

# 培養細胞スクリーニングに向けた ハイスループット電気化学発光計測バイオチップの開発

東北大学 大学院工学研究科バイオ工学専攻

伊野 浩介

## 1. はじめに

再生医療・移植医療や細胞工学（有用タンパク質を産生する細胞を作る）において、培養細胞が有用かを判断する必要があるため、そのために細胞分泌物の種類や量が計測されている。このために蛍光標識を用いた免疫アッセイが頻繁に用いられている。従来法では抗体などの捕捉素子を基板に修飾して、測定対象物を捕捉している。さらに、蛍光物質がついた抗体で測定対象物を標識することで、蛍光強度から対象物の濃度が計測できる。このような蛍光検出は有用であるが、従来法は標識プロセスが煩雑であり、測定時間がかかる、高価であるといった問題があった。したがって非標識で計測できるシステムが求められている。

非標識で計測できるシステムとして、電気化学センシングが挙げられる。この手法では、電極上に標的物質を捕捉して、電極上で誘起される電気化学反応の違いを観察している。免疫アッセイのような蛍光標識が不要であり、優位である。一方、通常の電気化学センサデバイスでは、多数のサンプルを計測のためにセンサをアレイ化する必要があるため、膨大な手間と費用がかかってしまっていた。

そこで本研究では、電気と化学反応を利用した発光現象である電気化学発光に注目した。電気化学発光とは、電極表面で電気化学反応を誘起した後に続く発光現象のことである（図1）。電気化学反応を発光シグナルに変換して計測できるため、センサのアレイ化が不要であり、上記の問題点を見事に解決できる。一般的に、ルミノフォアと共反応物を電極で反応させており、これらの濃度に依存した発光シグナルが得られる。したがって、これらの化学物質と細胞機能を結びつけることで、電気化学発光シグナルを細胞計測に利用できる。また、電極近傍が発光するため、電極界面の情報を取得できる。蛍光観察と異なり、励起光を必要としないため自家蛍光といったバックグラウンドノイズがなく、高感度計測が可能である。また、レーザーが不要であるため蛍光観察よりも簡単なセットアップで済む。本研究では、細胞計測に向けた電気化学発光計測バイオチップの開発を通し、ハイスループットな細胞計測システムとして完成させる。

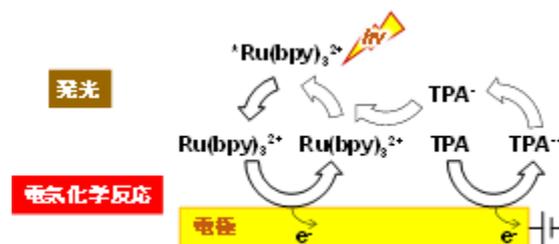


図 1. 電気化学発光の例。TPA：トリプロピルアミン。

## 2. 電気化学発光を用いた細胞計測の戦略

電極表面に吸着した測定対象物が電気化学発光を阻害することを利用して、測定対象物を計測する（図 2A）。本研究では、創薬研究でも使用される生体模倣モデルの 1 つである細胞スフェロイドを測定対象とした。このスフェロイドを電極に配置させて培養することで、電極に分泌物を吸着させる。吸着後、電気化学発光反応を誘起して、発光シグナルを観察した。今回は、ルミノールを用いた電気化学発光反応を採用した（図 2B）。図 2 で示した戦略を用いることで、スフェロイドが電極にある時は、溶存酸素消費活性（呼吸活性）を青色の発光シグナルから可視化でき、スフェロイドが電極から取り除いた時は、細胞分泌活性をイメージングできる。

