3 細胞を用いて蛍光定量法による結果と比較したところ (図 4b)), 同様の時間スケールでの脱顆粒が確認され, ラベル化を必要としない ISFET での評価の可能性を見出した。試薬濃度, 高 S/N 比の実現など測定条件の最適化を行うことで更なる測定系の改善が期待される。

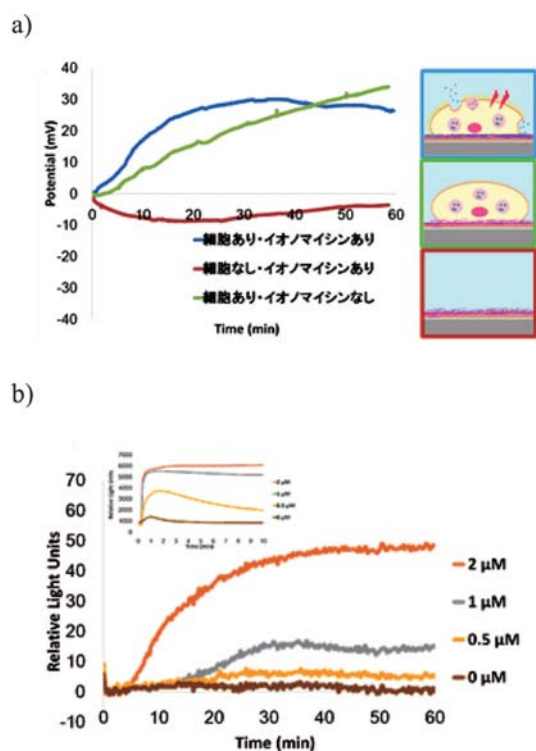


図5 マスト細胞の脱顆粒リアルタイムモニタリング a) ISFETによるラベルフリー電位変化計測, b) Ca^{2+} およびpHイメージングプローブを用いた蛍光強度測定。上図は Ca^{2+} の細胞内取り込み, 下図はpH上昇に伴う脱顆粒の様子をそれぞれ示す

[今後の研究の方向, 課題]

Ca^{2+} の流入が生体反応の引き金となることが明白であるが, カルシウムチャネルがどの程度カルシウムイオン動態やその後の物質動態に影響を及ぼしているか直接的に定量する

技術の開発は未だ研究の余地がある。そのためカルシウムセンシング技術または多項目センシング技術と本研究を組み合わせることで, 今後大きく発展していくと考えられる。

このように, 本研究で得られた基盤技術は, 免疫疾患の早期診断や予後診断への展開が見込まれるだけでなく, ポイントオブケアを目指した医療システムのイノベーションにつなげていくことが可能である。また, エレクトロニクスと医療・生命科学分野の融合という観点において特色を持つ本研究は, 一見対称的な間領域の技術・概念を融合することで幅広い医療分野に貢献していくと考えられる。

[参考文献]

- [1] D. Schaffhauser, M. Patti, T. Goda, Y. Miyahara, I. Forster, P. Dittrich, "An Integrated field-effect microdevice for monitoring membrane transport in *Xenopus laevis* oocytes via lateral proton diffusion", *Plos One*, 2012, 7 (7), e39238.

[成果の発表, 論文等]

- [1] M. Tabata, T. Goda, A. Matsumoto, Y. Miyahara, "Electrochemical label-free degranulation monitoring for in-situ evaluation of cellular function", the 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milan, Italy, August 25-29, 2015 (査読有, 国際学会)