

博 士 学 位 論 文

論文題目 走査型電気化学顕微鏡を用いた
細胞内および細胞表面タンパク質の
単一細胞レベル経時測定に関する研究

提出者 東北大学大学院環境科学研究科

環境化学・生態学 コース

学籍番号 B2GD1309

氏名 松前 義治

Name Yoshiharu Matsumae

目次

第 1 章 序論	1
1.1 はじめに.....	1
1.2 走査型電気化学顕微鏡 (SECM, Scanning Electrochemical Microscopy)	2
1.2.1 SECM の基本構成	2
1.2.2 微小電極による測定	3
1.2.3 フィードバック効果	4
1.2.4 Generation-Collection モード	5
1.2.5 プローブ走査法.....	5
1.2.6 距離制御を可能とする SECM.....	6
1.2.7 SECM アプリケーションについて[3]	7
1.3 SECM による生体試料測定	8
1.3.1 酵素活性測定	8
1.3.2 呼吸活性と光合成活性の測定	11
1.3.3 膜透過性評価	12
1.3.4 神経伝達物質測定	13
1.3.5 形状測定.....	14
1.3.6 その他 生細胞イメージング、代謝物測定、分子輸送、パターニング	14
1.4 本研究の目的	15
参考文献.....	16
第 2 章 実験	21
2.1 はじめに.....	21
2.2 電極の作製	21
2.2.1 マイクロ電極の作製	21
2.2.2 参照電極の作製.....	23
2.3 走査型電気化学顕微鏡 (SECM) の基本構成	24
2.4 細胞操作.....	24
2.4.1 使用した細胞	25

2.4.2	試薬・器具	25
2.4.3	細胞の培養	26
2.4.4	細胞の継代	26
2.4.5	細胞の凍結保存	27
2.4.6	細胞の融解	28
2.5	細胞のパターニング	28
第3章	二種のメディエーターを用いた単一細胞内酵素活性モニタリング	32
3.1	はじめに	32
3.2	実験	33
3.2.1	試薬	33
3.2.2	SECM 測定原理	34
3.2.3	NQO 活性評価方法と NQO 活性モニタリング	34
3.2.4	毒性評価	35
3.2.5	細胞内 ROS 量アッセイ	36
3.2.6	細胞内 GSH 量アッセイ	37
3.3	結果と考察	38
3.3.1	メディエーター毒性評価	38
3.3.2	ダブルメディエーターシステムによる NQO 活性測定	40
3.3.3	フェリシアン化カリウム ($K_3Fe(CN)_6$) 濃度による電流応答への影響	41
3.3.4	高濃度メナジオン曝露における電流応答	42
3.3.5	単一細胞からのメナジオン還元体放出量の算出	42
3.3.6	NQO 活性モニタリング	44
3.3.7	SECM-IT (SECM-induced transfer) の影響	44
3.4	まとめ	46
	参考文献	47
第4章	SECM による単一 ES 細胞の分化状態評価	50
4.1	はじめに	50
4.2	実験	51
4.2.1	試薬	51
4.2.2	ES 細胞の培養と分化条件	51
4.2.3	分化状態評価原理	52

4.2.4	毒性評価.....	52
4.2.5	キャピラリーサクショ​​ン	53
4.2.6	遺伝子発現解析.....	53
4.3	結果と考察.....	58
4.3.1	測定溶液の毒性評価	58
4.3.2	ES 細胞と分化細胞のイメージング	58
4.3.4	単一細胞レベル統計解析	60
4.4	まとめ	61
	参考文献.....	62
第 5 章	SECM による単一細胞レベル膜タンパク質検出.....	65
5.1	はじめに.....	65
5.2	まとめ	66
	参考文献.....	68
第 6 章	膜タンパク質内在化のリアルタイムモニタリング	71
6.1	はじめに.....	71
6.2	まとめ	73
	参考文献.....	74
第 7 章	総括	77
	謝辞	79

公表論文

- Yoshiharu Matsumae, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Electrochemical monitoring of intracellular enzyme activity of single living mammalian cells by using a double-mediator system, *Anal. Chim. Acta.*, 2014, **842**, 20
- Yoshiharu Matsumae, T. Arai, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Evaluation of the differentiation status of single embryonic stem cells using scanning electrochemical microscopy, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 6498
- Yoshiharu Matsumae, Y. Takahashi, H. Ida, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Mediator-free Electrochemical monitoring of Cetuximab-induced Internalization of Epidermal Growth Factor Receptors on Single Cell by Scanning Electrochemical Microscopy, *in preparation*
- Toshiharu Arai, T. Nishijo, Y. Matsumae, Y. Zhou, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Noninvasive Measurement of Alkaline Phosphatase Activity in Embryoid Bodies and Coculture Spheroids with Scanning Electrochemical Microscopy, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 9647
- Yasufumi Takahashi, K. Ito, X. Wang, Y. Matsumae, H. Komaki, A. Kumatani, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Nanoscale Cell Surface Topography Imaging using Scanning Ion Conductance Microscopy, *Electrochemistry*, 2014, **82**, 331
- Mustafa Şen, Y. Takahashi, Y. Matsumae, Y. Horiguchi, A. Kumatani, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Improving the electrochemical imaging sensitivity of scanning electrochemical microscopy-scanning ion conductance microscopy by using electrochemical Pt deposition, *submitted*

学術雑誌における解説

- 松前義治, 新規電気化学顕微鏡による触媒・電極材料の微細構造の局所機能評価, ぶんせき, 日本分析化学会, 2013 年 第 12 号 p. 751

受賞歴

- 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 日本化学会東北支部, 優秀ポスター賞受賞
- 平成 26 年度日本分析若手交流会, 日本分析化学会東北・関東支部, 優秀ポスター賞受賞

第 1 章 序論

本章では、本研究の目的と背景、走査型電気化学顕微鏡の原理や利用法について述べる。

1.1 はじめに

現代の生物学および生命科学は、過去の様々の出来事により大きく変化しながら形成されてきた。17 世紀の顕微鏡の発明により、動植物が同じ構成単位である『細胞』から成ることが解明された。19 世紀には進化論が提唱され、また 19 世紀後半には遺伝の法則が発見されて遺伝子の存在が証明された。1953 年には DNA の構造が明らかにされ、分子生物学は爆発的な発展を遂げた。また技術発展により医療が大幅に進歩し、遺伝情報を利用して創薬研究や遺伝子組み換えなど産業につなげることも可能となった。近年では、京都大学の山中伸弥教授らが、特定の遺伝子を利用することで、再生医療や創薬開発を大きく進展させる可能性を持つ iPS 細胞の作製に成功した。現在では、様々な細胞を遺伝子レベルから人工的に分化させて作製することが可能となった。しなしながら、世界中の研究者が iPS 細胞（などの幹細胞）の分化制御を試みているにもかかわらず、その成功率は決して高くない。生物ではほぼ完璧に近い精度で、受精卵から成体構築までの分化制御をしていることを考慮すれば、我々が知り得ている生命現象はほんの一握りに過ぎず、生体機能の完全な理解には到底到達できていないことが容易に想像できる。

近年、電子顕微鏡や光学顕微鏡・遺伝子発現解析法など様々な分析技術の発達により、一様に見える細胞群でもその性質や役割が異なり、細胞間ネットワークが組織形成に不可欠であることがわかってきた。さらに、このような細胞機能を作り出すには、遺伝子や蛋白質などの多数の生体分子の相互作用とそれを制御する機構が必要だと分かってきた。周辺環境や状態に応じた生体機能の変化メカニズムを詳細に解明するためには、生体分子の解析および細胞レベルでの解析の両方が必要である。例えば分子標的治療薬の開発では、がん細胞と正常細胞の違いをゲノムレベル・分子レベルで解明し、がん細胞の増殖や転移に関わる分子を特定するだけでなく、さらにその分子が細胞機能にどのように影響し、そしてその影響が生体組織に対してどのような効果を及ぼすか調べる必要がある。

SPM の一種である走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、単一細胞レベルでの測定に適しており、生体関連分子の定量的・経時的な測定が可能である。本研究では SECM を用いて細胞内

や細胞表面に局在するタンパク質の測定を行った。本章では、SECM の原理や生体試料測定への応用、本研究の目的について概説する。

1.2 走査型電気化学顕微鏡 (SECM, Scanning Electrochemical Microscopy)

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) とは、先端を尖らせた探針 (プローブ) を走査し、物質の表面状態を観察する顕微鏡を指す。代表的なものとして、走査型トンネル電流顕微鏡 (STM) や原子間力顕微鏡 (AFM) が知られており、原子レベルもしくはそれ以下のレベルで表面の凹凸状態を観察することができる。最初の SPM は、1982 年ゲルト・ビーニツヒらによって開発された STM である[1]。その後、1986 年に同じビーニツヒによって AFM が開発された他、様々な SPM が現在までに開発されている。

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、このような SPM の一種であり、プローブとして微小電極 (数 nm から数十 μm 程度) を利用し、それによる溶液中での電気化学測定を基本原理とする。微小電極による測定が 1980 年頃から行われるようになり、SPM の発展に伴い、SPM の技術を踏襲し、プローブとして微小電極を利用する SECM がバードらによって 1989 年に報告された[2, 3]。SECM では、試料表面での電気化学反応種を微小電極により検出することができる。SECM の利点を、SPM の側面と、電気化学測定の側面に分けると以下ようになる。1 つ目は、SPM の基本属性である高い空間分解能を有することであり、他の電気化学測定に比べ、空間分布の取得や局所測定が可能である。2 つ目の利点は、微小電極の利用に伴い、マクロ電極にはない特殊な電気化学特性を利用できる点である (後述)。SECM を用いることで、ガラス・金属・ポリマー・生体試料などの表面や、水銀・油などの液界面で起きる電気化学反応を検出でき、それらの特性を評価可能である。様々な生体反応解析をはじめ、表面加工、腐食研究など、幅広い分野にも利用されている[3]。

従来の SECM では、マイクロスケールの微小電極を用いてファラデー電流を計測する (ファラデー電流とは、電極表面での酸化還元反応に起因する電流のこと) ため、解像度は STM や AFM と比較して劣るが、細胞レベルでの活性や機能評価に対し、リアルタイムな測定が可能であるため大きな威力を発揮できる。さらに近年では、ナノ電極を用いた高解像な測定が可能となっており、また、多機能化も多く行われている。本項では、SECM について、その構成・原理・特徴を説明し、生体試料を中心に様々な利用法を紹介していく。

1.2.1 SECM の基本構成

SECM は、SPM 機器を基本としプローブとして微小電極を用いたため、微小電極の駆動系と電気化学計測系から構成されている。SECM は様々な研究者によって自家製されていることも多いためその詳細は異なることがあるが、簡単な例を Figure 1.1 に示す。微小電極駆動には圧電素子やステッピングモーターを用いる。微小電極自体を駆動する場合と、サンプルを乗せたステージを駆動させる場合がある。電気化学測定にはポテンシオスタットあるいはカレントアンプリファイヤーを用い、微小電極により検出した電流は増幅・変換され電圧シグナルとして PC に送られる。またこれら機器制御プログラムは、LabView や Visual Basic 等のソフトウェアを用いて作成できる。電気化学セルはファラデーゲージ内に用意され、微小電極、補助電極、参照電極を含む。微小電極を用いるため、補助電極を利用しない二電極式を適用することもできる。また、試料の振動の影響を排除した高精度な測定のためには、除振を必要とする。

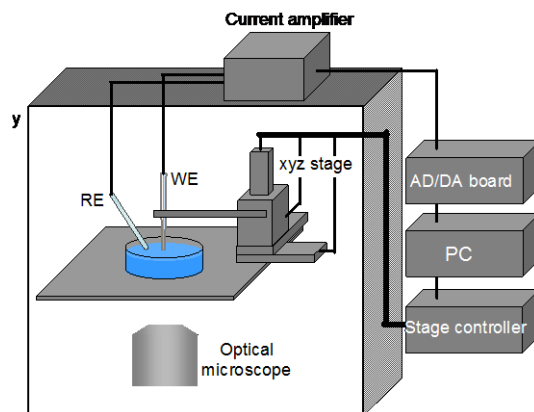


Figure 1.1 SECM system

またこれら機器制御プログラムは、LabView や Visual Basic 等のソフトウェアを用いて作成できる。電気化学セルはファラデーゲージ内に用意され、微小電極、補助電極、参照電極を含む。微小電極を用いるため、補助電極を利用しない二電極式を適用することもできる。また、試料の振動の影響を排除した高精度な測定のためには、除振を必要とする。

1.2.2 微小電極による測定

SECM では微小電極による電気化学測定を基本とする。微小電極とは、一般に電極の特性長さが拡散層の厚さと同様か、もしくはそれよりも小さい電極を指す。微小電極を利用することにより、以下のような利点を得られる[4,5]。

- ① 定常または準定常電流が得られるため反応を解析しやすい
- ② 充電電流の寄与が小さく測定精度が高い
- ③ 定常の条件下で反応速度が測定できる
- ④ 高速な化学反応を測定できる
- ⑤ 溶液抵抗の高い電解液中での測定が可能である
- ⑥ 局所的な測定が可能である

バルク溶液中にて、ディスク型微小電極を電気化学反応種が十分に酸化還元される電位に保持すると、拡散律速となり定常電流 ($i_{tip,\infty}$) (Figure 1.2、式 1) が得られる[4-7]。

$$I_{tip,\infty} = 4nFDCa \quad (\text{式 1})$$

(n : 反応電子数 [-], F : ファラデー定数=96500 [C/mol], D : 拡散係数 [cm^2/s], C : 電気化学反応種濃度 [mol/cm^3], a : 電極半径 [cm])

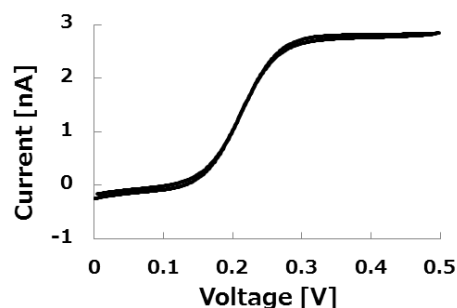


Figure 1.2 Cyclic voltammogram (CV) of microelectrode[8]. Pt microelectrode (radius = 10 μm), 1 mM FcCH_2OH in PBS. Scan rate is 20 mV s^{-1} .

この性質は、微小電極での特殊な拡散形態によるものである。電極での電子移動反応が十分に速い場合、電気化学反応種の拡散が反応速度を決める（拡散律速）。マクロ電極の場合、拡散層は電極に平行して形成され、従って物質は電極表面から垂直に線形拡散（1次元拡散）する（Figure 1.3 A）。一方で、電極を点とみなせる微小電極では、Figure 1.3 B に示すように球状拡散（3次元拡散）となる。球状拡散による電流は直ちに定常となるため、解析が容易となるだけでなく、溶液中で電極を走査しても定常状態での測定が可能となる。また、球状拡散では、マクロ電極との幾何的な面積比から計算される値より大きなファラデー電流が与えられる。しかし、電流測定の際にノイズとなりうる充電電流は、電極面積に比例するため電極を小さくすれば小さくなる。つまり、微小電極では、ファラデー電流の充電電流に対する割合が大きくなり、結果的に S/N 比の高い測定が可能となる。また、電流値は絶縁部分の厚さによっても多少変化し、絶縁部分の半径を r_g とし、 $RG=r_g/a$ を用いて議論される。例えば RG が 2 であるとき、式(1)の係数部分である『4』は『4.43』

となる。 RG が 10 以上の時、式(1)をそのまま利用可能である。解析や作製が容易であり、もっとも感度が高いために、ディスク型電極が多く利用されるが、コーン型や半球状の電極でも、似たような式で電流値を表すことができる。電極が小さくなれば、それだけ分析の局所性も向上する。また、微小電極を用いれば、高抵抗溶液における測定や高速な化学反応を追えるようになる。

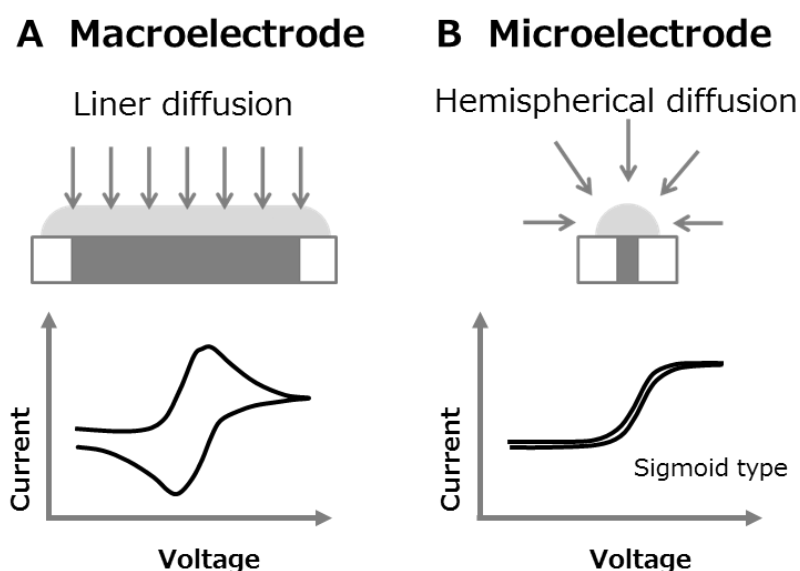


Figure 1.3 Diffusion layer of macroelectrode (A: liner diffusion) and microelectrode (B: hemispherical diffusion) [5].

1.2.3 フィードバック効果

電極が試料表面から十分に遠い場合、微小電極では式 1 に示した通り定常電流を示す。この状態では、電気化学反応種は球状拡散により電極へと供給される（Figure 1.4 A）。しかし、ガラスやプラスチックなどの絶縁性の試料に電極が近づくと（Figure 1.4 C）、電気化学反応種の拡散が絶縁部分によって阻害されるため、バルクに比べ電流値は減少する。電極が絶縁部分に近づけば近づくほど、電流値は減少することになる。この現象をネガティブフィードバックと呼ぶ。

一方で、金属などの導電性物質に電極を近づけていくと (Figure 1.4 B)、基板による拡散障害はあるものの、導電性物質上でレドックス種の再生が行われるため電流値が増加していく (レドックスサイクリング)。この現象をポジティブフィードバックという。なお、さらに近づけると、電子のトンネル効果により電流値は増大する。また、電極を基板に向かって走査 (z 方向) し、距離に対して電流値をプロットしたものをアプローチカーブと呼ぶ。

1.2.4 Generation-Collection モード

GC モードでは、試料表面で生成される電気化学反応種を微小電極により検出する (Figure 1.5)。電気化学反応種の濃度プロファイルのイメージングや、試料から放出される電気化学反応種の定量評価等に利用される。バルク溶液中に存在せず、試料にみから放出される物質を検出する場合、バックグラウンドを低減できるために高感度な分析が可能である。そのため、生体試料分析システムとして有用であり、様々な細胞の機能や活性評価に用いられている。典型的な GC モード SECM の応用として、基板上に固定化されたグルコースオキシダーゼ等の酵素活性評価や細胞活性評価が挙げられる (後述)。

1.2.5 プローブ走査法

SECM イメージングにおける電極走査法は、微小電極の絶対的な高さを一定に保持し走査する“高さ一定 (constant height) モード” (Figure 1.6A) と、電極と試料表面間の距離を一定に保持し走査する距離一定 (constant distance) モード (Figure 1.6B) に大別される。

高さ一定モードでは、微小電極を物理的に精密に配置し XY 方向に走査するため、特殊な電極やフィードバック制御を行う必要がなく比較的単純な方法である。そのため、SECM イメージングにはこのモードがよく採用されている。高さ一定モード SECM において、ネガティブ FB モードを利用すると、基板表面上のわずかな凹凸により電極-試料間距離が変化するため、観測される電流に変化が生じ形状イメージを得ることができる。しかし、電極先端をイメージング

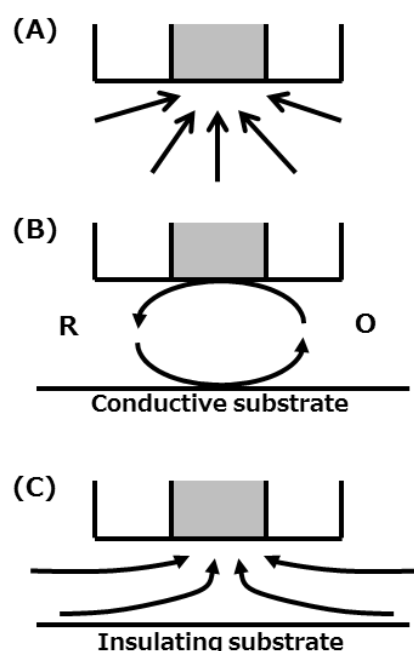


Figure 1.4 Basic principle of SECM[3].

A: hemispherical diffusion

B: positive feedback

C: negative feedback

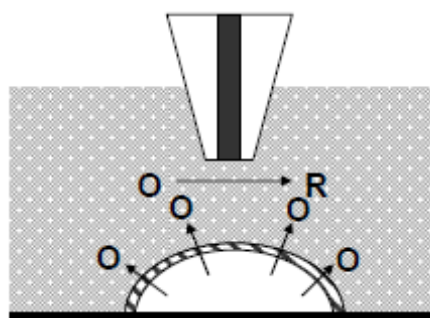


Figure 1.5 GC mode

範囲内における最高点以上の位置に設置しなければならないため、電極直径以上の凹凸情報を正確にイメージできない。また、イメージング範囲が広い場合には、試料のわずかな傾斜により、電極－試料間距離に勾配ができるため、イメージに電流勾配が生じてしまう。

一方、距離一定モードでは、微小電極が基板に接近した際に働く相互作用をフィードバックシグナルとして利用し、電極－試料間距離を一定に保ちながら微小電極を走査する。微小電極の Z 位置を制御しているピエゾ素子の伸縮情報を取得することにより、試料の形状情報を取得可能となる。さらに、微小電極により電流情報を取得することにより、表面の物理的形状および電気化学活性を同時に検出できる。距離一定モードを用いると、電極先端－試料表面距離を数十ナノメートル程度まで接近させることが可能であり、さらに、電気化学反応種の拡散距離を常時一定に保持できるため、極めて解像度およびコントラストの高いイメージングが可能となる。

ネガティブ FB モードを応用すると電流一定モードの距離制御システムを構築できる。電極に流れる電流量をフィードバックシグナルとして利用し、電流が一定に保持されるように電極の Z 位置を制御する。この手法を用いると、溶液中において非接触で高解像度な微小表面の形状測定が可能であり[9, 10]、一般的に使用される微小電極を用いて距離制御が可能である。しかし、この測定モードでは、電極反応に関与する電気化学反応種の濃度が一定であることが条件となる。また、電気化学シグナルを形状測定に利用するために、電気化学反応種の定量を同時に行うことは困難である。様々なフィードバックシグナルを利用し、他の測定機器と複合化した距離制御システムによる電極の距離制御方法が報告されており、次項で紹介する。

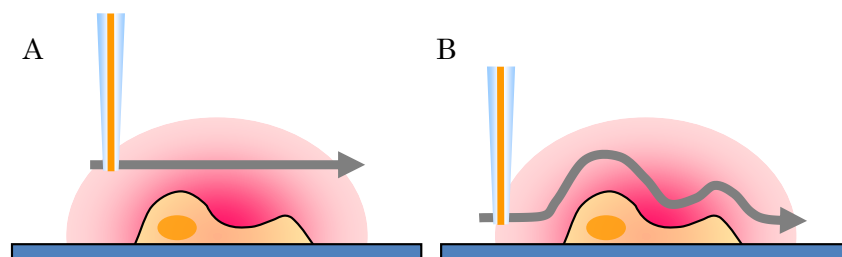


Figure 1.6 (A) constant height mode, (B) constant distance mode.

