



令和元年12月6日

各報道機関文教担当記者 殿

ナノスケールの pH センサーを開発し、 がん細胞表面の pH イメージングに成功！

金沢大学ナノ生命科学研究所の Yuri Korchev 教授、高橋康史准教授、英国・インペリアル・カレッジ・ロンドンの Yanjun Zhang 博士、富山大学薬学部の酒井秀紀教授、藤井拓人助教の国際共同研究グループは、ナノスケールの pH センサーを独自に開発し、胃酸放出細胞やがん細胞表面でのナノスケールの pH イメージングに成功しました。

生体内の細胞は、細胞固有の細胞外微小環境（※1）に取り囲まれており、細胞が生きていく上では、この細胞外微小環境を中性に保つことが必要です。細胞内で腫瘍や炎症が生じると細胞外微小環境が酸性化するなど、pH の異常はさまざまな疾患につながることから、細胞外微小環境での細胞外 pH (pHe) の測定は細胞の機能調整と pH の関係の理解につながります。しかし、これまで一般的に用いられている pH プローブでは、分解能や反応速度などの課題があり、pHe の定量化が困難でした。

本国際共同研究グループは、pH 感受性の膜をナノスケールのガラスピペットに修飾したナノピペット型 pH センサーを独自開発し、pHe を単一細胞レベルかつ非標識でイメージングすることに成功しました。

本研究成果は、がんの診断および酸性環境の評価に役立つと期待されます。

本研究成果は、2019年12月6日10時(英国時間)に英国科学誌『*Nature Communications*』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

細胞が生きていく上で、細胞外微小環境を中性に保つことが必要です。しかし、腫瘍および炎症が生じると、嫌氣的解糖（※2）により pH が酸性化し、腫瘍転移の促進や、炎症反応が調節されます。このような細胞外微小環境での pHe の測定は、細胞の機能調整と pH の関係を理解するために重要であり、がんの診断と治療にもつながります。しかし、現在最も一般的に使用される pH プロブはガラス電極を用いるもので、センチメートルのスケールであり、かつ、応答が非常に遅いことが課題です。また、蛍光分子を用いる pH プロブは、生体の自家蛍光（バックグラウンド蛍光）のレベルが高く検出感度が低いことに加え、急速な光退色が生じるため、pHe の定量化が困難になります。

【研究成果の概要】

そこで、本国際共同研究グループは、pH 感受性の膜をナノスケールのガラスピペットに修飾したナノピペット型 pH センサーを独自に開発し、pHe を単一細胞レベルかつ非標識でイメージングしました。

pH 感受性の膜は、ポリ-L-リジン/グルコースオキシダーゼ（PLL / GOx）の混合物をグルタルアルデヒドで架橋することで形成しました（図 1）。この膜は、PLL の正に帯電した第 4 級アミンと、GOx の負に帯電したカルボン酸残基により、双性イオンポリマー膜として振る舞い、pH に依存して電荷が効率的に変化します（図 2）。この電荷の変化に依存してナノピペット型 pH センサーで計測される電流や電位が変化することで、この変化から pH を計測することができます。開発したナノピペット型 pH センサーは、2 ミリ秒の応答時間、50 ナノメートルの空間分解能、pH を 0.01 ユニットの感度で計測できる世界最速の応答速度を示しました（図 3）。

そこで、このナノピペット型 pH センサーを試料近傍に配置して、pHe 計測を行ったところ、胃酸を放出する壁細胞からの胃酸放出の計測や、藻類の光合成や呼吸に伴う pHe の変化を計測することに成功しました（図 4 (a, b)）。

さらに、このナノピペット型 pH センサーは、pHe を計測するだけでなく、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）（※3）の計測原理を適用することで、細胞表面の形状を超解像度レベルで同時に取得することが可能です。実際に、がん細胞表面の pHe プロファイルを 3 次元的に可視化することに成功しました（図 4 (c)）。

