

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500427

研究課題名 (和文) 刺激応答性高分子を表面修飾した細胞診断・分取用マイクロアレイの開発

研究課題名 (英文) Development of surface modified cell array with stimuli-sensitive polymer for cell diagnosis and cell collection

研究代表者：白石 浩平 (SHIRAIISHI KOHEI)

近畿大学・工学部・教授

研究者番号：10196602

研究成果の概要：個細胞を固定化して細胞の機能診断を行ない、温度刺激によって細胞を非侵襲的に選択的に剥離・回収する新規な細胞診断デバイスを開発した。ガラス基板上のサイズやパターンを制御した金スポットに温度刺激に可逆的に応答する poly(2-hydroxypropylmethacrylamide-co-methylmethacrylate), ガラス面には細胞非接着面としての poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphoryl choline]をそれぞれ修飾した。細胞播種により個細胞をアレイ表面に固定化できることを初めて見出した。温度刺激で 90%以上の接着細胞が非侵襲的に剥離した。DNA トランスフェクションを 90%以上の高効率で行える等、本細胞マイクロアレイが診断と分取用デバイスとして有用でかつ実用化可能であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	330,000	1,430,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：検査・診断システム, 細胞・組織工学, 生体適合性材料

1. 研究開始当初の背景

従来までは抗体特異性、増殖性等の類性質で集めた細胞集団としての細胞研究が行われていると考えられるが、個細胞での研究例は細胞の分取が困難な点から殆ど行われていない。細胞集団でなく、性質が一定の細胞を分取することによって、細胞工学的研究と診断技術に大きく寄与すると考える。我々は、細胞膜表面のリン脂質の双性イオン構造に

類似した生体適合性材料の開発過程で、体内に類似する環境を人工材料で構築する研究を進め、安価で大量合成可能な人工分子の開発に成功していた。また、生体適合性材料を温度によって可溶—不溶が可逆的に変化する温度応答性ポリマーに転換できることを見出していた。細胞アレイは一度に大量の情報をもたらす high-throughput 解析を可能にするツールとして注目されるばかりでない。

上述のように、同一組織から得られた細胞情報も細胞集団からのものであり、それぞれの性質は全く均一ではなく、細胞内遺伝子やそれに付随した各種タンパク質の発現量は異なる。我々が開発した生体適合性分子と温度応答性分子を企業との共同研究にて独自に開発したガラス面に一定のパターンの約20000個の金スポットをもつアレイと組み合わせることにより、個細胞を固定化→DNAトランスフェクション等による細胞診断→選択細胞の分取→分取細胞培養とさらなる機能評価を可能として細胞診断を精密化するツールを提案した。

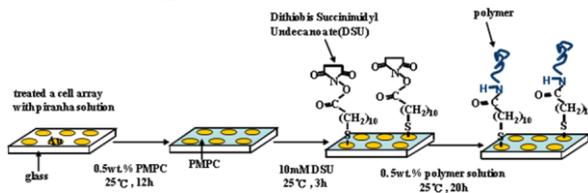
2. 研究の目的

本研究では、細胞レベルの大きさのスポットを基板上に形成させ、個細胞の固定化と細胞を特定して分取するデバイスの開発を目的とする。これは、固定化した細胞毎に細胞機能に関して一度に大量の情報を入手可能な high-throughput 解析も可能となる。また、細胞サイズのスポットには細胞の接着・剥離機能のみならず細胞膜表層に特異的に発現しているタンパク質等の特定も可能となる。さらに、細胞内への導入で特定配列の遺伝子との相互作用を利用した細胞識別機能等を活用して特定した細胞を非侵襲的に回収することを目的とする。

3. 研究の方法

【温度応答性ポリマー相と細胞非接着相をもつ細胞マイクロアレイの調製】図1に作製の一例を示す。(i)温度応答性を示す 2-Hydroxypropylmethacrylamide(HPMA)と methyl methacrylate(MMA)を2-mercaptoethanol(2ME)存在下でラジカル共重合して末端アミノ基の温度応答性ポリマー[P(HPMA-co-MMA)-NH₂]とした。(ii)セルサイズに(数μm:口径およびパターンは可変)マスキングして金コーティングした素材表面をプラズマ洗浄あるいは過酸化水素/硫酸等で表面を酸化分解(piranha)して洗浄する。(iii)ガラス面への細胞接着を避けるため、末端trimethoxysilane化した生体適合性poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phospho-

