

令和 7 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K12820

研究課題名（和文）核酸-脂質複合体の表面修飾を利用した生細胞の識別

研究課題名（英文）Classification of living cells using surface modification with nucleic acid-lipid conjugates

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）：生体システムの理解やがん細胞検出のためには、多様な細胞のなかから特定細胞を識別する必要がある。さらに、細胞を生きたまま識別・分取できれば、細胞機能など詳細な分析も可能となる。本研究では、核酸-脂質複合体の細胞識別プローブへの応用を目指した。至適設計を行った核酸-脂質複合体は、核酸分解酵素の発現量に鋭敏に応答するプローブであることが明らかとなった。さらに、この核酸-脂質複合体を用いることで、正常細胞と乳がん細胞が混在した状態でもがん細胞を生きたまま蛍光陰性あるいは陽性細胞として検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞を検出する核酸プローブは報告されているが、溶液全体の蛍光強度を検出するため、検体中にがん細胞の存在は分かるものの、どの細胞ががん細胞であるか特定は不可能である。一方、今回開発したプローブは細胞膜に局在するため、複数種の細胞が混在した状態でもがん細胞の特定が可能である。また、その細胞を分取・再培養も可能であるため、特定細胞の識別だけでなく細胞特性に至るまで詳しく解析することも可能である。以上のことから、多細胞生体システムの理解やがん細胞の特性分析など、生物学・医学分野への活用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：For the understanding of biological system and the detection of cancer cells, it is necessary to identify specific cells from a wide variety of cells. Furthermore, identifying and isolating cells while they are still alive, will allow for detailed analysis of cellular functions. In this study, we aimed to apply nucleic acid-lipid conjugates to cell identification probes. The optimally designed nucleic acid-lipid conjugates were found to be probes sensitive to the expression levels of nucleases. Furthermore, the nucleic acid-lipid conjugates successfully discriminated between normal cells and breast cancer cells as fluorescence negative or positive cells while they are still alive.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：細胞表面修飾 核酸プローブ 細胞分類

1. 研究開始当初の背景

我々の体は多くの異なる細胞種から構成されている。また、がんなどの病態に伴い、細胞の性質が正常な状態から変化する。多種多様な細胞が共存する生体系を理解する、あるいは細胞性質の変化から病態を決定するためには、異なる細胞種を識別することが重要である。特に、生きた細胞のまま識別できれば細胞を分離後培養でき、様々な細胞機能を調べることができる。細胞識別の代表的方法として、cluster of differentiation (CD)で分類される膜タンパク質を指標としたものがある。血球細胞では CD 分子に対する抗体を用いて CD 分子の発現パターンを調べることによって、生細胞を分類することが可能である。

細胞表面には膜タンパク質の他に糖鎖や脂質などが存在している。しかし、膜タンパク質以外の細胞表面分子を指標に、細胞を生きたまま識別する方法はない。生細胞の識別に利用できる分子の種類が増えれば、血液細胞以外の細胞や正常・がん細胞をより詳細に分類し分析できると考えられる。

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-lipid, Fig. 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 を導入できる。相補配列との特異的結合を利用することで、細胞表面への生理活性物質の固定化や細胞 - 材料間、細胞 - 細胞間接着の誘導が可能である。ssDNA-PEG-lipid による修飾を種々の細胞に試みたところ、がん細胞など修飾不可能な細胞があることを見出した。そこで、ssDNA-PEG-lipid の修飾を左右する細胞表面環境とは何か明らかにすれば、その差異を指標とした新たな生細胞の識別技術として応用できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ssDNA-PEG-lipid を用いた生細胞識別法の確立を目指す (Fig. 1)。そこで、以下の項目について検討した。