1.2.6 距離制御を可能とする SECM

電極－試料間距離を一定に保ったまま操作を行う距離一定モードを行うために、様々なフィードバックシグナルが利用されており、原子間力[11~15]、インピーダンス[9, 16-20]、シアフォース[21-30]、イオン電流[31-33]によって距離制御が可能な SECM が報告されている。

電気化学シグナルを用いた距離制御法として、ネガティブフィードバック、インピーダンスおよびイオン電流を用いたものがある。ネガティブフィードバック効果を利用した距離制御法については前項で紹介した。交流インピーダンスを利用した方法では、電極を基板に接近させた際に生じる電気化学インピーダンスの変化をフィードバックシグナルとしており、基本的に電流一定モードと同じ利点と欠点を有している。イオン電流を利用した方法では、走査型イオンコ

ンダクタンス顕微鏡 (SICM) の原理を用いる[34, 35]。SICM では、プローブとして先端に 50～150 nm ほどの開口の形成されたピペットを利用する。ピペット内に電解質と Ag/AgCl 線を挿入し、外部溶液中と電極との間に電圧を印加することにより、生じるイオン電流を測定する。プローブが試料に接近すると、(ネガティブフィードバック効果と同様に) イオンの拡散阻害によりイオン電流が減少するため、フィードバックシグナルとして利用することでプローブの距離制御が可能となる。SECM に用いる電極を加工することで、この SICM の機能を SECM へと複合化させることができ、距離制御可能な SECM となる。これまでにリング電極[32]やダブルバレル電極[33]が開発されている。

力学的相互作用を利用した距離制御では、AFM のカンチレバーを搭載した光てこ方式と、シアフォース (せん断応力) 制御方式がある。シアフォース制御方式では、光学システムと音叉型水晶振動子を用いた検出法がある。これらは力学的相互作用を距離制御に利用するため、形状測定を行いながら電気化学反応種の定量を行うことができる。

距離制御可能な SECM を利用する際の課題は、システムの構築と電極の作製である。他の測定方法を複合化するために、複雑なシステムを構築する必要がある。また、特殊な形状や複数の機能を有す微小電極が必要であり、そのような電極の作製や微細化は容易ではない。より簡便で再現性の高い電極作製方法の開発が必要である。

1.2.7 SECM アプリケーションについて[3]

SECM のアプリケーションは多岐にわたる。SECM は様々な生体測定に有用であり、多種の化学種を高解像にモニタリングできるため、生細胞イメージングをはじめ、酵素関連の研究、光合成や呼吸による酸素発生と消費、脂質二重膜での物質移動に関する研究、神経伝達物質の測定などにも利用されている。また、薄膜や触媒、電極材料などでの物質移動解析や表面反応解析にも利用される。電極を利用し局所領域での化学反応を誘起することが可能であるため、エッチングや堆積、ポリマー合成などの表面加工にも利用されている。また、微小電極の評価にも利用される。光学的観察や電子顕微鏡観察では、正確な電極形状や、面積の評価などが難しいことがある。特に、ナノメートルサイズの電極や、特殊な形状の電極では、評価により困難を伴う。ボルタモグラムやアプローチカーブを用いることでこれらを評価可能である。さらに、微小電極では、拡散による物質移動速度が速いため、高速反応を解析可能である。

もっとも基本的な利用法が SECM イメージングである。電極を走査することにより、2次元もしくは3次元の電流応答イメージングが可能であり、サンプルの形状測定や、化学反応のマッピングを行うことができ、とりわけ生体試料の測定に利用されている。

現在では、ナノ電極と距離制御可能 SECM の開発が精力的に進められており、生体関連試料から触媒・電極材料などに至るまでの電気化学反応および界面現象に関わる様々な分野において、さらなる精細測定が行われている。また、電極やシステムの開発・改良と同時並行で、適切な活用例の探索も必要である。

生体試料分析においては、他の分析技術にはない局所的・定量的・低侵襲・連続的に測定可能な SECM の性質により、生体反応をサブミクロンオーダーかつリアルタイムで定量分析できるため、生命現象解明への研究に対する多大な貢献が期待できる。また、触媒および電極材料表面の微細構造の局所評価においても SECM に関連する技術が利用されており、ナノメートルオーダーでの機能解析に利用可能である。SECM をはじめ、電気化学測定による多項目の物質の同時測定には困難を伴うことが多いが、他の分析技術との複合化やもしくは併用することによってその弱点を補うことができる。

1.3 SECM による生体試料測定

1.3.1 酵素活性測定

SECM によって測定可能な生体試料として最も重要なものの 1 つが酵素である。SECM は、局所領域に存在する酵素活性評価に極めて有効なツールである。様々な酵素の活性が SECM により測定されており（表 2、3）[3]、代表的なものとして、グルコースオキシダーゼ（GOx）、ジアフォラーゼ（Dp）、アルカリホスファターゼ（ALP）などが挙げられる。酵素活性測定の原理を Figure 1.7 に示した。

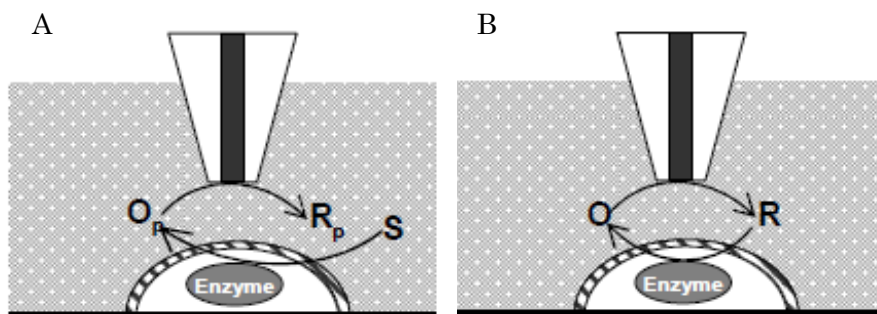


Figure 1.7 Detection principles of enzymes by GC mode (A) or FB mode (B).

最も単純な方法が、酵素の基質や生成物を GC モードにより測定する方法 (Figure 1.7 A) である。例えば、GOx がグルコースを酸化する際、溶液中の酸素を消費し過酸化水素が生成する。電極上で、過酸化水素[52]を検出することで酵素の検出が可能である。ALP の検出には基質として *p*-アミノフェニルホスフェイト (PAPP) 等が用いられる。PAPP は ALP により加水分解され、*p*-アミノフェノール (PAP) となる。生成物である PAP を電極上で酸化検出することにより、ALP を検出できる[56]。生成物を電極上で基質へと再生できる場合、レドックスサイクリングが誘起可能であり、ポジティブ FB モードによる測定が可能となる (Figure 1.7 B)。

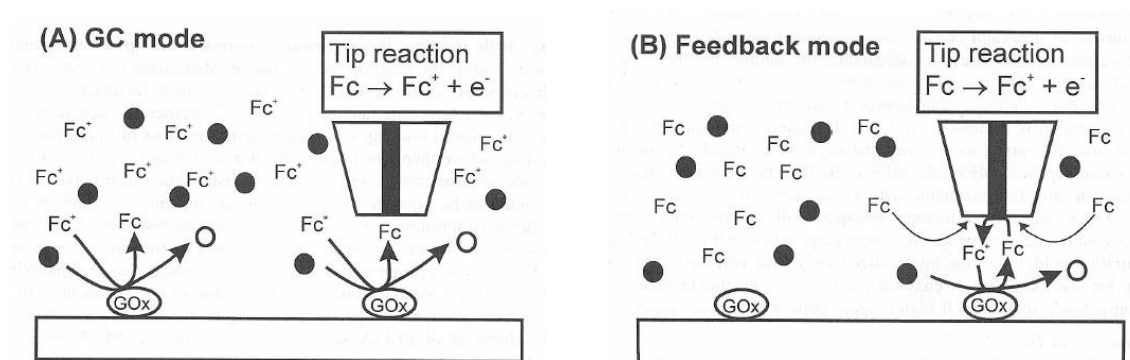


Figure 1.8 GOx detection methods by GC mode (A) and FB mode (B) [3].

次に、フェロセン誘導体などの電子伝達メディエーターを利用した方法がある[45-47]。GOxの場合について説明する。フェロセン誘導体 (Fc) を用いた GC モードと FB モードによる GOx 検出方法を Figure 1.8 にそれぞれ示した。グルコースが酸化される際、酸素の代わりに Fc が還元されることを利用する。GC モードでは Fc^+ を溶液中に多量に存在させておく。GOx により Fc^+ が還元され Fc が生成するため、電極上で Fc を酸化・検出すると、酵素近傍では Fc による酸化電流が大きくなる (Figure 1.8 A)。FB モードでは Fc を溶液中に存在させておく。電極上では常に Fc を酸化・検出する。GOx 近傍でのみ酸化された Fc が再生されたため、再度電極上での酸化・検出が可能となり、このようなレドックスサイクリングにより電流応答が増幅する (Figure 1.8 B)。GC モードでは、バルク溶液中には還元型の Fc が存在しないため、バックグラウンド電流を低く抑えることができるが、GOx により生成した還元型 Fc が拡散するため解像度は高くない。一方で FB モードでは、酵素近傍でのみ応答増幅が起こるために高解像な測定が可能だが、酵素活性が低い場合などの測定は難しくなる。このような酵素活性測定法は、後述する膜たんぱく質測定や ELISA、レポーター遺伝子アッセイにも利用されている。

NADH の酸化酵素であるジアフォラーゼの酵素活性が、ポジティブ FB モードを用いてイメージングされている[49]。適切な電子伝達還元型メディエーターおよび NADH 存在下において、電極上でメディエーターを酸化すると、ジアフォラーゼにより NADH が酸化されるとともに酸化型メディエーターが還元される。ジアフォラーゼにより生成された還元型メディエーターは再度電極により酸化されるため、電極-酵素間においてメディエーターのレドックスサイクリングが生じ、電流応答は増幅される。また、ポジティブ FB モードによって、同一基板上にパターンされた西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) [50] の評価も行われている。

β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) やアルカリホスファターゼ (ALP) の活性評価は、GC モードにより可能である。 β -Gal の基質である PAPG は、基板表面に固定された β -Gal により加水分解され、PAP が生成される。電極上で PAP を酸化検出することにより β -Gal の活性評価ができる。GC モードでは、メディエーターのレドックスサイクリングによる電流増幅が系内に存在しないが、検出する電気化学反応種が元から存在しないために、バックグラウンド電流を小さくすることができる。

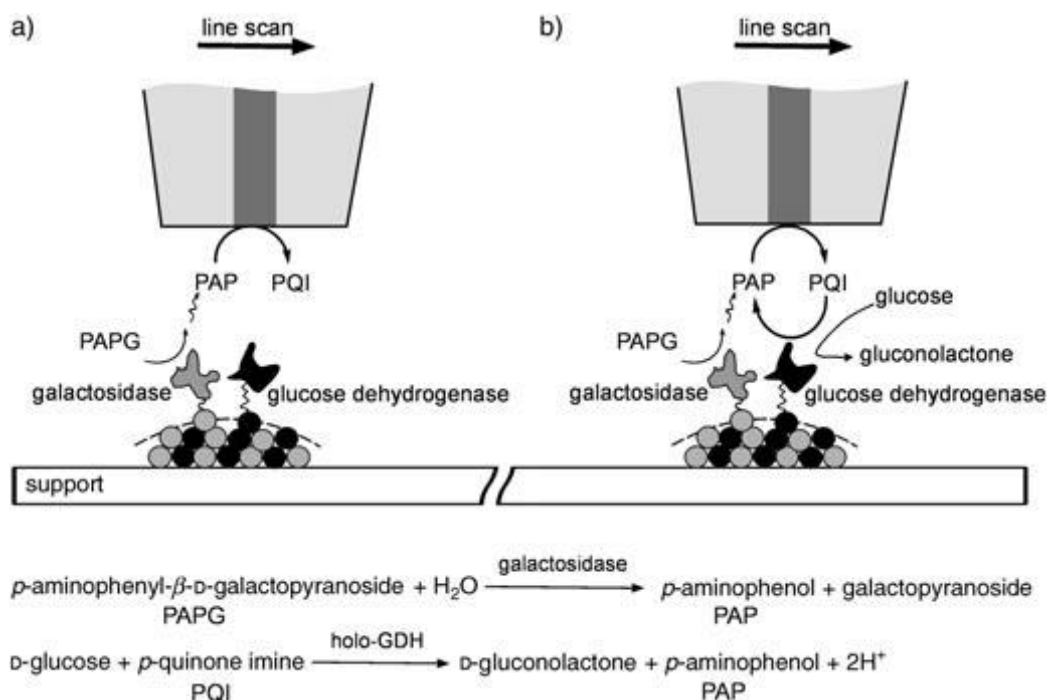


Figure 1.9 Detection by GC mode (A) or both GC mode and FB mode.

Wittstok らは、2 種類の酵素が固定化されたマイクロビーズを混合して固定化し、FB モードと GC モードを融合させた高感度測定システムを報告している (Figure 1.9) [59, 60]。β-ガラクトシダーゼおよびグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) 利用している。両酵素が固定化された基板を、グルコースを含む溶液中に浸漬し PAPG を添加する。p-アミノフェニル-β-D-ガラクトピラノシド (PAPG) は β-Gal により加水分解され PAP が生成する。PAP は電極上で酸化され p-キノンイミン (PQI) となる (Figure 1.9 A)。PQI は GDH により還元されことで PAP に再生され、PAP を再度電極上で酸化・検出することできる (Figure 1.9 B)。このようなレドックスサイクリングにより、GC モードのみの場合に比べて 1.8 倍の応答増幅が観測されている。

抗原抗体反応と酵素を利用した生体試料測定が行われている [79-82]。細胞膜を透過可能なメディエーターを利用することで、細胞内の酵素活性評価も行われている [61]。また、胚性幹細胞に過剰発現する ALP を利用した、分化状態評価も行われている [53]。特定の糖鎖に特異的に結合可能なレクチンによる糖鎖検出も行われている [83]。レポーター遺伝子を用いて β-GAL や ALP を発現させ、酵素反応を検出することにより遺伝子発現を分析可能である [84-86]。

表 2 Measurements of enzymatic activities by FB mode.

酵素名	基質	メディエーター	参考文献
グルコースオキシダーゼ	グルコース	<ul style="list-style-type: none"> • FcCOOH • (CH₃)₂NCH₂Fc • K₄[Fe(CN)₆] • hydroquinone • [Os fpy(bpy)₂ Cl]Cl 	45-47 45 45,48 48 46

NADPH-シトクロム C レダクターゼ	NADH	TMPD	48
ジアフォラーゼ	NADH	FcCH ₂ OH	49
西洋ワサビペルオキシダーゼ	H ₂ O ₂	(FcCH ₂ OH) ⁺	50
硝酸還元酵素	NO ₃ ⁻	MV ²⁺	51
Fc: ferrocene fpy: formylpyridine, bpy: bipyridine TMPD: N,N,N',N',-tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine MV ²⁺ : methylviologen			

表 3 Measurements of enzymatic activities by GC mode.

酵素名	電極上での検出物質	参考文献
グルコースオキシダーゼ	H ₂ O ₂	18,52
ウレアーゼ	H ⁺	54
アルカリホスファターゼ	PAPP	56
NAD ⁺ 依存性アルコールデヒドロゲナーゼ	H ⁺	57
NADPH 依存性オキシダーゼ	O ₂ ⁻	58
PAPP: <i>p</i> -aminophenyl phosphate		

1.3.2 呼吸活性と光合成活性の測定

細胞の呼吸活性が、細胞の代謝活性の指標となりうるため、生細胞周辺における酸素濃度測定が今まで盛んに行われてきている。単一細胞レベルでの酸素消費量測定が 1998 年に既に報告されており、SECM による光合成の定量的解析とイメージングも行われている[62 63]。光照射化において単一植物細胞から生成される酸素を微小電極で還元し、電極を走査すると光合成活性をイメージとしてとらえることが可能となる。光照射がない場合は、呼吸により酸素が消費されるため細胞近傍において酸素還元電流が減少する。単一細胞近傍の局所酸素濃度プロファイル进行评估することにより、単一細胞の呼吸による酸素消費速度および光合成による酸素生成速度を定量的に調査できる (Figure 1.11)。また SECM を用いる細胞活性評価には、非侵襲性に大きな

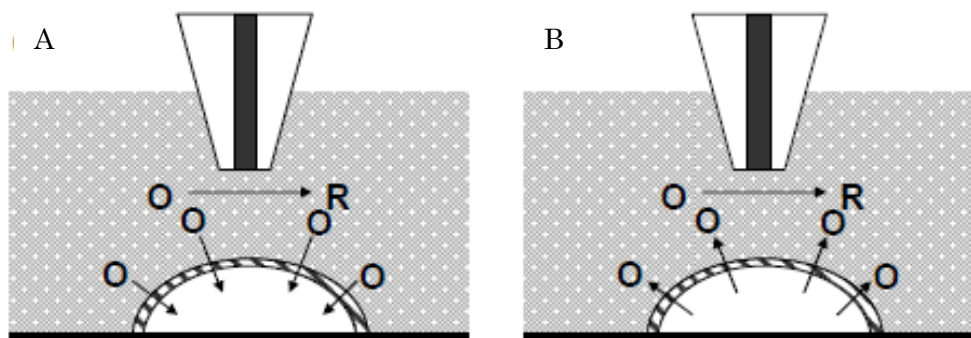


Figure 1.10 A: O₂ consumption by respiration, B: O₂ generation by photosynthesis

利点がある。蛍光プローブ法と比較して細胞に与える影響は極めて少ないため測定後の細胞を利用可能である。

酸素還元電流を指標に SECM を用いたがん細胞や哺乳動物細胞の呼吸活性イメージングが行われている[64, 65]。薬剤に曝された細胞の呼吸活性を調査することにより、薬剤の作動メカニズムに関する情報を得ることができる。SECM による細胞活性評価法は、胚の品質評価システムへも応用されている[66, 67]。発生効率の向上を目指して高効率・迅速な高品質胚の測定が行われており、畜産業界における育種改良の促進およびヒトの不妊治療への応用が期待されている。

SECM を用いて光合成および呼吸電子伝達鎖から電子受容体への電子移動について研究されている。細胞膜透過性の高い疎水性メディエーターであるベンゾキノン¹は、光合成および呼吸電子伝達鎖から電子を受容しヒドロキノンへと変換されることが分かった。Mirkin らのグループは、個々の細胞の電子移動活性を調査し、正常細胞と悪性細胞の判別に応用している[68]。細胞培養液中に TMPD を添加し、細胞近傍に近接させた微小電極を用いて TMPD²⁺に酸化した。電極表面で生成された TMPD²⁺は細胞膜を透過し呼吸電子伝達鎖から電子を受容して TMPD⁺へと還元される。この還元された TMPD⁺を電極で検出することにより個々の細胞の電子移動活性を評価している。悪性細胞は、正常細胞と比較して電子移動活性が高く、疎水性メディエーターの再生反応が速いため酸化電流の増加量が多い。また、細胞内シトクロム C の電子移動活性の評価がフェロセンメタノールをメディエーターに用いて行われている[69]。

Schuhmann らは、シアフォースを利用した距離制御可能な SECM を用い、単一細胞の酸素消費量の精密評価を行っている[70]。酸素は膜透過性が高く、細胞周辺で酸素が大幅に消費されて濃度が大きく減少すれば、濃度勾配に従って細胞内の酸素が吸い出されることになる。酸素検出の際に電極でも酸素を消費するため、電極での酸素消費が細胞による消費に比べて同等か大きい場合、細胞内酸素を吸い出してしまい、本来の酸素消費量を精密に測定できない。電極での酸素消費を減らす方法は3つ考えられ、①電極に印加する電圧を小さくする、②電極サイズを小さくする、③電圧印加時間を短くすることである。Schuhmann らは、電圧印加をパルス状にして精密評価に成功した。

1.3.3 膜透過性評価

電極での電子移動反応が十分に速い場合、拡散律速となり電気化学反応種の拡散による物質移動が反応速度を決める。言い換えれば、電極反応が、電極付近での局所的な物質移動に強く依存することを表しており、SECM を用いることで、局所的な物質移動を測定することができる。本項では生体試料に関わる研究を中心に簡単に述べる。

メディエーターの脂質二重膜透過性が SECM を用いて測定されている[71]。 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ とフェロセンカルボン酸を含む溶液を用いて、それぞれの還元電流と酸化電流の測定を行うと、脂質二重膜に電極が近づくにつれて $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ の還元電流値が減少する (Figure 1.12)。 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ は膜透過性が低く、脂質二重膜による拡散障害が起こるため、ネガティブフィードバック効果が表れる。一方フェロセンカルボン酸の酸化電流は、pH が高いときは同様の傾向がみられるが、pH を低くすると電極を膜に近づけてもほとんど変化しなくなる。これは、pH によってフェロセンカルボン酸の膜透過性が変化することを意味する。また藻類のプロトプラストを用いて、様々な種類のメディエーターの生体膜透過性も評価されている[72]。さらに Amemiya らは、カエル卵母細胞の核膜孔における物質透過性を、距離制御 SECM による精密測定とシミュレーションを用いることで評価し、核膜孔における物質輸送メカニズムの研究に貢献している[73, 74]。

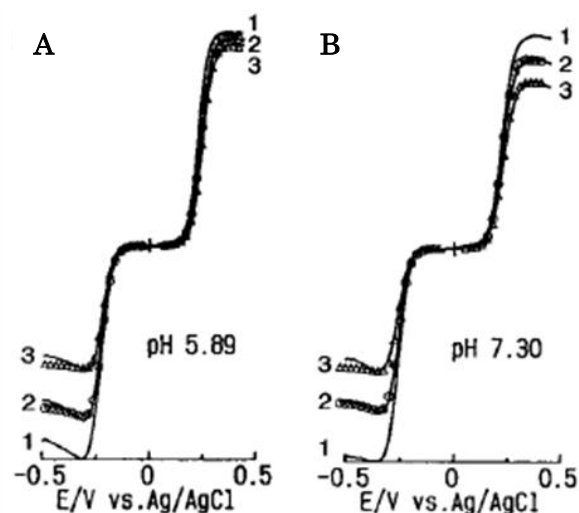


Figure 1.11 Relationship between CVs and membrane-electrode distances. [71]

1: bulk, 2: 51 μm , 3: 27 μm , A: pH 5.89, B: pH 7.30

1.3.4 神経伝達物質測定

SECM は、神経細胞を用いて神経伝達機能の研究に利用されている[9, 22, 75-78]。カーボンファイバー製の微小電極を用いた、単一神経細胞からの神経伝達物質の、高解像測定が行われている。エキソサイトシスにより個々の神経細胞から放出されるドーパミン、アドレナリンおよびノルアドレナリン等のカテコールアミン類の神経伝達物質は、電気化学的に活性であり、細胞表面近傍に設置された微小電極を用いてアンペロメトリーおよび高速掃引サイクリックボルタンメトリー (FSCV) によりリアルタイムで計測できる[9, 22]。小胞から放出される神経伝達物質の量は極めて少なく、細胞外に放出されると、拡散あるいは再び細胞に取り込まれる。この測定には高感度で高い時間分解能を有する計測が必要である。アンペロメトリーはミリ秒レベルの高い時間分解能があるが、検出されている物質の同定に制限がある。一方、FSCV は検出された分子の同定が可能だが、時間分解能においてアンペロメトリーに劣る。近年では、距離一定モード SECM を利用して電極を細胞の極近傍に設置し高感度化を達成している[9, 22, 76, 77]。しかし、電気化学的に直接検出が可能な神経伝達物質の種類には制限があり、グルタミン酸やアセチルコリン等の検出には酵素修飾マイクロ電極を用いる必要がある。

1.3.5 形状測定

細胞内あるいは細胞間の化学反応に関与する分子の中で、電気化学的に検出が可能な分子には限りがある。そこで細胞のイメージングには、外部溶液中に介在させたメディエーターを用いる。もしくは、原子間力やシアフォースなどの他のフィードバックシグナルを用いた距離制御により形状測定が可能となる。

高さ一定モードによる形状測定では、ネガティブフィードバック効果を利用して行われる。細胞膜透過性の低いメディエーターを用いると、細胞の高さに対応してネガティブフィードバック効果により電流応答が増減するため形状イメージング可能である。親水性メディエーターである $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ を用いて PC12 細胞の形状イメージングが行われた[78]。

距離一定モードによる形状測定も行われている。Wipf らは、電流をフィードバックシグナルとして利用して距離を一定に保つ SECM および、インピーダンスをフィードバックシグナルとして利用して距離を一定に保つ SECM により、PC12 細胞の高解像度イメージングを達成している[9]。Takahashi らは、シアフォースやイオン電流を利用したフィードバック制御による距離一定モードを用いて、PC12 細胞のイメージングを行っている[21, 33]。また Takahashi らは、ネガティブフィードバック効果を利用した形状測定と電気化学反応種の定量測定を、電圧をスイッチングし別々に測定することで可能とした[77]。

1.3.6 その他 生細胞イメージング、代謝物測定、分子輸送、パターンニング

その他にも、様々な利用がされている。膜透過性を有すメディエーターの代謝[87, 88]や、活性酸素種 (ROS) と活性窒素種 (RNS) の単一細胞レベルでの同時測定[89-91]が報告されている。合成多孔質膜や生体膜など、様々な膜での分子輸送の評価にも利用されている[92-101]。単一微細孔を透過する化学分子の絶対的な量を直接的に検出可能であり、またフィックの法則から分子の流束を計算し、サブミクロンオーダーでイメージングすることができる。微小電極を用いて局所的に反応を誘起させることにより、表面上に微小なパターンを作製することも可能である。様々な物質上への、銀、金、銅、パラジウム[102-104, 111, 114-116]、有機物[110, 115, 121, 122]、生体試料[49, 52, 123]、導電性ポリマー[46, 106-108]、蛍光分子[109]などのパターンニングが報告されている。銀・金・銅などのエッチング[103-105] や、半導体表面の高解像エッチング[117-119]、無機結晶の生成と溶解を利用したパターンニングも行われている[116, 118, 120]。固液界面における反応プロセスの解析にも SECM は有用であり、水和した金属酸化物の吸脱着[124]、イオン結晶の溶解[120, 125~130]、腐食現象[113, 131-139]などの、物質の相移動現象に関わる研究に利用されている。鉄鉍の(100)面への Ag イオンの吸着など、不可逆的な吸着の研究にも利用されている[140]。

1.4 本研究の目的

本章で述べたように、非常に多岐にわたる範囲に走査型電気化学顕微鏡 (SECM) が用いられてきた。特に生体試料分析においては、他の分析技術にはない単一細胞レベル・低侵襲・定量的・経時的に測定可能な SECM の性質により、生体反応をサブミクロンオーダーかつリアルタイムで定量分析できるため、生命現象解明への研究に対する多大な貢献が期待できる。本研究では、SECM により細胞内および細胞膜タンパク質の単一細胞レベル・経時的な定量評価を目指した。

第 3 章 二種のメディエーターを用いた単一細胞内酵素活性モニタリング

細胞の代謝活性の指標と成り得る細胞内酵素活性を、単一細胞レベル・定量的・経時的に評価することを目的とした。細胞膜透過性を有すメディエーターと、膜透過性を持たないメディエーターを利用し、細胞内酵素活性を評価した。得られた電流値から、細胞内での代謝によって細胞外へと放出されるメディエーター量を定量的に算出した。またメディエーターによる細胞への影響を調査し、最適濃度条件を採用することで長時間測定を可能とした。

第 4 章 SECM による単一 ES 細胞の分化状態評価

ES 細胞の分化状態評価は細胞溶解や固定化が必要であり、評価後も細胞を利用可能な低侵襲な分化評価法が求められている。ES 細胞の低侵襲な分化状態評価を目的とし、ES 細胞で過剰発現し分化とともに発現量が減少する酵素の活性を SECM により単一細胞レベルで評価した。

第 5 章 SECM による単一細胞レベル膜タンパク質検出

SECM による細胞の膜タンパク質の定量評価法の確立を目的とした。癌の増殖と関連の深い上皮成長因子レセプター(EGFR)を酵素修飾することで、定量的測定を行った。染色時の抗体濃度の最適化や、EGFR 発現量の違いを電流値から評価した。

