

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12805

研究課題名(和文) 多様な細胞に適用可能な異種細胞間接着誘導技術とその応用

研究課題名(英文) Cell type-independent surface modification for cell-cell adhesion

研究代表者

有馬 祐介 (Arima, Yusuke)

九州大学・先導物質化学研究所・准教授

研究者番号：90402792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異種細胞間の接着を誘導する技術は、生体類似組織の作製など細胞工学への幅広い応用が期待されている。本研究では、多種多様な細胞に適用可能な細胞間接着誘導技術の確立を目指した。主鎖骨格が中性電荷のペプチド核酸(PNA)を有する両親媒性分子を用いることで、従来法では修飾困難であった細胞種に対しても異種細胞間接着を誘導できることが明らかとなった。また、細胞表面へ修飾したタンパク質の作用による細胞間接着の誘導にも取り組んだ。細胞表面に修飾したリガンドとタンパク質中の特定配列と特異的結合を介して細胞表面をタンパク質で修飾することができ、異種細胞間接着の誘導が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体類似組織の形成や抗体作製などの医学応用において、細胞の接着が不十分なため使用可能な細胞種の限定や効率の低さなどが問題であった。本技術を用いることで多種多様な細胞種に対して表面修飾が可能となり、細胞を扱う医学・生物学分野における細胞間接着の問題を解決する方法を提供できる。また、細胞種による表面修飾効率の違いを生じさせる原因を知ることで、種々の分子が混在する細胞表面に関する更なる地検が得られると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cell-cell adhesion plays important roles in biomedical applications such as the construction of native-like tissues. In this study, we aimed to establish cell type-independent control of cell-cell adhesion.

Amphiphilic molecules carrying peptide nucleic acid with neutral backbone allowed for the modification of surfaces of many cell types, and thus the induction of adhesion to another cell types through hybridization.

We also tested cell-cell adhesion through cell surface modification with proteins. Modification of cell surface with ligand enabled to bind to proteins through binding of ligand to specific sequence in protein and thus to adhere to another cell types.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：細胞表面修飾 細胞間接着 核酸 タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、臓器と似た3次元生体組織(オルガノイド)の作製が試みられ、薬物スクリーニングや移植への利用が期待されている。しかし、複数種の細胞を混合し3次元組織を作ると、異種細胞間の自発的な接着に左右され望みの細胞を自在に用いることは困難である。また、モノクローナル抗体の産生に必須であるハイブリドーマの作製では、B細胞とミエローマが接着しないため融合効率は極めて低い。両細胞を接着させた上で細胞融合を誘発できれば、融合効率の飛躍的な向上が期待できる。このように、異種細胞間の接着を制御する技術が求められている。

細胞間接着を操作する方法として、遺伝子導入による膜タンパクの強制発現が報告されている。しかし、未導入細胞の混在や遺伝子導入により細胞の性質自体が変わることが懸念される。最近、タンパク質、核酸などを生細胞の表面へ直接修飾することが試みられ、遺伝子導入に比べ修飾が簡便・迅速・高効率であることから、細胞間接着制御への応用が期待されている。

申請者はこれまで、単鎖DNA-ポリエチレングリコール-リン脂質複合体(ssDNA-PEG-脂質、図1)を用いた細胞表面の修飾に取り組んできた。細胞の脂質二分子膜との疎水性相互作用により細胞表面にssDNAが導入される。同様にして異種の細胞へ相補配列のssDNAを導入することで相補対形成を介した細胞間接着の誘導が可能である。しかし、ssDNA-PEG-脂質による修飾を種々の細胞に試みたところ、ミエローマや間葉系幹細胞など医学応用上重要な細胞に対して修飾不可能であることを見出した。