(A) ssDNA-PEG-lipid の分子設計

ssDNA-PEG-lipid の主要構造が表面修飾の細胞種依存性に及ぼす影響を明らかにする。

(B) ssDNA-PEG-lipid の修飾に影響する細胞表面環境の解明

ssDNA-PEG-lipid 修飾が可能・不可能な細胞の間で細胞表面環境を比較し、ssDNA-PEG-脂質修飾が細胞種間の何の違いを識別するかを明らかにする。

(C) 細胞分類プローブとしての活用

上記プローブが、複数種の細胞が混在する状況で特定細胞を識別するプローブとして利用可能か評価する。

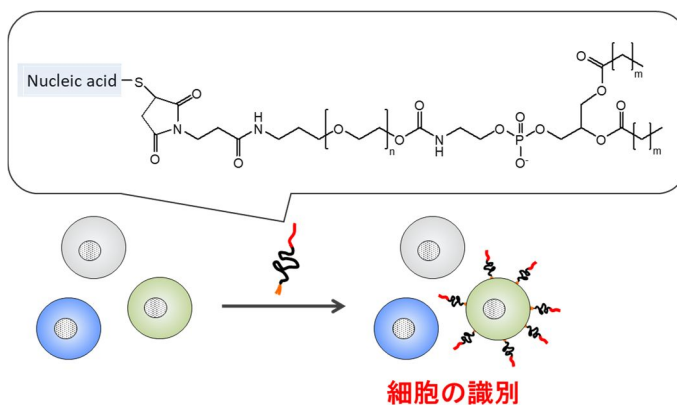


Fig. 1 ssDNA-PEG-lipid を用いた細胞識別

3. 研究の方法

Phosphatidyl ethanolamine に PEG を介してフルオレセイン標識 ssDNA を結合させた FAM-ssDNA-PEG-lipid (Fig. 1)を基本骨格とし、ssDNA 部を種々の分子に置換したものを合成した。これらを様々な細胞の懸濁液と混合し、37 °C で 30 分間静置後に共焦点蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで評価した。また、複数の細胞種を混合した懸濁液に対して上記の修飾分子を加え、特定細胞の検出も試みた。

4. 研究成果

(A) 細胞種依存的な細胞表面修飾分子の設計

FAM-ssDNA-PEG-lipid による表面修飾が細胞種依存性を示す要因として、細胞表面分子 (糖鎖や膜タンパク質) と FAM-ssDNA-PEG-lipid との静電反発をまずは想定した。そこで、異なる塩基長の ssDNA を用いて分子の総電荷を変化させる、あるいは、ssDNA と同様の負電荷を有するペプチド (Glu₁₀) に置換することで、DNA の負電荷と細胞膜に存在する糖鎖間の静電反発の影響を調べた。ssDNA を用いた場合、CCRF-CEM 細胞表面では蛍光が見られた一方、P3X63-Ag8.653 細胞では蛍光が見られず、細胞種依存的な表面修飾を示した (Fig. 2)。塩基長を従来の 21mer から 10, 6mer と減らしても同一の傾向を示した。一方、ssDNA を Glu₁₀ に置換した分子を用いたところ、いずれの細胞も修飾することができた。このことから、細胞種依存的な修飾に分子間の静電反発の寄与は小さいこと、また、細胞種依存的な修飾には ssDNA が重要な役割を担っていることが分かった。

次に、重要性が明らかとなった ssDNA 部の影響をさらに調べるため、天然核酸 (ホスホジエ

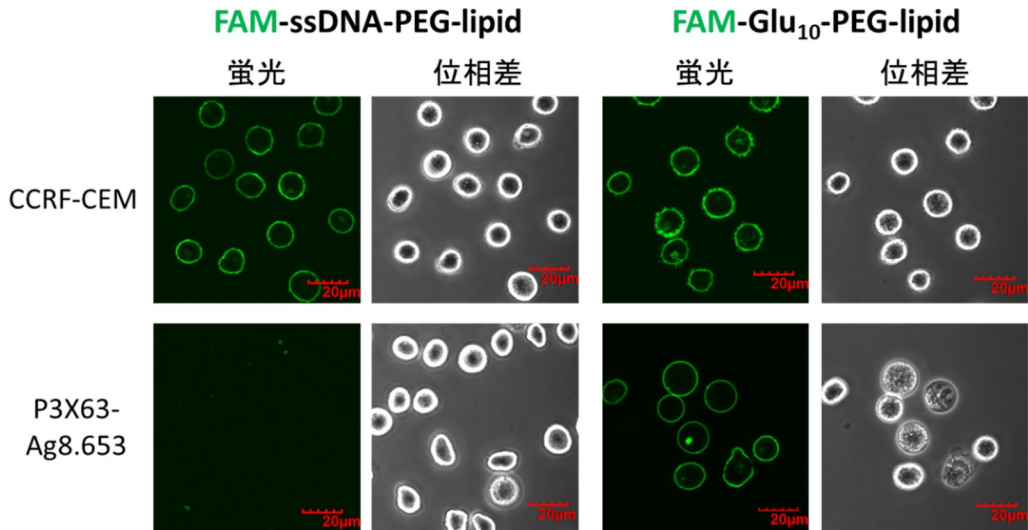


Fig. 2 種々の分子で処理した CCRF-CEM および P3X63-Ag8.653 細胞の共焦点蛍光顕微鏡像

ステル結合)から人工核酸(ホスホロチオエート結合)に置換した PEG-lipid を用いて検討を行った。ホスホロチオエート化核酸-PEG-lipid では、いずれの細胞も修飾された。このことから、細胞種依存的な修飾には天然型の核酸構造が重要であることが明らかとなった。