第 6 章 膜タンパク質内在化のリアルタイムモニタリング

膜タンパク質内在化の単一細胞レベル・定量的・経時的評価を目的とし、5 章で確立した手法により EGFR 内在化の測定を行った。

参考文献

- 1) G. Binning *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **49**, 57 (1982)
- 2) R. C. Engstrom *et al.*, *Anal. Chem.*, **58**, 844 (1986)
- 3) A. J. Bard *et al.*, "Scanning Electrochemical microscopy", Marcel Dekker, Inc., New York (2001)
- 4) 青木幸一ほか, 微小電極を用いる電気化学測定法, 電子情報通信学会 (1998)
- 5) 電気化学測定マニュアル 実践編, 電気化学会 (2002)
- 6) J. L. Amphlett *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 4873 (2001)
- 7) Y. Shao *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 9915 (1998)
- 8) Y. Shao *et al.*, *Anal. Chem.*, **69**, 1627 (1997)
- 9) R. T. Kurulugama *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 1111 (2005)
- 10) R. Guckenberger *et al.*, *Science*, **266**, 1538 (1994)
- 11) A. Kueng *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3419 (2005)
- 12) Y. Hirata *et al.*, *Bioelectrochemistry*, **63**, 217 (2004)
- 13) D. P. Burt *et al.*, *Nano. Lett.*, **5**, 609 (2005)
- 14) P. S. Dobson *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 3909 (2006)
- 15) R. J. Fasching *et al.*, *Sens. Actuators, B*, **108**, 964 (2005)
- 16) D. M. Osbourn *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 6999 (2005)
- 17) B. R. Horrocks *et al.*, *Anal. Chem.*, **65**, 3605 (1993)
- 18) A. Mario *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 4873 (2001)
- 19) M. Etienne *et al.*, *Electrochem. Commun.*, **6**, 288 (2004)
- 20) C. Gabrielli *et al.*, *Phys. Chem. B*, **108**, 11620 (2004)
- 21) Y. Takahashi *et al.*, *Langmuir*, **22**, 10229 (2006)
- 22) A. Hengstenberg *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 905 (2001)
- 23) L. P. Bauermann *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 4003 (2004)
- 24) S. Isik *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7451 (2006)
- 25) Y. Lee *et al.*, *Anal. Chem.*, **74**, 3634 (2002)
- 26) D. Oyamatsu *et al.*, *Bioelectrochemistry*, **60**, 115 (2003)
- 27) H. Yamada *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 1785 (2005)
- 28) M. Etienne *et al.*, *Anal. Chem.*, **78**, 7317 (2006)
- 29) M. Büchler *et al.*, *Electrochem. Solid-State Lett.*, **3**, 35 (2000)
- 30) M. F. Garay *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 4028 (2004)
- 31) D. J. Comstock *et al.*, *Anal. Chem.*, **82**, 1240 (2010)
- 32) Y. Takahashi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10118 (2010)
- 33) Y. Takahashi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 9638 (2011)
- 34) Y. E. Korchev *et al.*, *Biophys. J.*, **73**, 653 (1997)
- 35) P. Noval *et al.*, *Nature Methods*, **6**, 279 (2009)

- 36) P. M. Penner *et al.*, *Science*, **250**, 1118 (1990)
- 37) M. V. Mirkin *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **328**, 47 (1992)
- 38) J. L. Coners *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 4441 (2000)
- 39) K. Maruyama *et al.*, *Anal. Chem.*, **78**, 1904 (2006)
- 40) B. Zhang *et al.*, *Anal. Chem.*, **76**, 6229 (2004)
- 41) J. J. Watkins *et al.*, *Anal. Chem.*, **75**, 3962 (2003)
- 42) A. Kucernak *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9396 (2002)
- 43) D. H. Woo *et al.*, *Anal. Chem.*, **75**, 6732 (2003)
- 44) N. J. Gray *et al.*, *Analyst*, **125**, 889 (2000)
- 45) D. T. Pierce *et al.*, *Anal. Chem.*, **64**, 1795 (1992)
- 46) C. Kranz *et al.*, *Electrochim. Acta.*, **42**, 3105 (1997)
- 47) C. A. Wijayawardhana *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 333 (2000)
- 48) D. T. Pierce *et al.*, *Anal. Chem.*, **65**, 3598 (1993)
- 49) H. Shiku *et al.*, *Anal. Chem.*, **67**, 312 (1995)
- 50) H. Shiku *et al.*, *Anal. Chem.*, **68**, 1276 (1996)
- 51) J. Zaumseil *et al.*, *Anal. Chem.*, **367**, 352 (2000)
- 52) G. Wittstock *et al.*, *Anal. Chem.*, **69**, 5059 (1997)
- 53) Y. Matsumae *et al.*, *Chem. Commun.*, **49**, 6498 (2013)
- 54) B. R. Horrocks *et al.*, *Anal. Chem.*, **65**, 1213 (1993)
- 55) B. R. Horrocks *et al.*, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 1115 (1998)
- 56) G. Wittstock *et al.*, *Anal. Chem.*, **67**, 3578 (1995)
- 57) Y. N. Antoneko *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 225 (1996)
- 58) C. E. M. Berger *et al.*, *J. Endocrin.*, **158**, 311 (1998)
- 59) C. Zhao *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 4170 (2004)
- 60) F. M. Boldt *et al.*, *Anal. Chem.*, **76**, 3473 (2004)
- 61) K. Nagamine *et al.*, *Electroanal.*, **23**, 1168 (2011)
- 62) T. Yasukawa *et al.*, *Chem. Lett.*, **8**, 767 (1998)
- 63) T. Yasukawa *et al.*, *Anal. Chem.*, **71**, 4637 (1999)
- 64) T. Kaya *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 1379 (2003)
- 65) M. Nishizawa *et al.*, *Langmuir*, **18**, 3645 (2002)
- 66) H. Shiku *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 3751 (2001)
- 67) T. Saito *et al.*, *Analyst*, **131**, 1006 (2006)
- 68) W. Feng *et al.*, *Anal. Chem.*, **75**, 4148 (2003)
- 69) A. J. Bard *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 461 (2006)
- 70) M. Nebel *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 1 (2013)
- 71) H. Yamada *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1330 (1991)
- 72) T. Yasukawa *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1369**, 152 (1998)

- 73) J. Guo *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 2147 (2005)
- 74) J. Kim *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 2321 (2013)
- 75) T. K. Chen *et al.*, *Anal. Chem.*, **66**, 3031 (1994)
- 76) Y. Takahashi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 9638 (2011)
- 77) Y. Takahashi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 1154 (2012)
- 78) J. M. Liebetrau *et al.*, *Anal. Chem.*, **75**, 563 (2003)
- 79) Y. Takahashi *et al.*, *Anal. Chem.*, **81**, 2785 (2009)
- 80) Y. Takahashi *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 16569 (2011)
- 81) S. Kasai *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 5761 (2000)
- 82) H. Shiku *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **438**, 1 (1997)
- 83) Y. Xue *et al.*, *Anal. Chem.*, **82**, 7112 (2010)
- 84) T. Kaya *et al.*, *Chem. Commun.*, 248 (2004)
- 85) N. Matsui *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1202 (2006)
- 86) Y. S. Torisawa *et al.*, *Anal. Chem.*, **78**, 7625 (2006)
- 87) J. Mauzeroll *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 7862 (2004)
- 88) J. Mauzeroll *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 17582 (2004)
- 89) C. Amatore *et al.*, *ChemBioChem*, **7**, 653 (2006)
- 90) C. Amatore *et al.*, *ChemBioChem*, **9**, 1472 (2008)
- 91) C. Amatore *et al.*, *Anal. Chem.*, **82**, 1411 (2010)
- 92) E. R. Scott *et al.*, *Anal. Chem.*, **65**, 1537 (1993)
- 93) E. R. Scott *et al.*, *J. Membrane*, **58**, 71 (1991)
- 94) S. Nagues *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **408**, 125 (1996)
- 95) B. D. Bath *et al.*, *Anal. Chem.*, **70**, 1047 (1998)
- 96) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **91**, 1407 (1995)
- 97) J. V. Macpherson *et al.*, *Langmuir*, **11**, 3959 (1995)
- 98) J. V. Macpherson *et al.*, *Biophys. J.*, **73**, 2771 (1997)
- 99) E. R. Scott *et al.*, *Solid State Ion.*, **53**, 176 (1992)
- 100) E. R. Scott *et al.*, *Pharm. Res.*, **10**, 1699 (1993)
- 101) E. R. Scott *et al.*, *J. Invest. Derm.*, **104**, 142 (1995)
- 102) D. H. Craston *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **135**, 785 (1988)
- 103) O. E. Hüsser *et al.*, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **6**, 1873 (1988)
- 104) O. E. Hüsser *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 3222 (1989)
- 105) F. Forouzan *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 10876 (1997)
- 106) Y. M. Wu *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 885 (1989)
- 107) C. Kranz *et al.*, *Adv. Mater.*, **7**, 38 (1995)
- 108) C. Kranz *et al.*, *Adv. Mater.*, **7**, 568 (1995)
- 109) H. Sugimura *et al.*, *Electroanal. Chem.*, **361**, 57 (1993)

- 110) G. Wittstock *et al.*, *Electroanal.*, **9**, 746 (1997)
- 111) D. Mandler *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **137**, 1079 (1990)
- 112) D. Mandler *et al.*, *J. Electrochem. Chem.*, **136**, 3134 (1989)
- 113) J. W. Still *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **144**, 2657 (1997)
- 114) S. Meltzer *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **142**, L82 (1995)
- 115) K. Borgwarth *et al.*, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **99**, 1421 (1995)
- 116) I. Shohat *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **141**, 995 (1994)
- 117) D. Mandler *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **137**, 2468 (1990)
- 118) I. Turyan *et al.*, *Adv. Mater.*, **12**, 330 (2000)
- 119) S. Meltzer *et al.*, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **91**, 1019 (1995)
- 120) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6445 (1996)
- 121) K. Borgwarth *et al.*, *Adv. Mater.*, **11**, 1221 (1999)
- 122) J. Zhou *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **144**, 1202 (1997)
- 123) H. Shiku *et al.*, *Langmuir*, **13**, 7239 (1997)
- 124) P. R. Unwin *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **96**, 5035 (1992)
- 125) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**, 1883 (1993)
- 126) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **98**, 1704 (1994)
- 127) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **98**, 11764 (1994)
- 128) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **99**, 3338 (1995)
- 129) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **99**, 14824 (1995)
- 130) J. V. Macpherson *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **100**, 19475 (1996)
- 131) N. Casillas *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **140**, L142 (1993)
- 132) N. Casillas *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **141**, 636 (1994)
- 133) L. F. Garfias-Mesias *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **145**, 2005 (1998)
- 134) Y. Zhu *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **144**, L43 (1997)
- 135) D. E. Williams *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **145**, 2664 (1998)
- 136) D. O. Wipf *et al.*, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **93**, 251 (1994)
- 137) N. Casillas *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **142**, L16 (1995)
- 138) P. James *et al.*, *J. Electrochem. Soc.*, **143**, 3853 (1996)
- 139) J. L. Luo *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **326**, 51 (1992)
- 140) P. R. Unwin *et al.*, Abstracts of the 193rd Meeting of The Electrochemical Society, no. **980** (1998)

第 2 章 実験

2.1 はじめに

本章では、本研究で使用した電極の作製方法、電気化学測定装置、細胞とその操作方法など、全ての章で共通した実験操作について述べる。各章でのみ行う実験方法は適時記載する。

2.2 電極の作製

以下に、本研究で使用したマイクロ電極と参照電極の作製法について述べる。

2.2.1 マイクロ電極の作製

本研究では、直径 20 μm のディスク型 Pt マイクロ電極 (RG = 2) を作製し、実験に用いた。また 6 章ではカーボンファイバーによる電極作製した。以下に Pt ディスク型マイクロ電極の作製方法を示す (Figure 2.1)。

- ① 外径 1.65 mm, 内径 1.1 mm の低融点ガラス管 (PG10165-4, World Precision Instrument) の先端部を、キャピラリーブラー (PE-21, Narishige) で細尖化する。
- ② Pt 線 (直径 20 μm , 田中貴金属) を長さ約 10 mm に切り出し、長さ約 10 cm の Cu リード線にスポット溶接機 (ME-35A, Miyachi) で溶接する。
- ③ ガラスキャピラリー内に Pt 線を注意深く挿入し、キャピラリー先端に Pt 線が到達していることを光学顕微鏡あるいは目視により確認する。
- ④ キャピラリー後部のガラス管開口部分に銅リード線を熱収縮チューブにより固定する。
- ⑤ マイクロフォージ (MF-77, Narishige) を用いて、キャピラリー先端部を螺旋状電熱線の中心部に挿入し、Pt とキャピラリーの隙間の熱封止を行う。

- ⑥ キャピラリー先端部をダイヤモンドグラインダー（EG-6, number 5000, Narishige）で削り、Pt 線断面を露出させる。（ガラスの削りカスが電極先端に付着している場合は、0.01 M の NaOH 水溶液中にゆっくり浸し、ガラス削りカスを溶かす。その後、純水中で十分洗浄し乾燥させる。）

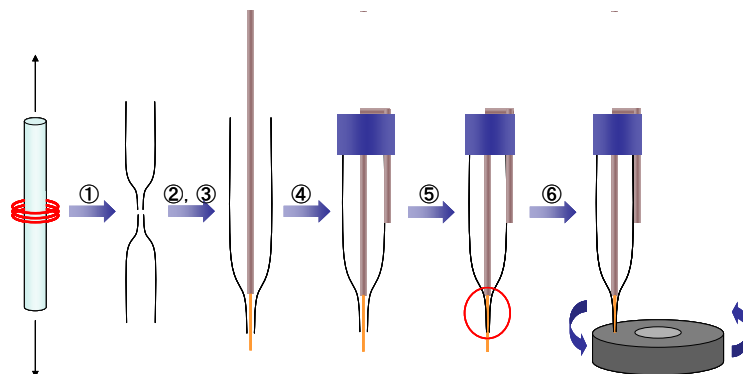


Figure 2.1 Fabrication procedure of Pt disk-type microelectrode.

微小電極では、レドックス種の電子移動が速く、酸化還元反応に十分な電位を印加した場合、レドックス種の拡散による供給が律速段階となる。この時の定常電流値 i_{bulk} は以下の式で表すことができる。

$$I_{tip,\infty} = 4nFDCa \quad (\text{式 1})$$

ここで i_{bulk} は定常電流値[A]、 n は反応電子数、 F はファラデー定数[C/mol]、 D はレドックス種の拡散係数[cm²/sec]、 C はレドックス種の濃度[mol/cm³]、 a は電極半径[cm]である。

作製した電極の電気化学的評価は FcCH_2OH や $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中で行った。その結果の例を Figure 2.2 に示す。電流電圧曲線はマイクロ電極特有のシグモイド型となった。本研究で作製した Pt 電極は RG がおよそ 2 であった。そこで上式の係数を『4.43』とし、観測された定常電流値を代入し電極半径を算出したところ、電極半径は約 10 μm と算出できた。なお、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の拡散定数は $6.5 \times 10^{-6} [\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}]$ とした。

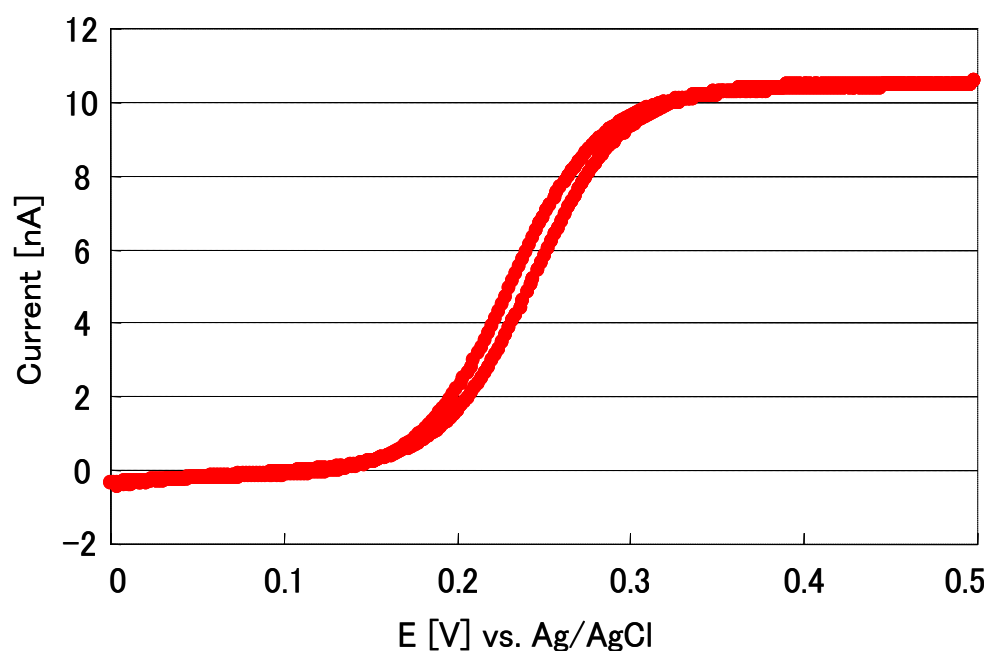


Figure 2.2 Cyclic voltammograms by a fabricated Pt disk-type microelectrode (radius = 10 μm). Measurement solution contains 4 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. The scan rate was 20 mV vs. Ag/AgCl.

2.2.2 参照電極の作製

本研究では、Ag/AgCl 参照電極を作製し実験に用いた。以下に作製方法を示す。

- ① 直径 300 μm の Ag 線を長さ約 30 mm、直径 300 μm の Pt 線を長さ約 10 mm 切り出した。
- ② 外径 3 mm、内径 2 mm のガラス管を長さ約 10 cm に切断し、切り出した Pt 線を挿入した状態でバーナーにより熱封止した。
- ③ 熱封止したガラス管を飽和 KCl 溶液で満たし、ガラス管内に KCl、AgCl 粉末を順に入れ先端に蓄積させた。
- ④ 切り出した Ag 線の半分程度を 0.1 M HCl もしくは KCl 溶液中に入れ、アノード分極させて AgCl を析出させた (Ag/AgCl 線)。
- ⑤ Ag/AgCl 線の AgCl 部分をガラス管に入れ、外れないようにパラフィルムで固定した。
- ⑥ 作製した Ag/AgCl 参照電極は、先端を飽和 KCl 溶液に浸した状態で保管した。

2.3 走査型電気化学顕微鏡（SECM）の基本構成

本研究では、Figure 2.3 に示すような SECM システムを用いて電気化学測定を行った。電気化学測定は 2 極式で行い、作用電極（WE）には既述の手順で作製した Pt マイクロ電極を、参照電極（RE）には既述の手順で作製した Ag/AgCl 電極を用いた。測定の際は、まず PC から DA ボードを通し、作用極であるマイクロ電極と参照極に電圧を印加する。マイクロ電極から検出した酸化還元電流は電流増幅器（Current amplifier、427 current amplifier、KEITHLEY）により増幅し、AD ボードを通して PC に出力した。ノイズ軽減のため、SECM システムはファラデーケージ（Faraday cage、HOKUTO DENKO）内に設置した。xyz ステージの調節はステージコントローラーで行った。測定条件の詳細は、各章にて解説する。

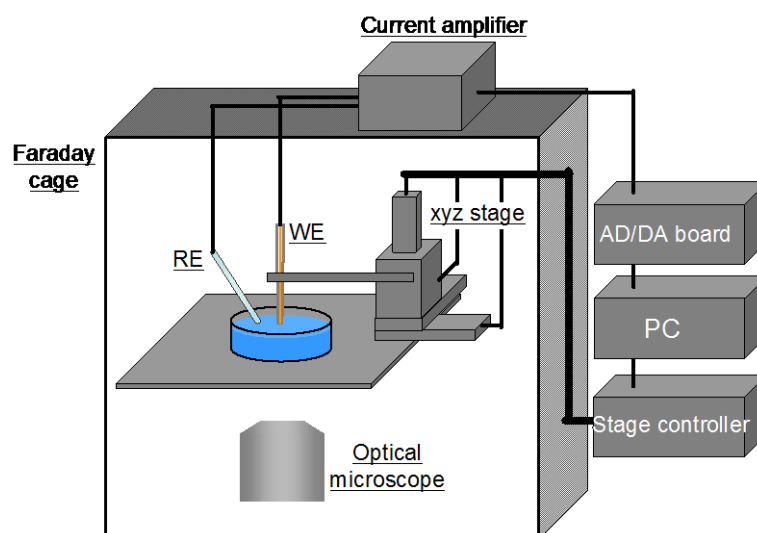


Figure 2.3 Schematic diagram of SECM system

2.4 細胞操作

細胞操作には無菌条件が不可欠なため、使用する器具はすべて滅菌し、細胞の操作はクリーンベンチ（MCV-B131F、三洋電機）内で作業を行った。以下に、使用した細胞とその操作の詳細を示す。

2.4.1 使用した細胞

本研究では、4種類の細胞を使用した。

- ① HeLa 細胞：ヒト子宮頸癌細胞、東北大学加齢研究所付属医用細胞資源センター提供
- ② マウス胚性幹細胞 (ES 細胞)：系列: Strain 129/ SVEV、DS Pharma Biomedical Co., Ltd から購入
- ③ A431 細胞：ヒト扁平上皮癌細胞、東北大学加齢研究所付属医用細胞資源センター提供
- ④ MCF-7 細胞：ヒト乳癌細胞、東北大学加齢研究所付属医用細胞資源センター提供

2.4.2 試薬・器具

- ① 培地：RPMI-1640 (Gibco)

500 mL の RPMI-1640 に 50 mL の非働化した牛胎児血清 (FBS、Gibco) および 5 mL のペニシリン/ストレプトマイシン (5000 U mL^{-1} , $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$; 和光純薬) を加えて使用した。非働化は、牛胎児血清を 37°C で解凍後、 56°C 、30 min 湯煎して行った。調整した RPMI-1640 培地は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

- ② 0.25%トリプシン-EDTA 溶液 (Gibco)

クリーンベンチ内で、アンプルチューブに 1.0 mL ずつ小分けにし、冷凍庫で保存した。

- ③ PBS (-)

洗浄、滅菌した瓶に 8.00 g L^{-1} NaCl, 0.20 g L^{-1} KCl, 1.54 g L^{-1} $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g L^{-1} KH_2PO_4 を混合し、オートクレーブ (KT-2346、アンプ) にて 121°C 、20 min 滅菌した。なお (-) とは Ca^{2+} 、 Mg^{2+} が含まれないことを意味する。

- ④ 滅菌済みのプラスチックピペット (5、10、50 mL、Falcon)
- ⑤ 滅菌済みの細胞培養用プラスチックフラスコ (25、250 mL、Falcon)
- ⑥ 滅菌済みの細胞培養用プラスチックシャーレ (3.0 mL、Falcon)
- ⑦ コニカルチューブ (15、50 mL、IWAKI)
- ⑧ C-Chip (DHC-B02、Digital Bio)

細胞数のカウントに使用した。

- ⑨ 70%消毒用エチルアルコール

霧吹きを用いてクリーンベンチ内に入れる器具類に吹きつけ消毒した。

- ⑩ 70%消毒用エチルアルコールで湿らせたカット綿

クリーンベンチ内の除菌、殺菌清掃に用いた。

- ⑪ 倒立型顕微鏡 (TE300、Nikon)

⑫ 廃液瓶

ガラス製ビーカーなどを洗浄後、乾燥器にて 85°C で乾燥させた。

2.4.3 細胞の培養

細胞培養用フラスコを用い、37°C、5% CO₂ のインキュベータ（APM-30D、アステック）内で培養を行った。HeLa 細胞、A431 細胞、MCF-7 細胞は、RPMI-1640 中で培養した。ES 細胞培養には、ゼラチンコートした培養容器が必要であり、以下に作製方法を述べる。ゼラチンコートは培養における細胞の接着面となる。

- ① Ultrapure water with 0.1 % Gelatin (Millipore, Cat. ES-006-B)を 25 cm² フラスコに 2 mL 入れ、全体になじませてクリーンベンチ内で 4 時間静置した。
- ② ゼラチン溶液を捨て、2 mL の PBS(-)を入れて洗浄し、PBS を捨ててさらにクリーンベンチ内で乾燥させた。
- ③ 乾燥したゼラチンコートフラスコは、チャック付の袋に乾燥剤（フラスコ内結露防止）と共に入れ、冷蔵庫内（4°C）で保存した。

ES 細胞は 1000 U mL⁻¹ of mouse leukemia inhibitory factor (mLIF) と 1 mM β-mercaptoethanol を含む Stem Medium（DS Pharma Biomedical. Co., Ltd., Tokyo, Japan）中で培養した。神経系へと分化誘導は、1 μM ATRA を含み、mLIF を含まない培地中で ES 細胞を培養することで行った[1, 2]。

2.4.4 細胞の継代

HeLa 細胞、A431 細胞、MCF-7 細胞は以下の手順で継代を行った。継代は細胞密度がフラスコの 80%程度となったところで行った。

- ① インキュベーター内から細胞培養用フラスコを取り出し、クリーンベンチに移す。また、新しい培地とトリプシンをあらかじめ 37°C に暖めておく。
- ② フラスコ内の培地を取り除き、PBS（-）溶液で細胞を 2 回洗浄する。
- ③ フラスコに 0.25%トリプシン-EDTA 溶液を 1 mL 滴下し、37°C、5%CO₂ で数分インキュベートし、光学顕微鏡で細胞の剥離を確認する。
- ④ フラスコに新しい培地を加えることでトリプシンの作用を停止させる。
- ⑤ フラスコ内の細胞懸濁液をピペッティングし、細胞を分散させる。
- ⑥ 細胞懸濁液をコニカルチューブに移し、遠心分離機（CT15D、日立製作所）を用いて 1500

rpm、5 min で細胞を遠心分離する。

- ⑦ コニカルチューブの上清を取り除き、新しい培地を加えてピペッティングし、細胞をよく分散させる。
- ⑧ 必要に応じて C-Chip を用いて細胞数を計測する。
- ⑨ 新しい細胞培養用フラスコに新しい培地を入れ、さらに細胞懸濁液を適量滴下する。
- ⑩ フラスコをインキュベーター内に入れ、37°C、5%CO₂ で培養する。