このことから、応用面で重要な細胞を含む多種多様な細胞間の接着を誘導するためには、細胞種に因らず表面修飾可能な分子の設計が重要である。

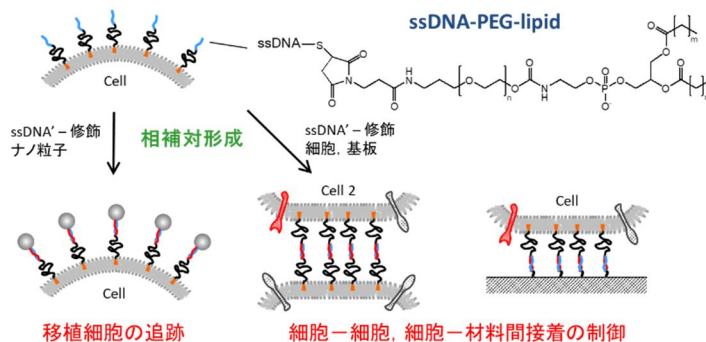


図1. ssDNA-PEG-脂質を用いた細胞操作

## 2. 研究の目的

本研究では、ssDNAの有する負電荷の影響に着目し、ssDNAに代わる機能分子を細胞間接着部位に用いた分子を設計し、多様な細胞に対する細胞間接着誘導技術の確立を目指した。その方法として以下の2つを検討した。

### A) 両方の細胞を修飾する方法(図2左)

従来のssDNAの代わりにペプチド核酸(PNA: 中性)を用いたPEG-脂質を用い、2種類の細胞(細胞A, B)の表面を修飾する。表面に導入された相補鎖間の結合を利用して細胞間接着を誘導する。

### B) 片側の細胞のみを修飾する方法(図2右)

PEG-脂質誘導体を介してタンパク質(中性近傍)を細胞Aへ修飾する。修飾したタンパク質と細胞Bが本来有する膜タンパク質との結合により細胞間接着を誘導する。

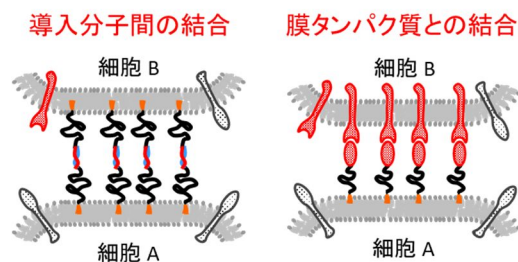


図2. 異種細胞間接着誘導の概念図

## 3. 研究の方法

### 1) 核酸誘導体の表面修飾による細胞間接着の誘導

末端にマレイミドを有するPEG-脂質を合成した後、末端配列にシステインをもつPNAと反応させることで、PNA-PEG-脂質(図3)を合成した。蛍光標識PNA-PEG-脂質溶液と細胞懸濁液を混合後、共焦点顕微鏡観察およびフローサイトメトリーにより細胞表面への修飾を評価した。また、相補配列のssDNA'-PEG-脂質またはPNA'-PEG-脂質で修飾した別種類の細胞と接触させ、異種細胞間の接着誘導を試みた。

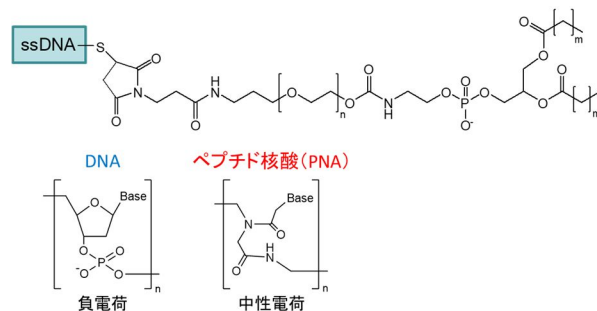


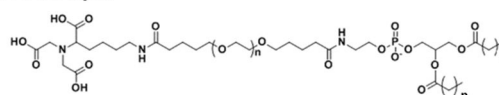
図3. ssDNA-, PNA-PEG-脂質の構造

### 2) 細胞表面のタンパク質修飾による細胞間接着の誘導

組換えタンパク質に含まれるタグ配列とそのリガンド間の特異的結合に着目し、リガンド

(benzyl guanine (BG)または nitrilotriacetic acid (NTA))を末端に有する PEG-脂質 (図 4) を合成した。細胞表面をリガンド-PEG-脂質で修飾した後、タグ配列 (SNAP-tag または His-tag) を有する蛍光タンパク質と作用させ、細胞表面へのタンパク質修飾を評価した。

