

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710113

研究課題名（和文） 細胞ゼータ電位を指標にした細胞品質管理デバイスの開発

研究課題名（英文） Development of a quality control device for cellular application
Based on zeta potential of cells

研究代表者

赤木 貴則（AKAGI TAKANORI）

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号 80401149

研究成果の概要：

細胞ゼータ電位は細胞の状態を反映する物性値であり、細胞をラベル化せずに測定できるため、細胞試料の品質管理に応用できると期待できる。本研究では、始めに、細胞ゼータ電位の測定に利用するマイクロ流体デバイスの材料であるポリジメチルシロキサン（PDMS）ポリマーの表面処理技術を構築し、ゼータ電位を高い信頼性で測定できる技術を開発した。次に、ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を細胞ゼータ電位を指標に判定できる可能性を見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	270,000	2,170,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス（2103A）

キーワード：マイクロデバイス、ナノバイオ、細胞・組織、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

近年、バイオテクノロジー分野の基礎研究だけでなく応用開発においても、細胞を用いた研究開発はますます重要になっている。特に、患者から採取した細胞を培養、分化させた後に患者自身に輸注・移植する、セルセラピーなどの再生医療においては、細胞を維持、管理する培養技術の高度化が重要である。現

在、細胞を増殖、分化させる技術の開発は進んでいるが、事前に細胞の状態を判定する手法の開発は進んでいない。すなわち、細胞の品質管理が、セルセラピー・再生医療などの最大限の治療効果を得るために解決すべき最重要課題である。分化した細胞と未分化細胞の区別は外見からは困難であり、これらの細胞を分離する手法として、抗原抗体反応を利用した FACS あるいは MACS 等の手法が

利用されている。しかしながら、これらのツールの使用には薬の侵襲や物理的ダメージが無視できないため、細胞の品質管理に用いることができない。細胞の品質を非侵襲的に計測する手法の開発が待ち望まれている。

一方、細胞表面電位(ゼータ電位)は非侵襲的に測定可能な細胞特性値として古くから着目されてきた。細胞ゼータ電位の評価装置は1960年頃に開発され、当初はNature誌で取り上げられるなど多くの期待を背負ったが、従来装置で実際に電気泳動を行うと、ゼータ電位導出のためのモデルとは大きく異なる泳動挙動がしばしば見られるため、装置の使用には熟練が必要で、概ね計測値のばらつきが大きいという問題があった。また、細胞ゼータ電位自体のばらつきも大きいと考えられていたためゼータ電位を評価することの重要性は過小に評価されてきた。近年、我々は微細加工技術により作られたマイクロキャピラリー電気泳動(μ CE)チップを中核技術とし、高速度カメラを搭載した顕微光学系、実時間粒子画像処理ソフトウェアから構成される高効率細胞ゼータ電位計測システムを提案した。本提案の原型は2000年に研究を開始した μ CEチップ上での細胞電気泳動技術であり、この技術は科学技術振興機構さがけプロジェクトを通じて、データ処理が自動化された計測システムへと発展し、計測値の信頼性、再現性の確立も図られた。また、本システムを用いて細胞ゼータ電位の細胞活動による変化を研究する過程で、ゼータ電位が細胞のわずかな変化を十分反映することを見出した。これは、独自開発した計測システムにより明らかになった重要な知見である。ゼータ電位の変動により細胞の診断を行う際には、ゼータ電位の高感度な検出が必須である。既に、株化細胞を用いた検討により、当該システムが細胞表面のわずかな変化を十分検出できることを見出した。本研究では、ゼータ電位の更なる効率的な測定方法の構築と、細胞の分化に伴うゼータ電位変動について検討し、本技術の細胞品質管理への応用可能性について検討した。

2. 研究の目的

細胞ゼータ電位の測定に利用するマイクロ流体デバイスの材料であるポリジメチルシロキサン(PDMS)ポリマーの表面処理技術を構築し、効率的なゼータ電位測定技術を構築すること、およびこの技術を利用して骨芽細胞へ分化させたヒト間葉系幹細胞のゼータ電位を測定し、ゼータ電位を指標とする細胞分化診断技術が構築可能か検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

真空紫外光によるPDMS酸化処理: PDMS薄膜に表面に真空紫外光(VUV)を照射した。PDMS表面の状態を分析するために、表面に滴果した水滴を顕微鏡で観察し、静的接触角を計測した。表面の化学的な状態は、赤外吸収量を全反射赤外分光法ATR-FTIR(FTIR-700, JASCO Co.)、およびX線光電子分光装置(Kratos-Shimadzu)で測定した。