ES 細胞の継代を以下に述べる。

- ① 培地をウォーターバス (37°C) で温め、遠心機を 4°C に冷やしておいた。
- ② 培地を除去し PBS(-)を 5 mL 添加して細胞層の洗浄を行った。
- ③ PBS(-)を取り除いた後、Accutase Solution (Millipore, Cat. R-SCR005)を 5 mL 添加して 5min インキュベーターに入れ、細胞を剥離した。
- ④ 接着している細胞を完全に剥がすため、フラスコ底面を洗うようにして 10 回懸濁した。(反応停止操作不要)
- ⑤ 液全量 (5 mL) を 15 mL の遠沈管に移し、ピペッティングを 10 回行いシングルセル状態にした。
- ⑥ 4 °C、100×g で 3 min 遠心分離を行った。
- ⑦ 上清を除去した後未分化維持培地を 5 mL 添加し、ピペッティングによりペレット状態の細胞を均一な細胞懸濁液にした。
- ⑧ C-Chip を用いて細胞数カウントを行い、懸濁液濃度を求めた。
- ⑨ 1.0×10^6 cells / 5 ml でゼラチンコート済の 25 cm² フラスコに播いた。
- ⑩ 温度 37°C、気相条件 5% CO₂、95% Air のインキュベーター内で培養を行った。

ES 細胞は代謝活性が高いため培地交換は毎日行った。

2.4.5 細胞の凍結保存

- ① 細胞の継代と同様の手順で細胞を剥離し、遠心分離を行い、細胞を回収する。
- ② 上清液を除去後、細胞濃度が 1.0×10^6 cells mL⁻¹ 程度になるように市販の凍結保存用培地を加える。
- ③ 調整した細胞懸濁液をアンプルチューブに分注し、-80°C の超低温槽に半日入れ徐々に凍結させる。
- ④ 十分に凍結したらチューブを液体窒素中に移して保存する。

2.4.6 細胞の融解

- ① コニカルチューブ 2 本に培地を適量入れ、ウォーターバスで 37°C に温める。また、細胞培養用フラスコに培地を適量入れ、インキュベーター内で 37°C に温める。
- ② 液体窒素中から凍結した細胞の入っているアンプルチューブを取り出し、ウォーターバスで溶かす（少し溶ければ充分）。
- ③ 融解した細胞懸濁液と溶けきれない氷塊をすべて温めた培地の入ったコニカルチューブに入れ、完全に溶かす。
- ④ 1500 rpm、5 min で細胞を遠心分離する。
- ⑤ 上清を取り除き、新しい培地を加えピペッティングし、細胞を分散させる。
- ⑥ 温めておいた細胞培養用フラスコに細胞懸濁液を全量加え、インキュベーター内に入れ、37°C、5%CO₂ で培養する。
- ⑦ 翌日、培地を交換し、育成状況を確認し生育が確認できれば培養を続ける。

2.5 細胞のパターニング

パターニング技術は、タンパク質や細胞を基板上に任意に配列するために用いられ、微細加工技術の発展に伴い、マイクロスケールのパターン形成が可能となっている。細胞パターニング技術の一つとして、貫通した穴を有する薄膜（ステンシル）を用いたマイクロステンシル法がある。ステンシルで基板を被覆することで、穴以外の領域への物質の接触が物理的に阻害される。本研究では、生体親和性が高く、細胞培養ディッシュに密着する素材である polydimethylsiloxane (PDMS) を用いてステンシルを作製した。PDMS ステンシルにより被覆したディッシュ上で細胞を培養すると、作製した穴と同じ形状を有する細胞パターンが基板上に形成される。この PDMS ステンシルは、ピンセット等で容易に掴んで細胞培養基板に貼り付けることができ、細胞が接着した後、細胞に損傷を与えることなく剥がすことができる。また、細胞種を問わず用いることができる。Figure 2.5 に本研究で用いた細胞パターン作製法を示す。

- ① ガラス基板（S1225 水切放、MATSUNAMI）を 2 等分に切り、3、3、4、4、5、5、6、6、6-Nonafluorohexyltrichlorosilane（信越化学）20 μ l と共にポンプで真空引きすることによって、ガラス基板をシラン化する。
- ② シラン化したガラス基板上に PDMS（シルポット 184W/C、東レダウコーニング）を適量垂らして 1000 rpm で 30 秒間スピコートし、その後 80 °C、1 時間程度で硬化することによって、膜厚約 100 μ m の PDMS 薄膜を作製する。
- ③ 作製した PDMS 薄膜に CO₂ レーザーを照射することで円状の穴を作製する。
- ④ PDMS ステンシルの表面をプラズマアッシャーで 1 分処理し、親水化する。

- ⑤ PDMS ステンシルを 70%消毒用エタノール中に数分置いた後、クリーンベンチ内で乾燥させる。
- ⑥ 細胞培養ディッシュに PDMS ステンシルを貼り付ける。
- ⑦ 1.0×10^6 cells mL^{-1} の濃度に調整した 100 μL の細胞懸濁液をステンシル上にのみ滴下し、 37°C 、5% CO_2 で 2 時間程度培養する。
- ⑧ 細胞が接着しているのを確認後、上澄みを取り除き、PDMS 製の枠を貼り付ける。
- ⑨ 枠の中に新たな培地を加え、 37°C 、5% CO_2 で 1 日間培養する。
- ⑩ 細胞が 80-90%コンフルエント状態になっているのを確認後、PDMS ステンシルを剥がし、細胞パターンを作製する。

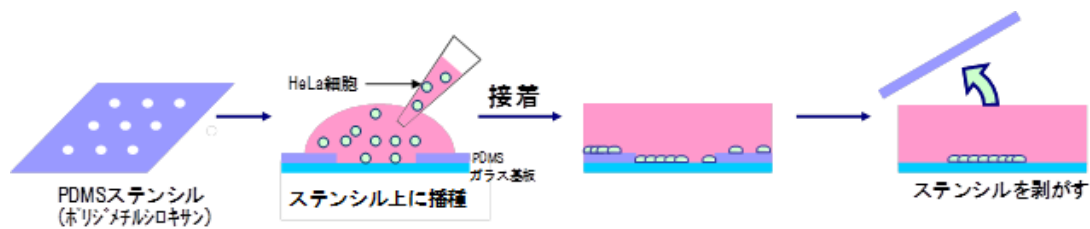


Figure 2.4 Manufacture method of patterned cells by PDMS stencil.

直径 300 μm および 100 μm の穴を有すステンシルを用いて実際に作製した細胞パターンの光学画像を Figure 2.6 示した (HeLa 細胞)。細胞パターンの作製に成功したことが確認できた。

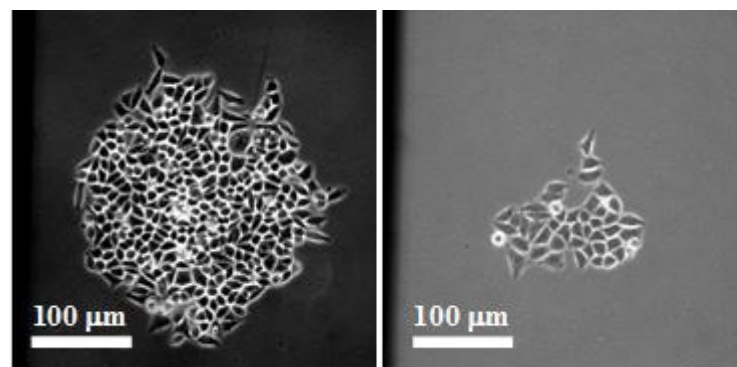


Figure 2.5 Patterned HeLa cells by PDMS stencil.

[1] M. Kim, A. Habiba, J.M. Doherty, J.C. Mills, R.W. Mercer, J.E. Huettner, Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid, *Developmental biology*, 328

(2009) 456-471.

[2] R. Martin-Ibanez, N. Urban, S. Sergent-Tanguy, J.R. Pineda, N. Garrido-Clua, J. Alberch, J.M. Canals, Interplay of leukemia inhibitory factor and retinoic acid on neural differentiation of mouse embryonic stem cells, *J. Neurosci. Res.*, 85 (2007) 2686-2701.

[3] 高橋康史、東北大学博士学位論文 (2008)

[4] 宮本健史、東北大学修士学位論文 (2008)

[5] 村上有美、東北大学修士学位論文 (2009)

[5] 小沢文智、東北大学博士学位論文 (20013)

[4] 新井俊陽、東北大学修士学位論文 (20013)

第3章 二種のメディエーターを用いた単一細胞内酵素活性モニタリング

本章では、単一細胞内酵素活性の経時測定について述べる。メナジオンとフェリシアン化カリウム ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) の 2 種のメディエーターを組み合わせることで、電気化学的に細胞内の酵素活性を評価した。SECM を用いることで、単一細胞レベル・低侵襲・定量的な測定を行った。

3.1 はじめに

細胞内酵素活性は、細胞の代謝や機能の指標の 1 つとなりうるため、低侵襲・連続的・定量的・単一細胞レベルでの測定が求められている。電気化学的手法では、電子伝達を仲介するメディエーターを利用することで、酸化還元酵素の低侵襲・定量的な評価が可能である。疎水性メディエーターは細胞膜を透過することができ、細胞内酵素活性の測定に有効である[1, 2]。SECM は、単一細胞もしくはそれ以下のサイズでの測定に適しており[3, 4]、細胞内・細胞膜表面の酵素活性[5-12]の評価に利用されてきた。

メナジオン (2-methyl-1,4-naphthoquinone、別名ビタミン K3、Figure 3.1) は、細胞膜透過性を有すキノン類のメディエーターであり、細胞内酵素活性の測定に利用できる[5-7, 13, 14]。しかし、メナジオンは過酸化水素 (H_2O_2) やスーパーオキシドアニオン (O_2^-) などの活性酸素種 (ROS) の発生源となり、細胞に対して毒性を示すことも報告されている。細胞内におけるメナジオン解毒は、NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) およびグルタチオン (GSH) 抱合反応により行われる[15]。

NQO は、キノン類の解毒を担う酵素である。NQO 以外の他の還元酵素によりメナジオンが一電子還元を受けると、セミキノンラジカルが生成し、ROS の発原因となる。一方、NQO は、キノン類を二電子還元し、ROS の発生を防ぐ (Figure 3.1)。ROS は、脂質酸化反応や酵素不活性化、DNA の損傷を招き、細胞毒性を示す。また、セミキノンラジカルそのものが、DNA を含む生体高分子と反応し、発がん性を示す[16]。がん組織で NQO 活性が上昇しているという報告も多くあり、がん診断の 1 つの指標として利用できる可能性がある。NQO 活性

を特異的に変動させる基質の研究が進歩すれば、がん治療への応用も期待できる。

もう1つの解毒経路にグルタチオン抱合反応がある。GSH はメナジオンと抱合反応を起こし、細胞内から排出される。GSH は、生体内の主な抗酸化物質であり、ROS と反応し無毒化することができる。Bard らは、酵母および Hep G2 細胞（ヒト肝がん由来細胞株）からのメナジオン-GSH 複合体の放出量を算出している[5, 6]。

メナジオンとフェリシアン化カリウム ($K_3Fe(CN)_6$) を、利用したダブルメディエーターシステムが、細胞内 NQO 活性由来の電流増幅に利用されている (Figure 3.2) [13, 14, 17]。Pt 電極上でのメナジオンの電極反応は遅いが、十分に電極反応の速い $K_3Fe(CN)_6$ を利用することで、この制約に打ち勝ち、結果的に電流値が増幅される。また、電極上で消費された $Fe(CN)_6^{4-}$ は、細胞から放出されたメナジオン還元体によって直ちに還元（再生）されるため、電極-細胞間でのレドックスサイクリングが起き、電流値が増幅される。Nagamine らは、ダブルメディエーターシステムと SECM を利用し、酵母菌の NQO 活性を評価した[7]。彼らは、電流応答が最大となるようにメナジオン濃度を最適化したが、この濃度では、メナジオン毒性のために長時間測定には適さなかった。

本研究では、SECM とダブルメディエーターシステムを用いて、NQO 活性の単一細胞レベル・定量的・経時的モニタリングを行った。各メナジオン濃度での毒性評価と SECM 測定結果から、経時測定に適したメナジオン濃度、 $K_3Fe(CN)_6$ 濃度を決定した。球面拡散理論から単一細胞のメナジオン還元体放出量を算出し、経時評価した。メナジオン曝露による細胞内の活性酸素種 (ROS) とグルタチオン (GSH) の変化量も評価した。

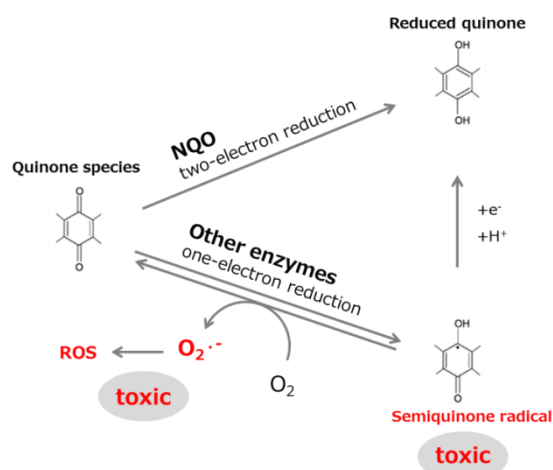


Figure 3.1 Schematic illustration of the reduction of quinone species within the cells. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) can reduce quinone species by two-electron reduction without the generation of reactive oxygen species (ROS) and semiquinone radicals which lead to cytotoxicity.

3.2 実験

3.2.1 試薬

本章では以下の試薬を使用した。

D-グルコース、KCl、NaCl、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、フェリシアン化カリウム $K_3Fe(CN)_6$ 、2-methyl-1,4-naphthoquinon（メナジオン）、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ （和光純薬）、

N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid (HEPES) (同仁化学)、Cell Counting Kit-8 (同仁化学)、OxiSelect™ ROS Assay Kit (CELL BIOLABS, INC.)、GSH-Glo™ Glutathione Assay (Promega)、HEPES buffer (150 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 2.7 mM MgCl₂, 1.0 mM Na₂HPO₄, 11.2 mM D-glucose, 10 mM HEPES)

3.2.2 SECM 測定原理

ダブルメディエーターシステムによる NQO 測定原理を Figure 3.2 に示した。十分な疎水性を有すメナジオンは、輸送タンパク質など必要とせずに受動的な拡散によって細胞膜を透過することができる[2, 5, 18]。細胞内に取り込まれたメナジオンは、NQO によって還元される。メナジオン還元体は細胞外で Fe(CN)₆⁴⁻を還元し、Fe(CN)₆³⁻が生成する。Fe(CN)₆^{3-/4-}は、親水性メディエーターであり細胞透過性は持たない。Fe(CN)₆⁴⁻を電極上で検出することで NQO 活性を間接的に測定可能である。細胞外で再生されたメナジオンは再度 NQO と反応する。

SECM 測定には、直径 20 μm の Pt ディスク型マイクロ電極を用いた。電極に 0.5 V vs. Ag/AgCl を印加した。0.5 V vs. Ag/AgCl は Fe(CN)₆⁴⁻を十分に酸化する電位である。二次元走査もしくは、細胞直上を通過するように 1-line scan を行った。1-line scan とは、一次元方向に電極を走査する測定法である。

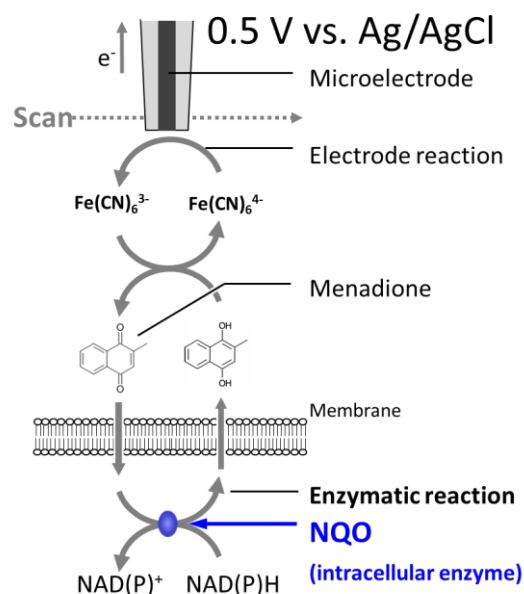


Figure 3.2 Principle of electrochemical detection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) activity in a HeLa cell. Fe(CN)₆³⁻ and menadione were added in the measurement solution.

3.2.3 NQO 活性評価方法と NQO 活性モニタリング

SECM 測定により得られる電流応答から、球面拡散理論による濃度プロファイル解析法を述べる[19]。本研究では、単一細胞からのメナジオン還元体放出量を算出し NQO 活性とした。

メナジオン還元体の放出が定常状態だと仮定すると、Fick の第一法則より *flux* は以下のように表せる。

$$flux = -D \frac{\partial C}{\partial L} \quad (\text{式 3-1})$$

D はレドックス種の拡散係数、C はレドックス種の濃度、L は細胞－電極距離である。細胞を半球と仮定した場合（Figure 3.3）、細胞からのレドックス種放出量 F_{cell} は次のように表せる。

$$F_{cell} = 2\pi r_s^2 \times flux_{L=r_s} \quad (\text{式 3-2})$$

r_s は細胞半径、 $flux_{L=r_s}$ は細胞表面でのレドックス種の流束を表している。 $Fe(CN)_6^{3-}$ が十分に存在する場合、細胞から放出された全てのメナジオン還元体が、細胞外にて直ちに $Fe(CN)_6^{3-}$ と反応すると仮定でき、生成した $Fe(CN)_6^{4-}$ の放出量をメナジオン還元体から見積もることができる。また、メナジオンと $Fe(CN)_6^{3-}$ の濃度が、NQO のミカエリス定数よりも十分に大きい場合、NQO の酵素反応が律速段階となり電流値を決定する。微小電極の定常電流の式（1 章）から $Fe(CN)_6^{4-}$ 濃度 C を算出できるため、電流値と距離のデータ（1-line scan）から放出量 F_{cell} を算出することができる。1-line scan 結果よりメナジオン還元体の放出量を算出した。具体的な方法を以下に示す。

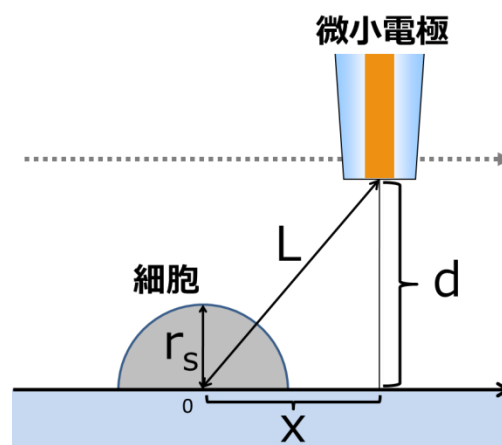


Figure 3.3 Schematic illustration of the SECM measurement with a disk-type microelectrode. Where r_s is radius of a cell, x is lateral electrode-cell distance, d is electrode-substrate distance, $L = (x^2 + d^2)^{0.5}$.

- ①電極走査速度 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査範囲 500 μm で、細胞上を 1-line scan 測定（細胞上を $x=0$ とする）
- ②1-line scan の最初と最後（細胞から離れた位置）の電流値を利用し、バックグラウンド電流を差し引く
- ③横軸を r_s/L 、縦軸を補正した電流値に再プロットする
- ④最小二乗法により線形近似直線を計算し、直線の傾きと式（1-1、3-1、3-2）から放出量 F_{cell} を算出する

3.2.4 毒性評価

Cell Counting Kit-8（同仁化学）を用いてメディエーターの毒性試験を行った。細胞の操作はクリーンベンチ内で行い、測定溶液の曝露時間は、SECM イメージングの際にかかる時間と同等の 30 min とした。以下に測定方法を示す。

- ① 100 nM~1 mM のメナジオン、20 μM ~200 mM の $K_3Fe(CN)_6$ を含む測定溶液

(HEPES buffer) を作製する。

- ② 約 1×10^5 cells/mL の HeLa 細胞懸濁液を作製し、96well 細胞培養用プレート (Falcon) に 100 μ L (細胞 1×10^4 cells) 添加する。
- ③ 37°C 、5% CO_2 のインキュベータ内で 6 hr 培養し、細胞を接着させる。
- ④ 細胞を HEPES buffer で 3 回洗浄し、測定溶液 (各濃度のメナジオンおよび $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 含有 HEPES buffer) に 30 min 曝露する。
- ⑤ 曝露の後、新しい培地で 3 回洗浄する。
- ⑥ 各 well に WST-8 (Cell Counting Kit-8 に含まれる試薬) を 10 μ L ずつ添加し、 37°C 、5% CO_2 のインキュベータ内で 2 hr 呈色する。
- ⑦ 96well プレートをインキュベータから取り出し、マイクロプレートリーダー (モデル 680、日本・バイオ・ラッド・ラボラトリーズ) を用いて 450 nm の吸光度を測定する。

各濃度のメナジオンを曝露した細胞の吸光度を A_s 、メナジオンを含まない溶液に曝露した細胞の吸光度を A_c 、培地のみ (細胞を含まない) の吸光度を A_b とし、以下の式で細胞生存率を算出した。

$$Viability = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \quad (\text{式 3-3})$$

水溶性テトラゾリウム塩である WST-8 は、細胞内で脱水素酵素により WST-8 ホルマザンに還元される。還元された WST-8 ホルマザンは 460 nm 付近に極大吸収を持つ (橙色)。細胞内脱水素酵素活性に応じて生産されるホルマザン色素の量は、生細胞数に比例するため、450 nm の吸光度を測定することで生細胞数を概算することができる。

3.2.5 細胞内 ROS 量アッセイ

OxiSelect™ ROS Assay Kit (Cell Biolabs, CA) を用いて細胞内 ROS 量をフローサイトメーターにより測定した。フローサイトメトリーとは、微細な粒子を流体中に分散させ、その流体を細く流して、個々の粒子を光学的に分析する手法である。細胞の操作はクリーンベンチ内で行い、測定溶液の曝露時間は SECM イメージングの際にかかる時間と同等の 30 min とした。細胞内に散在した DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) は、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化され非蛍光型の DCFH (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein) になる。DCFH は ROS により速やかに酸化され、強く蛍光する DCF (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein) に変化する。DCF の蛍光強度 (励起光 480 nm, 蛍光 530 nm) は細胞質ゾルの ROS 量に比例するため、蛍光強度から細胞内 ROS レベルを算出することができる。以下に実験方法を示す。

- ① 0, 1, 100 μM メナジオン、200 μM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を含む測定溶液 (HEPES buffer、pH 7.0)

を作製する。

- ② 100000 cells/mL 程度の HeLa 細胞懸濁液を細胞培養用ディッシュに滴下する。
- ③ 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で 6 hr 培養し、細胞を接着させる。
- ④ DCFH-DA を添加し 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で 1 hr 培養し、細胞内に DCFH-DA を取り込ませる。
- ⑤ 細胞を 30 min メナジオン含有溶液に曝露する。
- ⑥ 継代時と同様にトリプシンにより細胞懸濁液 (50,000~200,000 cells/mL) を作製する。
- ⑦ フローサイトメーター (MoFlo™ XDR, Beckman Coulter, USA) により、530 nm の蛍光検出を行う (励起光 488 nm)。約 1×10^4 cells のサンプルを解析する。

3.2.6 細胞内 GSH 量アッセイ

GSH-Glo™ Glutathione Assay (Promega, madison, USA) を用いて細胞内 GSH 量の測定を行った。細胞の操作はクリーンベンチ内で行い、測定溶液の曝露時間は SECM イメージングの際にかかる時間と同等の 30 min とした。ルシフェリン誘導体 (Luc-NT) は、グルタチオン (GSH) とグルタチオン S 転移酵素 (GST) によってルシフェリンへと変換される。ルシフェリンはルシフェラーゼにより酸化されると発光する。このとき、発光強度はサンプル中の GSH 量に比例するため、発光強度から GSH の量を算出することができる。

細胞内 GSH 量の測定方法を以下に述べる。

- ① 0~100 μ M メナジオン、200 μ M K₃Fe(CN)₆ を含む測定溶液 (HEPES buffer) を作製する。
- ② 約 1×10^5 cells/mL の HeLa 細胞懸濁液を作製し、96well 細胞培養用プレート (Falcon) に 100 μ L (細胞 1×10^4 cells) 添加する。
- ③ 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で 6 hr 培養し、細胞を接着させる。
- ④ 細胞を HEPES buffer で 3 回洗浄し、測定溶液 (各濃度のメナジオンおよび K₃Fe(CN)₆ 含有 HEPES buffer) に 30 min 曝露する。
- ⑤ 曝露の後、新しい培地で 3 回洗浄する。
- ⑥ 96well プレートに測定用試薬 (Luc-NT、GST) を添加し、37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で 30 min 反応させる。
- ⑩ 96well プレートをインキュベーターから取り出し、発光検出用試薬を添加し、37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で 15 min 反応させる。
- ⑪ 96well プレートをインキュベーターから取り出し、ICCD カメラ (PI-MAX 512RB, Princeton Instruments, USA) を用いて発光を撮影し、強度を解析する。

測定の際に、検量線作製用として各種濃度の GSH を添加したサンプルを用意し、これらの発光強度から検量線を作製した。検量線から、各細胞サンプルの発光強度を GSH 濃度へと換算した。

