

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500428

研究課題名（和文） 再生医療のための分泌物を指標とした細胞検出法の開発

研究課題名（英文） Development of cell detection system by secreted products for tissue engineering

研究代表者

田辺 利住（TANABE TOSHIKUMI）

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20315972

研究成果の概要（和文）：ES細胞やiPS細胞から分化させた細胞を調製する際、目的の細胞だけを選別・単離することは極めて重要な技術である。本計画では、サイトカインなど細胞の分泌を検出し目的の細胞を見つけることを目標とした。抗体に結合する ZZ ドメインとアルブミンに結合する ABD ドメインの融合タンパクを遺伝子工学的に調製しこれを介して、アルブミンゲルフィルムに抗体を結合させた。本検出系で FGF が検出できることがわかったが、感度が低く細胞が分泌する低濃度の FGF は検出できなかった。

研究成果の概要（英文）：It is important to detect and isolate the aimed cells from the culture consisting of diversified cells, when preparing specific cells from ES or iPS cells. This project aimed to develop a detection system of the cell based on cell secreted products. Antibody against secreted products was bound to albumin film through a fusion protein consisting of ZZ and ABD domains, which have binding ability to IgG and albumin, respectively. Although the resultant detection system could detect FGF, the sensitivity was too low to detect FGF secreted from a single cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞、スクリーニング、サイトカイン、アルブミン、抗体

1. 研究開始当初の背景

現在も特に変わりはないが、ES細胞やiPS細胞が注目され、再生医療に大きな期待が寄せられている。しかし、ES 或いは iPS 細胞を治療に用いたい1種類の細胞に分化させる技術は存在しておらず、その一方 ES 細胞や iPS 細胞が体内に入ると奇形種を生じることが知られており、再生医療の実現のために

は、複数種の細胞が混在する細胞培養系から目的とする1種類の細胞を選別・単離する技術が必要である。既存の細胞選別技術としてはフローサイトメトリーや磁気細胞分離法などがあるが、フローサイトメトリーは高価な機器が必要であり、磁気細胞分離法はランニングコストがかかる。また、これらの方法は細胞の表面抗原を指標に細胞を選別する

もので、ほとんどの正常臓器・組織の細胞は特異的表面抗原を持たず適応できない。しかも、接着状態の細胞には使用できないという欠点を有している。そのような状況下で接着細胞にそのまま適用できる新しい細胞検出・単離システムの開発が望まれている。

2. 研究の目的

多種類の細胞が混在する接着細胞培養系から、細胞が分泌する物質を指標にして、細胞を脱着させることなしに特定の細胞を検出するシステムを作製することを目的とした。我々は以前より架橋アルブミンハイドロゲルフィルムについて研究してきた。二官能性架橋剤と反応させたアルブミンをキャストすることにより得られるハイドロゲルフィルムは、非水溶性かつ細胞非接着性である。このアルブミンハイドロゲルフィルムに細胞分泌物に対する抗体を結合させ、直接培養している細胞上に静置させることで、分泌物を検出しようというものである。ハイドロゲルであるので培地を含浸させておくことで栄養補給ができ、またその柔軟性によって細胞への物理的衝撃を避け得ることが期待された。

3. 研究の方法

(1) アルブミンハイドロゲルフィルムは、アルブミンを ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) により架橋し、これを細胞培養用ディッシュもしくはプラスチック基板上にキャスト・乾燥し作製した。得られたフィルムを 70%エタノールに一晩浸漬し滅菌した。次にフィルムを PBS に浸漬しエタノールを除去した。1 時間ごとに PBS を交換し合計 6 時間洗浄した。さらに細胞培養用培地を加えゲル内包液を培地に置換した。培地による処理は 2 時間ごとに 3 回培地を交換した後、ゲルを一晩培地中浸漬した。ほぼコンフルエントになった細胞から培地を除去し、細胞の上にアルブミンハイドロゲルを静かにのせ、ゲルが浮かぬ程度の培地を加えて 2 時間静置した。ゲルを除去し細胞がダメージを受けていないかどうか確認した。

