

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4517074号
(P4517074)

(45) 発行日 平成22年8月4日(2010.8.4)

(24) 登録日 平成22年5月28日(2010.5.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/483 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	G O 1 N 33/483

請求項の数 6 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-64714 (P2005-64714)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成17年3月9日(2005.3.9)		独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号	特開2006-246731 (P2006-246731A)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日	平成18年9月21日(2006.9.21)	(72) 発明者	中村 史
審査請求日	平成19年2月13日(2007.2.13)		兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号
			独立行政法人産業技術総合研究所関西センター尼崎事業所内
		(72) 発明者	小幡谷 育夫
			兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号
			独立行政法人産業技術総合研究所関西センター尼崎事業所内
		(72) 発明者	中村 徳幸
			兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号
			独立行政法人産業技術総合研究所関西センター尼崎事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫力学測定による生細胞タンパク質の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内タンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料であって、前記細胞内タンパク質抗原が、細胞骨格タンパク質であり、かつ、前記抗体が、針状材料の引き抜き時にかかる力を測定出来るものであることを特徴とする、細胞挿入用針状材料。

【請求項2】

請求項1に記載の細胞挿入用針状材料を細胞内に挿入することを特徴とする、骨格タンパク質と抗体を相互作用させる方法。

【請求項3】

請求項1に記載の細胞挿入用針状材料を細胞内に挿入して抗原抗体複合体を生じさせ、該針状材料を抜き出す際に該針状材料にかかる力を測定することを特徴とする、細胞内の細胞骨格タンパク質を力学的に検出する方法。

【請求項4】

請求項1に記載の細胞挿入用針状材料を細胞内に挿入して抗原抗体複合体を生じさせ、該針状材料を抜き出す際に該針状材料にかかる力を測定し、得られる測定値に基づき細胞内の前記細胞骨格タンパク質量を定量する方法。

【請求項5】

請求項1に記載の細胞挿入用針状材料を細胞内に挿入して抗原抗体反応を生じさせ、該針状材料を抜き出す際に該針状材料にかかる力を測定し、得られる測定値に基づき細胞の種類を判別する方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の細胞挿入用針状材料、該針状材料にかかる力を検出する手段、検出された力学情報に基づき細胞の種類を分析する手段、細胞の種類ごとに細胞の種類を選別する手段を備えたセルソーター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内もしくは細胞間のタンパク質に関する情報を得、これにより、細胞内タンパク質の定量あるいは細胞の種類を判別する方法、並びにセルソーターに関する。

【背景技術】

【0002】

細胞を識別、判別する方法として、免疫による方法が従来法である。細胞膜表面に提示されたタンパク質をマーカーにした抗体を用い、セルソーターなどにより細胞を選別する方法は確立されているが、細胞の内部のタンパク質をマーカーとした場合には、生きたままの細胞を抗体で識別することは出来ない。

【0003】

細胞内に物質を導入する方法として、遺伝子を固定化した針状物を細胞内に挿入し、細胞の動態変化をリアルタイムで観察する技術が知られている（特許文献 1）

しかしながら、特許文献 1 では細胞内での外来遺伝子発現の影響を見ることができ、細胞の種類を判別することはできない。

【特許文献 1】特開 2003-325161

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、細胞が生きたままで細胞内のタンパク質を検出ないし定量し、あるいは、細胞の識別ないし選別を行うことを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、以下の発明に関する。