3.3 結果と考察

3.3.1 メディエーター毒性評価

長時間 NQO 活性を測定する上で、メナジオンの毒性による細胞死を防ぐことが必要である。最初に、メナジオンおよび $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の毒性について検討した。 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度を 200 μM に固定し、各メナジオン濃度で 30min 暴露した際の細胞生存率を Figure 3.4 (A)に示す。メナジオン濃度が 20 μM を超えると細胞生存率が大幅に低下した。この結果は、過去に Bard らのグループによって報告された Hep-G2 細胞における毒性試験の結果と一致している[5]。次に、メナジオン濃度を 10 or 100 μM に固定し、各 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度での細胞生存率を Figure 3.4 (B)に示す。 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 20 mM 以下では細胞生存率は大きくは変化せず、10 μM メナジオンでは毒性は低かった。しかし、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の濃度が 20 mM を超えると細胞生存率は著しく低下した。

メナジオン曝露に伴う細胞毒性がどのように解毒されるかを調べた。各メナジオン濃度を暴露した際の細胞内の ROS 量と GSH 量を Figure 3.5 に示した。100 μM メナジオン暴露では細胞内 ROS 量が増大した。この濃度では、NQO によるメナジオン解毒が間に合わず、NQO 以外の還元酵素によってメナジオンが一電子還元され、ROS が大量に発生していることが示唆された。また細胞内 GSH 量も大きく減少しており、GSH による ROS 解毒も不十分であるために、結果的に細胞生存率が低下したと考えた。1 μM メナジオン暴露でも ROS が発生しているが、細胞生存率には影響しなかつ

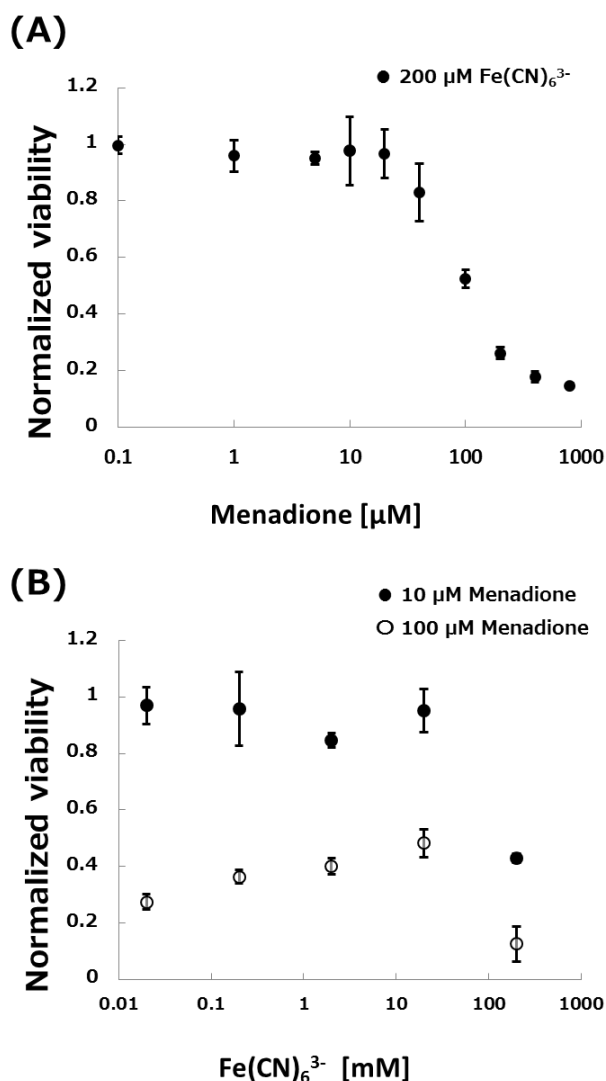


Figure 3.4 Viability assay results for HeLa cells normalized to the cells exposed with HEPES-based saline solution without menadione and ferricyanide. The absorbance at 450 nm was measured for HeLa cells after exposure for 30 min to different concentrations of menadione and ferricyanide. (A) Black circle: 200 μM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, (B) Black circle: 10 μM menadione, Void circle: 100 μM menadione. The values represent several independent measurements for different menadione concentrations. Within each concentration, measurements for three or more replicates were performed.

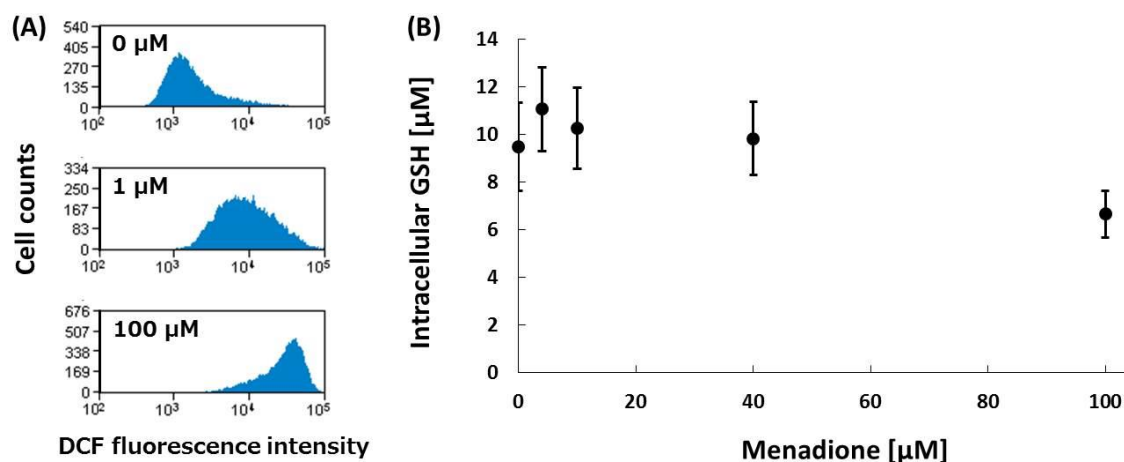


Figure 3.5 (A) Menadione increased intracellular ROS level. HeLa cells were pre-incubated with DCFH-DA for 60 min and then treated with 0, 1 or 100 μM menadione with 200 μM ferricyanide. The fluorescence of DCF was measured with a flow cytometer using excitation and emission wavelengths of 480 nm and 530 nm, respectively. (B) Menadione decreased intracellular GSH level. HeLa cells were pre-incubated with luciferin derivative and then treated with 0, 4, 10, 40 or 100 μM menadione with 200 μM ferricyanide. The luminescence of luciferin was measured by ICCD camera and then GSH concentration was calculated from a standard curve.

た。40 μM 以下のメナジオン濃度では、細胞内 GSH 量は減少していなかったことから、GSH による解毒機構が十分に機能しているためだと考えた。また、1 μM では ROS 量の分布が大きな広がりを持つことがわかるが、これは各細胞での解毒能力の個体差に起因すると思われる、単一細胞解析ならではの結果である。

これらのことから、細胞毒性を考慮するとメナジオン濃度は 10 μM 以下、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度は 20 mM 以下が望ましいと判断した。

3.3.2 ダブルメディエーターシステムによる NQO 活性測定

多細胞パターンおよび単一細胞の NQO 活性を測定した。細胞パターンのサイズは直径約 300 μm のものを使用した。10 μM メナジオン、200 μM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を含む測定溶液 (HEPES buffer) を用いて SECM 測定を行った結果を Figure 3.6 に示す。細胞パターンの形状に対応して細胞付近でのみ電流応答が増加し、ダブルメディエーターシステムにより細胞内酵素活性である NQO の測定に成功した。また、単一細胞レベルでの NQO 活性測定にも成功した (Figure 3.6 (A))。光学画像に比べ、SECM 像が大きくなったのは、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ が拡散したためである。細胞パターンでの測定では応答の増加を期待できるが、細胞数の明確な規定が煩雑であり、解析も難しくなる。そこで今後は全て単一細胞サンプルで測定を行った。また、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 濃度が高いと電流応答を得るのが難しかったため、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度の最適化を行った。

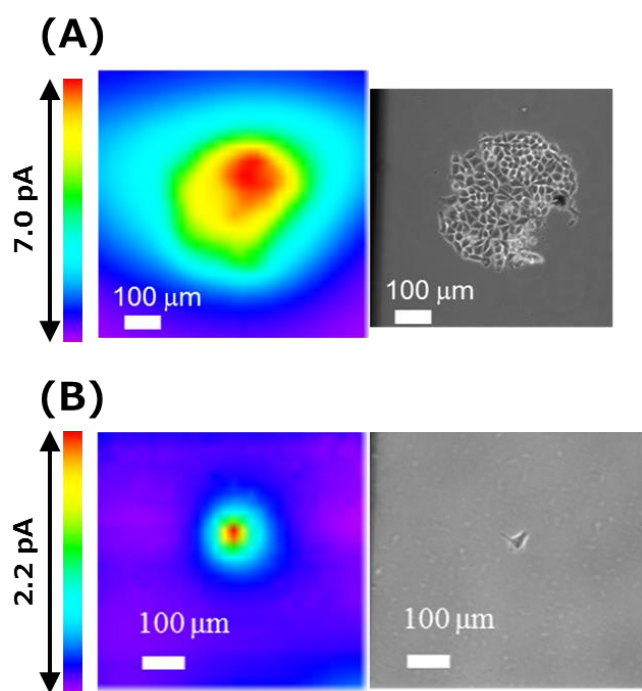


Figure 3.6 SECM images (left) and optical images (right) of patterned HeLa cells (A) or a single HeLa cell (B) based on the oxidation current for ferrocyanide. Measurements were performed in HEPES-based saline solution (pH 7.0) containing 10 μM menadione and 200 μM ferricyanide. The electrode was positioned 20 μm above the substrate. (A) The scan rate was 50 $\mu\text{m s}^{-1}$, the scan range was $800 \times 800 \mu\text{m}^2$ and the step size was 20 μm . (B) The scan rate was 20 $\mu\text{m s}^{-1}$, the scan range was $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ and the step size was 20 μm . Scale bar: 100 μm . SECM images are displayed with interpolation and without correction of baseline shift of current response.

3.3.3 フェリシアン化カリウム ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 濃度による電流応答への影響

NQO 活性としてメナジオン還元体の放出量を算出する際に、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度は極力高いことが理想的である (3.2.3 項)。各 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度における電流応答を比較し、濃度最適化を行った。 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の濃度を変化させて SECM 測定した結果を Figure 3.7 に示す。メナジオン濃度は細胞毒性の少ない $10\text{ }\mu\text{M}$ とした。 2 mM 以上の $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ では応答が不明瞭となったが、 $200\text{ }\mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ において電流応答が明瞭となった。また、全ての $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 濃度において、時間経過とともに電流値が減少し続けた。これは、電極表面の汚れなどによるものと考えられる。高濃度 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ では、バックグラウンド電流が大きく、低濃度では小さかった。測定中における電流値減少はバックグラウンド電流の大きさに依存し、高濃度 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ では、細胞からの応答が埋もれ不明瞭となった。以降は $200\text{ }\mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ で測定を行った。

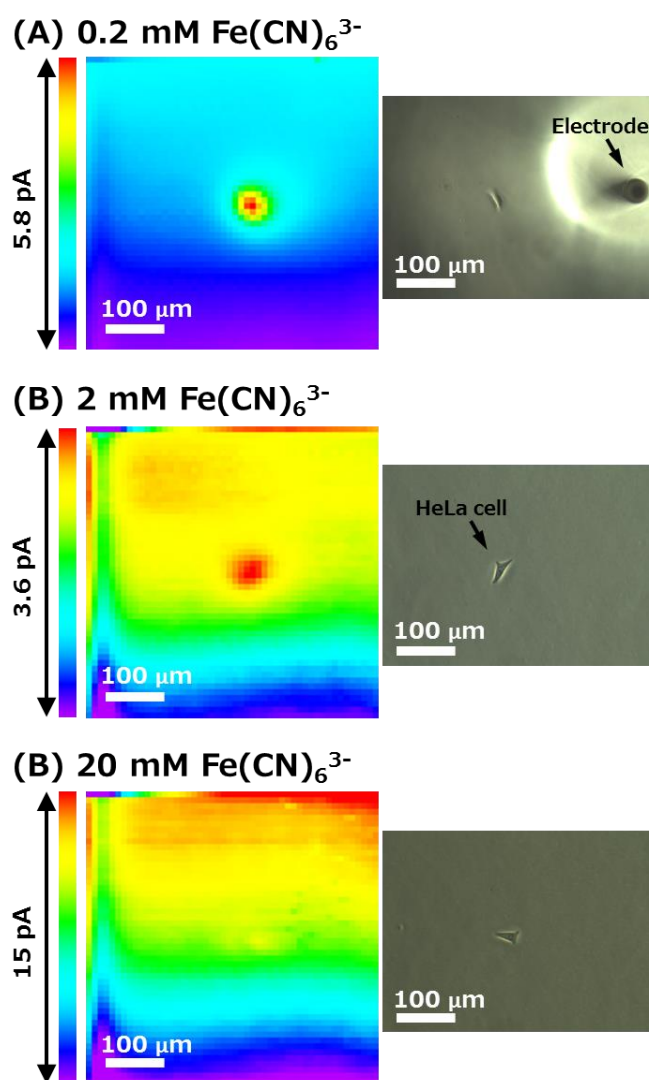


Figure 3.7 SECM images (left) and optical images (right) of a single HeLa cells. Measurements were performed in HEPES-based saline solution containing $10\text{ }\mu\text{M}$ menadione and ferricyanide ($200\text{ }\mu\text{M}$ (A), 2 mM (B) or 20 mM (C)). The measurements were started at 30 min after addition of measurements solution and finished within 10 min. The electrode was positioned $20\text{ }\mu\text{m}$ above the substrate, and the scan rate was $50\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$. The scan range was $500 \times 500\text{ }\mu\text{m}^2$ and the step size was $10\text{ }\mu\text{m}$. Scale bar: $100\text{ }\mu\text{m}$. SECM images are displayed without correction of baseline shift of current response

3.3.4 高濃度メナジオン曝露における電流応答

100 μM メナジオンによる NQO 活性測定結果を、Figure 3.8 に示す。メナジオン曝露 30 min 後に測定を行った。 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の濃度にかかわらず、細胞上で電流が減少した。細胞生存率評価 (3.3.1) から、100 μM メナジオンへの 30 min 曝露では細胞が死滅していることが予想され、細胞上での電流値減少は、細胞形状を反映したネガティブフィードバック効果である (1.3 項)。

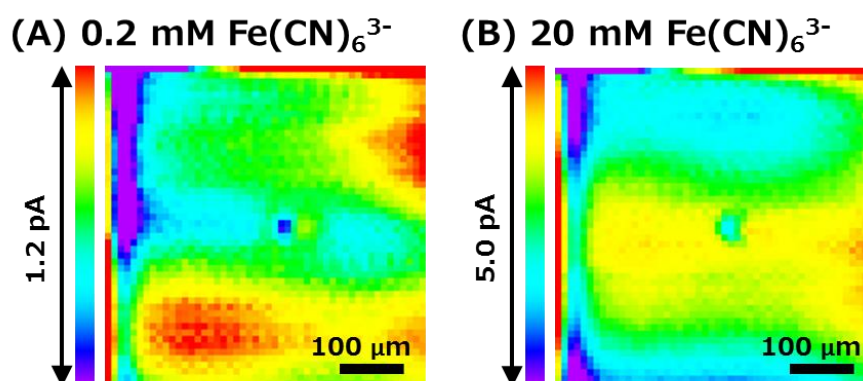


Figure 3.8 SECM image of a single HeLa cell based on the oxidation current for ferrocyanide in a measurement solution containing 100 μM menadione and ferricyanide (200 μM (A) or 20 mM (B)). The measurements were started at 30 min after addition of measurements solution and finished within 10 min. The electrode was positioned 20 μm above the substrate, and the scan rate was 50 $\mu\text{m s}^{-1}$. The scan range was 500 \times 500 μm^2 and the step size was 10 μm . Scale bar: 100 μm . SECM images are displayed without correction of baseline shift of current response.

3.3.5 単一細胞からのメナジオン還元体放出量の算出

3.2.3 項の手法により、単一細胞からのメナジオン還元体放出量を算出した。単一細胞上での 1-line scan 結果を Figure 3.9 (A-C) に示す。バックグラウンド電流を差し引いた後 (Figure 3.9 (A))、横軸を再プロットした (Figure 3.9 (B))。細胞半径 r_s を 10 μm 、電極半径 a を 10 μm 、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ の拡散係数 D を $6.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ とし、式 (1、3-1、3-2) と近似直線の傾きからメナジオン還元体放出量を算出したところ、 $7.79 \times 10^{-17} \text{ mol s}^{-1} \text{ per cell}$ と算出できた。また、10 μM メナジオン 30 min 曝露時点における放出量の平均は、 $7.15 \pm 3.54 \times 10^{-17} \text{ mol s}^{-1} \text{ per cell}$ ($N = 18$) となった。18 サンプルのヒストグラムを Figure 3.1 に示す。この値は、Nagamine らによって報告されている単一酵母菌からの放出量 ($3.07 \times 10^{-19} \text{ mol s}^{-1} \text{ per cell}$) よりも大きい [7]。この差異は、動物細胞 (ヒト子宮頸がん由来) である HeLa 細胞が、酵母菌

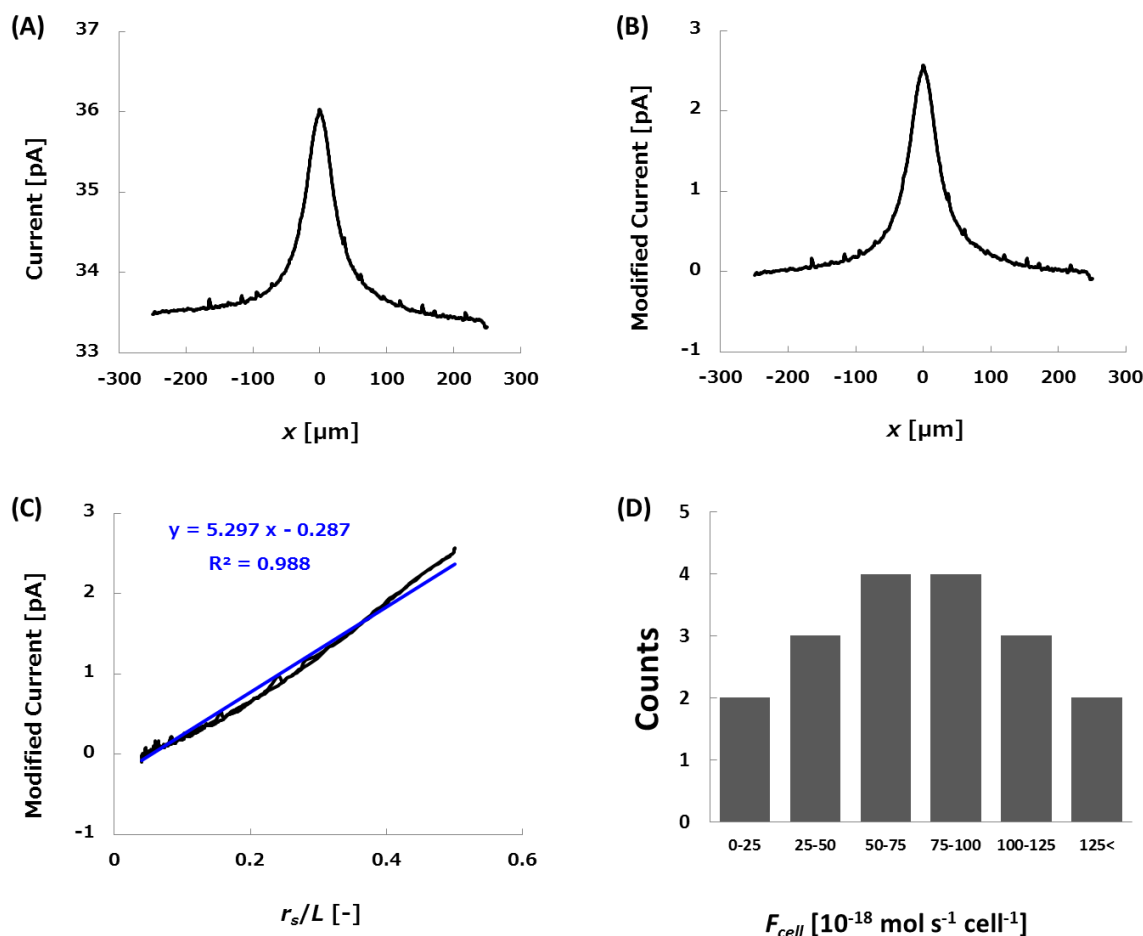


Figure 3.9 (A) Current profile versus lateral position from the center of the cell sample (x) observed various electrode-substrate distances (d). The scan rate was 10 $\mu\text{m s}^{-1}$. The scan range was 500 μm . The baseline shift of current response was subtracted by current response at the start and last points of the one-line scan where the microelectrode located away from the cell samples. (B) Current versus r_s/L plot rearranged from panel B. Where $L = (x^2 + d^2)^{0.5}$. F_{cell} in Fig. 6 of manuscript was calculated by Eq. (1) and ΔC value obtained from the intersection of Panel B and Eq. (2). The black lines in the plots were drawn by the least squares method. (D) Histogram of the menadiol (reduced form of menadione) generation rates from single HeLa cells. The menadiol generation rates from individual HeLa cells, F_{cell} , were calculated from one-line scan SECM. The scan rate was 20 $\mu\text{m s}^{-1}$. The scan

より大きいことに起因すると主に考えられ。しかし、本研究とはメディエーター濃度が異なることを留意する必要がある。また、ヒストグラムを見てもわかるように、放出量に大きなばらつきがあった。これは単一細胞間の個体差であり、単一細胞解析ならではの結果である。

3.3.6 NQO 活性モニタリング

単一細胞の NQO 活性モニタリングを行った。30 min においてメナジオンを添加し、数分毎に 1-line scan 測定を行い、メナジオン還元体放出量を経時測定した結果を Figure 3.11 に示す。メナジオンの添加に伴い電流応答が観測できた。10 μM メナジオンでは、120 min にわたり、放出量はほぼ一定となった。一方、100 μM メナジオンでは、メナジオン添加後 30 min 以内に電流応答が急速に減少した。これは、メナジオン毒性による細胞へのダメージに起因している。長時間 NQO 活性を測定するためには、細胞へのダメージを少なくし、適切なメナジオン濃度で測定する必要がある。

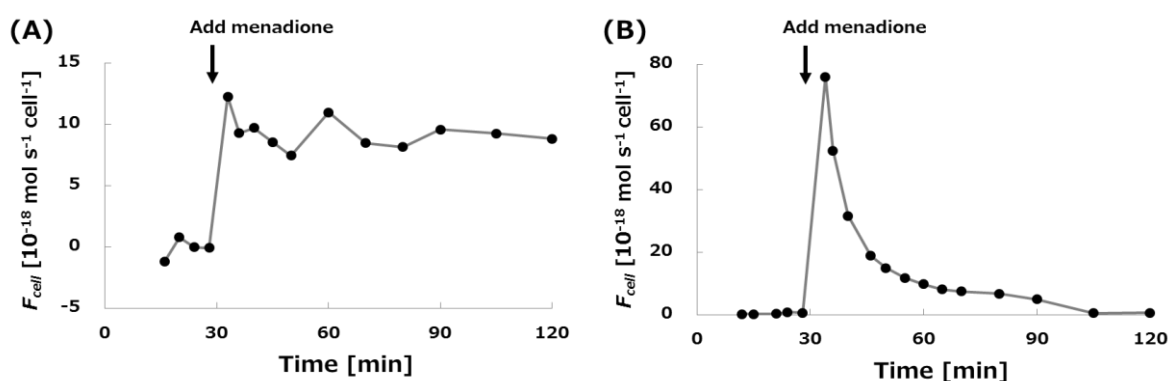


Figure 3.11 Time course of the menadiol generation rate from a single HeLa cell at 10 μM (A) or 100 μM (B) of menadione. Menadione was added at 30 min. The generation rates were calculated from modified current of one-line scan SECM by using Eq. (1). The scan rate was 10 $\mu\text{m s}^{-1}$. The scan range was 500 μm .

3.3.7 SECM-IT (SECM-induced transffer) の影響

膜透過性を有すレドックス種を用いて細胞近傍で測定を行う場合、電極によって誘起される流束の影響を考慮する必要がある。Figure 3.11 (A)の 60 min における応答電流値は 0.377 pA であり、 $F_{\text{tip}} = I_{\text{tip}}/nF$ [20]より、電極上での $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 消費量は $3.91 \times 10^{-18} \text{ mol s}^{-1}$ と算出できた。この値は、単一細胞由来の $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の 1/10 以下であるが、電極によって誘起される拡散状態の変化が、放出量に影響している可能性がある。そのため、電極－基板距離を変化させて、各距離での放出量を算出し、電極で消費される $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の影響を評価した (Figure 3.12)。距離を変えても、メナジオン放出量はほとんど変化せず (距離 $d=15$ におけるわずかな放出量減少は、ネガティブフィードバック効果によるものだと考えられる)、各距離 ($d=15, 20, 30, 50 \mu\text{m}$) における電流値は、球面拡散理論とよく一致した (Figure 3.13)。このことから、電極での $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の消費量は、メナジオン放出量の計測にほとんど影響しないことがわかった。本実験では、高さ一定モード (constant-height mode、1.3.4 項) で SECM 測定を行っており、

電流応答には電極－細胞間距離に伴うフィードバック効果を含む。本実験では細胞を半球面と仮定したが、実際には複雑な形状をしており、より正確な測定のためには、距離制御可能な SECM による精密形状測定も必要である。

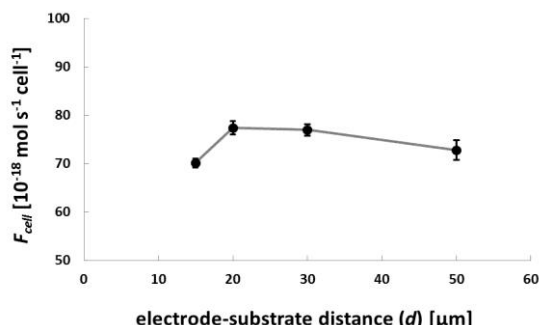


Figure 3.12 The menadiol generation rates from a single HeLa cell at different electrode-substrate distances (d) were calculated from modified current (Figure 3.13) of one-line scan SECM. Measurements at each distance were performed three times in the same sample. One measurement was completed within 1 minute, and all measurements (12 times) were completed within 60 minutes. The menadiol generation rate at 20 μm was maintained virtually constant.