図1 アレイ基板上へのポリマーのコーティング



rylcholine] [PMPC] やaminopropyltrimethoxysilaneにてガラス表面のみをアミノ化したのち、末端イソシアネート化したポリエチレンゲ

リコール(PEG)等によってガラス面を細胞非接着相とした。(iv)基板を塩酸/メタノール等で洗浄した後、スクシンイミドとチオール基を末端にもつ試薬(dithiobis succinimidylundecanoate:DSU)を金表面と反応させる。反応後直ちに、P(HPMA-co-MMA)-NH₂と反応させ、金表面に温度応答性の生体適合性ポリマーでコーティングする。これらポリマーの固定化は走査型プローブ顕微鏡(SPM) (図2)あるいは顕微鏡IRイメージング等で確認した。一方、温度応答性を示すpoly(N-isopropylacrylamide)[PNiPAAm]も2ME存在下、連鎖移動ラジカル重合法によって末端をアミノ基とし、P(HPMA-co-MMA)同様に金表面に固定化した。

【細胞の接着・増殖試験】細胞の接着・増殖試験には HeLa 細胞 (理研セルバンク RCB0007) を用いた。クリーンベンチ内で70%エタノールに浸漬した後、1h, UV照射下で乾燥して滅菌処理した。表面をリン酸緩

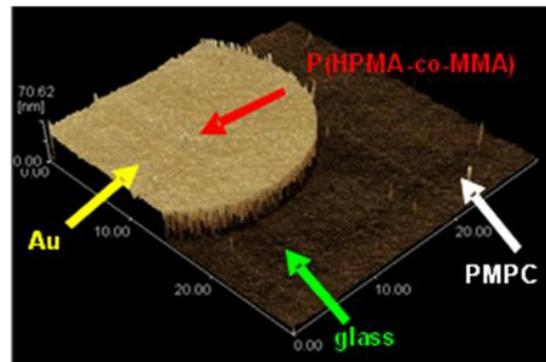


図2 P(HPMA-co-MMA)とPMPCを化学固定化したアレイのSPM像

衝液(PBS)にて洗浄し、細胞接着のためのコラーゲン塗布して、MEM培地浮遊 HeLa細胞 10⁵ cells/mLを播種して、37°C, 24 h, 5%CO₂インキュベータ中で培養した。表面をPBSで3回洗浄し、倒立型ルーチン顕微鏡で観察し、Hechst33342で核染色し、蛍光像を顕微鏡デジタルカメラで撮影した。

【細胞の温度刺激剥離】細胞の温度刺激による剥離は、上記同様に培養後、20°Cに予冷しておいたMEM培地を加えて、20°Cのサーモプレート上で2h静置した。上澄みを除いたのち、接着細胞を同様に核染色して未剥離細胞を蛍光顕微鏡で観察・計測した。

【細胞への緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ベクターのトランスフェクション】pTracerTM-EF / His A(Invitrogen)を用いてGFP発現ベクターをもつプラスミドを得た。次に、プラスミドDNAと細胞導入のためのカチオン性試薬(Lipofectamien2000)との複

合体を形成させた。HeLa 細胞を 37°C, 24 h, 5%CO₂ インキュベータ中で培養した後、上澄みを除き、上記複合体を加えて、6 h 培養した。次に、上澄みを除き、MEM 培地を加えて 18 h 培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定化後に核染色試薬 Hoechst33342 を加えた。核染色数と GFP 蛍光数を計測して、トランスフェクション効率を算出した。

【トランスフェクション後の細胞の温度刺激剥離】上記同様にトランスフェクション後、20°Cのサーモプレート上で静置した。MEM 培地にて 2 回洗浄して浮遊細胞を回収した。トランスフェクション時に GFP と同時に抗生物質(Zeocin)耐性が組み込まれた HeLa 細胞を Zeocin を含む MEM 培地にて培養して細胞増殖能を検討した。

4. 研究成果

単一細胞がもつ遺伝子や形態情報等を高い精度で解析できれば細胞診断の精密化が可能となる。また、診断した細胞を個別に回収することによりこれまでは難しかった機能的に同一の細胞を収集することができ、診断や治療および創薬に有用なデバイスが構築される。