(2) アルブミンハイドロゲルフィルムへの抗体担持は以下のような方法を試みた。

2-1. SH 基と NH₂ 基を架橋する試薬である *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP) をまずフリー-SH 基を持たないラビット IgG と反応させ、IgG の NH₂ 基に 2-pyridyl disulfide (2PDS) 基を導入した。これとアルブミンゲルフィルムに存在する 1 個のフリー-SH 基を反応させ、フィルムへの IgG の導入を図った。

2-2. 2-1 ではフィルムへの抗体導入量が少な

い可能性があった。そこで、アルブミンフィルムと SPDP を反応させアルブミンの NH₂ 基に 2PDS 基を導入後、酸性条件下 DTT により還元し 2PDS 基を SH 基に変換した。これとアミノ基に 2PDS 基を導入した IgG を反応させ、アルブミンフィルムと IgG の結合を試みた。IgG の結合の確認は 2-1、2-2 ともにアルカリリンフォスファターゼ標識抗ラビット IgG を用い、BCIP/NBT の発色を見ることにより行なった。

2-3. アルブミンフィルムと抗体を結合させるためのアダプター分子として、スタフィロコッカス A タンパク由来 ZZ ドメインとストレプトコッカス G タンパク由来 ABD ドメインの融合タンパクを、大腸菌を宿主として遺伝子工学的に発現させた。ZZ ドメインは IgG の Fc 領域への結合能を、ABD はヒト血清アルブミン(HSA)への結合能を有している。具体的には、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) と ZZ-ABD の融合タンパクと GST-GFP と ZZ-ABD の融合タンパクを発現させ、グルタチオンカラムで精製した後、PreScission Protease で GST タグを切断した。

融合タンパクの HSA 及び IgG 結合能確認

発現した融合タンパクが、HSA と IgG への結合能を有していることを確認するため、GST 切断前の融合タンパクと HAS、IgG を混合し、グルタチオンカラムに流した。

アルブミンフィルムへの抗体固定化

EGDE 架橋ウシ血清アルブミン(BSA)フィルムに UV 照射を施しタンパク接着性に変換後、HSA で処理し表面を HSA でコーティングした。続いて、ZZ-ABD 融合タンパク、ラット抗 FGF 抗体で順次処理を行ないフィルム上に抗 FGF 抗体を結合させた。

抗体が固定化されていることを確認するため、FGF 抗体固定化アルブミンフィルムに FGF を加えてから、ビオチン化抗 FGF 抗体で処理した。次にアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識ストレプトアビジンを加え合成基質の発色を調べた。

4. 研究成果

(1) アルブミンハイドロゲルフィルムの物理的細胞障害性

アルブミンを架橋することによって作製されたフィルムはハイドロゲルであるので、培地を含浸させた上で培養している細胞上に載せても物理的衝撃も少なく、培地からの栄養分補給も可能であるので、細胞がダメージを受けないことが予想された。実際にコンフルエント状態になった培養細胞上にアルブミンハイドロゲルフィルムを 2 時間静置したが、ゲルを除去後残存している細胞の数、

形態に変化がないことを顕微鏡観察により確認した。

(2) SPDP によるアルブミンフィルムへの IgG の導入

アミノ基とスルフィドリル基に対する二官能性架橋剤である SPDP を用いて、アルブミンフィルムに IgG を固定化することを試みた。まず、フリー-SH 基を有しない IgG と SPDP を反応させアミノ基にピリジリジチオ (PD) 基を導入した。これでアルブミンフィルムを処理し、アルブミンに一つ存在するフリー-SH 基を介して IgG を結合させようとしたが、得られたフィルムに免疫染色を行なったが陰性であった。アルブミンフィルム表面に出ている SH 基量が充分でなかった可能性が考えられた。そこで、アルブミンフィルムを SPDP で処理し豊富に存在するアミノ基へ PD 基を導入し、これを還元し SH 基に変換した。これと PD 基を導入した IgG を反応させアルブミンフィルム上に IgG を導入することを試みた。この方法を用いても免疫染色の結果は陰性であった。