PDMS製 μ CEデバイスの作製: 幅100 μ m、高さ50 μ m、長さ1 cmの流路をソフトリソグラフィ法で作製した。細胞の非特異吸着抑制のためにPDMS表面をVUV処理後、バイオメティックポリマーであるMPCポリマーを塗布し、コーティングした。

細胞電気泳動実験: 細胞の電気泳動度はオンチップ細胞電気泳動法で測定した。50 V/cmの電界を30秒間印加した。測定された細胞の電気泳動度には電気浸透流の速度成分も含まれるため、無電荷ビーズの電気泳動実験で電気浸透流速度を測定した。細胞の泳動度から電気浸透流の速度成分を差し引くことで、真の電気泳動度を算出した。

電気泳動度に及ぼす細胞剥離剤の効果: ヒト子宮頸癌株化細胞(HeLa)にトリプシンを作用させた。その後再培養し時間の経過とともに細胞を回収した。増殖率を指標にして細胞へのダメージを評価した。表面の電気的な状態は電気泳動度で評価した。

マウス白血球細胞の電気泳動度計測: C57BL/6J雄性マウスの大腿骨、脾臓、血液から採取した白血球の電気泳動度を測定し、電気泳動度を指標に白血球を区別できるか検討した。更に、マウス由来の4種類の白血病細胞(骨髄性白血病・骨髄腫・リンパ性白血病・骨髄単球性白血病)の電気泳動度を測定し、電気泳動度を指標に白血球の分化を評価できるか検討した。動物実験は東京大学動物実験規則に則って行った。

間葉系幹細胞の分化誘導実験: JCRB細胞バンクより購入したヒト間葉系幹細胞(UTBERT21)をMSCBM培地(LONZA)で2週間培養した。骨分化誘導培地(LONZA)で3週間培養して分化誘導させた。細胞の電気泳動度を測定し、電気泳動度を指標に間葉系幹細胞の分化を評価できるか検討した。

4. 研究成果

ゼータ電位の高精度計測に必要なデバイス表面処理技術について検討した。電気泳動デバイスの材料には、電気絶縁性に優れ、光学的ひずみがないPDMSポリマーを用いた。PDMS上で細胞を利用する場合には、PDMSの高い疎水性と細胞の吸着性が測定の妨げになることが知られており、PDMSをバイオ

デバイスで利用するための表面処理技術の構築が必要である。本研究では、VUVでPDMS表面を酸化させその表面状態を分析した上で、バイオミメティックポリマーであるMPCポリマーをPDMS表面にコーティングする技術について検討した。

PDMS表面の水滴接触角はおよそ120度で疎水性を示したが、VUVを照射するとその接触角は急激に減少し、30秒でほぼ0度に達する。そこでVUVの照射時間を30秒に設定した。次に、VUV照射後のPDMS表面の化学的な状態を調べるために、ATR-FTIRおよびXPSで分析した。図1にVUV酸化処理を行ったPDMS表面のATR-FTIRスペクトルを示す。VUV照射時間を増加させるとメチル基の赤外吸収量が減少し、シラノール基の吸収量が増加した。図2にXPS分析の結果を示す。VUV照射時間の増加と共に炭素原子の組成量が減少し、酸素原子の量が増加していた。以上の結果から、VUVを照射するとPDMS表面のメチル基がヒドロキシル基に置換され、PDMSが酸化されていることが確認された。

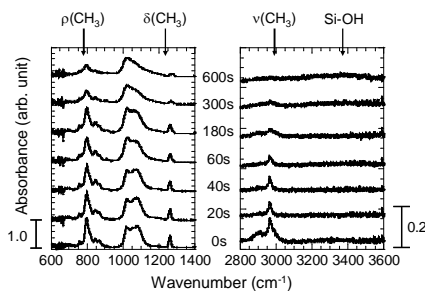


図1 PDMS酸化層のIRスペクトル

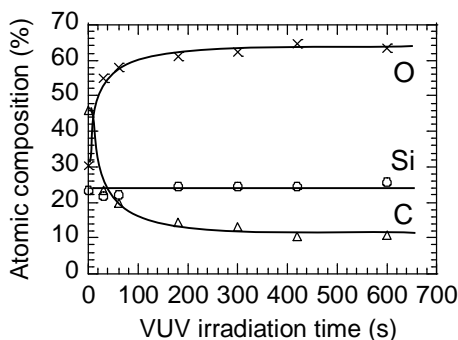


図2 VUV照射後のPDMS表面元素分析

PDMS製バイオデバイスで問題となっている生体分子の非特異吸着を抑制し、親水性を維持するために、生体適合性材料であるMPCポリマーのコーティング技術を構築した。これまで、ガラス用MPCポリマーはガラス表面と化学的に結合するが、PDMS用MPCポリマーは物理吸着によるため安定性に課題があった。本研究では、PDMS表面をVUVでガラス化した後でガラス用MPCポリマー