【今後の展開】

細胞外酸性 pH は、がん細胞の浸潤と移動を促進し、治療の障壁となっています。開発したナノピペット型 pH センサーを SICM に応用した SICM-pH ナノピペットセンサー技術により、単一細胞レベルで pHe の 3D マッピングが可能になります。これにより、がんの診断の新たな技術となるだけでなく、細胞外酸性化速度の評価に貢献することが期待されます。

本研究は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点プログラム」(WPI)、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業さきがけ「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」研究領域における「ケミカルマッピングを実現するナノ電気化学顕微鏡の創成」(研究代表者:高橋康史)、日本学術振興会科学研究費助成事業などの支援を受けて実施されました。

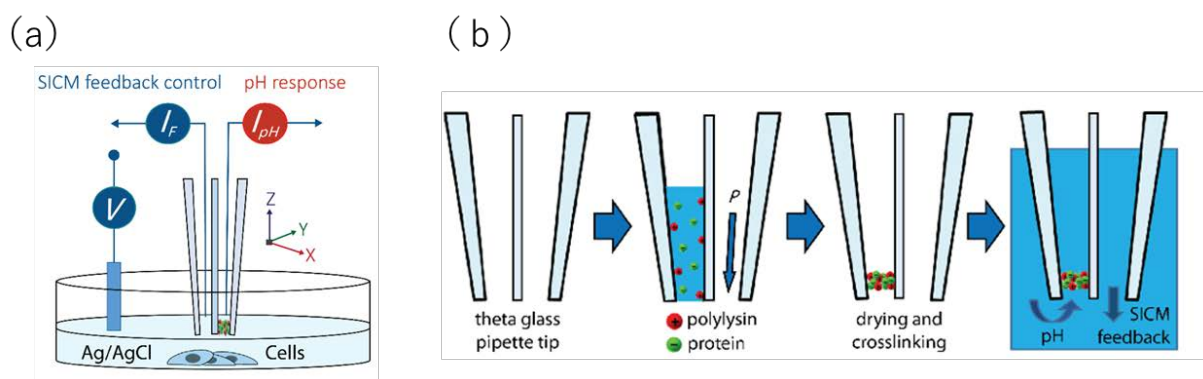


図 1. (a) pHe と細胞表面形状の同時イメージング技術の概要と、
(b) プローブの作製方法

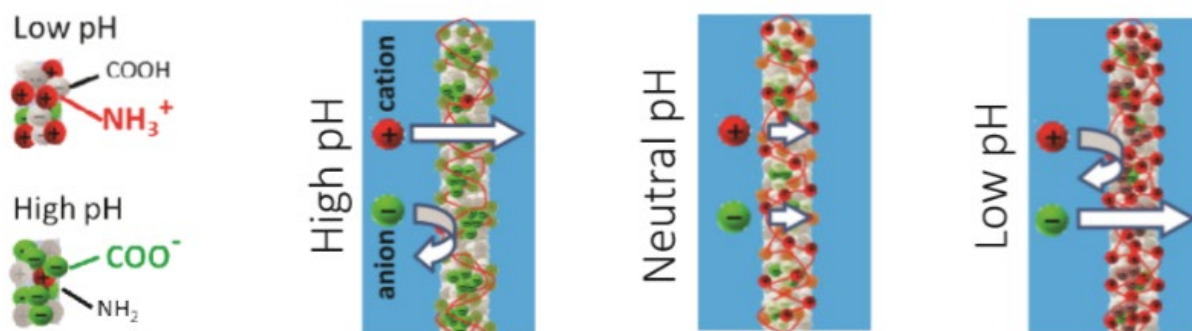


図 2. pHe の計測原理の概要

pH に依存して、双性イオンポリマー膜 (PLL と GOx の混合ポリマー) の電荷が効率的に変化する。この電荷の変化に依存してイオンの透過性が変化するため、イオン電流の値から pH を計測することができる。