本研究では、細胞の固定化操作が簡便でかつ個々の細胞を評価後は、培養温度 37°C では、水に不溶、低温では水に可溶の温度応答性ポリマーを用いて非侵襲的細胞回収が可能な細胞アレイを提案した。

【温度応答性ポリマー相と細胞非接着相をもつ細胞マイクロアレイの調製】ガラス基板上に金スポットを任意の配列にパターン化したアレイ表面を調製した。このとき、リソグラフィの手法によって、金スポットの形状やピッチ等をマイクロスケールで自由に調整できる基板作成技術を確立した。次に、ガラス面にガラス特異的に反応が可能な methoxysilane を末端にもつ PMPC を 3-mercaptopropyltrimethoxysilane 存在下、ラジカル連鎖移動重合法によって調製した。一方、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルと 3-isocyanatopropyltriethoxysilane の反応により片末端に ethoxysilane 基をもつポリエチレングリコール(PEG)を調製したのち、ガラス面に PEG 鎖を修飾した。その後、金表面を DSU 処理した後、連鎖移動重合法によって調製した末端アミノ基の P(HPMA-co-MMA)-NH₂ と反応して修飾した。P(HPMA-co-MMA)はポリマー鎖長あるいは共重合する MMA 比によって相転移温度が変化する。そこで、相転移温度を細胞培養温度 37°C にとすため、共重合組成を変化させ最適化した P(HPMA-co-MMA)(HPMA/MMA=0.76/0.24 :モル比)を調製した。SPM 像から、細胞非接着相としての

PMPC あるいは PEG の修飾後はガラス面のみにブラシ状のポリマー鎖が認められた。次に、P(HPMA-co-MMA)を反応させると金表面にブラシ状のポリマー鎖が修飾された。金表面およびガラス表面には P(HPMA-co-MMA)、PMPC がポリマー鎖長に相当する数 nm のブラシ状に固定化されていた。また、スポットを凸部とする金表面とガラス表面の境界部までポリマーがブラシ状に固定化されていた。これは、反応性の異なる金およびガラスでアレイの基板を作成していることから、それぞれに特異的な反応によってナノスケールでの精密さで温度応答性ポリマー鎖とタンパク質吸着および細胞接着を抑制するポリマー鎖が修飾された最初の例と考える。PMPC 固定化後は水に対する接触角は 18°C と親水的に変化した。また、P(HPMA-co-MMA)を修飾すると、37°C と 20°C で水に対する接触角が約 10°C 変化し、P(HPMA-co-MMA)と PMPC でパターン化した細胞アレイ表面の温度刺激による性状変化を認めた。

【細胞の接着・増殖】約 2 万個の金スポットには細胞接着および温度刺激剥離が可能な生体適合性を示す温度応答性 P(HPMA-co-MMA)、ガラス面には生体適合性を示しかつタンパク質や細胞の接着を高度に抑制する生体膜の性質に類似した生体適合性ポリマーを固定化した。実用化可能な細胞非接着相として最適なポリマー素材を知るため、これまでに細胞非接着性およびタンパク質の吸着を抑制する素材として多くの研究が行われている PEG および PMPC を用いて、細胞非接着性の素材を HeLa 細胞により検討した。(図 3)

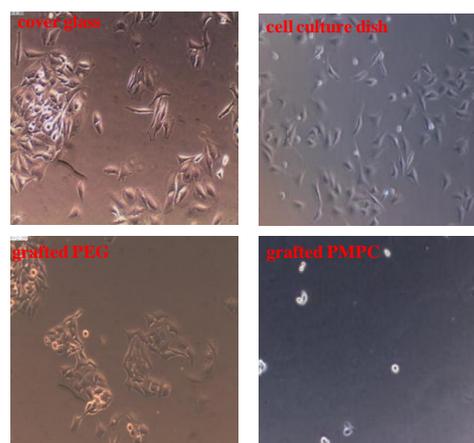


図 3 ガラス面、細胞培養皿、PEG、PMPC 修飾表面への HeLa 細胞の接着

PEG 修飾表面ではガラスに比べて細胞の接着はかなり抑制されていたが、接着細胞も認められ、効果は不十分であった。PEG 層は密度が高くなると表面の水が排除され PEG の末端官