を結合させた。図3にはMPCで被覆したPDMS表面の蛍光標識アルブミンバクスの非特異吸着量に対するVUV照射時間の効果を示す。未処理のPDMSでは非特異的に吸着したアルブミンが多数確認された。一方で、VUVを30秒照射した際の非特異吸着量は未処理のPDMSと比較しておよそ90%抑制された。これは石英ガラスにMPCポリマーをコーティングした試料で得られる抑制量と同程度であり、PDMS表面に対するMPCポリマーの安定的なコーティング技術を構築できることが示された。

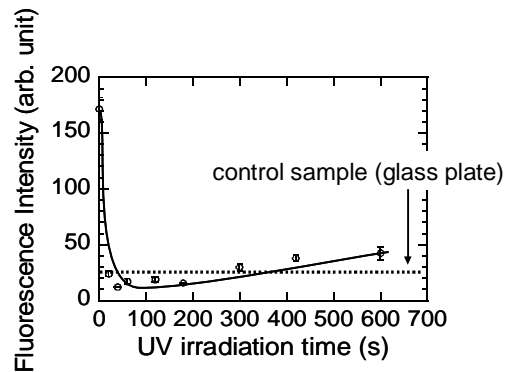


図3 BSA吸着量に対するVUVの効果

この表面処理技術を利用して電気泳動デバイスを作製し、細胞表面に対する酵素反応の影響を電気泳動度で評価できるか検討した。トリプシン処理後のHeLa細胞の表面は、顕微鏡観察では大きな変化が認められなかったが、再播種後の細胞増殖が抑制されるなど、細胞へのダメージがあることが認められた。さらに、トリプシン処理時間の増加に伴って細胞電気泳動度が減少し、トリプシンによる細胞へのダメージが細胞電気泳動度を計測することによって評価できる可能性が示された。

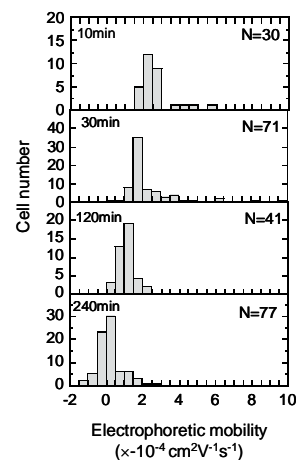


図4 HeLa細胞の電気泳動度に及ぼすトリプシン処理時間の効果

以上の検討で、細胞の電気泳動度を高い信頼性で簡便に測定できることが分かってきた。この技術を利用して、再生医療やセルセラピーへの応用を目指して研究されている細胞の分化を電気泳動度を指標に評価できるか検討した。

骨髄移植および造血幹細胞移植は最も臨床応用が進んでいるセルセラピーであり、日本では年間 1000 例を越える治療例が報告されている。現状では、移植前の全ての細胞の品質をチェックする技術は無いが、安全な治療を行うためには本来必要な技術である。本研究では、電気泳動度を指標に骨髄細胞および白血球の分化を評価できるか調べるために、マウスから抽出した白血球および株化されたマウス白血病細胞の電気泳動度を測定した。

図5に血液、骨髄、脾臓から抽出した白血球の電気泳動度を示す。それぞれの平均値は-2.0、-1.6および-1.2 ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)と異なった。血液中の白血球は成熟した細胞であり、骨髄や脾臓は未分化の細胞である。このことから、マウス白血球は分化の過程で異なる電気泳動度を持つことが示唆された。