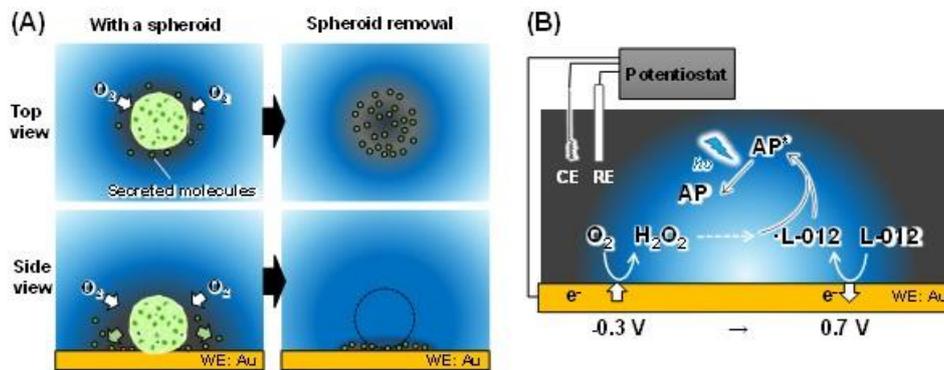


図 2. 電気化学発光イメージングを用いた細胞分泌物計測の概要。(A) 細胞スフェロイドを電極上で培養してから計測する。スフェロイドがある時は、細胞の O<sub>2</sub> 消費に基づく電気化学発光の減光が見られる（左）。スフェロイドが除かれた場合、吸着した細胞分泌物による電極反応の阻害が起こり、電気化学発光の減光が観察できる（右）。(B) 今回の戦略で使用するルミノール誘導体 (L-012) を用いた電気化学発光。-0.3 V を印加して溶存酸素を過酸化水素に還元した後、0.7 V に変化させて L-012 を酸化させる。この後に続く化学反応により発光シグナルが得られる。この発光シグナルは溶存酸素の量に依存している。AP: aminophthalic acid。AP\*: excited state of aminophthalic acid。Reproduced with permission from [1]。Copyright 2023、Elsevier。

## 3. 細胞分泌物活性の電気化学発光イメージング

ガンモデルとしての MCF-7 の細胞分泌物活性の電気化学発光イメージングの結果を図 3 に示す。生きているスフェロイドを計測した時は、スフェロイドの周辺の電気化学発光シグナルが減光しているのが確認できた。一方、死んでいるスフェロイドをイメージングした場合は減光が見られなかった。この結果から、細胞呼吸量を電気化学発光により明確にイメージングできたといえる。また、生きている細胞を使用した時、細胞を取り除いた場合で減光現象が見られており、図 2 で示した戦略通りに、吸着した細胞分泌物を見事にラベルフリーでイメージングできた。この減光の度合いは、細胞培養時間に依存しており、細胞分泌物の吸着を濃縮してイメージングできることが示唆された。これにより、従来の標識プロセスが不要になるため、検出時間とコストをそれぞれ半分以下になる。個別の培

養細胞・培養組織を評価できるため、有用細胞の検出・回収が期待できる。この研究成果は、論文として報告された[1]。

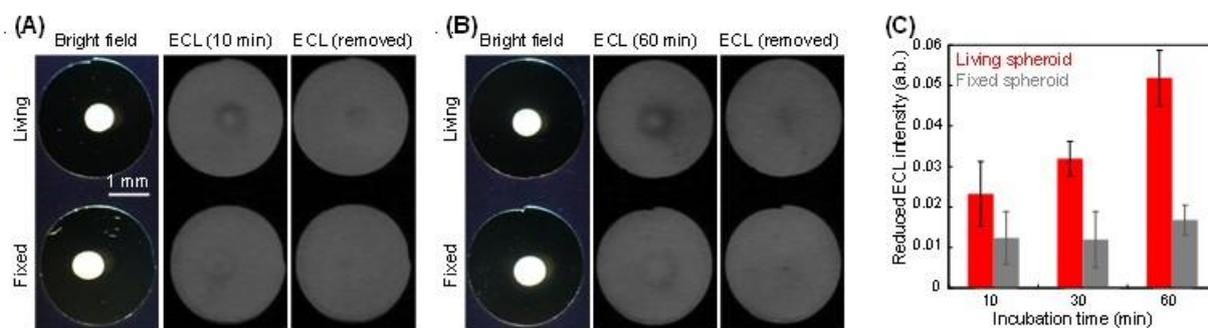


図 3. MCF-7 スフェロイドの電気化学発光イメージング。電極上で (A) 10 もしくは (B) 60 min 培養した結果。上段：生きている細胞スフェロイド。下段：死んでいる細胞スフェロイド。左：明視分画像。中央：細胞をある状態での電気化学発光イメージ。右：細胞を取り除いた後の電気化学発光イメージ。(C) 各培養時間における規格化した減光シグナル。Reproduced with permission from [1]. Copyright 2023、Elsevier。