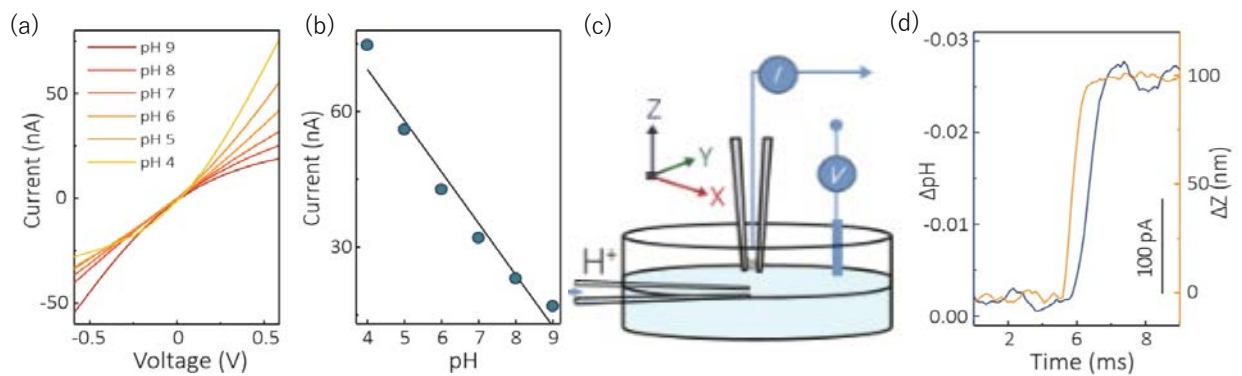


図3. ナノピペット型 pH センサーの応答特性

(a) pH に依存して、電圧電流特性が変化している。(b) +0.5 V に電圧を維持した際の応答。(c) ナノピペット型 pH センサーの応答速度評価の概要。ナノピペット型 pH センサーの近傍にプロトン供給用のピペットを配置し、プロトン供給用のピペット近傍に形成された定常状態の pH 勾配を利用して、ナノピペット型 pH センサーとプロトン供給用のピペットとの距離を調整することで、応答時間を評価している。(d) 応答時間の評価。オレンジ色が高さ方向のセンサーの位置、青が pH の応答。2 ミリ秒 (ms) 以内に定常に達していることが確認できます。

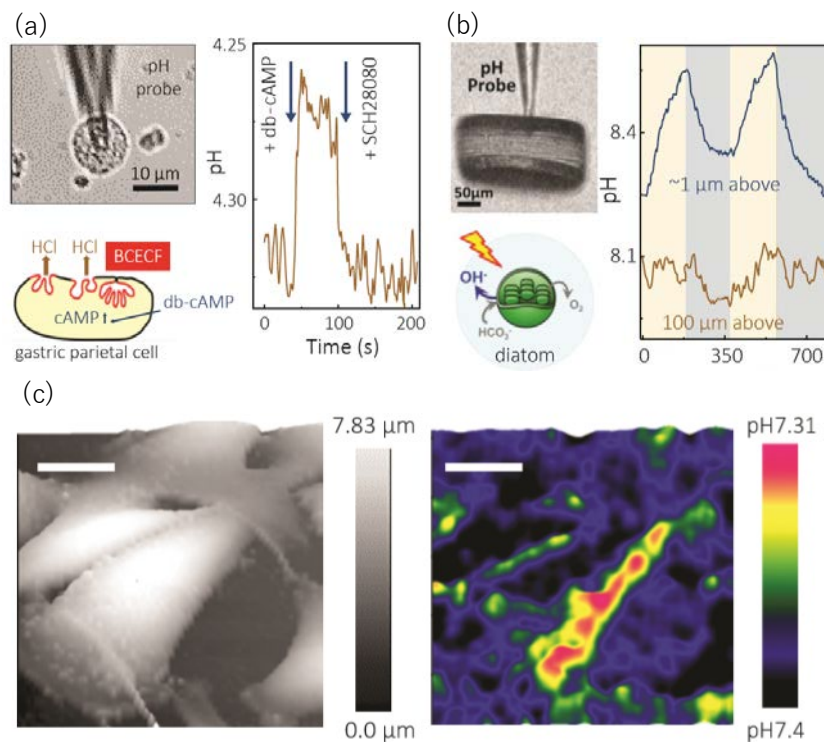


図4. ナノピペット型 pH センサーによる pHe 計測およびイメージング

(a) 胃酸を放出する壁細胞の胃酸放出の計測。ナノピペット型 pH センサーを壁細胞に近接させ、100 μ M db-cAMP により細胞を刺激することで、胃酸放出に伴う pH 変化が計測できた。さらに、 K^+ ATPase 阻害剤 (胃酸放出を抑える) である SCH28080 を加えることで応答が元に戻る様子を確認できた。

(b) 珪藻に光を照射した際に生じる pHe の計測。外部からの光の照射の on/off に対応した pHe の変化を計測することができた。

(c) メラノーマ細胞の (左) 形状と (右) pHe イメージ。細胞の不均一性に依存して、細胞表面の pHe にも違いがあることがイメージングにより明らかとなった。スケールバーは、20 μm 。

【掲載論文】

雑誌名 : Nature Communications

論文名 : High-resolution label-free 3D mapping of extracellular pH of single living cells
(単一細胞外 pH の非標識高解像イメージング)

著者名 : Yanjun Zhang, Yasufumi Takahashi, Sung Pil Hong, Fengjie Liu, Joanna Bednarska, Philip S Goff, Pavel Novak, Andrew Shevchuk, Sahana Gopal, Iros Barozzi, Luca Magnani, Hideki Sakai, Yoshimoto Suguru, Takuto Fujii, Alexander Erofeev, Peter Gorelkin, Alexander Majouga, Dominik J Weiss, Christopher Edwards, Aleksandar P Ivanov, David Klenerman, Elena V Sviderskaya, Joshua B Edel, Yuri Korchev

掲載日時 : 2019 年 12 月 6 日 10 時 (英国時間) にオンライン版に掲載

DOI : 10.1038/s41467-019-13535-1

【用語解説】

※1 細胞外微小環境

生体内の細胞が、さまざまな成分からなる細胞固有の環境に取り囲まれている環境。細胞外微小環境から発生するシグナルは、細胞の分化、分裂、動態を制御している。特にがん細胞近傍の酸化環境については、がんの増殖などとも密接に関わりがあるとされる。

※2 嫌気性解糖

グルコースを分解する過程で ATP を作り出す反応のうち、赤血球などのミトコンドリアを欠く細胞や、十分な酸素供給が得られない細胞で生じる反応。

※3 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM)

ナノピペットをプローブとして用いて、イオン電流をフィードバックシグナルに利用し、非接触で試料のナノスケールの形状測定を行う。具体的には、ナノピペット先端部を通過するイオン流が、試料近傍において物理的に阻害され、イオン電流が減少するときのシグナルの変化を利用して、ピペットと試料間距離を制御し、非接触で溶液中の試料の表面形状を取得する。

【本件に関するお問い合わせ先】

【研究内容に関すること】

金沢大学ナノ生命科学研究所 准教授

高橋 康史 (たかはし やすふみ)

TEL : 076-234-4866

E-mail : yasufumi@se.kanazawa-u.ac.jp

【広報担当】

金沢大学総務部広報室広報係

嘉信 由紀 (かしん ゆき)

TEL : 076-264-5024

E-mail : koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵 (よねだ ひろえ)

TEL : 076-234-4556

E-mail : hiroe@adm.kanazawa-u.ac.jp

富山大学総務部総務・広報課

柿沼 亜矢子 (かきぬま あやこ)

TEL : 076-445-6028

E-mail : kouhou@u-toyama.ac.jp