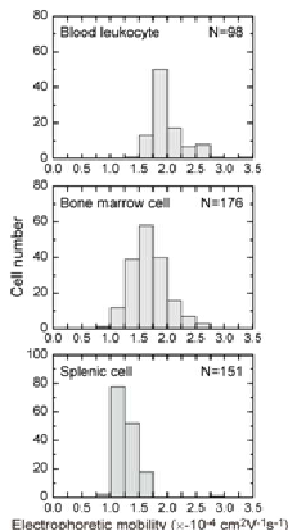


図5 マウス白血球細胞の電気泳動度

図6に、マウス由来の4種類の白血病細胞（骨髄性白血病・骨髄腫・リンパ性白血病・骨髄単球性白血病）の電気泳動度を示す。平均値は骨髄性白血病(M1)細胞が-1.5、骨髄腫(PAI)が-1.0、リンパ性白血病(L1210)細胞が-0.8、骨髄単球性白血病(WEHI3)細胞が-1.2 ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)と異なった。白血病細胞のEPMは正常細胞と比較して低い値を示している。白血病細胞はがん化しており、未分化の細胞であるため、正常細胞と比較して表面の状態が大きく異なっていると考えられる。従って、電気泳動度を指標に白血球のがん化や分化を評価できる可能性が示唆された。

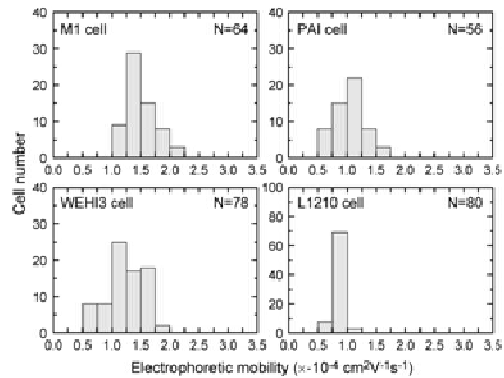


図6 マウス白血病細胞の電気泳動度

間葉系幹細胞は造血幹細胞と同様に臨床応用が進んでいる。骨髄細胞以外への応用可能性を調べるため、ヒト間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させると電気泳動度がどのように変化するか検討した。図7に未分化の間葉系幹細胞と骨芽細胞へ分化誘導させた細胞の電気泳動度を示す。分化誘導前の細胞電気泳動度は-0.5 ~ -2.2 ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)と広く分布したのに対し、分化させた細胞の電気泳動度は-0.5 ~ -1.0 ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)の範囲に分布した。ヒトから採取した間葉系幹細胞はヘテロジニアスな集団であるため、電気泳動度は広範囲に分布するが、分化誘導によってホモジニアスな集団と変化し、均一な電気泳動度をもったものと予想される。この結果から、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を電気泳動度を指標にして評価できる可能性がある。今後、一細胞レベルでの電気泳動度実験を行うことで、上記の可能性について検討できるものと思われる。

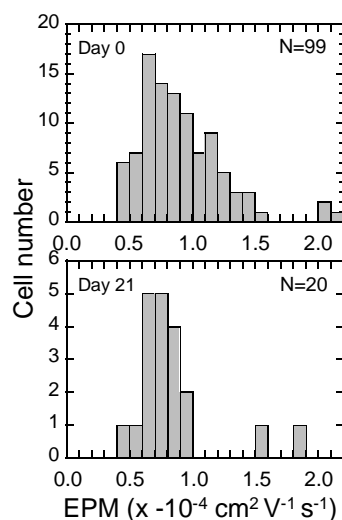


図7 ヒト間葉系幹細胞の電気泳動度に基づき骨芽細胞への分化誘導の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. T. Akagi and T. Ichiki, "Cell electrophoresis on a chip: what can we know from the changes in electrophoretic mobility?", *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.39, pp.2433-2442, 2008, 査読有
2. 一木隆範, 赤木貴則, "チップ型電気泳動による細胞の非侵襲計測.", *バイオサイエンスとインダストリー*, Vol.66, pp.604-609, 2008, 査読有
3. T. Akagi, M. Suzuki, T. Sato and T. Ichiki, "On-chip evaluation of damage on cell surfaces induced by cell dissociation agents.", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.46, pp. 6404-6409, 2007, 査読有
4. Y. Hamada, T. Ono, T. Akagi, K. Ishihara, and T. Ichiki, "Photochemical oxidation of poly(dimethylsiloxane) surface and subsequent coating with biomimetic phosphorylcholine polymer.", *J. Photopolymer Sci. Technol.* Vol.20, pp.245-249, 2007, 査読有
5. H. M. L. Tan, H. Fukuda, T. Akagi, and T. Ichiki, "Surface modification of poly(dimethylsiloxane) for controlling biological cells' adhesion using a scanning radical jet." *Thin Solid Films*, Vol.515, pp.5172-5178, 2007, 査読有
6. 細居洋介, 赤木貴則, 一木隆範, "マイクロリアクターアレイチップを用いた酵素機能高効率スクリーニングシステムの開発.", *電気学会論文誌 (IEEJ Trans. EIS)*, Vol.127-C, pp.1508-1514, 2007, 査読有
7. 平田孝道, 畠山力三, 金子俊郎, 岡田健, 秋谷昌宏, 島谷裕一, 一木隆範, 赤木貴則, "ナノスケールプラズマプロセスによるバイオデバイス構築." *プラズマ核融合学会誌* 83, 647-657, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計16件)