能基からなる層が最表面となり、末端官能基が疎水性であると細胞の接着が起こることが報告されている。一方、PMPCで表面を修飾すると細胞接着はほとんど認められず接着細胞も伸展していなかった。また、HeLa細胞以外でもHepG2細胞でも同様な結果となった。したがって、細胞非接着性高分子として、PMPCは細胞非接着性の効果が強い。細胞非接着相として、PEGには鎖密度や鎖長の精密な制御が求められるのに対して、PMPCにはこのような制御が必要なく簡便でかつ効果的な非接着相の形成に最適であると結論付けた。ここに、P(HPMA-co-MMA)の相転移温度は37°Cであり、37°Cよりも低温側では親水性となり水に可溶化、高温側では疎水性となり水に不溶化と表面特性が可逆的に変化することから、細胞の接着・剥離が制御できる。次に、細胞アレイのスポットサイズあるいはスポットの間隔を変化させて、個細胞を固定するために最適化を行った。金スポットのサイズを30 μ mスポット間の間隔を150 μ mとしてP(HPMA-co-MMA)とPMPCを修飾した細胞アレイには個細胞を固定化できることを初めて示した(図4)。

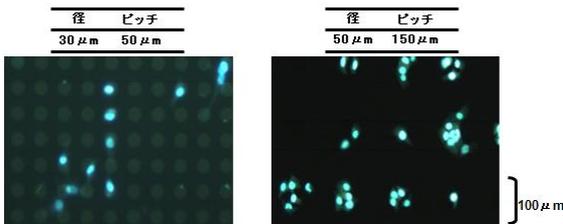


図4 パターンの異なる細胞アレイ表面へのHeLa細胞の接着

また、サイズ、ピッチ等を変化させることにより、個細胞から数個の細胞集団を固定化できることを明らかにした。

【細胞の温度刺激剥離】HeLa細胞を接着・培養後、雰囲気温度を20°Cとして2h静置して、温度刺激による細胞剥離を行った。細胞培養用皿、ガラス面での接着細胞が温度刺激によって10%また、P(HPMA-co-MMA)およびPMPC未修飾の細胞アレイでは20%が剥離したのに対して、これらポリマー鎖を修飾したアレイでは約80%の接着細胞が剥離した。同様にPNiPAAmを金スポットに表面修飾したアレイでも80%程度の高い細胞剥離を観察した。剥離した細胞を回収して、通常条件にて細胞培養した結果、細胞は接着・増殖した。

【細胞への緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ベクターのトランスフェクション】細胞アレイ表面に個細胞を固定化した後、細胞機能の評価についての一つの手法を検討するために、GFP発現ベクターのトランスフェクションを行った。金表面にP(HPMA-co-MMA)ある

いはPNiPAAmを修飾した表面で、HeLa細胞を接着・増殖後にGFP発現ベクター(pTracer™-EF/HisA)のトランスフェクションを行った。(図5)

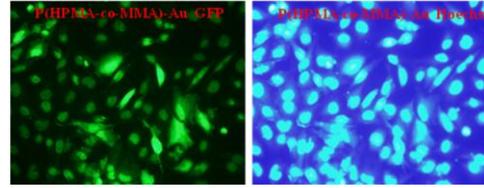


図5 P(HPMA-co-MMA)修飾表面で培養HeLa細胞へのGFPトランスフェクション後の蛍光像とHoechst核染色像

図から、核染色された細胞数とGFP蛍光が認められる細胞数を比較した結果、ほぼ100%の細胞にトランスフェクションされていた。また、PNiPAAmあるいは未修飾の金表面でもほぼ100%のトランスフェクション効率となったことから、温度応答性素材表面に接着した細胞へのトランスフェクション効率は通常とは大きな差異がないと考えられる。したがって、温度応答性ポリマー鎖を修飾した細胞アレイ表面でも確立されたトランスフェクション手法によって細胞評価が可能である。

トランスフェクション後の20°C、2hで温度刺激による細胞の剥離を検討した結果、未修飾では細胞剥離は約30%であったが、P(HPMA-co-MMA)あるいはPNiPAAmでは約90%の高い効率で剥離を確認した。細胞は洗浄操作で物理的に剥がれたのではなく、温度刺激によって温度応答性鎖の表面性状が変化したため、細胞が剥離したことを再確認した。

