

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14490

研究課題名（和文）「呼吸」をトリガーとする革新的1細胞包括技術の開発

研究課題名（英文）Single cell-encapsulation in hydrogels triggered by cellular respiration

研究代表者

境 慎司（Sakai, Shinji）

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞が「呼吸」に伴う副生物として産生する微量の過酸化水素を利用して、高分子とその高分子からのヒドロゲル形成反応を触媒する酵素などを含む1つの溶液に浸すだけで細胞をヒドロゲル被膜で1個ずつ別々に包括できる方法の創出に取り組んだ。その結果、細胞膜に細胞の生存を損なわない方法で刺激を加えて、細胞の呼吸活性を上昇させることにより、最大で系に存在する細胞の98%を、厚さ1マイクロメートル程度のヒドロゲル皮膜で覆うことに成功した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we tried to develop a novel method for enclosing mammalian cells in hydrogel sheath individually. Especially, we focused on the use of cell respiration as a trigger of the enclosing process. It is known that a small amount of reactive oxygen species is produced in respiration. Our idea is a use of the reactive oxygen species for the formation of hydrogel sheath on the individual cell surface. We used a certain biocompatible molecule for enhancing respiration activity. By soaking in the aqueous solution containing enzyme, polymer and the biocompatible molecules, 98% of fibroblast cells were successfully enclosed in a hydrogel sheath of around 1 micrometer in thickness.

研究分野：生物化学工学

キーワード：生体材料 生物化学工学 細胞包括

GFP-BAM 濃度と細胞の浸漬時間と細胞表面への GFP-BAM の固定化量の相関を明らかにした。その後、過酸化水素特異的蛍光プローブを細胞内へ取り込ませ、BAM 溶液に浸漬することで、過酸化水素産生速度の変化を測定した。さらに、BAM と結合させる蛋白質（アルブミン (BSA)、オパールブミン、カゼイン) の種類を変えることで、BAM の活性酸素産生誘導性が変化するかを調べた。検討の対象としては、マウス線維芽細胞 (10T1/2 細胞、STO 細胞)、ヒト肝臓がん由来細胞 (HepG2 細胞)、ヒトさい帯静脈内皮細胞 (HUVE 細胞) を使用した。さらに、細胞への影響も調べた。

(2)細胞表面へのヒドロゲル皮膜形成評価

BAM と BSA を結合させた BSA-BAM を細胞に作用させた後、アルギン酸とチラミンを水溶性カルボジイミドを使用して結合させたフェノール性水酸基導入アルギン酸と西洋わさび由来ペルオキシダーゼを含む水溶液に浸した。15~60 分間に洗浄し、フローサイトメーターを用いて皮膜が形成した細胞の割合を測定した。また、西洋わさび由来ペルオキシダーゼと BAM を結合させた HRP-BAM を同様に作用させた後、西洋わさび由来ペルオキシダーゼを含まないフェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液に浸した。ヒドロゲル皮膜の形成の評価には、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターを使用した。

4. 研究成果

(1) 簡便な刺激付与による活性酸素産生速度の制御可能性の検討

マウス線維芽細胞 (10T1/2 細胞) を培養皿から剥離後、15 nM、150 nM、1.5 μ M の GFP-BAM 溶液に 1~15 分間浸した後の、細胞表面の蛍光強度を測定した結果を図 2 に示す (15 nM GFP-BAM 溶液に 1 分間浸した場合の蛍光強度を 1 とした相対蛍光強度)。その結果、浸漬 15 分以内に細胞表面に存在する GFP-BAM 量はほぼ一定値となっていることがわかった。続いて、BSA-BAM 濃度および溶液への浸漬時間を操作した場合の、細胞内活性酸素量を、細胞に蛍光プローブを取り込ませることで測定した。その結果を図 3 に