1. 細胞内または細胞間タンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料。
2. 細胞内または細胞間タンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料を細胞内或いは組織の細胞間隙に挿入することを特徴とする、該細胞内タンパク質抗原と該抗体を相互作用させる方法。
3. 細胞内または細胞間で局在化されたタンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料を細胞内または組織の細胞間に挿入して抗原抗体複合体を生じさせ、該針状材料を抜き出す際に該針状材料にかかる力を測定することを特徴とする細胞内または細胞間の抗原タンパク質を力学的に検出する方法。
4. 細胞内または細胞間で局在化されたタンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料を細胞内または細胞間に挿入して抗原抗体複合体を生じさせ、該針状材料を抜き出す際に該針状材料にかかる力を測定し、得られる測定値に基づき前記細胞内または細胞間タンパク質量を定量する方法。
5. 細胞内で局在化されたタンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料を細胞内に挿入して抗原抗体反応を生じさせ、該針状材料を抜き出す際に該針状材料にかかる力を測定し、得られる測定値に基づき細胞の種類を判別する方法。
6. 細胞内タンパク質抗原に対する抗体を固定化した細胞挿入用針状材料、外信状材料にかかる力を検出する手段、検出された力学情報に基づき細胞の種類を分析する手段、細胞の種類ごとに細胞の種類を選別する手段を備えたセルソーター。

【発明の効果】

【0006】

10

20

30

40

50

本発明によれば、生きたままの細胞において、細胞内または細胞間タンパク質の定量を行うことができる。また、針状材料にかかる力（力学情報）に基づき、細胞内タンパク質の定量、細胞の識別及び細胞の選別を生きた細胞において行うことができる。

【0007】

従来のセルソーターと異なり、細胞内のタンパク質情報に基づき細胞選別が可能であるので、全ての細胞の選別が可能であり、例えば幹細胞などでは、将来どのように分化するかの情報も含めて精密な選別が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明で使用する針状材料の形状は、細長く、先端及び幅が十分小さく、細胞に挿入した場合に細胞に実質的にダメージをほとんど或いは全く与えない限り特に限定されないが、例えば円筒形、円錐形、筒状（角柱状を含む）、角錐形等の形状が例示される。先端が鋭利である必要はない。針状材料は、円柱形の方が細胞に対する侵襲性がより低く、導入効率を高められることから好ましい。また、針状材料のアスペクト比は、5：1～50：1程度、好ましくは10：1～40：1である。

【0009】

針状材料のサイズ（円筒型の場合の直径に相当し、円筒型以外の場合には、直径に対応する大きさ）は、細胞に挿入した場合に細胞を殺すことがなく、細胞にほとんど或いは全くダメージを与えないことが望ましい。このような針状材料のサイズは、通常約800nm程度以下、好ましくは約600nm程度以下、より好ましくは約500nm程度以下である。針状材料は、細い方が細胞へのダメージが小さくなるため望ましいが、あまりに細くなり過ぎると強度が低下し抗体を十分量結合させることが困難になるので、通常100nm程度以上、好ましくは200nm程度以上のサイズを有する。

【0010】

針状材料の材質としては、酸化ニッケル、石英、シリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニア、ダイヤモンド等の無機物；金、銀、銅、白金、アルミニウム等の金属；シリコン結晶、ジルコニウム、チタン、タングステン等の金属結晶；酸化亜鉛等の金属酸化物；シリコン、窒化シリコン、ガラス、石英、プラスチック等、細胞に毒性のない物質であればいずれも使用でき、針状の固体材料であることが好ましい。

【0011】

針状材料は、表面を化学的に修飾できるものが好ましい。例えば、ガラス、シリカ、石英またはシリコン結晶の場合、ビニルトリアルコキシシラン、アミノアルキルトリアルコキシシラン、エポキシ含有アルキルトリアルコキシシラン、3-メルカプトプロピルトリアルコキシシラン（MPTESS）等のSH，NH₂，エポキシ基、ビニル基等の官能基を導入可能なシランカップリング剤、或いはポリリジンやポリエチレンイミン等のポリ陽イオンで処理することにより官能基（アミノ基）を導入できる。これらの処理物をさらにグルタルアルデヒドやジイソチアン酸フェニル等で処理し、次いで抗体を結合させても良い。また、シリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニア等の表面に水酸基を有する材料の場合には、例えば該水酸基をジイソシアネートと反応させ、次いで抗体と反応させることにより抗体を結合できる。金を含む金属へのチオール、スルフィド類の結合性を利用する方法を利用することもできる。この際、一方にチオール、スルフィド類を有し、他方にアミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基等の官能基を有するリンカーを結合させることで、他方の官能基に抗体を結合させることができる。針状材料の表面修飾は、上記に限定されず、抗体を結合可能な官能基を導入する方法は、全て包含される。