#### 4. 電気化学発光イメージングを用いた間葉系幹細胞スフェロイドの解析

電気化学発光イメージングが幹細胞の分化状態を解析できるかを調査した。今回は、骨の再生医療での利用が期待されている間葉系幹細胞を用いて、骨への分化状態を電気化学発光イメージングした(図 4)。特に、3次元培養したスフェロイド状態の計測を実施した。その際、血管誘導できる能力を調べられる微小流体デバイスを組み合わせて、さらに複雑な生体機能の解析をした(図 4)。

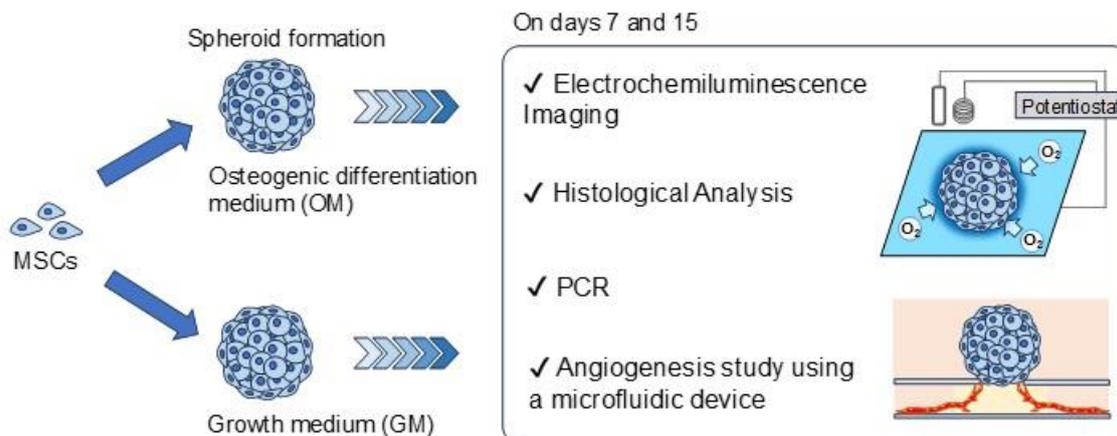


図 4. 間葉系幹細胞 (MSC) スフェロイドの電気化学発光イメージングの概要。細胞を骨分化用培地 (OM)、もしくは通常の増殖用培地 (GM) で培養して、スフェロイドを形成させた。7 もしくは 15 日間培養後、酸素消費計測のための電気化学発光イメージングと血管誘導機能測定を行い、両者の相関性を調査した。Reproduced with permission from [2]. Copyright 2024、Elsevier。

図 5A、B に、間葉系幹細胞スフェロイドの電気化学発光イメージングの結果を示す。細胞分化状態によって、電気化学発光シグナルの減光（つまり、酸素消費の変化）が観測された。また、ある条件においては血管新生を誘導することが確認でき、報告した論文に詳細な解析を示した[2]。このような移植が期待されているサンプルでの計測にも成功しており、今後の展開や、開発した技術の産業化が期待できる。