NTA-PEG-lipid



BG-PEG-lipid

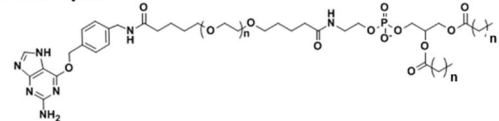


図 4. NTA, BG-PEG-脂質の構造

#### 4. 研究成果

##### 1) 核酸誘導体の表面修飾による細胞間接着の誘導

ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞 (CCRF-CEM), マウスミエローマ細胞に対し蛍光標識 ssDNA-PEG-脂質および PNA-PEG-脂質を作用させ、共焦点蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーから表面修飾を評価した。ssDNA-PEG-脂質では CCRF-CEM 細胞表面は修飾できたが、ミエローマ細胞の表面は修飾できなかったことから、ssDNA-PEG-脂質による細胞表面修飾では、細胞種依存性のあることが分かった (図 5)。一方、PNA-PEG-脂質ではどちらの細胞も表面修飾することができた。また、他の細胞種を用いて検討した結果、ssDNA-PEG-脂質で修飾困難な細胞であっても、PNA-PEG-脂質では修飾可能であることが分かった。このことから、PNA-PEG-脂質を用いることで、細胞種非依存的な細胞表面の核酸修飾を実現することができた。これは、中性荷電の PNA を用いることで、細胞表面との静電反発を回避できたためと考えられる。

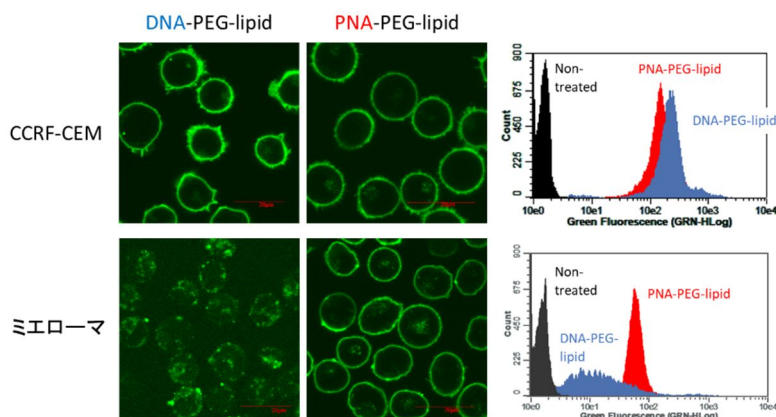


図 5. ssDNA-PEG-脂質, PNA-PEG-脂質を用いた細胞表面修飾。左: 共焦点蛍光顕微鏡像, 右: フローサイトメトリー測定

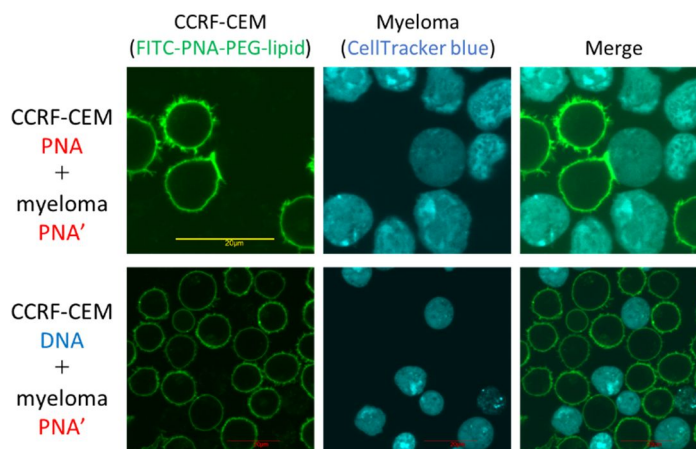


図 6. PNA-PEG-脂質を用いた異種細胞間接着の誘導

次に、PNA-PEG-脂質を用いた細胞間接着の誘導を試みた。ミエローマ細胞を PNA-PEG-脂質で、CCRF-CEM 細胞を相補鎖 PNA'-PEG-脂質で修飾した場合のみ、相補対形成を介した細胞間接着を誘導することができた (図 6)。以上のことから、中性荷電の PNA-PEG-DPPE は様々な細胞種に適用可能な細胞表面修飾分子として利用できることが分かった。