1. 赤木貴則, 一木隆範, "電気泳動度と蛍光強度の同時測定のためのチップ型細胞電気泳動システムの開発", 第56回春季応用物理学会, 2009年4月1日, つくば.
2. 赤木貴則, 松橋隆太郎, 毛利秀平, 一木隆範, "オンチップ細胞電気泳動法による骨分化誘導時の間葉系幹細胞表面の

電気的評価", 第56回春季応用物理学会, 2009年4月1日, つくば

3. 赤木貴則, 一木隆範, "電気泳動原理に基づいた細胞診断チップ", シンポジウム「ナノ、バイオ、環境科学の基礎としての界面動電現象」, 2009年3月7日, つくば.
4. 赤木貴則, 一木隆範, "ナノ・マイクロ加工技術による細胞分析システムの開発", 「医薬品開発のための細胞アッセイ技術」シンポジウム, 2009年1月8日, 東京.
5. 赤木貴則, 一木隆範, "Cell Applications.", 未踏・ナノデバイステクノロジー第151委員会研究会, ナノバイオフュージョン分科会研究会(invited), 2008年12月1日, 東京.
6. T. Akagi, R. Matsushashi, and T. Ichiki, "Relation between electrophoretic mobility and amount of sialic acids in cultured cells.", *International Union of Materials Research Societies (IUMRS-ICA2008)*, 2008年12月10日, Nagoya.
7. T. Akagi, R. Matsushashi, S. Mohri, and T. Ichiki, "On-chip cell electrophoresis for evaluating cells' functions.", *NanoBio-Seoul2008*, 2008年10月30日, Seoul, Korea.
8. 赤木貴則, 一木隆範, "オンチップ細胞電気泳動法による低侵襲細胞診断", 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム, 2008年9月23日, 東京.
9. 赤木貴則, 松橋隆太郎, 毛利秀平, 一木隆範, "血清飢餓培養したマウス白血病細胞のオンチップ細胞電気泳動", 第69回秋季応用物理学会, 2008年9月4日, 春日井, 愛知
10. T. Akagi, and T. Ichiki, "On-Chip Cell Electrophoresis to Evaluate Cell's Condition." *The 5th int. conf. interfaces against pollution (IAP2008)*, 2008年6月2日, Kyoto.
11. T. Akagi and T. Ichiki, "On-chip Analysis of the Effect of an Anticancer Drug on the Electrophoretic Mobility of Human Kidney Cells." *The 8th International Symposium on Biomimetic Materials Processing*, 2008年1月23日, Nagoya, Japan
12. T. Akagi, Y. Hamada, T. Ichiki, "Cell electrophoretic mobility change with the progress of apoptosis evaluated by on-chip cell electrophoresis." *The 18th Symp. of The Materials Research Society of Japan*, 2007年12月9日, Tokyo.

13. T. Akagi, Y. Hamada, T. Ichiki, "Evaluation of differentiation and canceration on mouse leukocytes by on-chip cell electrophoresis." The 18th Symp. of The Materials Research Society of Japan, 2007年12月8日, Tokyo.
14. T. Akagi and T. Ichiki, "On-chip evaluation of effect of drug-induced apoptosis on electrophoretic mobility of HEK cells.", The 11th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life sciences (Micro Total Analysis Systems 2007), 2007年10月10日, Paris, France.
15. 赤木貴則, 濱田祥輝, 一木隆範, "マイクロチップ細胞電気泳動法による塩酸イリノテカン誘導性細胞表面電位変化の評価", 日本分析化学会第56年会, 2007年9月21日, 徳島
16. 赤木貴則, 濱田祥輝, 一木隆範, "オンチップ細胞電気泳動法による HEK 細胞の薬物誘導性アポトーシスの電氣的評価(2)", 第68回秋季応用物理学会, 2007年9月5日, 札幌

〔図書〕(計1件)

1. 一木隆範, 赤木貴則, シーエムシー出版, 『細胞分離・操作技術の最前線』第8章 細胞電気計測用デバイス, 2008, 計8頁.

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤木 貴則 (Akagi Takanori)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号:80401149

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし