

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23107008

研究課題名（和文）多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御

研究課題名（英文）Three dimensional tissue regeneration through multipoint molecular weak association

研究代表者

岩田 博夫（IWATA, Hiroo）

京都大学・再生医科学研究所・名誉教授

研究者番号：30160120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 74,900,000 円

研究成果の概要（和文）：単鎖DNA-ポリエチレングリコール-脂質（ssDNA-PEG-脂質）を細胞表面の修飾材料として用い、細胞表面でのDNA相補対形成を介して細胞機能を工学的に操作することを試みた。

1) 抗酸化剤の固定化による再灌流障害の低減、磁性ナノ粒子の固定化による移植細胞のMRI観察など、現在の医療で求められている課題の解決に本手法が有用であることを示した。

2) DNA配列設計の多様性を利用し、3次元の生分解性足場材料上に接着する細胞の配置さらには接着・脱着の時間制御を実現し、再生医療の発展に必要な基盤技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is manipulation of cellular function through the modification of cell surface. We used single-stranded DNA, which was conjugated both to poly(ethylene glycol) and to a terminal phospholipid (ssDNA-PEG-lipid) for cell surface modification. The cell surface of cells can be further functionalized through DNA hybridization. We examined control of 1) biological responses and 2) cell-substrate and cell-cell attachment.

1) The modification of cell surface of endothelial cells with antioxidant-loaded liposomes reduced oxidative stress during ischemia reperfusion. The modification of cell aggregates with superparamagnetic iron oxide nanoparticles allowed for MRI monitoring post-transplantation.

2) We realized cell attachment to poly(lactic acid) scaffold in a spatially controlled manner by taking advantage of variety of DNA sequence. In addition, both cell attachment and detachment can be programmed using DNA containing the cleavage site for restriction enzyme.

研究分野：高分子医工学

キーワード：細胞 単鎖DNA リン脂質 細胞表面修飾 分子間相互作用 細胞配置 生体応答

1. 研究開始当初の背景

生体内では二次結合、すなわち弱い結合を通じて分子がダイナミックに相互作用している。DNA の二重らせん、抗原・抗体反応、レセプター・リガンド相互作用、酵素・基質相互作用、細胞・細胞間相互作用、高次形態形成等々、生命活動の多くの局面で、二次結合は一つ一つの相互作用は弱いながらも協同することで極めて特異的で多様性を持った強い相互作用を行うことができるばかりでなく、ダイナミックに相互作用の on-off を行っている。生命活動の本質は“弱い相互作用の協同性”に潜んでいるといっても過言ではないと考えている。

再生医療などへの応用から我々が着目する細胞レベルにおいても、初期の細胞集合体を形成させた後、細胞は予想外の速さでこの集合体の中でダイナミックに相互の位置を変えている。個体発生時、組織の再生時、がん細胞の転移という具合に生物のほとんどの局面でこの細胞のダイナミックな動きに遭遇する。この過程に関与する分子やその相互作用定数を決め、数理モデルを構築してそのダイナミックな過程の理解を進めることが生命活動の本質を理解するのに重要と考えられる。一方応用面では、これら細胞レベルのダイナミックな動きを工学的に操作することで望みの細胞集合体を形成することができれば、再生医療への展開、また、iPS 細胞から誘導した機能細胞、その集合体である機能組織体の薬物スクリーニングへの供給が可能になる。再生医療では、異なる細胞を三次元的に配列させて新たな組織を作ることに加え、人工的な手が加わった再生組織を生体に移植する際に起こるであろう様々な生体応答から移植組織を守る必要がある。

2. 研究の目的

異なる細胞を三次元的に配列させて新たな組織を作る、また移植組織を生体応答から保護するためには、細胞の界面を上手にコントロールする必要があると考えた。そこで、細胞の表面を人工的に改変することで細胞へ新たな機能を付与し、細胞界面で起こることを制御することを試みた。具体的には、

- (1) 細胞表面を修飾する分子の設計
 - (2) 細胞表面で起こる生体応答の制御
 - (3) 細胞 - 細胞および細胞 - 材料間接着の制御
- の 3 つに取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 細胞表面を修飾する分子の設計

水溶性高分子ポリエチレングリコール (PEG) の片末端にリン脂質、もう片末端に単鎖 DNA (ssDNA) を結合した ssDNA-PEG-脂質を細胞表面の修飾材料として用いた。細胞膜の脂質二分子膜と ssDNA-PEG-脂質のリン脂質部が疎水性相互作用することで細胞表面に修飾される。ssDNA-PEG-脂質の構

造と細胞表面修飾能との関係を調べるため、リン脂質部の構造 (アルキル鎖の鎖長または本数) の異なるものを合成した。細胞表面への修飾を可視化するため、蛍光色素標識したのもも合成した。

(2) 細胞表面で起こる生体応答の制御

抗酸化剤修飾による再灌流障害の軽減

臓器移植では再灌流開始に伴って内皮細胞内部で活性酸素種 (ROS) が発生することで移植臓器の血管が障害され機能不全に陥ることが問題となる。これを回避するため、内皮細胞へ抗酸化物質を送達し、細胞内部で発生した ROS を還元し無毒化することを試みた。抗酸化物質としてはビタミン E を用いた。

血管内皮細胞を ssDNA-PEG-脂質で修飾した後に、それと相補的な ssDNA-PEG-脂質で修飾したビタミン E 含有リポソームを結合させた。所定時間経過後に antimycin A を用いて HUVEC 内部に ROS を生じさせ、その発生量を蛍光プローブで検出した。また、同様の操作をラット心臓についても行い、虚血再灌流操作後の毛細血管を観察した。

MRI 観察のための移植細胞への酸化鉄ナノ粒子標識

細胞移植による治療では、移植細胞の体内分布や生死を追跡することが重要である。MRI は非侵襲な撮影方法であることから、移植後の細胞を経時的に追跡することが可能である。体内へ移植した細胞の MRI 観察を可能とするため、細胞へ MRI 造影剤となる酸化鉄ナノ粒子 (SPIO) を修飾することを試みた。

I 型糖尿病の根本的治療として移植が行われている膵島および神経変性疾患の細胞治療ソースとして考えられている神経幹細胞を用いた。これらを単個細胞にしたのちに ssDNA-PEG-脂質で修飾し、相補 ssDNA 修飾した SPIO を結合させた。SPIO で修飾した細胞を再凝集させ、得られた細胞凝集体を MRI 観察した。神経幹細胞については、ラット脳へ移植後の MRI 観察も行った。

(3) 細胞 - 細胞および細胞 - 材料間接着の制御

ポリ乳酸足場材料への細胞接着の空間的制御

ポリ乳酸は代表的な生分解性高分子であり、組織工学の足場材料としても用いられている。さらには近年注目を集めている 3D プリンターの成型材としても用いられており、任意の 3D 形状の足場材料を作ることができる。一方で、ポリ乳酸表面は細胞接着性に乏しい。さらに、任意の形状の足場は作製できるものの、生体組織のように様々な種類の細胞を望みの位置に接着させることはできない。これを解決するため、ssDNA-PEG-脂質を用いた細胞接着制御を試みた。

末端がアルキルエステルのポリ乳酸と末端がカルボキシル基のポリ乳酸を混合し、フィルムおよびファイバーを作製した。ポリ乳酸表面のカルボキシル基を介してマレイミド基を導入した後に、チオール化 ssDNA を固定化した。フィルムの場合、配列の異なる ssDNA 溶液をスポットし、ssDNA のパターンを作製した。ファイバーの場合は、配列の異なる ssDNA で各々修飾した後、格子状に重ね合わせた。ポリ乳酸に固定した ssDNA と相補配列の ssDNA-PEG-脂質で修飾した蛍光標識細胞をポリ乳酸上に播種し、蛍光顕微鏡で観察した。その後、血清を含む培地中へ交換し細胞挙動を調べた。

細胞接着および脱着の制御

制限酵素 (BamH1 または EcoR1) で切断される DNA 配列を有する ssDNA-PEG-脂質を合成した。マレイミド基修飾したガラス基板へこの相補配列 ssDNA をパターン状に固定化した後、ssDNA-PEG-脂質で修飾した細胞を播種し、DNA を介して細胞を接着させた。同様に別細胞を ssDNA-PEG-脂質で修飾し、DNA を介して細胞-細胞間の接着を誘導させた。その後、制限酵素を添加し、特定の制限酵素切断配列を介して接着した細胞を選択的に脱離させた。また、制限酵素の代わりに DNA 分解酵素を添加し、DNA を介して接着したすべての細胞を脱離させることを試みた。

4. 研究成果

(1) 細胞表面を修飾する分子の設計

PEG-脂質の脂質部のアルキル鎖長 (炭素数 16, 16, 18) および鎖数 (1 または 2) の PEG-脂質を用いて細胞表面への導入と脱離を調べた。アルキル鎖数は、1 本より 2 本有する分子の方が細胞表面へ導入されやすいことが分かった。また、アルキル鎖長依存性を調べたところ、アルキル鎖 1 本の場合は長いほど導入量が多かった。一方、アルキル鎖 2 本の場合、炭素数 16 のものが最も導入量が多く、それ以上に鎖長が長くなると導入量の低下することが分かった。細胞表面からの脱離については、アルキル鎖が長く鎖数が多いほど脱離が遅いことが分かった。アルキル鎖が長く鎖数が多いほど疎水環境である細胞膜の脂質二分子膜への局在が熱力学的に安定である一方、水溶液中ではミセルを形成するため単量体としての見かけ濃度は低下する。細胞表面からの PEG-脂質の脱離は前者の寄与が大きい一方、細胞表面への導入は両者の兼ね合いの結果、中程度のアルキル鎖長のものが高い導入量を示したと考えられる。

(2) 細胞表面で起こる生体応答の制御

抗酸化剤修飾による再灌流障害の軽減

抗酸化剤であるビタミン E を担持させたリポソームとヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を相補配列関係にある

ssDNA-PEG-脂質で修飾することで、HUVEC 表面にリポソームを固定することができ、時間経過と共に細胞内部へ取り込まれることが分かった。また、ビタミン E 含有リポソームを HUVEC に固定後、antimycin A による酸化ストレスを与えたところ、培養時間に応じて HUVEC 内の活性酸素種生成量が減少した。

次に、ラット心臓を用いて再灌流障害の評価を行った。ラット心臓の血管内腔へビタミン E 含有リポソームを固定することで、再灌流障害による毛細血管の膨張を有意に抑制できることが分かった。

MRI 観察のための移植細胞への酸化鉄ナノ粒子標識

単個細胞にした腓島または神経幹細胞の細胞表面に DNA ハイブリダイゼーションを利用して SPIO 標識を行い、これを再凝集させることで SPIO 標識腓島または神経幹細胞凝集体を作製した。発現タンパクやインシュリン産生能など、SPIO 標識に伴う細胞機能の変化は見られなかった。また、SPIO 標識腓島または神経幹細胞凝集体をアガロースゲル中に分散固定し MRI 撮像を行ったところ、細胞凝集体が黒く観察され、凝集体 1 個ずつを十分な分解能で画像化できることが示された (図 1a,b)。このことから、細胞一つずつへ SPIO 標識しその凝集体を再構築させることで、MRI のコントラストを向上させることができた。さらに、SPIO 標識した神経幹細胞凝集体をラット脳へ移植したところ、1 か月にわたり MRI による経過観察が可能であった (図 1c,d)。以上のことから、本手法により移植細胞の MRI 経過観察が可能であることが示された。

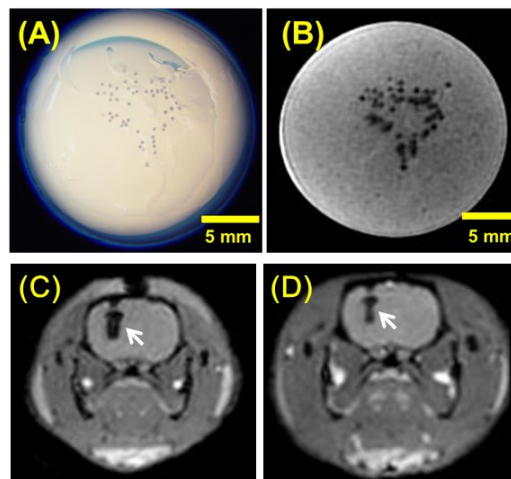


図 1. (A) SPIO 標識した神経幹細胞凝集体の位相差像および (B) MRI 像。図の黒点それぞれが神経幹細胞凝集体 1 つを示す。(C) SPIO 標識した神経幹細胞凝集体を移植した直後のラット脳の MRI 像。(D) 移植 1 か月後。

(3) 細胞 - 細胞および細胞 - 材料間接着の制御

ポリ乳酸足場材料への細胞接着の空間的制御

DNA の相補対形成を利用して、細胞接着性の乏しいポリ乳酸表面への細胞接着の誘導、さらに、DNA 配列設計の多様性を利用して複数種の細胞のパターニングを試みた。ポリ乳酸ファイバーまたはフィルムへ ssDNA (SeqA' または SeqB') を固定化し、その相補鎖を有する ssDNA-PEG-lipid を用いて細胞表面を修飾する。異なる配列の ssDNA および ssDNA-PEG-lipid を用いることで、特定の DNA ペア (SeqA と SeqA', SeqB と SeqB') 間の相補対形成に伴う複数種の細胞の接着を空間的に制御することができた (図 2)。次いで、血清含有培地中での培養に切り替えることで、DNA を介した接着から細胞接着性タンパク質を介した天然の接着様式へと移行し、細胞増殖することが分かった。この方法を用いることで、様々な形状の足場材料の望む位置へ望みの細胞を接着させることが可能になり、複雑な生体用組織の構築が期待できる。

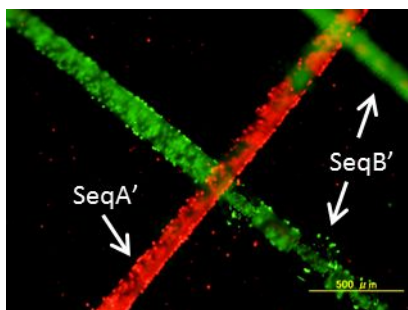


図 2. 配列の異なる ssDNA (SeqA' および SeqB') を固定化したポリ乳酸ファイバー上へ相補配列を持つ ssDNA-PEG-脂質で修飾した細胞を播種した後の蛍光顕微鏡像。赤: SeqA-PEG-脂質修飾細胞。緑: SeqB-PEG-脂質修飾細胞

細胞接着および脱着の制御

遺伝子工学で利用される、特定の DNA 配列を選択的に切断する制限酵素を利用し、DNA を介して接着した細胞を選択的に回収することを試みた。制限酵素 (BamH1 または EcoR1) の切断サイトを有する ssDNA-PEG-脂質を設計し、それを用いて細胞 - 基板間および細胞 - 細胞間接着を誘導した。その後、BamH1 を添加すると、その切断サイトを有する細胞のみが脱離した (図 3, 緑標識細胞)。また、すべての DNA を分解する酵素を添加することで、DNA を介して接着した細胞をその DNA 配列に寄らず脱離させることができた。この技術を用いれば任意のタイミングで細胞の接着・脱離を制御することができるため、細胞間の相互作用を解析するツールとしての利用が期待される。

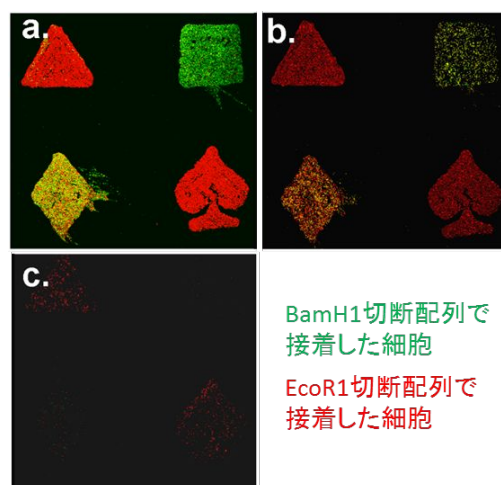


図 3. 制限酵素による細胞パターンの選択的脱離。(a) 細胞パターン作製直後、(b) BamH1 添加後、(c) DNA 分解酵素添加後

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Okamoto, Y., Ikeda, T., Suga, K., Umakoshi, H.: Development of in situ cell surface modification for surface enhanced Raman analysis of cell membrane. Chem. Lett., in press 査読有
DOI: 10.1246/cl.160137
2. Matsui, T., Arima, Y., Takemoto, N., Iwata, H. Cell patterning on polylactic acid through surface-tethered oligonucleotides. Acta Biomaterialia. 13:32-41(2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.011
3. Hoffecker, I.T., Takemoto, N., Arima, Y., Iwata, H.: Sequence-specific nuclease-mediated release of cells tethered by oligonucleotide phospholipids. Biomaterials, 53, 318-329 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.059
4. Itagaki T, Arima Y, Kuwabara R, Kitamura N, Iwata H. Interaction between cells and poly(ethylene glycol)-lipid conjugates. Colloids Surf. B 135:765-773 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.014
5. Egawa, E.Y., Kitamura, N., Nakai, R., Arima, Y., Iwata, H.: A DNA hybridization system for labeling of neural stem cells with SPIO nanoparticles for MRI monitoring post-transplantation. Biomaterials, 54, 158-167 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.017

6. Deno, S., Takemoto, N., Iwata, H.: Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 350-357 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2013.11.023

7. Sakurai, K., Hoffecker, I.T., Iwata, H.: Long term culture of cells patterned on glass via membrane-tethered oligonucleotides. *Biomaterials*, 34, 361-370 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.080

8. Kitamura, N., Nakai, R., Kohda, H., Furuta-Okamoto, K., Iwata, H.: Labeling of islet cells with iron oxide nanoparticles through DNA hybridization for highly sensitive detection by MRI. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 7175-7181 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2013.08.063

〔学会発表〕(計 43 件)

1. Edgar Yuji Egawa, 北村成史, 中井隆介, 有馬祐介, 岩田博夫: A DNA hybridization system for labeling of NSCs with SPIO for MRI monitoring post-transplantation, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 19 日 - 21 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

2. 松岡洋佑, 有馬祐介, 岩田博夫: 塩基長の異なる単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質による胞間接着. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日 - 10 日, 京都テルサ (京都市)

3. 平居佑亮, 有馬祐介, 岩田博夫: ポリエチレングリコール-脂質を用いた細胞表面への遺伝子組み換えタンパクの固定化. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月 9 日 - 10 日, 京都テルサ (京都市)

4. 有馬祐介, 岩田博夫: 単鎖 DNA ポリエチレングリコール-脂質による細胞間接着のモデル化. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日 - 10 日, 京都テルサ (京都市)

5. 岡本行広: 生体分子の分離分析の高性能化を目指して, 日本分析化学会近畿支部, 異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手講演会, 2015 年 11 月 7 日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市)

6. 有馬祐介, 岩田博夫: 単鎖 DNA - ポリエチレングリコール - 脂質複合体を用いた細胞表面工学とその応用, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学

会大会 合同大会), 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際会議場 (神戸市中央区)

7. Arima, Y., Iwata, H.: Cell attachment to supported lipid bilayer mediated by oligonucleotide-phospholipid conjugates. E-MRS Spring Meeting, 2015 年 5 月 11 日 - 15 日, Lille Grand Paris (Lille, France)

8. Arima, Y., Matsui, T., Iwata, H.: Cell patterning on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 2nd Japan-China Symposium on Nanomedicine, 2014 年 5 月 16 日 - 17 日, 広島大学応仁会館 (広島市南区)

9. 松井利樹, 有馬祐介, 竹本直紘, 岩田博夫: オリゴヌクレオチドを介したポリ乳酸上への細胞パターンニング. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日 - 18 日, タワーホール舟堀 (東京都江戸川区)

10. 板垣 亮, 岩田博夫: 脂質部の異なるポリエチレングリコール-脂質複合体と種々の細胞との相互作用. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 2013 年 11 月 25 日 - 26 日, タワーホール舟堀 (東京都江戸川区)

11. 出野 翔, 竹本直紘, 岩田博夫: 単鎖 DNA-PEG-脂質複合体を用いた薬剤送達による再灌流障害の軽減. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 2013 年 11 月 25 日 - 26 日, タワーホール舟堀 (東京都江戸川区)

12. Egawa, E.Y., Kitamura, N., Nakai, R., Iwata, H.: A DNA hybridization system for labeling and tracking of transplanted neural stem cells by MRI. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 2013 年 11 月 25 日 - 26 日, タワーホール舟堀 (東京都江戸川区)

13. 岩田博夫: Cell LEGO 細胞から組織を作る. MEDTEC Japan 2013, 2013 年 4 月 25 日, 東京ビッグサイト (東京都江東区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 博夫 (IWATA, Hiroo)
京都大学・再生医科学研究所・名誉教授
研究者番号：30160120

(2) 研究分担者

岡本 行広 (OKAMOTO, Yukihiro)
大阪大学・基礎工学研究科・講師
研究者番号：50503918

北村 成史 (KITAMURA, Narufumi)
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号：50624912

有馬 祐介 (ARIMA, Yusuke)
京都大学・再生医科学研究所・助教
研究者番号：90402792

(3) 連携研究者

なし