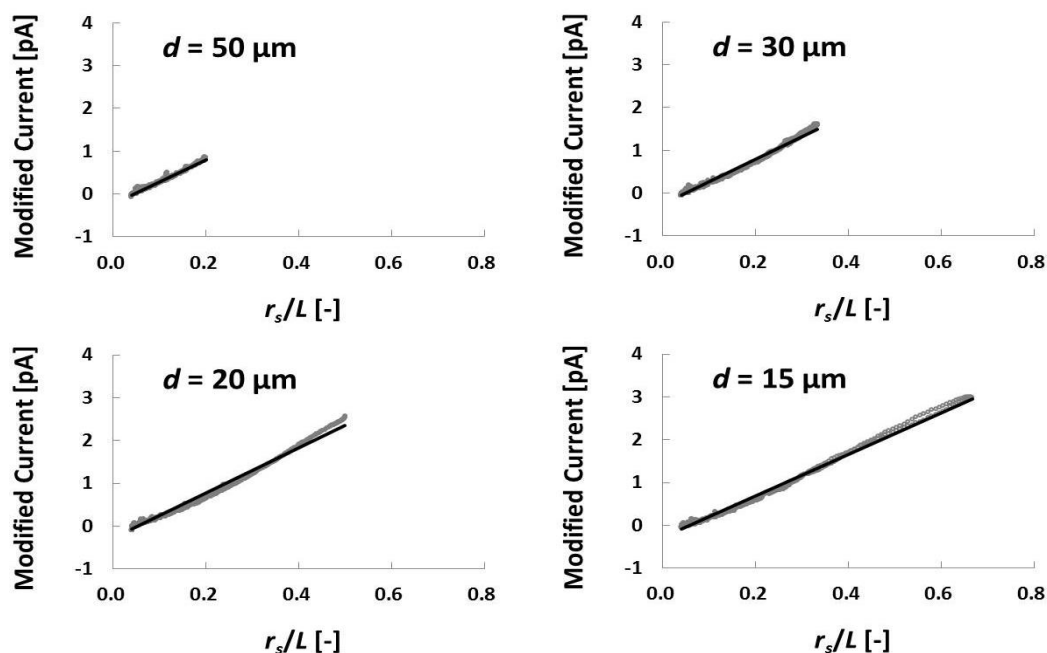


Figure 3.13 Modified current versus r_s/L plot rearranged from one-line scan results with various electrode-substrate distances (d). Where $L = (x^2 + d^2)^{0.5}$. In one-line scan, the scan rate was $10 \mu\text{m s}^{-1}$ and the scan range was $500 \mu\text{m}$. The baseline shift of current response was subtracted by current response at the start and last points of the one-line scan where the microelectrode located away from the cell samples. The black lines in the plots were drawn by the least squares method.

3.4 まとめ

本章ではメナジオンと $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の 2 種のメディエーターを利用したダブルメディエーターシステムにより、SECM を用いて単一 HeLa 細胞の NQO 活性測定を行った。メナジオン毒性を抑え、明瞭な電流応答を得るために、メディエーター濃度最適化を行った。細胞生存率評価、細胞内の ROS・GSH 量評価、および SECM 測定結果から、 $10\ \mu\text{M}$ メナジオン、 $200\ \mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ が NQO 活性経時測定に最適だと判明した。細胞近傍でのみ NQO 活性に由来する $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 酸化電流応答を得ることができ、単一 HeLa 細胞からのメナジオン還元体放出量は $7.15 \pm 3.54 \times 10^{-17}\ \text{mol s}^{-1}\ \text{per cell}$ と算出できた。また NQO 活性の経時測定に成功した。メナジオン添加直後から電流応答を観測でき、 $10\ \mu\text{M}$ メナジオンでは 120 min に渡って放出量はほぼ一定となった。一方 $100\ \mu\text{M}$ メナジオンでは、細胞毒性により 30 min 以内に急激に応答が減少した。メナジオンの膜透過性による、電流値への影響は小さいことがわかった。以上の結果から、単一細胞レベル・定量的な細胞内酵素活性測定に、SECM 利用が有効であることが示唆された。

本章の内容の一部は、「Electrochemical monitoring of intracellular enzyme activity of single living mammalian cells by using a double-mediator system」という題目で、*Analytica Chimica Acta* の学術論文として受理され掲載されている。(Anal. Chim. Acta, 842 (2014) 20-26.)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014008046>

参考文献

- [1] B. Liu, W. Cheng, S.A. Rotenberg, M.V. Mirkin, Scanning electrochemical microscopy of living cells - Part 2. Imaging redox and acid/basic reactivities, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 500 (2001) 590-597.
- [2] B. Liu, S.A. Rotenberg, M.V. Mirkin, Scanning electrochemical microscopy of living cells: Different redox activities of nonmetastatic and metastatic human breast cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 9855-9860.
- [3] S. Amemiya, A.J. Bard, F.R. Fan, M.V. Mirkin, P.R. Unwin, Scanning electrochemical microscopy, *Annual review of analytical chemistry*, 1 (2008) 95-131.
- [4] A. Schulte, W. Schuhmann, Single-cell microelectrochemistry, *Angewandte Chemie*, 46 (2007) 8760-8777.
- [5] J. Mauzeroll, A.J. Bard, O. Owhadian, T.J. Monks, Menadione metabolism to thiodione in hepatoblastoma by scanning electrochemical microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) 17582-17587.
- [6] J. Mauzeroll, A.J. Bard, Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) 7862-7867.
- [7] K. Nagamine, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Influence of Tip Size on Single Yeast Cell Imaging Using Scanning Electrochemical Microscopy, *Electroanalysis*, 23 (2011) 1168-1174.
- [8] Y.S. Torisawa, N. Ohara, K. Nagamine, S. Kasai, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Electrochemical monitoring of cellular signal transduction with a secreted alkaline phosphatase reporter system, *Analytical chemistry*, 78 (2006) 7625-7631.
- [9] C. Zhao, J.K. Sinha, C.A. Wijayawardhana, G. Wittstock, Monitoring beta-galactosidase activity by means of scanning electrochemical microscopy, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 561 (2004) 83-91.
- [10] Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical detection of epidermal growth factor receptors on a single living cell surface by scanning electrochemical microscopy, *Analytical chemistry*, 81 (2009) 2785-2790.
- [11] Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, B. Babakinejad, J. Macpherson, P.R. Unwin, H. Shiku, J. Gorelik, D. Klenerman, Y.E. Korchev, T. Matsue, Topographical and electrochemical nanoscale imaging of living cells using voltage-switching mode scanning electrochemical microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 11540-11545.
- [12] Y. Matsumae, T. Arai, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Evaluation of the differentiation status of single embryonic stem cells using scanning electrochemical

microscopy, Chemical communications, 49 (2013) 6498-6500.

[13] K.H. Baronian, A.J. Downard, R.K. Lowen, N. Pasco, Detection of two distinct substrate-dependent catabolic responses in yeast cells using a mediated electrochemical method, Applied microbiology and biotechnology, 60 (2002) 108-113.

[14] A. Heiskanen, J. Yakovleva, C. Spegel, R. Taboryski, M. Koudelka-Hep, J. Emneus, T. Ruzgas, Amperometric monitoring of redox activity in living yeast cells: comparison of menadione and menadione sodium bisulfite as electron transfer mediators, Electrochemistry Communications, 6 (2004) 219-224.

[15] P. Nioi, J.D. Hayes, Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors, Mutation research, 555 (2004) 149-171.

[16] P. Joseph, A.K. Jaiswal, Nad(P)H-Quinone Oxidoreductase(1) (Dt Diaphorase) Specifically Prevents the Formation of Benzo[a]Pyrene Quinone-DNA Adducts Generated by Cytochrome P4501a1 and P450 Reductase, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 (1994) 8413-8417.

[17] C.F. Spegel, A.R. Heiskanen, N. Kotesha, T.H. Johanson, M.F. Gorwa-Grauslund, M. Koudelka-Hep, J. Emneus, T. Ruzgas, Amperometric response from the glycolytic versus the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae* cells, Analytical chemistry, 79 (2007) 8919-8926.

[18] C.X. Cai, B. Liu, M.V. Mirkin, H.A. Frank, J.F. Rusling, Scanning electrochemical microscopy of living cells. 3. *Rhodobacter sphaeroides*, Analytical chemistry, 74 (2002) 114-119.

[19] T. Kaya, D. Numai, K. Nagamine, S. Aoyagi, H. Shiku, T. Matsue, Respiration activity of *Escherichia coli* entrapped in a cone-shaped microwell and cylindrical micropore monitored by scanning electrochemical microscopy (SECM), The Analyst, 129 (2004) 529-534.

[20] Y. Takahashi, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Yamada, T. Matsue, Topographic, electrochemical, and optical images captured using standing approach mode scanning electrochemical/optical microscopy, Langmuir, 22 (2006) 10299-10306.

第4章 SECM による単一 ES 細胞の分化状態評価

本章では、単一細胞の分化状態評価法について述べる。SECM を用いて、胚性幹細胞（ES 細胞）で過剰発現する酵素活性を評価し、細胞分化状態を低侵襲・定量的に評価した。

4.1 はじめに

胚盤胞の内部細胞塊から得られる胚性幹細胞（ES 細胞）は、分化多能性と無限増殖能を有す（Figure 4.1）[1, 2]。適切な分化制御が可能となれば、再生医療、病因研究や薬剤スクリーニングへの利用が期待できる[3]。ES 細胞をはじめとする幹細胞は、様々な化学的・物理的・生理学的な要因により分化誘導される[4-9]。分化誘導や分化制御メカニズムの解明には、分化状態評価法が不可欠であるが、従来の方法では長時間測定や細胞再利用が困難であり、低侵襲な分化状態モニタリング技術が求められている。分化状態評価には、細胞表面マーカー（SSEA 類・CD 類）、転写因子（Oct3/4・Sox2・Nanog）、細胞内マーカー、酵素・ペプチド・レクチンなどが利用される[10]。ES 細胞マーカーの蛍光検出法は高感度だが、蛍光プローブのラベリング（免疫染色など）や遺伝子導入が必要であり、細胞本来の状態でない可能性がある。ま

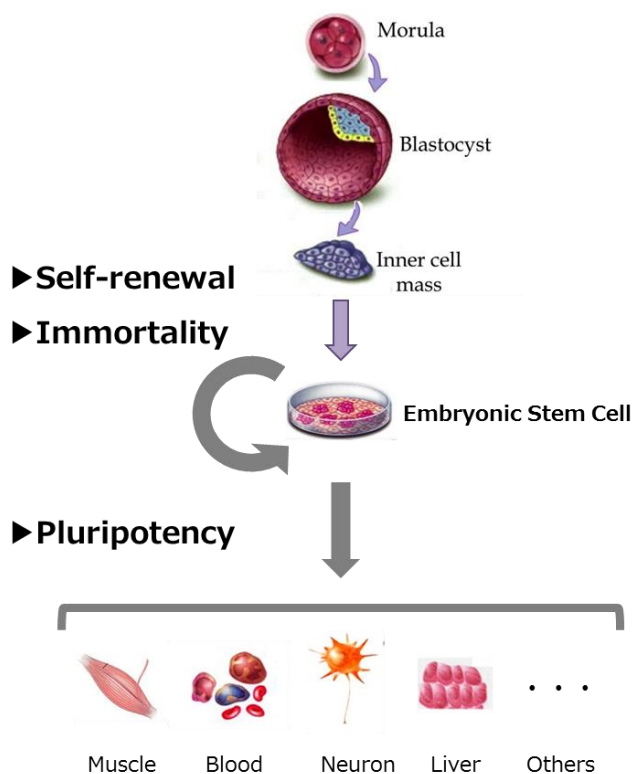


Figure 4. 1 Schematic illustration of the property of ES cells (adapted from M. Meregalli *et al.*, 'Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases', Stem Cells in Clinic and Research, InTech). ES cells have the capacity to differentiate into a wide range of cell types.

た、長時間測定においては蛍光プローブの退色や光毒性が懸念される。転写因子等の遺伝子発現解析では、様々な遺伝子を一度に定量できるが、細胞溶解が必要であり持続的測定は不可能である。マーカーとなる酵素、アルカリホスファターゼ（ALP）を利用した比色分析法では、細胞固定化や長い検出時間が必要である。一方で、ALP の電気化学的測定では、定量的かつ持続的に非侵襲的な測定が可能である[11, 12, 19-21]。当研究室では、局所レドックスサイクリングと電気化学チップデバイスを利用した方法 [11, 12, 19]や、円錐型ウェルと SECM を利用した方法[18, 20]、large scale integration（LSI）計測システムによる電気化学測定[21]により、ES 細胞胚葉体の分化評価を行ってきた。しかし、胚葉体は数百以上の細胞から成る集合体であり、単一細胞レベルでの評価は行われていなかった。

本章では、ES 細胞に過剰発現するアルカリホスファターゼ（ALP）を利用し、SECM を用いた低侵襲・単一細胞レベルでの分化状態評価方法について検討した。また、キャピラリーサクション法[13-15]を用いて SECM 測定後の細胞を回収し、ES 細胞の未分化マーカーである Oct3/4 の遺伝子発現解析結果と比較した。

4.2 実験

4.2.1 試薬

本章では以下の試薬を使用した。遺伝子発現解析に利用した試薬は 4.2.6 項にて別途記述した。

p-Aminophenylphosphate monosodium salt（PAPP）（LKT Laboratories Inc., St. Paul, U.S.A.）、all-trans-retinoic acid（ATRA）（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）、D-グルコース、KCl、NaCl、Na₂HPO₄・12H₂O、MgCl₂・6H₂O（和光純薬）、N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid（HEPES）（同仁化学）、N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid（CHES）（同仁化学）、Cell Counting Kit-8（同仁化学）、Double Staining Kit（Wako）、HEPES buffer（150 mM NaCl、4.2 mM KCl、2.7 mM MgCl₂、1.0 mM Na₂HPO₄、11.2 mM D-glucose、10 mM HEPES）
溶液調整には Milli-Q（Millipore, Billerica, USA）を利用した。

4.2.2 ES 細胞の培養と分化条件

マウス ES 細胞株（strain 129/SV, passage 11）は DS Pharma Biomedical. Co., Ltd. から購入した。ES 細胞は 1000 U/mL of mouse leukemia inhibitory factor (mLIF) と 1 mM β-mercaptoethanol を含む Stem Medium（DS Pharma Biomedical. Co., Ltd., Tokyo, Japan）

中で培養した。1 μ M ATRA を含み、mLIF を含まない培地中で ES 細胞を培養することで、神経系へと分化誘導した[6, 16]。

4.2.3 分化状態評価原理

Figure 4.2 に ALP 活性測定を利用した分化状態評価原理を示す。*p*-Aminophenylphosphate (PAPP) は、ALP により *p*-aminophenol (PAP) に分解される。電極上で PAP を検出する (0.3 V vs. Ag/AgCl) ことで ALP 活性を評価した。ES 細胞では ALP が過剰発現しているが、神経系へと分化誘導された細胞では ALP 発現量が低下するため、電流応答の減少が期待できる。SECM 測定には、直径 20 μ m の Pt ディスク型マイクロ電極を用いた。電極に 0.3 V vs. Ag/AgCl を印加し、電極を二次元走査もしくは、細胞直上を通過するように一次元走査 (1-line scan) した。0.3 V vs. Ag/AgCl は PAP を十分に酸化する電位である。

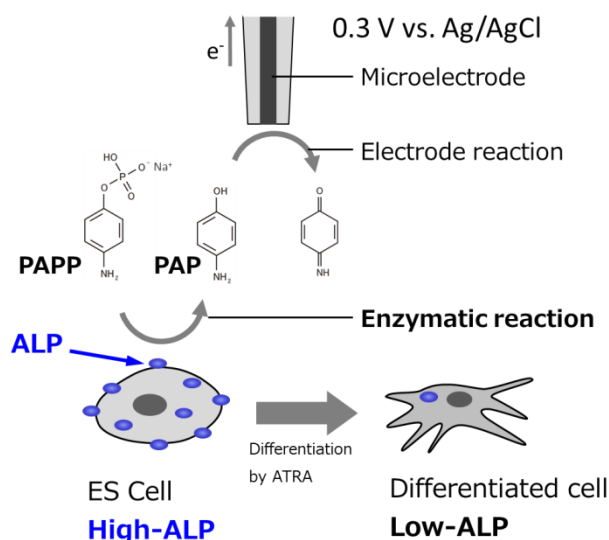


Figure 4. 2 Schematic diagrams of ALP detection of a single cell by using SECM showing distinct differences in ALP activity between an ES cell and a differentiated ES cell. 4.4 mM PAPP was added in the measurement solution.

4.2.4 毒性評価

Double Staining Kit (Wako) を用いて、測定溶液の毒性試験を行った。Calcein-AM /PIの二重染色によって細胞生死判別を行う。Calcein-AM は、フルオレセイン骨格のフェノール性水酸基がアセトキシメチル基やアセチル基で保護されることにより脂溶性が増加し、細胞膜を容易に透過することができる。エステル保護基により蛍光が抑制されているが、生細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けると、フルオレセイン本来の緑色蛍光を示す (励起490 nm、蛍光515 nm)。また加水分解を受けると脂溶性が減少し、細胞内からの溶出が抑えられる。Propidium Iodide (PI) は生細胞膜を透過できないが、死細胞では膜透過可能となり、DNA の二重らせん構造にインターカレートして赤色蛍光を発する (励起530 nm、蛍光580 nm)。結果的に、生細胞は黄緑色、死細胞は赤色の蛍光を示す。細胞の操作はクリーンベンチ内で行い、測定溶液の曝露時間はSECMイメージングの際にかかる時間と同等の30 minとした。以下に具体的な方法を示す。

- ① PBS 1 mLに対し、Calcein-AM 溶液を2 μ L、PI溶液を3 μ Lの割合で混合し染色液を調整した

- ② 細胞をPBSで3回洗浄し、測定溶液 (4.7 mM PAPP含有HEPES buffer、pH 9.5) に30 min 暴露した
- ③ PBSで3回洗浄後、染色液を添加し、遮光した状態で15分インキュベートした。
- ④ 位相差蛍光顕微鏡を用いて形状観察した。励起には水銀ランプを用いて、Calcein-AMの蛍光観察にはNIBAフィルタ (Ex:470-490 nm、Em:510-550 nm)、PIの蛍光観察にはWIGフィルタ (Ex:520-550 nm、Em:580 nm以上) を使用した。

4.2.5 キャピラリーサクション

キャピラリーサクション法により単一細胞を回収した。ガラスキャピラリーチューブ (O.D.: 1.0 mm; I.D.: 0.58 mm; Harvard Apparatus) を CO₂ レーザープレー (model P-2000, Sutter Instrument, CA, USA) により先端径は 3-10 μ m となるように細尖化した。ガラスキャピラリーへの細胞質ゾルや核酸の吸着を低減するために、作製したキャピラリーを 2 hr 室温窒素雰囲気化で、3,3,4,4,5,5,6,6-non-afluorohexyltrichlorosilane (Shinetsu Chem. Ind. Co., Ltd.) によりシラン化した。キャピラリーを 99.5%エタノールで洗浄し、乾燥させた後、クリーンベンチ内で UV ライトを少なくとも 30 min 照射し滅菌した。キャピラリーの操作はマニピュレーター (MNO-203; Narishige) により手動で行った。キャピラリーをシリコンチューブによりシリンジへと接続し、細胞へ接触させた後、シリンジを引いて細胞を回収した。全ての操作は光学顕微鏡で観察しながら行い、SECM 測定後に数分以内に細胞を回収した。

4.2.6 遺伝子発現解析

細胞サンプルからの cDNA 精製法、遺伝子発現解析法を概説する。Real-Time PCR では、PCR の 1 サイクルでターゲット遺伝子配列を 2 倍に増幅する原理に基づき、規定した量に到達するまでの PCR サイクル数 (Ct 値) を比較する。PCR の増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。

PCR 法では鋳型となる DNA にプライマーを結合させ、目的のプライマー配列に挟まれる DNA を、DNA ポリメラーゼによって増幅し特異的に検出する。RNA 検出の際には、逆転写により cDNA に変換し PCR 法を行う。これを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction、RT-PCR) と呼ぶ。リアルタイム PCR と逆転写ポリメラーゼ連鎖反応とを組み合わせる mRNA の定量を行う。

PCR 法では蛍光検出により DNA 量を測定する。蛍光検出法として、主にインターカレーション法、ハイブリダイゼーション法の 2 つが挙げられるが、本項で用いたインターカレーション法について説明する。SYBR Green は、インターカレーション法において一般的に用いられる蛍光プローブである。SYBR Green は二本鎖 DNA にインターカレートするため、

SYBR Green の蛍光強度を測定することで増幅した DNA 量を定量できる。また、PCR 反応の特異性は融解曲線分析により判別できる。SYBR Green の利用では蛍光プローブの設計が不要であり、安価で簡便であるが、プライマー二量体のような非特異的な二本鎖 DNA を検出してしまう可能性がある。融解曲線分析では反応液温度を徐々に上昇させ、SYBR Green の蛍光シグナルを検出する。通常、プライマー二量体がない場合、融解曲線のピークは1つであるが、目的 DNA 以外の増幅やプライマー二量体形成が起こるとピークが2つ以上となる。

本章ではLightCycler 1.5により測定を行った。Total RNA精製にはRNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いた。キットに付属しているプロトコルに従い mRNA 抽出を行った。精製した Total RNA は即座に次の逆転写反応により cDNA へと合成した。逆転写反応には、Quantitect Reverse Transcription キット (QIAGEN) を使用し、反応プロトコルに基づいて調製を行った。LightCycler 1.5 (Roche) による Real-Time PCR は、LightCycler Software (Roche) で行った。LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) によるインターカレータ法で行った。mRNA 量の相対定量は $\Delta \Delta C_t$ 法により行った (後述)。以下に各手順を示す。

■Total RNA 精製

【事前準備】

99.5%エタノール (Wako) と、キット付属の RNase free water を用いて、70%エタノールおよび 80%エタノールを調製した。1 mL の Buffer RLT (キット付属) あたり、10 μ L の 2-Mercaptoethanol (Wako) を添加して Buffer RLT 調製した。11 mL の Buffer RPE (キット付属) に、44 mL の 99.5%エタノールを添加して Buffer RPE を調製した。DNase I 粉末 (キット付属) に、フタをしたままテルモシリンジで水 550 μ L (キット付属) を添加し静かに転倒攪拌し DNase I を調製した。

【操作手順】

- ① 細胞サンプルの入っている 1.5 mL チューブに 75 μ L の Buffer RLT を添加した後、1 min ボルテックスして細胞を破砕した。この溶解液には、Guanidine Thiocyanate および 2-Mercaptoethanol が含まれており、RNase を不活性化する。
- ② 75 μ L の 70%エタノールを添加し、ピペッティングにより混和した。この操作により、スピнкаラム内のシリカメンブレンに RNA が結合する条件が調整される。
- ③ サンプル全量を 2 mL コレクションチューブの中にセットされている RNeasy MinElute Spin Column に添加した。チューブの蓋を静かに閉め、8000 \times g で 25 秒間遠心したのち、ろ液を取り除いた。
- ④ 350 μ L の Buffer RW1 をスピнкаラムに加え、8000 \times g で 25 秒間遠心したのち、ろ液を取り除いた。
- ⑤ 10 μ L の DNase I ストック溶液と 70 μ L の Buffer RDD を混和し、スピнкаラムに添加し室温で 15 分静置した。ゲノム DNA が分解される。

- ⑥ 350 μ L の Buffer RW1 をスピнкаラムに加え、8000 \times g で 25 秒間遠心したのち、ろ液を取り除いた。
- ⑦ 500 μ L の Buffer RPE をスピнкаラムに加え、8000 \times g で 25 秒間遠心したのち、ろ液を取り除いた。
- ⑧ 再度 500 μ L の 80%エタノールをスピнкаラムに加え、8000 \times g で 2 分間遠心したのち、ろ液を取り除いた。
- ⑨ スピнкаラムの蓋を開け、最大速度で 6 分間遠心した。
- ⑩ RNase free water 14 μ L をスピнкаラム・メンブレンの中央に添加し、蓋をして最大速度で 77 秒間遠心し、Total RNA を溶出させた。

■逆転写

【操作手順】

- ① 精製したテンプレートRNAに2 μ L gDNA wipeout Bufferを加え、42°Cで2 minインキュベートすることで、ゲノムDNAを除去した。
- ② ゲノムDNA除去後、4 μ L Quantiscript RT Buffer（緑色チューブ）、1 μ L RT Primer Mix（紫色チューブ）、1 μ L Quantiscript Reverse Transcriptase（赤色チューブ）を氷上で加え、混合した。
- ③ 42°Cで30 min（逆転写反応）、95°Cで3 min（逆転写酵素の失活）、サーマルサイクラーにて逆転写反応を行った。
- ④ 作製したcDNA（total 20 μ L）は-30°Cで保存した。

■Real-Time PCR

用いたプライマーはTable 4.1に示した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) および POU domain transcription factor (Oct3/4) のプライマーは Nihon Gene Research Laboratories, Inc から購入した。Gapdh はハウスキーピング遺伝子、Oct3/4 は未分化マーカーとして知られている。

【操作手順】

- ① 1 サンプルあたりの試薬量 Table 4.2 に示した。測定するサンプル数分の試薬を調製した。
- ② 調製した試薬を 18 μ L ずつ Real Time PCR 専用キャピラリーに添加した。
- ③ cDNA サンプルをキャピラリーに 2 μ L ずつ添加し、Light Cycler 専用の遠心分離機で遠心分離した。遠心後、液量が等しいかどうか確認した。
- ④ Light Cycler にキャピラリーをセットし、規定のプログラムで測定を行った。

Table 4.1		
遺伝子	Fw プライマー配列	Rv プライマー配列
Gapdh	5'-AAA TGG TGA AGG TCG GTG TG-3'	5'-AGG TCA ATG AAG GGG TCG TT-3'
Oct3/4	5'-TGT GGA CCT CAG GTT GGA CT -3'	5'-AGG TTC CCT CTG AGT TGC TT -3'

本実験で用いた Real-Time PCR は大きく次の 4 つのステップからなる。

①Denature

熱変性により、2 本鎖 DNA を 1 本鎖 DNA 化する。

②PCR

PCR 反応に伴い、プライマー特異的に目的配列の cDNA が増幅する。

その際に cDNA に結合する SYBR Green の蛍光強度をモニタリングする。

③Melting

温度を上げ、PCR 生成物の解離に伴う蛍光強度減少をモニタリングする。

PCR 生成物の解離が起こる温度から、目的生成物が得られているか判断する。

④Cooling

サンプルの冷却を行う。

Table 4.2	
試薬	量 [μL]
25 mM MgCl ₂	1.6
10 μM forward (Fw) primer,	1.0
10 μM reverse (Rv) primer	1.0
SYBR Green	2.0
Rnase free H ₂ O	12.4

それぞれの条件を Table 4.3~4.6 に示す。

Table 4.3 Denature 条件	
Cycles	1
Segment Number	1
Target Temperature [°C]	95
Incubation Time [min]	10
Temperature Transition Rate [°C /s]	20
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0
Step Delay [cycles]	0
Acquisition Mode	None

Table 4.4 PCR 条件			
Cycles	45		
Segment Number	1	2	3
Target Temperature [°C]	95	60	72
Incubation Time [min]	10	10	13
Temperature Transition Rate [°C /s]	20	20	20
Secondary Target Temperature [°C]	0	0	0
Step Size [°C]	0	0	0

Step Delay [cycles]	0	0	0
Acquisition Mode	None		

Table 4.5 Melting 条件			
Cycles	1		
Segment Number	1	2	3
Target Temperature [°C]	95	70	99
Incubation Time [min]	0	15	0
Temperature Transition Rate [°C /s]	20	20	0.1
Secondary Target Temperature [°C]	0	0	0
Step Size [°C]	0	0	0
Step Delay [cycles]	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Cont.