【0012】

本発明では、抗体を針状材料に直接結合しても良く、リンカーを介して結合することもできる。リンカーとしては、前記シランカップリング剤、メルカプト（SH）基、アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基などの基を有する2官能性或いは多官能性の化合物が挙げられる。

【0013】

10

20

30

40

50

針状材料に結合される抗体は、細胞内或いは細胞間物質成分、細胞間接着成分、細胞接着成分などに対する抗体が例示される。

【0014】

本発明において対象となる細胞は、動物細胞であり、例えばヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ブタ、ウシ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物細胞が好ましく例示できる。細胞の種類としては、リンパ球、造血系幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞などの幹細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、筋芽細胞、網膜上皮細胞、ランゲルハンス島、副腎髄質細胞、骨芽細胞、破骨細胞、神経系幹細胞、神経細胞、グリア細胞、神経節細胞、および肝細胞などが挙げられる。

【0015】

結合の対象となる抗原タンパク質は、微小管系の成分、アクチン/ミオシン系の成分、中間径フィラメント系の成分のいずれかの細胞骨格タンパク質、染色体の成分、ミトコンドリアの成分、ゴルジ体の成分、小胞体の成分など、細胞内のオルガネラに特異的なタンパク質で、針状材料の引き抜き時にかかる力を測定出来るものが広く対象となり得る。

【0016】

また、さらには細胞組織を対象とし、細胞間物質成分、細胞間接着成分、細胞接着成分なども対象となる。

【0017】

この針状材料の細胞内或いは細胞間への挿入は、力応答測定の可能なAFMをはじめとする装置により行うことができる。

【0018】

本発明の1つの好ましい実施形態として、この針状材料表面に細胞内の骨格タンパク質を抗原とした抗体を固定化し、細胞に挿入操作を行う場合を、図1に基づき説明する。

【0019】

図1に示すように抗体が細胞内の骨格タンパク質(抗原タンパク質)と結合し、針の抜き時に大きな引力が発生する。この力の発生を持って、細胞骨格タンパク質を定量的に検出することが可能である。また、細胞骨格タンパク質を検出することで、細胞の種類を生きたまま判別することができる。さらに、種々の幹細胞から分化誘導した細胞の中から目的の細胞のみを取り出し、選別することが出来る。幹細胞は分化の過程で種々の細胞に分化するが、将来どのような細胞に分化するのかを本発明の方法により予測することもできる。このような予測は、表面抗原を利用する従来の細胞選別方法では行えない。本発明は細胞内タンパク質を指標にした新たな細胞選別技術を提供する。

【0020】

例えば、神経細胞は、良い表面マーカー抗原が無く、骨格タンパク質に神経細胞特異的なマーカータンパク質が多く発見されている。従来法では、骨格タンパク質を免疫検出する場合には、細胞からタンパク質を抽出した後に、ウェスタンブロットや、ELISAによって検出するか、細胞を固定化し、免疫染色する方法がとられるが、どの場合も細胞を殺すことになり、目的の骨格タンパク質を発現している細胞は殺すことになる。また、蛍光タンパク質と目的の骨格タンパク質の融合遺伝子を発現させる方法もあるが、遺伝子組み換え体になってしまい、野生型の健常な細胞とは言えない。本発明の方法では、細胞を殺さないで、後の細胞は続く用途に使用でき、後に細胞を利用した治療(例えば再生医療)などへの応用も可能である。

【実施例】

【0021】

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことは言うまでもない。

実施例1

AFM用の単結晶シリコン探針を集束イオンビームによってエッチング加工し、針状材料(ナノニードル、図2右)を作製した。抗体固定化の過程を図3に示した。オゾンクリーニングにより、探針表面を酸化し、2% MPTMS(3-mercaptopropyl trimethoxysilane)で1