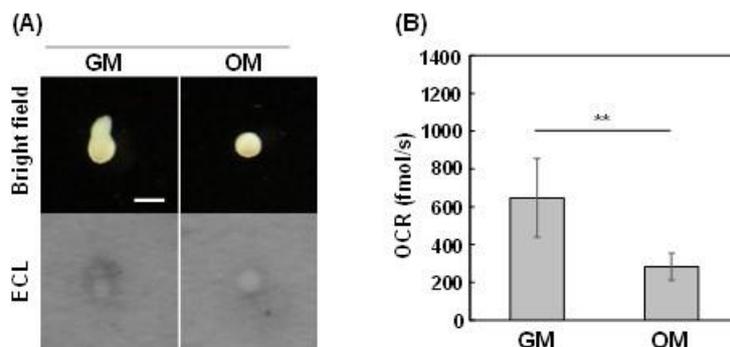


図 5. 間葉系幹細胞スフェロイドの電気化学発光イメージング。(A) 明視分イメージ（上段）と電気化学発光（ECL）イメージ（下段）。GM（左）と OM（右）で培養した時の違いを調査した。(B) 各培養条件における呼吸活性（OCR：fmol/s）。Reproduced with permission from [2]. Copyright 2024、Elsevier。

#### 4. 電気化学発光イメージングを用いた細胞接着の解析

本研究では細胞分泌物の電気化学発光イメージングを目標に掲げていたが、その研究の仮定で、このイメージング技術が細胞接着を可視化でき、通常の顕微鏡画像以上の情報を得ることができると気付いた。細胞接着は細胞増殖や分化、遊走に深く関与しており、その計測には大きな意味がある。細胞接着のイメージングの戦略を図 6 に示す。

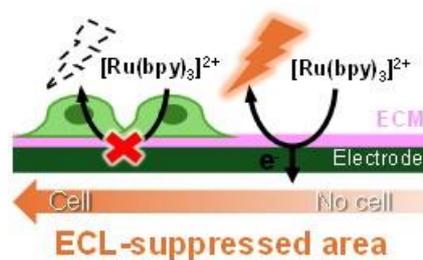


図 6. 電気化学発光イメージングを用いた細胞接着の可視化。Reproduced from [3]. Copyright 2024、The Authors。

この戦略では、電極上で細胞を接着培養させる。細胞は絶縁体であるため、細胞が接着した箇所では電気化学反応が阻害され、その結果の電気化学発光シグナルが減少する。血管モデルの作製を目指して、血管内皮細胞（HUVEC）を電極上で培養し、その接着状態を電気化学発光イメージングした。図 7 で示すように、細胞が接着している箇所の発光シグナルが減少しており、原理実証できた。位相差顕微鏡画像では細胞間の隙間がないように

見えるが、電気化学発光イメージでは細胞間に大きな隙間があることが確認された。HUVEC は細胞間バリア機能が弱いことが知られており、矛盾ない結果が得られている。今後、細胞接着を指標としてバイオアッセイへの展開が期待できる。これらの結果は、学術論文として報告された[3]。