(3) ZZ-ABD 融合タンパク質の大腸菌での発現
 スタフィロコッカス A タンパク由来 ZZ ドメインは IgG Fc 領域への結合性を有している。また、ストレプトコッカス G タンパク由来 ABD ドメインはヒトアルブミンと結合することが知られている。そこで ZZ-ABD 融合タンパク質を調製し、アルブミンフィルム上に IgG を結合させる方法を試みることにした。ABD は報告配列より合成したものを用いた。ZZ 領域は市販プラスミド pEZZ18 より単離した。これらを市販ベクタープラスミド pGEX の tac プロモーター下の GST に ZZ-ABD の順につないだ。同様に GST-GFP-ZZ-ABD のコンストラクトも作製した。これらの発現プラスミドでそれぞれ大腸菌 ER2566 株を形質転換し、融合タンパク質を発現させた。粗抽出液をグル

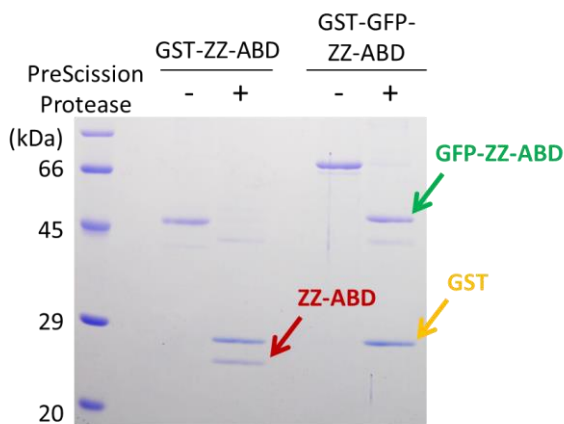


Fig. 1 発現した融合タンパク質の SDS-PAGE 分析

タチオンカラムにかけることにより目的の融合タンパク質を精製した。得られた融合タンパク質を PreScission Protease で切断し GST を除いた。PreScission Protease 切断前後の精製タンパク質の SDS-PAGE 分析結果を Fig. 1 に示した。GST-ZZ-ABD、GST-GFP-ZZ-ABD いずれも予想される分子量の位置にバンドが認められ、設計通り融合タンパクを調製できていることが分かった。

(4) 融合タンパク質の IgG および HSA 結合能
 融合タンパクが IgG と HSA に結合するかを確認するために、PreScission Protease 処理前の GST-ZZ-ABD もしくは GST-GFP-ZZ-ABD と HSA、IgG の混合物をグルタチオンカラムにアプライし溶出物を SDS-PAGE で分析した。HSA と IgG がいずれも GST-GFP-ZZ-ABD と共に溶出画分に見られていることから、融合タンパクは IgG、HSA の両方に結合活性を有していることが確認できた。用いる融合タンパクを GST-ZZ-ABD に変えても同様の結果が得られた。また、HSA の代わりに BSA を使用すると Fig. 3 に示すように、BSA はグルタチオンカラムを素通りし、溶出画分には現れなかった。ABD ドメインは HSA には結合能を有するが

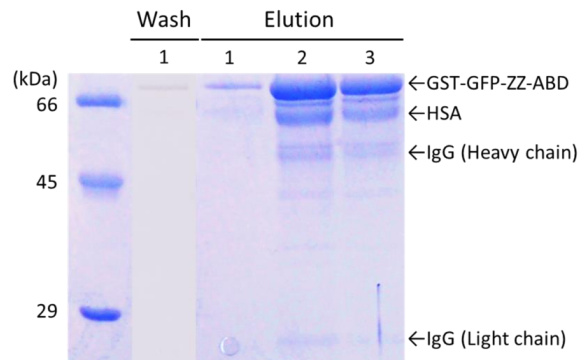


Fig. 2 融合タンパク質の IgG、HSA 結合能
 グルタチオンカラムに融合タンパク、IgG、HSA の混合物を流し溶出物を SDS-PAGE で分析した。