##### 2) 細胞表面のタンパク質修飾による細胞間接着の誘導

2ステップで細胞表面にタンパク質を修飾する方法を検討した (図 7)。リガンド分子を末端にもつリガンド-PEG-脂質で細胞表面を修飾したのち、リガンドと特異的に結合するタグ配列を持った組み換えタンパク質を作用させ、リガンド-タグ間結合を介してタンパク質修飾を試みた。リガンド-タグの組み合わせとして、キレート結合を介する NTA - His-tag, 共有結合を介する BG - SNAP-tag の 2 種類を用いた。

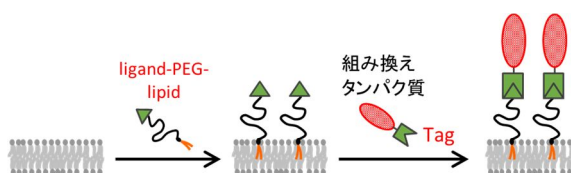


図 7. 細胞表面への組み換えタンパク質修飾

まず、His-tag および SNAP-tag をもつ緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を用いて、細胞表面へのタンパク修飾を評価した。CCRF-CEM 細胞に NTA-PEG-脂質または BG-PEG-脂質を作用させたのち、EGFP 修飾を試みた。いずれの分子を PEG-脂質を用いた場合も EGFP 由来の蛍光が細胞表面で観察された (図 8)。また、金属キレートを介さない場合またはフリーの BG を溶液中に転嫁した場合、細胞表面は EGFP で修飾されなかった。このことから、細胞表面に導入されたりガンドと EGFP 中のタグ配列との特異的結合により細胞表面をタンパク質で修飾できることが明らかとなった。

次に、機能性タンパク質を細胞表面に修飾することで、細胞間接着の誘導を試みた。CCRF-CEM 細胞の表面を NTA-PEG-脂質で修飾したのち、細胞間接着にかかわる膜タンパク質である E-cadherin の細胞外ドメイン (His-tag 含有) で修飾した。この細胞の懸濁液をマイクロウェル中に播種したところ、未処理細胞では見られない細胞凝集体が形成された。このことから、細胞表面に修飾された E-cadherin が細胞間接着誘導能を保持していることが分かった。そこで次に、HeLa 細胞と MCF-7 細胞を用い異種細胞間の接着を調べた。上述の方法を用いて HeLa 細胞 (E-cadherin 陰性) の表面を E-cadherin の細胞外ドメインで修飾し、MCF-7 細胞 (E-cadherin 陽性) と混合し凝集体を形成させた。未修飾 HeLa 細胞を用いた凝集体では、HeLa 細胞が外側、MCF-7 細胞が内側に配置されたコア-シェル構造を形成し、異種細胞間接着が弱いため HeLa 細胞が容易に剥離した (図 9 左)。一方、E-cadherin 修飾した HeLa 細胞を用いた場合、両細胞が相互に混合した構造の凝集体を形成した (図 9 右)。このことから、E-cadherin 修飾により細胞間接着を誘導し、それにより異種細胞凝集体の内部配置を調整できることが明らかとなった。