10

20

30

40

50

時間反応させることにより表面にチオール基を提示させた。次に2価性架橋剤であるEMCS (N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide)を1 mg/mlで1時間反応させ、スクシンイミド基を提示させた。スクシンイミド基を提示したナノニードルと抗アクチン抗体溶液を接触させ、固定化を行った。

【0022】

抗アクチン抗体固定化ナノニードルをヒトメラニン細胞に挿入することで細胞内のアクチンフィラメントを検出した。図4に示す顕微鏡写真の矢印形のカンチレバーの先端にAFM探針すなわちナノニードルは位置しており、写真面に対して垂直方向にナノニードルがある。よって、先端位置を細胞に位置あわせし、カンチレバーの上下動作(写真面に垂直方向)を行うことによって、細胞にナノニードルを挿入する。使用するAFM装置は背面にレーザー照射する光でこの方式によってカンチレバーにかかる力を測定することができ、カンチレバーの移動距離に対してカンチレバーにかかる力をプロットしたフォースカーブを得ることが出来る。抗アクチン抗体固定化ナノニードルをメラニン細胞に挿入した時に得られるフォースカーブを、図5に示した。Iではカンチレバーと細胞はまだ接触していない。しだいにカンチレバーが接近し、細胞に接触する点がIIである。IIの時点から、細胞膜に対してナノニードルが圧入し、IIIのような緩和が観察される部分で細胞膜を貫通し、細胞に挿入される。IVで折り返し、カンチレバーは細胞から離れて行く抜去過程に入る。VIでは、カンチレバーにかかる見かけの力はゼロに戻り、これ以降の抜去過程では、抗原-抗体相互作用によりナノニードルを引っ張る作用が働いており、ゼロ点を下回る引力側の力の変異が観察される。カンチレバーにかかる力は引き離し距離の増大に従って大きくなり、VIIで抗原-抗体相互作用を破壊し、力が最大からゼロに戻る。最初の細胞接触のIIとほぼ一致することから、ナノニードルは細胞と離れた状態になっていると考えられる。このようにして観測される相互作用破壊の力の最大値は2~12 nN程度であり、抗体固定化量に依存して変化する。

【0023】

図6のBには、抗アクチン抗体固定化ナノニードルと、同じ過程で抗体を固定化した後に単量体アクチンでブロッキングしたナノニードルの二つのナノニードルを挿入した際のフォースカーブを示している。単量体アクチンの結合により、抗体はアクチンフィラメントと結合出来ず、Aのような抗原-抗体相互作用破壊のための力は観察されない。Aのようなフォースカーブは同じ細胞に数十回連続的に挿入しても繰り返して測定される。このことは、抗体の結合により、アクチンフィラメントが破壊され抗体と結合したアクチンフィラメント破壊残渣が抗原結合部位をふさぎ次の結合を阻害することが無く、また、抗体のニードル表面からの脱離も生じておらず、抗原-抗体の結合が破壊されており、抗体の抗原結合部位は抜去時に再生されていることを示唆する。

【0024】

抗アクチン抗体固定化ナノニードルをアクチン脱重合剤CytochalasinDでアクチンフィラメントを脱重合させたメラノサイトに挿入して力学応答を観察した結果が、図6Cである。脱重合することにより、細胞内アクチンフィラメントの含有量は減少する。2 μMの終濃度でCytochalasinDを培地に添加し、20分間インキュベーションし、アクチンフィラメントを脱重合させ、CytochalasinDを含まない培地に交換し、5分後に抗体固定化ナノニードルの挿入操作を行った。Cに示すように、フォースカーブに抗原-抗体相互作用を示す引力が観察されなかった。CytochalasinDの処理時間を短くした場合、処理時間を短くするに従い、抗原-抗体相互作用破壊のための力の最大値は、増大することが観察された。この結果は、細胞内のアクチンフィラメント含有量と測定される相互作用破壊力の最大値は相関しており、力の大きさからアクチンフィラメント含有量を定量出来ることを示唆している。