Table 4.6 Cooling 条件	
Cycles	1
Segment Number	1
Target Temperature [°C]	40
Incubation Time [min]	30
Temperature Transition Rate [°C /s]	20
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0
Step Delay [cycles]	0
Acquisition Mode	None

■相対定量（ $\Delta \Delta Ct$ 法）

本研究では、 $\Delta \Delta Ct$ 法により複数遺伝子の発現量を相対定量した。基準サンプルとのサイクル数の比較を行う手法である。 Ct 値とは、PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数である。Reference 遺伝子（house keeping）と、Reference サンプル A における目的遺伝子 X の Ct 値の差は、

$$\Delta Ct (A) = Ct \text{ 値 (Target 遺伝子) } - Ct \text{ 値 (Reference 遺伝子)}$$

となる。さらに、Target サンプル B についても $\Delta Ct (B)$ を算出し、サンプル A と B における ΔCt 値の差は、

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (B) - \Delta Ct (A) \text{ となる。}$$

サンプル間で遺伝子発現を比較する際に、Reference サンプル A を基準に Target サンプル B の発現量を示すと、

$$Y=2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

となり、Target 遺伝子 X は、A と比較して B では Y 倍発現しているということになる。この手法を用いて各種遺伝子の発現量を比較した。本章では、ハウスキーピング遺伝子である Gapdh を Reference 遺伝子とし、Target 遺伝子である Oct3/4 の相対定量を行った。

4.3 結果と考察

4.3.1 測定溶液の毒性評価

ALP の至適 pH は高いため、高 pH 溶液での測定は細胞へのダメージが懸念される。そこで、ES 細胞を培地 (stem medium) および測定溶液 (4.7 mM PAPP 含有 HEPES buffer、pH 9.5) に室温で 30 min 暴露し、生死判別染色した結果を Figure 4.3 に示す。ほとんどの細胞の生存を確認できたため、30 min 以内での SECM 測定では細胞への影響は小さいと考えた。

4.3.2 ES 細胞と分化細胞のイメージング

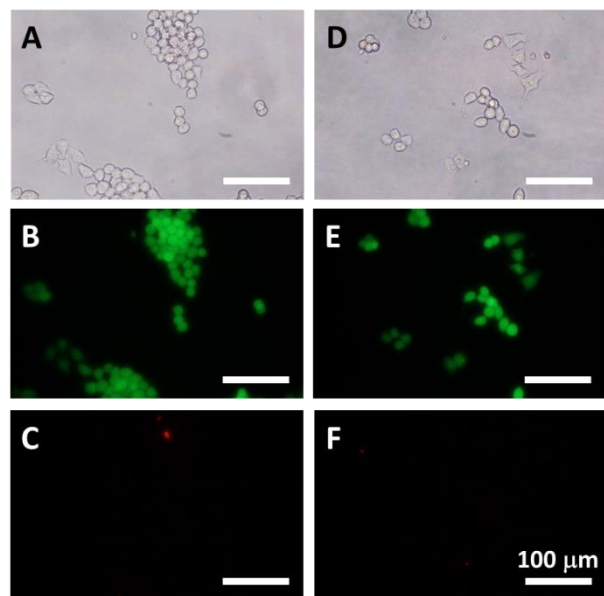


Figure 4. 3 Optical images (A, B) and cell viability assay of ES cells by using fluorescence detection (B, C, E, F). Calcein-AM: green: viable cell (B, E), PI: red: dead cell (C, F). ES cells were incubated in medium (A-C) or in measurement solution 30 min (D-F). Scale bar: 100 μ m.

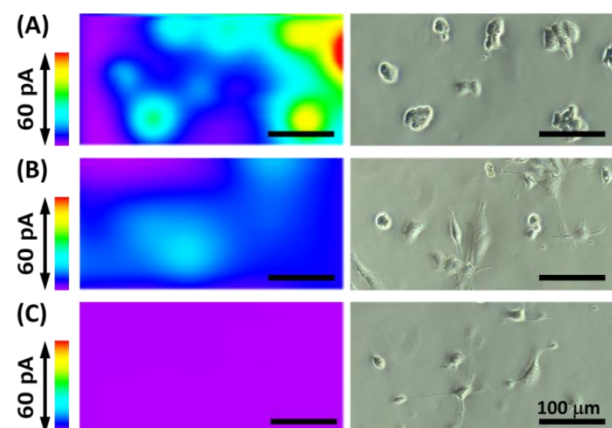


Figure 4. 4 SECM images (left) and optical images (right) of ES cells (A) and differentiated ES cells cultured with RA for 4 days (B) and 13 days (C). The electrode was set at 30 μ m above the substrate, and the scan rate was 10 μ m s⁻¹. The scan range was 400 \times 200 μ m², and the step size was 5 μ m. Scale bar: 100 μ m.

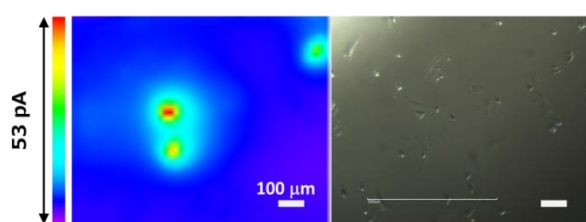


Figure 4. 5 SECM image (left) and optical image (right) of differentiated cells cultured with RA for 4 days. The measurements were performed in HEPES-based saline solution (pH 9.5) containing 4.7 mM PAPP. The electrode was set at 20 μm above the substrate, and the scan rate was 50 $\mu\text{m s}^{-1}$. The scan range was $1000 \times 1000 \mu\text{m}^2$, and the step size was 20 μm . Scale bar: 100 μm .

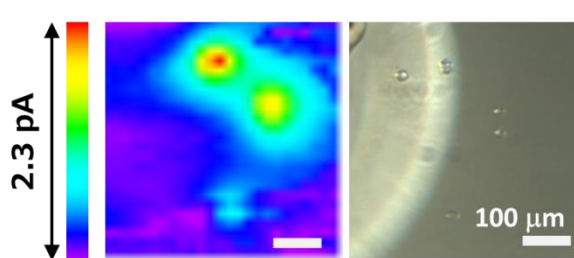


Figure 4. 6 SECM image (left) and optical image (right) of single ES cells. The measurements were performed in HEPES-based saline solution (pH 7.5) containing 4.7 mM PAPP. The electrode was set at 30 μm above the substrate, and the scan rate was 50 $\mu\text{m s}^{-1}$. The scan range was $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, and the step size was 20 μm . Scale bar: 100 μm .

Figure 4.4 に、ES 細胞と分化細胞の光学画像および SECM イメージング結果を示す。光学画像から、RTTA 分化誘導に伴い細胞の形態が変化していることが観測できた。ES 細胞では約 60 pA の電流応答が得られ、ES 細胞の ALP 活性測定に成功した。分化培養 4 日目では、僅かに電流応答が観測できたが、13 日目ではほとんど観測できなかった。これは、分化進行に伴い ALP 発現量が減少したためである。SECM によってノンラベルで分化進行状態を評価可能であることが示唆された。分化細胞では神経突起のような形態を観測できたが、細胞形状による分化状態判断は難しかった。特に分化 4 日目の細胞では、電流応答を強く観測できる細胞も確認できた (Figure 4.5)。これは、分化進行における個体差が大きいことを示している。また、pH 7.5 の測定溶液では電流応答は 10 分の 1 以下に減少した (Figure 4.6)。HEPES buffer は pH 9.5 に緩衝能をもたないため、緩衝域を pH 8.6-10.0 に持つ CHES buffer の利用が考えられる。CHES buffer pH 9.5 でも HEPES buffer pH 9.5 と同等の結果が得られたが (Figure 4.7)、細胞が途中で剥離するケースなどが見受けられた。これは CHES buffer の細胞毒性によるものと考えられ[18]、本研究では HEPES buffer pH 9.5 を測定溶液として採用した。

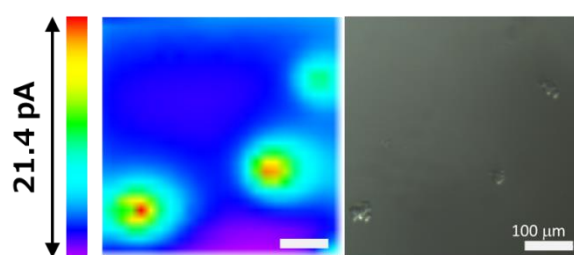


Figure 4. 7 SECM image (left) and optical image (right) of single ES cells. The measurements were performed in CHES-based saline solution (pH 9.5) containing 4.7 mM PAPP. The electrode was set at 30 μm above the

4.3.4 単一細胞レベル統計解析

単一細胞レベルでの 1-line scan 測定を行い、測定直後の細胞をキャピラリーサクショ
ンにより回収し遺伝子発現解析を行った。個々の細胞から放出される PAP の拡散層が重ならない
ように、1000 cells/dish の濃度で細胞を播種した。単一細胞レベルでの 1-line scan 結果を
Figure 4.8 に示す。ES 細胞と分化細胞 (day13) で明確な電流応答の差を観測できた。キャピ
ラリーサクションは光学顕微鏡で観察しながら行い、細胞回収を確認した (Figure 4.9)。遺伝
子発現解析では、ES 細胞マーカーとして知られる Oct3/4 の発現量を測定した。SECM による
電流応答 ΔI と遺伝子発現解析結果を比較した結果を Figure 4.10 に示す。分化進行に伴い ALP
由来の電流応答が減少した (day0: 29.4 pA, day4: 6.53 pA, day13: 0.491pA)。分化培養 4 日
目での応答電流値 ΔI は ES 細胞の 5 分の 1 程度となったが、これは ALP 比色分析による既往
の報告と一致していた[17]。また多細胞遺伝子解析結果とも一致していたが、SECM では分化
途中 (day4) 細胞での電流応答のばらつきが大きくなった。これは細胞間個体差を意味し、単
一細胞レベル測定では細胞不均一性評価が可能であることが示唆された。単一細胞遺伝子解析
では、検出限界を下回り分化過程評価が困難だった。遺伝子解析では細胞溶解を必要としたが、
SECM 測定では細胞が接着した状態で低侵襲に分化状態評価が可能だった。単一細胞レベル・
低侵襲な細胞状態評価に、SECM 利用が有効だと示唆された。

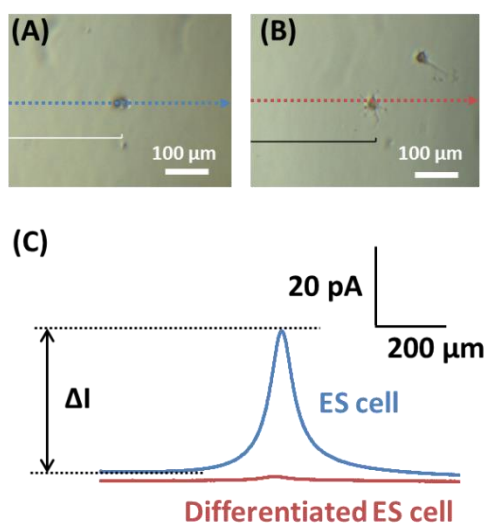


Figure 4. 8 Optical images of a single ES cell (A) and differentiated ES cell (B). SECM one-line scan of single ES cell in Panel A (blue line) and differentiated ES cell in Panel B (red line). The electrode was set at 30 μm above the substrate, and the scan rate was 10 μm s⁻¹. The scan range was 1,000 μm. Scale bar: 100 μm.

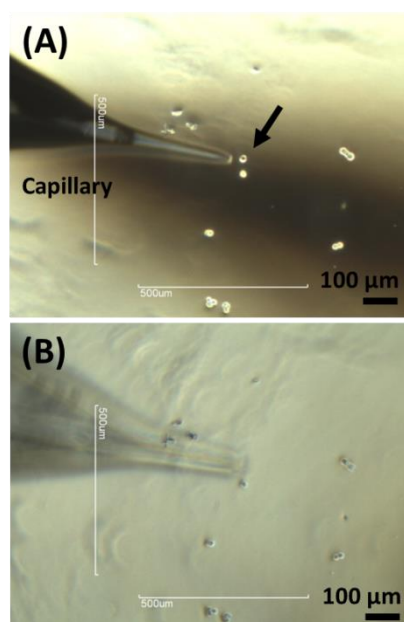


Figure 4. 9 Optical images of a single ES cell before (A) and after (B) capillary suction. Capillary is positioned left side of the cell. Arrow shows target cell.

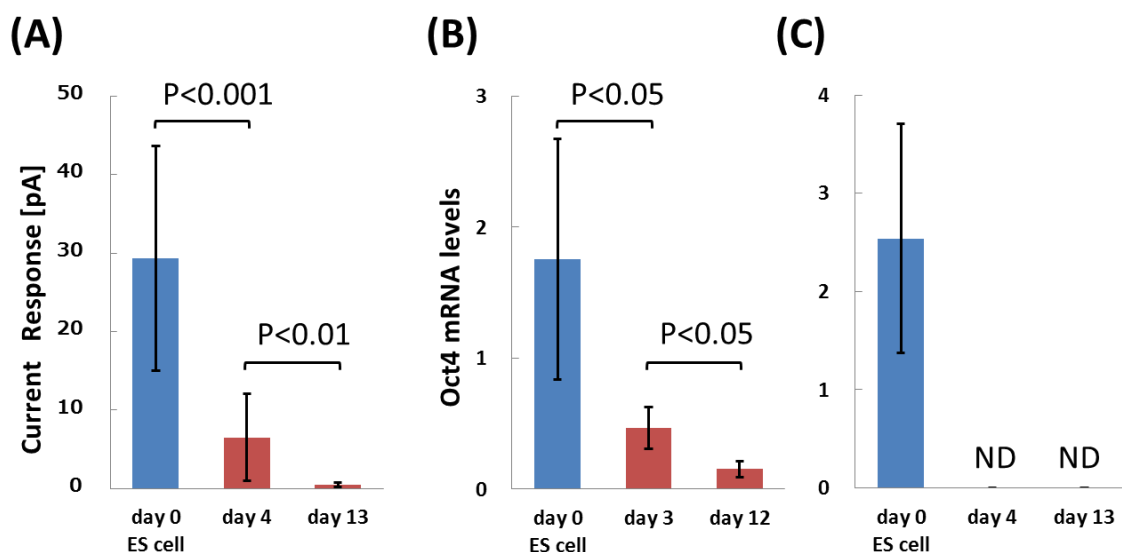


Figure 4.10 (A) ALP activities (ΔI) of single cells from SECM one-line scan. (B) Oct3/4 expression level of 5×10^5 cells. (C) Oct3/4 expression level in single cells suctioned after SECM measurements. ES cells were cultured with ATRA for differentiation. (A, C) Day 0 (ES cell): N = 12, Day 4: N = 8, day 13: N = 13. (B) Day 0 (ES cell): N = 5, day 3: N = 4, day 12: N = 5. ND means not detected. Error bars = SD. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

4.4 まとめ

SECMを用いたALP酵素活性測定により、単一ES細胞の分化状態を、non-labelで低侵襲・定量的に評価した。単一細胞近傍での電流応答が、ES細胞に比べ、ATRA添加培養した分化細胞では有意に減少し、また分化過程の細胞も判別可能だった。分化過程の細胞では、個体差による電流値の大きなばらつきを観測できた。これらのことは、形態観察等では定量化困難な分化状態評価を、SECMを用いることで、単一細胞レベル・低侵襲に定量評価できることを示唆している。他の分析方法を組み合わせる事により、分化誘導機構解明や分化制御研究、細胞膜上に局在する酵素の挙動や消失過程の解明などへの貢献が期待できる。

本章の内容の一部は、「Evaluation of the differentiation status of single embryonic stem cells using scanning electrochemical microscopy」という題目で、Chemical communicationsの学術論文として受理され掲載されている。(Chem. Commun., 49 (2013) 6498-6500.)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014008046>

参考文献

- [1] Y. Strulovici, P.L. Leopold, T.P. O'Connor, R.G. Pergolizzi, R.G. Crystal, Human embryonic stem cells and gene therapy, *Mol Ther*, 15 (2007) 850-866.
- [2] M. Meregalli, A. Farini, Y. Torrente, 'Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases', *Stem Cells in Clinic and Research*, InTech.
- [3] A.M. Wobus, Potential of embryonic stem cells, *Molecular aspects of medicine*, 22 (2001) 149-164.
- [4] G. Keller, Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine, *Genes & development*, 19 (2005) 1129-1155.
- [5] K. Guan, J. Rohwedel, A.M. Wobus, Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro, *Cytotechnology*, 30 (1999) 211-226.
- [6] M. Kim, A. Habiba, J.M. Doherty, J.C. Mills, R.W. Mercer, J.E. Huettner, Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid, *Developmental biology*, 328 (2009) 456-471.
- [7] A.M. Bratt-Leal, R.L. Carpenedo, T.C. McDevitt, Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation, *Biotechnology progress*, 25 (2009) 43-51.
- [8] D. Li, J.X. Zhou, F. Chowdhury, J.J. Cheng, N. Wang, F. Wang, Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells, *Regen. Med.*, 6 (2011) 229-240.
- [9] F. Guilak, D.M. Cohen, B.T. Estes, J.M. Gimble, W. Liedtke, C.S. Chen, Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix, *Cell Stem Cell*, 5 (2009) 17-26.
- [10] W.X. Zhao, X. Ji, F.F. Zhang, L. Li, L. Ma, Embryonic Stem Cell Markers, *Molecules*, 17 (2012) 6196-6236.
- [11] R. Obregon, Y. Horiguchi, T. Arai, S. Abe, Y.S. Zhou, RyosukeTakahashi, A. Hisada, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, A Pt layer/Pt disk electrode configuration to evaluate respiration and alkaline phosphatase activities of mouse embryoid bodies, *Talanta*, 94 (2012) 30-35.
- [12] K. Ino, T. Nishijo, T. Arai, Y. Kanno, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Local Redox-Cycling-Based Electrochemical Chip Device with Deep Microwells for Evaluation of Embryoid Bodies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51 (2012) 6648-6652.
- [13] Y. Nashimoto, Y. Takahashi, T. Yamakawa, Y.S. Torisawa, T. Yasukawa, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Shiku, H. Kambara, T. Matsue, Measurement of gene expression from single adherent cells and spheroids collected using fast electrical lysis, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 6823-6830.
- [14] H. Shiku, T. Yamakawa, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, Y.S. Torisawa, T. Yasukawa, T.

- Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, H. Kambara, T. Matsue, A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids, *Analytical biochemistry*, 385 (2009) 138-142.
- [15] H. Shiku, M. Takeda, T. Murata, U. Akiba, F. Hamada, T. Matsue, Development of electrochemical reporter assay using HeLa cells transfected with vector plasmids encoding various responsive elements, *Anal. Chim. Acta*, 640 (2009) 87-92.
- [16] R. Martin-Ibanez, N. Urban, S. Sergent-Tanguy, J.R. Pineda, N. Garrido-Clua, J. Alberch, J.M. Canals, Interplay of leukemia inhibitory factor and retinoic acid on neural differentiation of mouse embryonic stem cells, *J. Neurosci. Res.*, 85 (2007) 2686-2701.
- [17] Y. Kim, A. Deshpande, Y.S. Dai, J.J. Kim, A. Lindgren, A. Conway, A.T. Clark, D.T. Wong, Cyclin-dependent Kinase 2-associating Protein 1 Commits Murine Embryonic Stem Cell Differentiation through Retinoblastoma Protein Regulation, *J. Biol. Chem.*, 284 (2009) 23405-23414.
- [18] 新井俊陽、東北大学修士学位論文 (2014)
- [19] 西條拓、東北大学修士学位論文 (2013)
- [20] T. Arai, T. Nishijo, Y. Matsumae, Y. Zhou, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Noninvasive Measurement of Alkaline Phosphatase Activity in Embryoid Bodies and Coculture Spheroids with Scanning Electrochemical Microscopy, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 9647-9654.
- [21] M. Sen, K. Ino, K. Y. Inoue, T. Arai, T. Nishijo, A. Suda, R. Kunikata, H. Shiku, T. Matsue, LSI-based amperometric sensor for real-time monitoring of embryoid bodies, *Biosensors & Bioelectronics*, 48 (2013) 12-18.