回収した細胞を抗生物質(Zeocin)を含むMEM培地中にて培養した。このとき、トランスフェクション時にはGFPと同時にZeocin耐性を組み込んでいる。コントロールとしてZeocin耐性を組み込んでいないHeLa細胞では培養後、120hでほぼすべての細胞が死んでいることを確認した。一方、トランスフェクション後に温度刺激にて回収した細胞ではZeocin含有培地中でも増殖を続けた。さらに、温度応答性ポリマーを修飾していない表面から剥離した細胞をではアポトーシスは認められなかったが、温度応答性ポリマーを修飾表面からの温度刺激で回収した細胞と比較して細胞増殖量が少なく、温度応答性ポリマー鎖表面からの剥離回収細胞のダメージが少ないことが示唆された。

以上の結果から、当該研究期間によって、個細胞の固定化技術基盤を確立したのみならず細胞診断のための既成技術が個細胞を固定化した細胞アレイにも適用できることを示した。さらに、温度応答性ポリマー鎖を修飾しているため、温度刺激によって細胞剥離・回収することがで

き、回収した細胞のダメージは少ないことも示された。ポリマー鎖の修飾密度等のさらなる制御によって、提案した細胞アレイによって細胞機能の診断と同一機能の細胞回収によって精密な細胞評価が可能になると考える。また、個細胞を固定化した表面に、新薬の投与により細胞への薬効や副作用の精密な診断も可能となる。

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 3 件)

① K. Shiraiishi(3/4), 他 3 名, Poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine] carrying Tocopheryl Moieties as terminal groups, *Journal Applied Polymer Science*, in press, 査読有

② 白石浩平(2/3), 他 2 名, 自己組織化能をもつポリ[N- α -メタクリルアミド-L-リジン-ブロッカージメチルシロキサン]の血液適合性, 高分子論文集, 65, 132-139, 2008, 査読有

③ 白石浩平(1/4), 他 3 名, 温度応答性ポリマーで修飾した PET 表面の大腸菌 *in vitro* セレクション法による評価, 高分子論文集, 65, 132-139, 2008, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 白石浩平(5/6), 他 6 名, 温度応答性 poly(HPMA-co-MMA) ドメインおよび細胞非接着相としての PMPC ドメインをもつ細胞マイクロアレイの調製と細胞接着および温度刺激剥離挙動, 高分子学会予稿集, 58(1), 発表決定, 神戸

② 白石浩平(7/8), 他 7 名, 温度応答性 poly(HPMA-co-MMA) と PMPC でパターン化した細胞アレイの調製と細胞接着および温度刺激剥離, 高分子学会予稿集, 57(2), 4781, 2008 年 9 月 25 日, 大阪

③ 白石浩平(6/7), 他 6 名, 温度応答性高分子を表面にもつ細胞アレイへの細胞接着と温度刺激剥離, 高分子学会予稿集, 57(1), 1960, 2008 年 5 月 29 日, 横浜

④ 白石浩平(4/5), 他 4 名, 大腸菌ランダムペプチドライブラリ法で選択されたペプチドの探索法による温度応答性ポリマー表面の性状評価, 高分子学会予稿集, 56(2), 5129, 2007 年 9 月 30 日, 名古屋

⑤ 白石浩平(5/6), 他 5 名, 細胞接着-剥離面としての温度応答性高分子と細胞非接着面としての PEG を表面修飾した細胞マイクロアレイ基板の調製, 高分子学会予稿集, 56(2), 5128, 2007 年 9 月 30 日, 名古屋

⑥ 白石浩平(5/6), 他 5 名, 温度応答性ポリ(N-2-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド/アルキルメタクルレート)共重合体をグラフ

とした PET 表面の大腸菌 *in vitro* セレクション法による評価, 高分子学会予稿集, 56(1), 2119, 2007 年 5 月 30 日, 京都

⑦ 白石浩平(5/6), 他 5 名, 温度応答性 poly(N-2-hydroxypropylmethacrylamide-co-methyl methacrylate) を表面修飾した細胞アレイ基板の調製, 高分子学会予稿集, 56(1), 2118, 2007 年 5 月 30 日, 京都

⑧ 白石浩平(2/3), 他 2 名, 両親媒性ブロックコポリマーの分子集合性と血液適合性, 高分子学会予稿集, 56(1), 2116, 2007 年 5 月 30 日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石浩平(SHIRAISHI KOHEI)

近畿大学・工学部・教授

研究者番号: 10196602

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

細谷浩史(HOSOYA HIROSHI)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 90183102