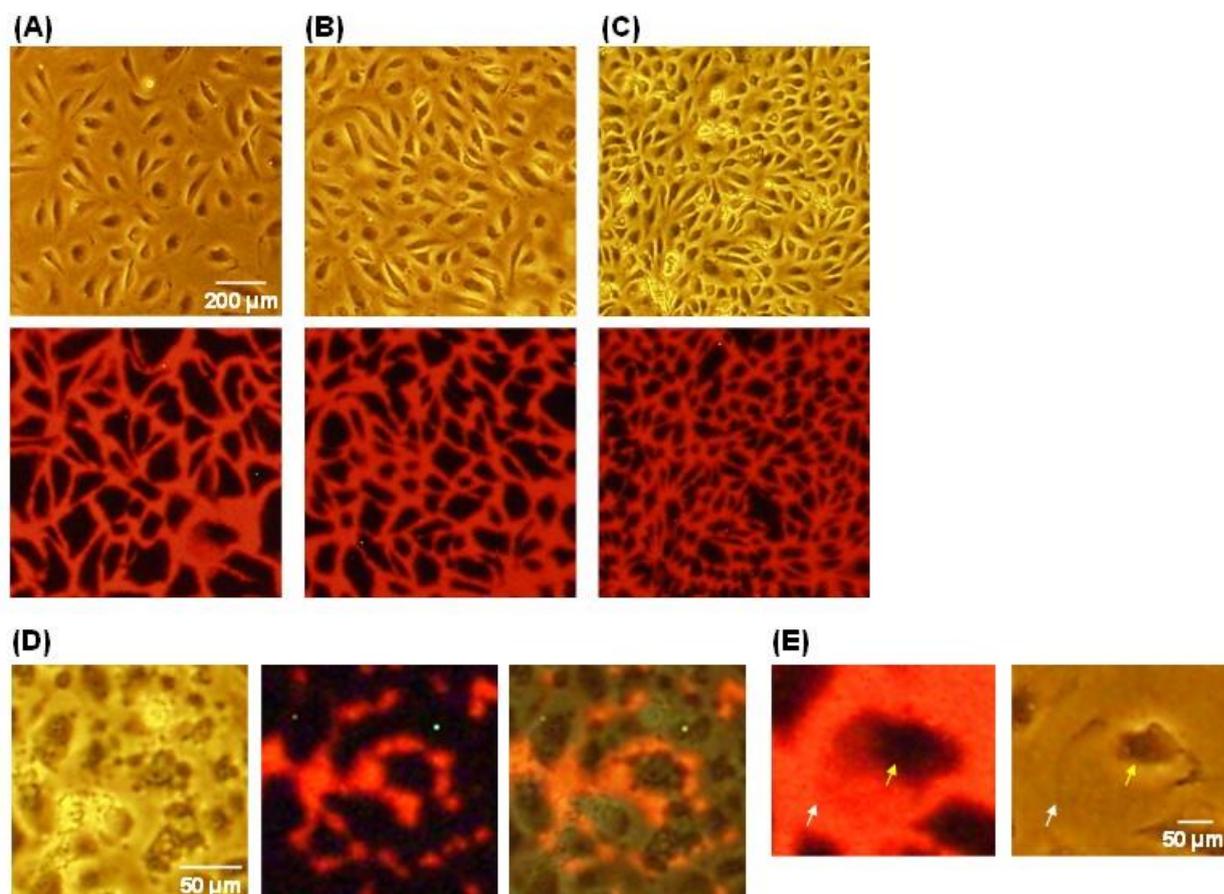


図 7. 細胞接着の電気化学発光イメージング。HUVEC を透明電極上で培養後（A :  $2 \times 10^4$ 、B :  $4 \times 10^4$ 、C :  $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>）、イメージングした。(D) 拡大した画像。(E) 1 細胞を拡大図。Reproduced from [3]. Copyright 2024、The Authors。

## 6. まとめ

本研究は電気化学発光イメージングシステムを構築し、細胞分泌物や生体関連物質の消費量、細胞接着機能の可視化を実現した。これらは非標識で観察できるため、再生医療、創薬開発など、様々なバイオ応用に展開できる技術である。上記した論文に加え、該当分野の総説も報告しており[4、5]、電気化学発光バイオイメージングの啓蒙も達成した。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴財団から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

## 参考文献

- 1) K Hiramoto, K Komatsu, R Shikuwa, A Konno, Y Sato, A Hirano-Iwata, K Ino, and H Shiku, "Evaluation of respiratory and secretory activities of multicellular spheroids via electrochemiluminescence imaging," *Electrochimica Acta*, 458, 142507, 2023
- 2) K Hiramoto, A Konno, Y Nashimoto, A Hirano-Iwata, K Ino, H Shiku, "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell spheroids: A microfluidic device and electrochemiluminescence imaging study," *Electrochimica Acta*, 491, 144291, 2024
- 3) K Oba, K Ino, Y Utagawa, H Abe, H Shiku, "Comprehensive cell adhesion analysis using electrochemiluminescence imaging and electrochemical impedance spectroscopy," *Electrochemistry*, 92, 022009, 2024
- 4) K Ino, Y Utagawa, K Hiramoto, H Abe, H Shiku, "Porous membranes integrated into electrochemical systems for bioanalysis," *Electrochemical Science Advances*, e2300026, 2024
- 5) K Ino, Y Utagawa, and H Shiku, "Microarray-based electrochemical biosensing," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, in press