第5章 SECMによる単一細胞レベル膜タンパク質検出

本章では、膜タンパク質である上皮成長因子受容体（EGFR）に酵素を修飾し、EGFR の定量検出を行った。

5.1 はじめに

上皮成長因子受容体（EGFR、Epidermal Growth Factor Receptor）は、最も盛んに研究が行われてきたチロシンキナーゼ型受容体である。リガンド（特定の受容体に特異的に結合する物質）の結合により活性化され、細胞内へと刺激が伝搬される（シグナル伝達）[1, 2]。EGFR（別名：ErbB1 もしくは Her1）は、分子量 170 kDa の膜貫通型受容体タンパク質である。EGFR、ErbB2（Her2）、ErbB3（Her3）、ErbB4（Her4）で構成される ErbB チロシンキナーゼ受容体ファミリーに属し、細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域の 3 つのドメインから構成される。細胞外領域にはリガンド結合部位（ligand-binding pocket）があり、上皮成長因子（EGF、Epidermal Growth Factor）などが結合すると、EGFR が二量体を形成する。そして、自己リン酸化により細胞内領域のチロシン残基がリン酸化され活性化すると、細胞内タンパク質が次々活性化されシグナルが伝達していく[5]。EGFR によって活性化される情報伝達経路には、Ras/Raf/MAPK 経路、ホスホリパーゼ C γ /プロテインキナーゼ C 経路、PI3K（フォスフォイノシトール 3 キナーゼ）/Akt 経路、Jak/STAT シグナル経路等[6, 7]があり、増殖・転移・接着・分化・アポトーシスに関与する[8, 9]。また、多くの癌細胞で EGFR の過剰発現や発現量の変化が見られ[10-14]、EGFR は抗癌剤のターゲットとしても多くの関心を集めている[8]。

抗原抗体反応を利用した蛍光測定により、簡便に EGFR 検出が可能である[15]。全反射蛍光顕微鏡による単一分子計測[16]や、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）現象を利用した測定[17, 18]などが EGF シグナル伝達の研究に利用されてきた。しかし、細胞が透明であるために、通常の蛍光測定では細胞表面に局在する EGFR のみの定量には適さない。細胞表面 EGFR の測定には、放射性物質を用いた手法[19-24]やフローサイトメトリーを用いた手法[25-27]、ナ

ノ粒子を利用した手法[28-33]などがある。放射性物質を用いた手法では、比較的正確に定量測定が可能だが、単一細胞での測定やリアルタイムでの EGFR 挙動追跡が困難であり、また放射性物質を取り扱うため危険である。1 章で述べたように、組織の機能を深く理解するためには、単一細胞レベルでの機能解析や経時的測定が必須である。フローサイトメトリーによる EGFR 測定では、抗原抗体反応を利用して蛍光プローブを EGFR に標識する。その後、細胞を剥離し、細胞懸濁液状態で個々の細胞を光学的に分析する。ハイスループットな単一細胞計測が可能であり、細胞の大きさや細胞内の複雑さも同時に分析できるが、細胞を懸濁化するため、接着性細胞では本来の細胞の状態での測定とは言えず、細胞剥離操作による影響も懸念される。また、放射性物質を用いた手法と同様に同一細胞における EGFR の経時測定が困難である。

SECM は単一細胞レベル・低侵襲・定量的・リアルタイムで電気化学活性分子を測定可能である。当研究室では酵素を利用した EGFR 電気化学的検出法を既に報告した[42-44]。細胞表面に発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) 酵素を標識し、酵素を SECM で検出することで、細胞表面に発現している EGFR の定量的評価を行った。しかしながら生細胞での測定においては、測定溶液の pH の影響、基質やメディエーターによる細胞への影響や膜透過性の影響、酵素標識方法や酵素/EGFR 複合体サイズの影響、内在性酵素の影響などが考えられた。そこで本章では、これらの影響を考慮し、よりシンプルな系での測定を目指した。また 6 章では、本章で確立した方法で EGFR の挙動追跡を行った。生細胞の測定では、細胞の増殖状況などにあわせて実験を行うことや、形態を変化させないために迅速に測定するなどの必要があり非効率的であると考えられる。そこで固定化した細胞を用いた。ヒト扁平上皮がん細胞株 (A431 細胞) では EGFR を過剰発現していることが、ヒト乳がん細胞株 (MCF-7 細胞) では EGFR がほとんど発現していないことが知られ[34]、本章では上記細胞を用いて実験を行った。

5.2 まとめ

本章では、GOx、ALP、カタラーゼを利用して、SECM による単一細胞レベル・低侵襲・定量的な EGFR 測定を行った。GOx を利用した場合、メディエーターを介した EGFR 検出は困難だったが、H₂O₂ の直接検出により測定可能だった。H₂O₂ 検出では基質が酸素とグルコースであるために、細胞への影響の低減が期待できる。ALP を利用した場合、基質である PAPP を添加することで EGFR 検出が可能だった。ALP は GOx に比べて高いターンオーバー数を有するため、Buffer を適切に選択すれば高い電流応答が得られた。また pH 7.4 での測定にも成功した。GOx と ALP による単一細胞レベル EGFR 検出結果から、定量的に抗体最適濃度を算出できた ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$)。カタラーゼを利用した場合、最も高い電流応答が期待できたが、基質として高濃度 H₂O₂ を利用する必要がある、生細胞への影響が懸念された。6 章では GOx と ALP を利用して EGFR 挙動追跡を行う。

現在、5 章・6 章を含めて、「SECM による単一細胞レベルでの、膜タンパク質内在化のリアルタイムモニタリング」に関する学術論文を執筆・投稿中である。

参考文献

- [1] K. Roepstorff, L. Grovdal, M. Grandal, M. Lerdrup, B. van Deurs, *Histochemistry and Cell Biology*, 129 (2008) 563-578.
- [2] A. Gschwind, O.M. Fischer, A. Ullrich, *Nature Reviews Cancer*, 4 (2004) 361-370.
- [3] G.P. Bienert, J.K. Schjoerring, T.P. Jahn, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758 (2006) 994-1003.
- [4] T. Yasukawa, I. Uchida, T. Matsue, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1369 (1998) 152-158.
- [5] A.B. Schreiber, T.A. Libermann, I. Lax, Y. Yarden, J. Schlessinger, *Journal of Biological Chemistry*, 258 (1983) 846-853.
- [6] A. Hirata, S. Ogawa, T. Kometani, T. Kuwano, S. Naito, M. Kuwano, M. Ono, *Cancer Research*, 62 (2002) 2554-2560.
- [7] E. Raymond, S. Faivre, J.P. Armand, *Drugs*, 60 (2000) 15-23.
- [8] N.E. Hynes, H.A. Lane, *Nature Reviews Cancer*, 5 (2005) 341-354.
- [9] Y. Yarden, M.X. Sliwkowski, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (2001) 127-137.
- [10] J.R.C. Sainsbury, J.R. Farndon, G.K. Needham, A.J. Malcolm, A.L. Harris, *Lancet*, 1 (1987) 1398-1402.
- [11] J.R.C. Sainsbury, A.J. Malcolm, D.R. Appleton, J.R. Farndon, A.L. Harris, *Journal of Clinical Pathology*, 38 (1985) 1225-1228.
- [12] J.R.C. Sainsbury, J.R. Farndon, A.L. Harris, G.V. Sherbet, *British Journal of Surgery*, 72 (1985) 186-188.
- [13] B. Ozanne, C.S. Richards, F. Hendler, D. Burns, B. Gusterson, *Journal of Pathology*, 149 (1986) 9-14.
- [14] N. Normanno, M.R. Maiello, A. De Luca, *Journal of Cellular Physiology*, 194 (2003) 13-19.
- [15] S. Bhattacharyya, R. Bhattacharya, S. Curley, M.A. McNiven, P. Mukherjee, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010) 14541-14546.
- [16] Y. Sako, S. Minoguchi, T. Yanagida, *Nature Cell Biology*, 2 (2000) 168-172.
- [17] A. Sorkin, M. McClure, F.T. Huang, R. Carter, *Current Biology*, 10 (2000) 1395-1398.
- [18] A.H.A. Clayton, M.L. Tavarnesi, T.G. Johns, *Biochemistry*, 46 (2007) 4589-4597.
- [19] H. Masui, L. Castro, J. Mendelsohn, *Journal of Cell Biology*, 120 (1993) 85-93.
- [20] H. Sunada, B.E. Magun, J. Mendelsohn, C.L. Macleod, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (1986) 3825-3829.
- [21] T. Kawamoto, J.D. Sato, A. Le, J. Polikoff, G.H. Sato, J. Mendelsohn, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80 (1983) 1337-1341.
- [22] M.M. Wrann, C.F. Fox, *Journal of Biological Chemistry*, 254 (1979) 8083-8086.

- [23] M. Das, T. Miyakawa, C.F. Fox, R.M. Pruss, A. Aharonov, H.R. Herschman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (1977) 2790-2794.
- [24] M.L. Jaramillo, Z. Leon, S. Grothe, B. Paul-Roc, A. Abulrob, M.O. McCourt, *Experimental Cell Research*, 312 (2006) 2778-2790.
- [25] R. Kimmig, D. Pfeiffer, H. Landsmann, H. Hepp, *International Journal of Cancer*, 74 (1997) 365-373.
- [26] I. Brotherick, T.W.J. Lennard, S.E. Wilkinson, S. Cook, B. Angus, B.K. Shenton, *Cytometry*, 16 (1994) 262-269.
- [27] J.G. Lopez, S.J. Chew, H.W. Thompson, J.S. Malter, M.S. Insler, R.W. Beuerman, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33 (1992) 2053-2062.
- [28] J. Wang, S.V. Boriskina, H.Y. Wang, B.M. Reinhard, *Acs Nano*, 5 (2011) 6619-6628.
- [29] I.H. El-Sayed, X.H. Huang, M.A. El-Sayed, *Cancer Letters*, 239 (2006) 129-135.
- [30] K. Sokolov, M. Follen, J. Aaron, I. Pavlova, A. Malpica, R. Lotan, R. Richards-Kortum, *Cancer Research*, 63 (2003) 1999-2004.
- [31] J. Wang, X. Yu, S.V. Boriskina, B.M. Reinhard, *Nano Lett*, 12 (2012) 3231-3237.
- [32] J. Aaron, K. Travis, N. Harrison, K. Sokolov, *Nano Letters*, 9 (2009) 3612-3618.
- [33] X.H. Huang, I.H. El-Sayed, W. Qian, M.A. El-Sayed, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 2115-2120.
- [34] C. Berger, I.H. Madshus, E. Stang, *Experimental Cell Research*, 318 (2012) 2578-2591.
- [35] N.I. Goldstein, M. Prewett, K. Zuklys, P. Rockwell, J. Mendelsohn, *Clinical Cancer Research*, 1 (1995) 1311-1318.
- [36] S. Li, K.R. Schmitz, P.D. Jeffrey, J.J. Wiltzius, P. Kussie, K.M. Ferguson, *Cancer Cell*, 7 (2005) 301-311.
- [37] B. Vincenzi, G. Schiavon, M. Silletta, D. Santini, G. Tonini, *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 68 (2008) 93-106.
- [38] H.W. Waksal, *Cancer Metastasis Rev*, 18 (1999) 427-436.
- [39] C. Hooijmaijers, J.Y. Rhee, K.J. Kwak, G.C. Chung, T. Horie, M. Katsuhara, H. Kang, *Journal of Plant Research*, 125 (2012) 147-153.
- [40] T. Kobayashi, J.M. Robinson, *Journal of Cell Biology*, 113 (1991) 743-756.
- [41] R.G. Parton, B. Joggerst, K. Simons, *Journal of Cell Biology*, 127 (1994) 1199-1215.
- [42] 宮本健史、東北大学修士学位論文 (2008)
- [43] 高橋康史、東北大学博士学位論文 (2008)
- [44] Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 2785-2790.

第6章 膜タンパク質内在化のリアルタイムモニタリング

本章では、5章で確立した EGFR 測定法を利用し、EGFR 内在化の経時測定を行った。

6.1 はじめに

エンドサイトーシス（Endocytosis、単に内在化（internalization）とも言う）とは、細胞が細胞外の物質を取り込む機構の一つである。ガスや H_2O は拡散により受動的に細胞膜を透過可能だが、細胞膜透過性を持たない極性を持つ分子や大きな物質は、エンドサイトーシスにより細胞内へ輸送される。電子顕微鏡の登場により、ナノレベルでの形状（構造）情報が手に入るようになり、細胞膜にサッカーボール状構造を有す陥没構造が発見された。その後、その実態であるクラスリンが同定され[4]、エンドサイトーシスの分子レベルでの理解が急速に進んだ。エンドサイトーシスの機能は、栄養成分の摂取・シグナル伝達・細胞形状変化などが知られ、ウィルス感染ルートにも利用される。現在、内在化経路はクラスリンやダイナミンなどの特定のタンパク質や脂質に依存するかどうかで分類されている[5]。現在までに知られている内在化経路を Figure 6.1 に示す[3]。内在化の初期段階に出芽構造を取ることが特徴であり、細胞膜の屈曲に必要なタンパク質等が明らかになりつつある。ある分子は、特定経路からのみ内在化することが知られているが、大半の分子では複数の経路を利用する。しかしながら、どのように経路が選択されているかはわかっていないが多い。内在化経路の特定には、電子顕微鏡や蛍光測定と、毒素・抗体・阻害剤・遺伝子変異サンプル・ノックアウトサンプルを併用して行われてきた。電子顕微鏡による測定では、高解像形状測定が可能である。免疫電子顕微鏡法により特定物質の検出もできる。しかし、3次元観察が難しく、細胞を固定化するため経時観察ができない。また、細胞固定化により本来の細胞状態でない観察をしている可能性がある。一方蛍光測定では、特定物質を三次元的に測定が可能だが、プローブ開発が必要であり、分解能の限界（光の回折限界）や退色の問題がある。超解像顕微鏡の発達により解像度は大幅に上昇しているが、1つのイメージを取得するのに時間がかかり、生細胞での長時間経時測定には適さない。また、生細胞の測定では、遺伝子導入や光毒性による影響も懸念される。

Endocytic mechanisms	Morphology	Implicated cargoes	Small G-protein dependence	Dynamin Implicated	Other proteins implicated
Clathrin mediated	Vesicular	RTKs, GPCRs, Transferrin receptor, anthrax toxin	Rabs, Arf6 implicated	Well established	Clathrin, AP2, epsin, SNX9, Synaptojanin, actin, amphipysin, plus many others
Caveolae-/caveolin1-dependent	Vesicular/tubulovesicular	CTxB, SV40, GPI-linked proteins	Unclear (caveolins may regulate cdc42 activity)	Some evidence	Caveolins, PTRF, src, PKC, actin (many signaling proteins localize to these sites)
CLIC/GEEC	Tubular/ring like	Fluid phase markers, CTxB, GPI-linked proteins	Cdc42, Arf1	Not as yet	ARHGAP10, actin, GRAF1, other GRAFs
IL2Rβ pathway	Vesicular?	IL2R β , FC ϵ RI, Kir3.4, yc-cytokine receptor	RhoA, Rac1	Implicated	PAK1, PAK2
Arf6 dependent	Vesicular/tubular	MHC class I proteins, CD59, carboxypeptidase E	Arf6	Not as yet	Unclear as yet
Flotillin dependent	Vesicular	CTxB, CD59, proteoglycans	Unclear	Implicated but unclear	Flotillin 1 and 2
Phagocytosis	Cargo shaped	Pathogens, apoptotic remnants	Arf6/cdc42/rac1/rhoA (depending on type)	Implicated	Actin, IQGAP1, amphipysin1, Rho kinase, adhesion proteins
Macropinocytosis	Highly ruffled	Fluid phase markers, RTKs	Rac1	Not as yet (CtBP1/BARS implicated in scission)	Actin, PAK1, PI3K, Ras, Src, HDAC6
Circular dorsal ruffles	Highly ruffled	Fluid phase markers, RTKs	Unclear	Implicated	Cortactin, actin
Entosis	Cell shaped	Matrix-deligated cells	RhoA	Not as yet	Adherens junction

Figure 6. 1 Internalization pathways[3].

Figure 6.2にEGFR内在化の模式図を示す[2]。EGFRは通常、細胞膜上にモノマーで存在する。EGFなどのリガンドの結合により、二量体化し、キナーゼの活性化と自己リン酸化が起こる。活性化したEGFRは、細胞膜上のクラスリンコートピット（CCP）から内在化し、初期エンドソーム（EE）に結合する。EGFRは細胞表面へトリサイクルされるか、初期エンドソーム内の小胞（ILV）に取り込まれ、リソソーム（Lys）に運搬されて分解される。EGFRは通常クラスリンを介して内在化するが[5-9]、高濃度のEGFでは違った経路（カベオラ caveolae-/caveolin1-dependent endocytosis）により内在化することが指摘されている[10-12]。しかしながら、高濃度のEGFに暴露したとき、カベオラの運動性がないという報告もあり[8]、まだ未解明なことも多い。また225抗体の内在

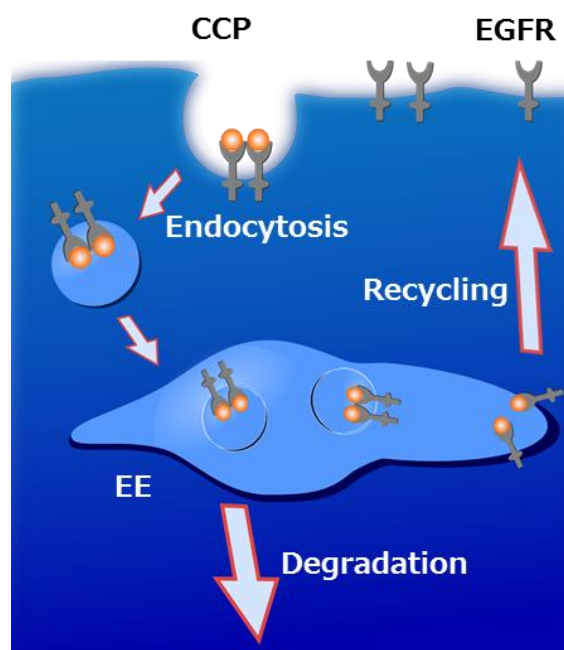


Figure 6. 2 Schematic illustration of EGFR internalization by clathrin coated pits (CCP). EGFR is transported to early endosomes (EE), followed by recycling or degradation [2].

化は、EGFR に比べて遅く、またキナーゼ活性も必要としないため、異なる内在化経路である可能性が示唆されている[13-16]。225 抗体に二次抗体やサイズの異なる Au ナノ粒子を標識すると、内在化経路が変化することが報告されており、分子サイズによる内在化経路の変化や細胞種による違いが指摘されている[17, 18]。また、Au ナノ粒子単体での内在化でも、粒子サイズや形状、細胞種によって内在化経路が変化することが報告されている[19]。225 抗体に関しては、実際に抗がん剤として利用されているにも関わらず、内在化のメカニズムなどはわかっていないことが多い現状である。

細胞種による差異や EGFR に結合する物質など、様々な条件での内在化メカニズムを正確に比較するためには、内在化した EGFR の定量的評価が必要である。5 章で述べたように、細胞が透明であるために、通常の蛍光測定では細胞表面に局在する EGFR の定量には適さない。本章では、単一細胞レベル・低侵襲・定量的・リアルタイムな EGFR 定量測定が可能な SECM を用いて、内在化に伴う細胞表面 EGFR 量変化をモニタリングした。

6.2 まとめ

本章では、単一細胞レベル・低侵襲・定量的・リアルタイムな EGFR 定量測定が可能な SECM を用いて、細胞表面 EGFR の内在化モニタリングを行った。蛍光測定結果から、EGF による内在化は数分で起きるが、225 抗体による内在化は 60 min 程度で起きることを確認した。GOx を用いた測定ではメディエーターを用いずに測定可能だが、Pt 電極では電流値減衰し H₂O₂ モニタリングが難しかった。また、酵素修飾電極 (Os-HRP/CFE) により H₂O₂ 測定を試みたが、感度が不足し EGFR 検出ができなかった。Pt 電極活性の回復や、HRP 修飾量を増加させることでこれらの問題点を解決できる可能性がある。ALP を用いた測定では、生細胞において内在化に伴う 10~20%程度の電流応答減少を観察することができた。SECM による膜タンパク質内在化の定量測定が可能であると示唆された。本手法と阻害剤などを組み合わせることで、内在化経路の解明に貢献が期待できる。

現在、5 章・6 章を含めて、「SECM による単一細胞レベルでの、膜タンパク質内在化のリアルタイムモニタリング」に関する学術論文を執筆・投稿中である。

参考文献

- [1] Z.Q. Gao, G. Binyamin, H.H. Kim, S.C. Barton, Y.C. Zhang, A. Heller, *Angewandte Chemie-International Edition*, 41 (2002) 810-+.
- [2] K. Roepstorff, L. Grovdal, M. Grandal, M. Lerdrup, B. van Deurs, *Histochemistry and Cell Biology*, 129 (2008) 563-578.
- [3] G.J. Doherty, H.T. McMahon, *Annu Rev Biochem*, 78 (2009) 857-902.
- [4] B.M. Pearse, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73 (1976) 1255-1259.
- [5] S. Mayor, R.E. Pagano, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (2007) 603-612.
- [6] J.A. Hanover, M.C. Willingham, I. Pastan, *Cell*, 39 (1984) 283-293.
- [7] J.L. Carpentier, P. Gorden, R.G.W. Anderson, J.L. Goldstein, M.S. Brown, S. Cohen, L. Orci, *Journal of Cell Biology*, 95 (1982) 73-77.
- [8] M. Kazazic, K. Roepstorff, L.E. Johannessen, N.M. Pedersen, B. van Deurs, E. Stang, I.H. Madshus, *Traffic*, 7 (2006) 1518-1527.
- [9] A. Motley, N.A. Bright, M.N.J. Seaman, M.S. Robinson, *Journal of Cell Biology*, 162 (2003) 909-918.
- [10] B.P. Ceresa, *Int J Mol Sci*, 14 (2012) 72-87.
- [11] L.K. Goh, A. Sorkin, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (2013).
- [12] J.W. Xiao, *Journal of Contemporary China*, 17 (2008) 513-528.
- [13] H.J. Liao, G. Carpenter, *Cancer Res*, 69 (2009) 6179-6183.
- [14] S. Bhattacharyya, R. Bhattacharya, S. Curley, M.A. McNiven, P. Mukherjee, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010) 14541-14546.
- [15] M.L. Jaramillo, Z. Leon, S. Grothe, B. Paul-Roc, A. Abulrob, M.O. McCourt, *Experimental Cell Research*, 312 (2006) 2778-2790.
- [16] H.W. Waksal, *Cancer Metastasis Rev*, 18 (1999) 427-436.
- [17] C. Berger, I.H. Madshus, E. Stang, *Experimental Cell Research*, 318 (2012) 2578-2591.
- [18] S. Bhattacharyya, R.D. Singh, R. Pagano, J.D. Robertson, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Angewandte Chemie-International Edition*, 51 (2012) 1563-1567.
- [19] L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 1258-1288.
- [20] R.B. Lichtner, V. Schirrmacher, *J Cell Physiol*, 144 (1990) 303-312.
- [21] Z. Lu, S. Ghosh, Z. Wang, T. Hunter, *Cancer Cell*, 4 (2003) 499-515.
- [22] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochimica Acta*, 45 (2000) 3573-3579.
- [23] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochimica Acta*, 44 (1999) 4573-4582.
- [24] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochimica Acta*, 44 (1999) 2455-2462.
- [25] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochimica Acta*, 43 (1998) 579-588.
- [26] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochimica Acta*, 43 (1998) 2015-2024.
- [27] W. Chen, S. Cai, Q.Q. Ren, W. Wen, Y.D. Zhao, *Analyst*, 137 (2012) 49-58.

- [28] J.G. Roberts, K.L. Hamilton, L.A. Sombers, *Analyst*, 136 (2011) 3550-3556.
- [29] S.A.G. Evans, J.M. Elliott, L.M. Andrews, P.N. Bartlett, P.J. Doyle, G. Denuault, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 1322-1326.
- [30] M.R. Guascito, E. Filippo, C. Malitesta, D. Manno, A. Serra, A. Turco, *Biosensors & Bioelectronics*, 24 (2008) 1057-1063.
- [31] A.L. Sanford, S.W. Morton, K.L. Whitehouse, H.M. Oara, L.Z. Lugo-Morales, J.G. Roberts, L.A. Sombers, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 5205-5210.
- [32] C. Karuppiah, S. Palanisamy, S.M. Chen, V. Veeramani, P. Periakaruppan, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 196 (2014) 450-456.

第 7 章 総括

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、他の分析技術にはない単一細胞レベル・低侵襲・定量的・経時的に測定可能な性質を有し、特に生体試料分析においては、生体反応を単一細胞レベル・リアルタイムで定量分析できるため、生命現象解明への貢献が期待できる。本論文では、SECM により細胞内および細胞膜タンパク質の単一細胞レベル・経時的な定量評価を行った。第 3 章では細胞内酵素活性、第 4 章では細胞分解状態評価、第 5 章と第 6 章では細胞膜タンパク質の検出と内在化モニタリングを行った。

第 1 章 序章

本研究の中心となる SECM に関して、基本原理の概説と生体試料測定への応用例を記し、本研究の目的について述べた。

第 2 章 実験

本研究で使用した電極の作製方法、電気化学測定装置、細胞とその操作方法など、全ての章で共通した実験操作について記載した。

第 3 章 二種のメディエーターを用いた単一細胞内酵素活性モニタリング

細胞の代謝活性の指標と成り得る細胞内酵素活性を、細胞膜透過性を有すメディエーターと、膜透過性を持たないメディエーターを利用し、単一細胞レベル・定量的・経時的に評価した。またメディエーターによる細胞への影響を調査し、最適濃度条件を採用することで長時間測定を可能とした。細胞近傍でのみ NQO 活性に由来する電流応答を得ることができ、単一細胞からのメナジオン還元体放出量を算出できた。また NQO 活性の経時測定にも成功した。

第4章 SECMによる単一ES細胞の分化状態評価

SECMを用いた酵素活性測定により、単一ES細胞の分化状態を、non-labelで低侵襲・定量的に評価した。ES細胞に過剰発現する酵素の基質を添加し、生成物を電極で検出した。単一細胞近傍での電流応答が、ES細胞に比べて分化細胞では有意に減少し、また分化過程の細胞も判別可能だった。形態観察では定量化困難な分化状態評価を、SECMを用いることで、単一細胞レベル・低侵襲に定量評価できた。

第5章 SECMによる単一細胞レベル膜タンパク質検出

SECMによる単一細胞レベル・低侵襲・定量的なEGFR測定を行った。酵素を修飾し、酵素反応の基質や生成物を検出することで、EGFRの定量測定を行った。単一細胞レベルEGFR検出結果から、定量的な抗体濃度の最適化を行った。3種の酵素とメディエーターの利用について検討し、メディエーターの膜透過性も検討した。

第6章 膜タンパク質内在化のリアルタイムモニタリング

膜タンパク質内在化の単一細胞レベル・定量的・経時的評価を目的とし、5章で確立した手法によりEGFR内在化の経時測定を行った。生細胞において内在化に伴う約20%の電流応答減少を観察することができた。本手法と阻害剤などを組み合わせることで、内在化経路の解明に貢献が期待できる。

第7章 総括

7章では本研究を総括した。

謝辞

本研究は東北大学大学院環境科学研究科末永研究室において行われたものである。研究テーマの設定から本論文の完成に至るまで、終始一貫した御指導、御鞭撻を頂きました末永智一教授に心より深く感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたりご多忙の中、貴重なご助言を賜りました魚住信之教授、壹岐伸彦教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を進める上で、深い見識をもとに的確なご指導をいただきました珠玖仁准教授に心より感謝申し上げます

研究方針やデータ解析、発表等の資料作成など、様々な知識や実験指針をご指導賜りました高橋康史助教に心から深くお礼申し上げます。

様々な研究に関する知見をはじめとして、普段の生活の場面でも助言を頂いた熊谷明哉助教、伊野浩介助教、井上久美講師に心より感謝申し上げます。

研究室生活において、様々な討論を行ったムスタファ博士に深く感謝申し上げます。

日常の研究室生活において様々な場面でお世話になった、沖知子さん、堀口佳子さん、上田麻衣子さんをはじめとするスタッフの方々に深く感謝申し上げます。

研究室に配属された当初から、研究室での実験や、研究室での生活について優しく御指導いただいた小沢文智博士に深く感謝いたします。

研究室の同期のドクターとしてともに研究に励んだ高野真一郎さん、梨本裕司さん、周縁殊さんに深く感謝します。

同じチームとして共に苦楽を分かち合った、伊藤小町さん、王雄偉さん、小牧弘和さん、井田大貴さん、猪又宏貴さん、西坂篤さん、小笠原航汰、渡邊徹弥さんに深く感謝いたします。

研究室で同じ時間を共有し、励まし合い、笑い合い、助け合った、後輩たちに深く感謝します。

そして、ここまで育てていただき、経済的にも、精神的にも支え、励ましてくれた両親と家族に心より深く感謝いたします。

2015 年 1 月 20 日