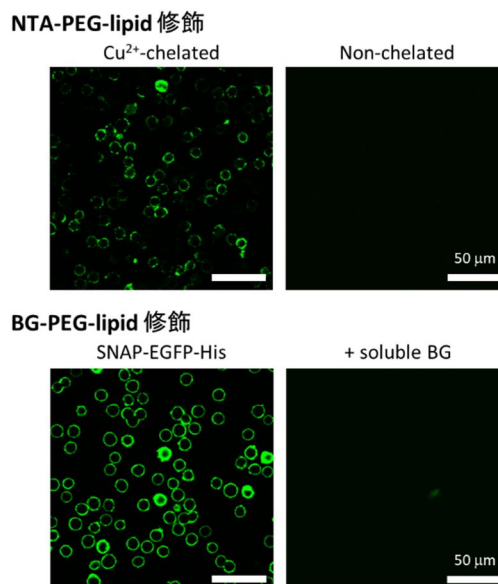


図 8. NTA-および BG-PEG-脂質修飾後、EGFP を作用させた細胞の共焦点蛍光顕微鏡像

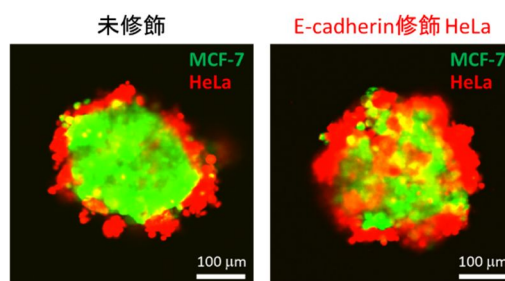


図 9. 未修飾または E-cadherin 修飾 HeLa 細胞と MCF-7 細胞から形成された複合凝集体の共焦点蛍光顕微鏡像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Masuda, T. Kuboki, S. Kidoaki, S. T. Lee, S. Ryuzaki, K. Okamoto, Y. Arima, K. Tamada	4. 巻 3
2. 論文標題 High Axial and Lateral Resolutions on Self-Assembled Gold Nanoparticle Metasurfaces for Live-Cell Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Appl. Nano Mater.	6. 最初と最後の頁 11135-11142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.0c02300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ian T Hoffecker, Yusuke Arima, Hiroo Iwata	4. 巻 159
2. 論文標題 Tuning intercellular adhesion with membrane-anchored oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Royal Society Interface	6. 最初と最後の頁 20190299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsif.2019.0299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 S. T. Lee, T. Kuboki, S. Kidoaki, Y. Aida, S. Ryuzaki, K. Okamoto, Y. Arima, K. Tamada	4. 巻 2
2. 論文標題 Transient Nascent Adhesion at the Initial Stage of Cell Adhesion Visualized on a Plasmonic Metasurface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced NanoBiomed Research	6. 最初と最後の頁 202100100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anbr.202100100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 有馬祐介, 柴沼宏輔, 平居佑亮
2. 発表標題 細胞表面のタンパク修飾による多細胞凝集体の形成
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Arima, K. Shibamura, Y. Hirai
2. 発表標題 Cell surface modification with recombinant proteins for controlling multicellular aggregate formation
3. 学会等名 The 11th World Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Arima
2. 発表標題 Cell-cell interaction studied using model cell membrane
3. 学会等名 The 7th China-Japan Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬 祐介
2. 発表標題 材料モデル表面を用いた材料 - 生体間相互作用の解析
3. 学会等名 第18回高分子表面研究討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬 祐介, 柴沼 宏輔
2. 発表標題 Benzylguanine-PEG-脂質複合体を用いた細胞表面修飾
3. 学会等名 第41回 日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬 祐介
2. 発表標題 モデル表面を用いた生体 - 材料間相互作用の解析
3. 学会等名 高分子学会九州支部フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野友輔, 玉田 薫, 有馬祐介
2. 発表標題 DNAを介した 細胞 間 接着における塩基長の影響
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井千晶, 萩尾 蓮, 玉田 薫, 有馬祐介
2. 発表標題 細胞種に依存しない細胞表面への核酸修飾を用いた細胞間接着の誘導
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. T. Lee, T. Kuboki, S. Kidoaki, Y. Aida, S. Ryuzaki, K. Okamoto, Y. Arima, K. Tamada
2. 発表標題 Transient nascent adhesion in early cell adhesion observed by LSPR-based fluorescence imaging
3. 学会等名 The 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Arima, C. Hirai, R. Hagio, K. Tamada
2. 発表標題 Cell type-independent surface modification with nucleic acids for cell manipulation
3. 学会等名 14th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関