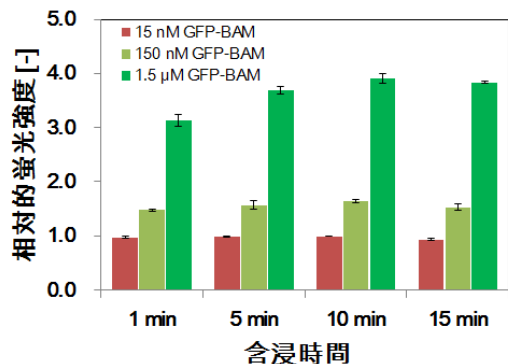


図 2. 濃度の異なる GFP-BAM 溶液への浸漬時間と細胞の蛍光強度。

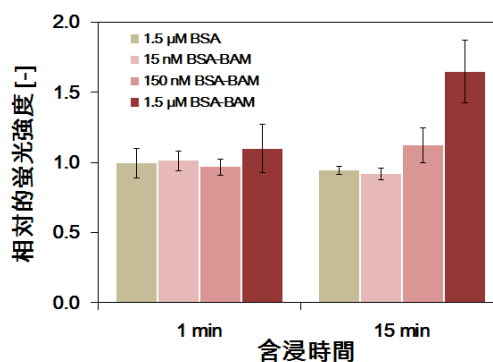


図 3. 濃度の異なる GFP-BAM 溶液への浸漬時間と細胞の活性酸素産生にもとづく蛍光強度。

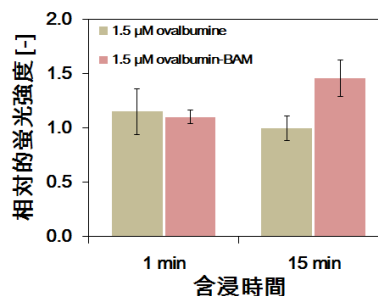
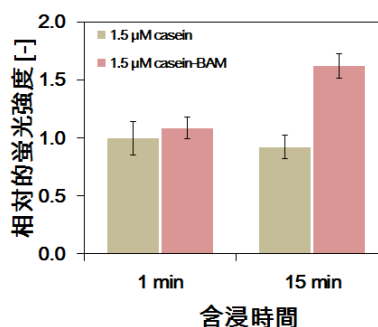


図 4. カゼイン-BAM、オパールブミン-BAM 溶液への浸漬時間と細胞の活性酸素産生にもとづく蛍光強度。

示す。浸漬時間 1 分では、いずれの条件でも細胞の活性酸素産生に差は確認されなかった。一方で、15 分間浸漬した条件では、15 nM と 150 nM の BSA-BAM ではほとんど活性酸素産生に差が見られなかったのに対して、1.5 μ M では 15 nM の場合の約 1.5 倍の蛍光強度を示した。なお、BSA と結合させていない BSA では活性酸素産生速度の向上は確認されなかった。さらに、この活性酸素産生速度の向上は、蛋白質に依存しないことを明らかにするために、カゼインとオパールブミンと結合させた BAM を用いて、活性酸素の産生評価を行ったところ、いずれの場合にも 15 分後には、活性酸素産生の増大に起因する蛍光強度の増大が確認された (図 4)。これらの結果より、脂質成分を細胞膜に接触させることによって、細胞の呼吸活性が増強され、それにより生じる活性酸素産生も増大することが明らかとなった。

細胞周囲へのヒドロゲル皮膜を形成させるにあたって、細胞の生存が阻害されていることは細胞包括技術として意味をなさないこと

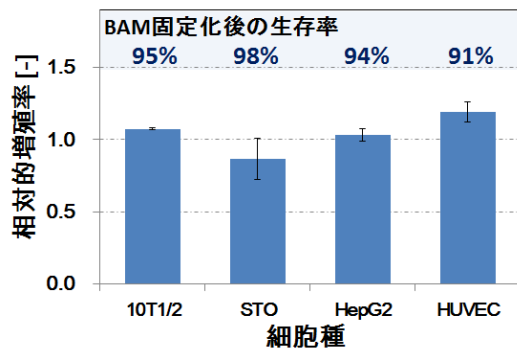


図 5. BSA-BAM 溶液への浸漬後の細胞生存率と正常細胞との増殖率比較。

から、1.5 mM の BSA-BAM 溶液に 60 分間浸漬した後の細胞の生存率を評価した。さらに 1 日以上経過後に顕著になってくる影響を調べるために、正常な細胞と 4 日間の増殖を比較した。その結果、図 5 に示されるように、10T1/2 細胞、STO 細胞、HepG2 細胞、HUVEC 細胞のいずれも BSA-BAM 溶液への浸漬により、生存率が著しく低下することなく、90% 以上を維持していた。また、正常細胞の値を 1 とした相対増殖率は、正常細胞とほぼ同じ値であり、この結果からも、脂質成分の付与による悪影響は確認できなかった。以上より、オレイル基を含む BAM での処理は、細胞の生存に影響を与えず、活性酸素産生を促進できることが明らかとなった。