本発明の技術で細胞分化段階の評価を行うことが出来る。例えば、神経細胞の分化を観察する場合には、マーカータンパク質である チューブリンやニューロフィラメントなどの細胞骨格タンパク質を標的として、当該抗体を固定化したナノニードルの挿入とフォースカーブ観察を行う。あらかじめ用意しておいた検量線から、細胞内骨格タンパク質の含有

10

20

30

40

50

量を定量し、分化の進行度合いを評価する。挿入操作された細胞はほとんどダメージを受けないので、その後の操作などに用いることが出来、また、使用した抗体は脱離せず細胞内に残留するその他の物質もないことから、以後の細胞を、移植治療などに使用した場合でも高い安全性を期待することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】細胞内骨格タンパク質を抗原とした抗体を固定化した針状材料の挿入と抗原 - 抗体相互作用を針状材料抜去時に引力として測定する様子の模式図

【図2】単結晶シリコンAFM探針（左）とナノニードル（右）

【図3】ナノニードル表面への抗体固定化方法

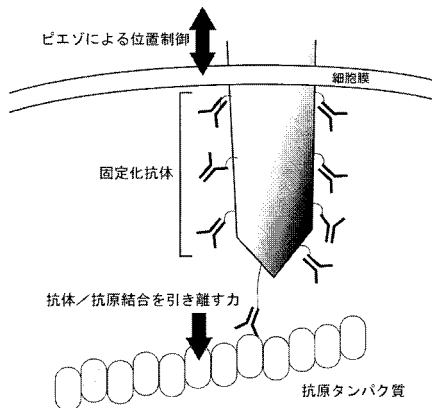
【図4】抗体固定化ナノニードル挿入したヒトメラニン細胞の明視野像

【図5】抗体固定化ナノニードル挿入時のフォースカーブとナノニードルの細胞への挿入位置の関係を示す模式図

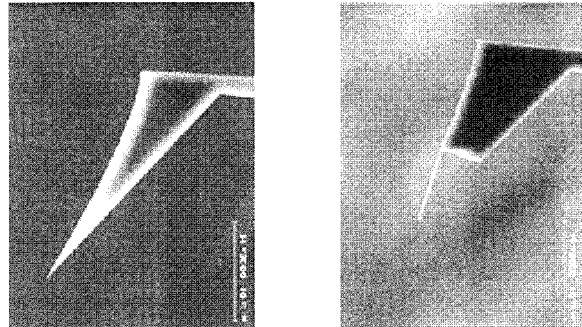
【図6】フォースカーブ観察による力学測定量とアクチン量の関係 A 抗体固定化ニードルをメラノサイトに挿入した時のフォースカーブ B 単量体のアクチンによって抗体をブロッキングした時のフォースカーブ C 脱重合剤CytochalasinDを添加した時のフォースカーブ