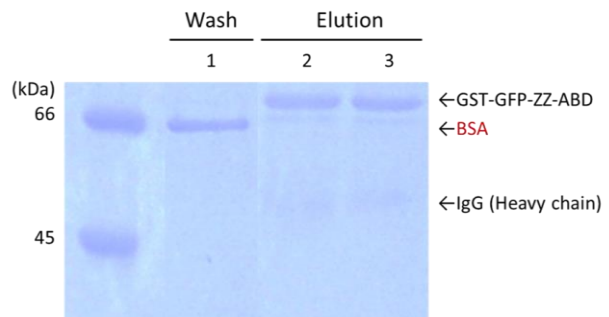


Fig. 3 融合タンパク質の IgG、BSA 結合能
 グルタチオンカラムに融合タンパク、IgG、BSA の混合物を流し溶出物を SDS-PAGE で分析した。

BSA には結合しないことが知られており、融合タンパクでも同様であることが分かった。

(5) 融合タンパクによるアルブミンフィルムへの IgG の結合

融合タンパクが HSA と IgG に対し結合能を有することがわかったので、HSA を用いフィルムを作製し、これに融合タンパク質を介して抗 FGF 抗体を結合させようとしたが、結合しなかった。フィルム作製では HSA を EGDE と反応させるため、反応後の HSA と融合タンパクとの結合を上記グルタチオンカラムの系で調べたところ、EGDE と反応させた HSA には融合タンパクとの結合能がないことが判明した。そこで、BSA フィルムに UV を照射しタンパク質接着性に変換した。それを HSA で処理し HSA コーティングした。続いて融合タンパクと抗 FGF 抗体で処理を行ない抗体を固定化した。実際にこのフィルムで FGF の検出が可能かを調べるために、抗 FGF 抗体固定化フィルムに FGF、ビオチン化抗 FGF 抗体、ALP 標識ストレプトアビジンを順に加え、合成基質の発色を調べた。結果を Fig. 4 に示す。HSA の代わりに BSA をコーティングしたフィルムでは合成基質の発色は全く認められなかったが、HSA をコーティングしたフィルムでは発色が認められ、本検出システムが機能していることが示された。

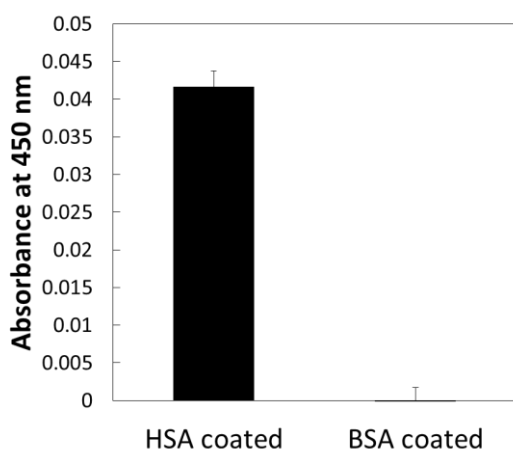


Fig. 4 HSA コートフィルムと BSA コートフィルムにおける FGF の検出

次に、本検出系の FGF の検出限界を調べたところ 10 ng/ml が検出限界であることがわかった。コーティング時の HSA 濃度や抗 FGF 抗体濃度を変えても検出感度の上昇は見られなかった。ELISA での検出限界は 1 ng/ml であった。コーティングした HSA 上に融合タンパクを介して抗体を結合しているため、基板上に直接抗体を配置する ELISA に比べ単位面積当たりの抗体密度が低くなったと考察された。実際に FGF を産生している L929 細胞

に本検出系を適用したが、FGF を検出できなかった。

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)

[学会発表] (計 1 件)

第 64 回日本生物工学会 (2012 年 10 月 23 日 ~26 日、神戸) 服部 輝、中西 久嗣、立花 亮、田辺 利住「抗体固定化アルブミンフィルムを用いた FGF-2 の検出」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 利住 (TANABE TOSHIKAZUMI)
大阪市立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20315972

(2) 研究分担者

立花 亮 (TACHIBANA AKIRA)
大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80305614

(3) 連携研究者

なし