(2)細胞表面へのヒドロゲル皮膜形成評価

(1)の検討結果にもとづいて、細胞表面にヒドロゲルを形成させる検討を実施した。1.5 μ M BSA-BAM 溶液に浸した後に、蛍光修飾フェノール性水酸基導入アルギン酸と 1.5 μ M の西洋わさび由来ペルオキシダーゼ溶液に 15 分間浸したところ、BSA-BAM で処理をしなかった細胞の包括率 8% が 20% に上昇した (図 6)。しかし、包括率 100% にはほど遠かったことから、次いで、BSA の代わりに西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を BAM と結合させ、細胞が産生した活性酸素がすぐに高分子の架橋反応に利用できるようにした (図 6)。その結果、包括率は約 70% に向上した。さらに高い包括率を得るために、1.5 μ M の HRP-BAM 溶液に 15 分間浸した細

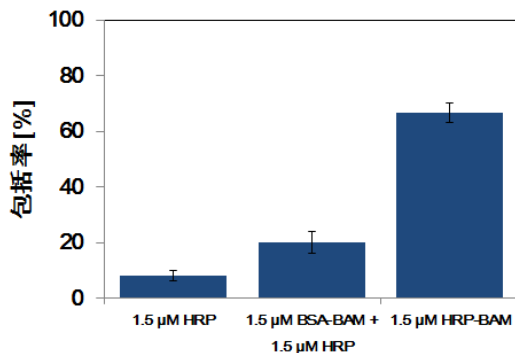
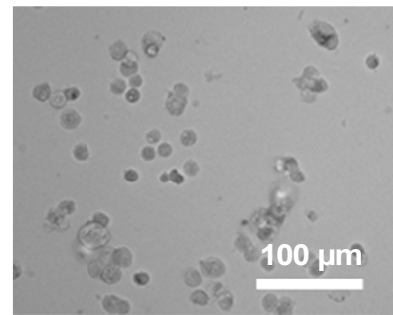
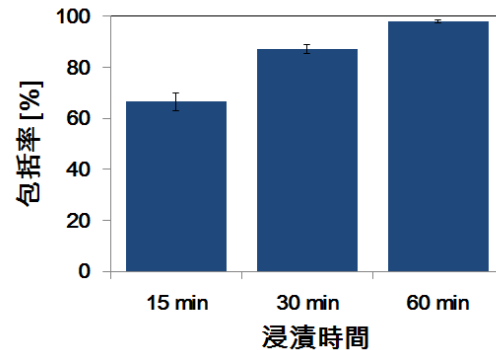
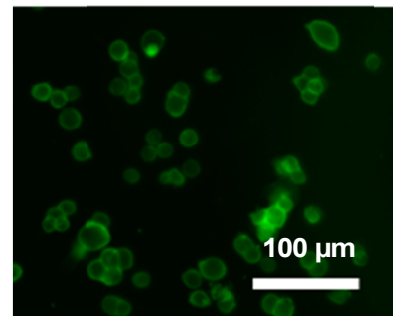


図 6. HRP を含む溶液もしくは HRP-BAM を含む溶液に浸漬した細胞のヒドロゲルへ包括率。

胞を、蛍光修飾フェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液に浸す時間を 60 分まで延長した。その結果、30 分間浸した場合には 87%、60 分間浸した場合には 98% とほぼすべての細胞をアルギン酸ヒドロゲルで覆うことに成功した (図 7)。



明視野撮影：60min 浸漬条件



蛍光撮影：60min 浸漬条件

図 7. 蛍光修飾フェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液への浸漬時間と包括率 (上)、60 分浸漬時の明視野像 (中)、蛍光観察像 (下)

以上の検討結果より、本研究で開発を目指した細胞の呼吸により生成する活性酸素を利用した、新しい細胞包括技術の開発に成功したと言える。この方法は、特別な機器を必要とせず、単に溶液に複数回浸すだけであるという容易さから多くの研究者が利用することになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

境慎司 (SAKAI, SHINJI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938