10

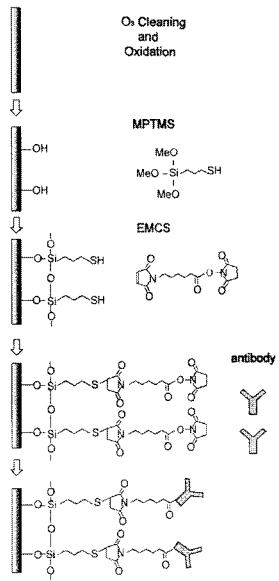
【図1】



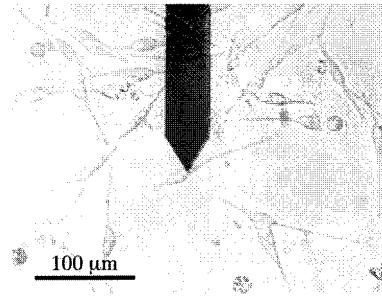
【図2】



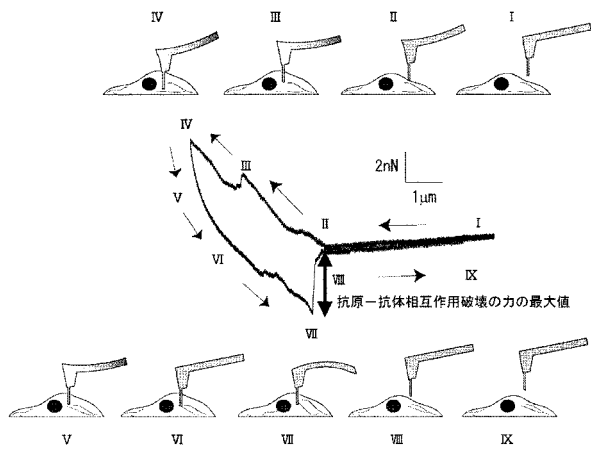
【 図 3 】



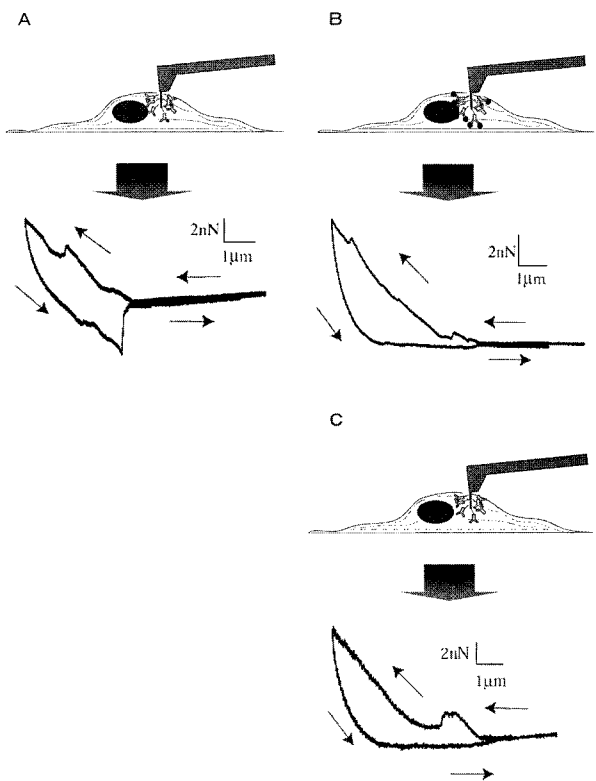
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 M 1/00 Z

(72)発明者 三宅 淳
兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター尼崎事業
所内

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 特開2003-088383(JP,A)
特開平07-023796(JP,A)
特開2003-325161(JP,A)
日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター, 第18巻, 第14-17頁(2004年1月)
)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.97, pages 9972-9977 (2000)
日本化学会講演予稿集, 第81st巻, 第873頁, 1F3-31(2002年)
Nat. Cell Biol., vol. 2, pages 313-317 (2000)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 M 1 / 3 4

C 1 2 Q 1 / 0 4

G 0 1 N 3 3 / 5 3

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	通过免疫力学测量检测活细胞蛋白的方法		
公开(公告)号	JP4517074B2	公开(公告)日	2010-08-04
申请号	JP2005064714	申请日	2005-03-09
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	中村史 小幡谷育夫 中村德幸 三宅淳		
发明人	中村 史 小幡谷 育夫 中村 德幸 三宅 淳		
IPC分类号	C12M1/34 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/483 C12M1/00		
FI分类号	C12M1/34.F C12Q1/04 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/483 C12M1/00.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA01 2G045/FB03 2G045/GC01 2G045/HA09 2G045/JA01 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX04 4B063/QX10		
审查员(译)	石丸聪		
其他公开文献	JP2006246731A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测或测定细胞生存状态下细胞中蛋白质或鉴定或选择细胞的方法。ŽSOLUTION：用于插入细胞的针状材料，其上固定有针对细胞内或细胞间蛋白抗原的抗体。这种用于确定细胞内或细胞间蛋白质质量以及判断和鉴定细胞种类的方法的特征在于将材料插入细胞或细胞之间的空间以产生抗原 - 抗体复合物然后拔出针头。用于测量添加到针状材料上的力的材料。Ž