人工核酸は分解耐性を有することから、P3X63-Ag8.653 細胞への FAM-ssDNA-PEG-lipid 修飾で蛍光が見られなかった要因として、DNA 分解による蛍光色素の遊離が考えられた。そこで、阻害剤下で修飾を行ったところ、P3X63-Ag8.653 細胞の表面でも蛍光が見られた (Fig. 3a,b)。また、P3X63-Ag8.653 細胞と CCRF-CEM 細胞について DNA 分解酵素の発現を Western blotting で調べたところ、P3X63-Ag8.653 細胞の方が発現量が高いことが分かった (Fig. 3c)。以上のことから、FAM-ssDNA-PEG-lipid は DNA 分解酵素の発現に鋭敏なプローブであることが明らかとなった。

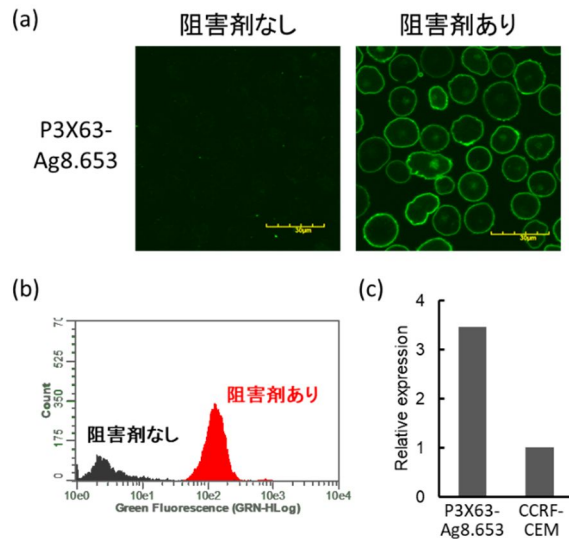


Fig. 3 (a) FAM-ssDNA-PEG-lipid 処理した P3X63-Ag8.653 細胞の共焦点蛍光顕微鏡像 (b) フローサイトメトリーによる 1 細胞あたりの蛍光強度分布、(c) DNA 分解酵素の発現量

(B) がん細胞の識別

ssDNA-PEG-lipid が特定細胞を識別するプローブとして利用可能か調べるため、乳がん細胞株を用いた表面修飾を行った。ヒト乳腺由来細胞 (MCF10A)、乳がん細胞 (MCF-7)、転移性乳がん細胞 (MDA-MB-231) に ssDNA-PEG-lipid を作用させたところ、MCF10A の細胞表面のみで蛍光が見られ、がん細胞である MCF-7 および MDA-MB-231 では蛍光が見られなかった。このことから、ssDNA-PEG-lipid は乳がん細胞を陰性検出するプローブであることが分かった (Fig. 4 上)。しかし、利用を考えるとがん細胞を陽性検出できる方が望ましい。ssDNA-PEG-lipid は DNA 分解により蛍光が消失する turn-off 型プローブであることから、DNA 分解により蛍光が生じる turn-on 型プローブを別途設計した。同一の乳がん細胞株を

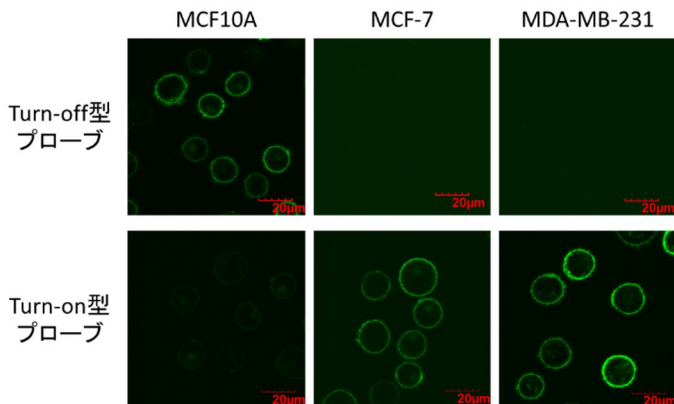


Fig. 4 Turn-off または Turn-on 型核酸プローブで処理した乳がん細胞株の共焦点蛍光顕微鏡像

turn-on 型プローブで処理したところ、正常細胞は蛍光陰性、がん細胞は蛍光陽性として検出することに成功した (Fig. 4 下) また、転移性のがん細胞である MDA-MB-231 細胞の方が MCF-7 細胞と比べ蛍光強度が高いことが分かった。

乳がん細胞検出プローブとしての応用へ向けて、細胞種が混在した状態で乳がん細胞を分類可能か調べた。MCF10A 細胞 (正常) と MCF-7 細胞 (がん細胞) を混合した懸濁液に turn-on 型プローブを作用させ、30 分後に顕微鏡観察を行った。その結果、MCF-7 細胞のみ蛍光陽性として観察された (Fig. 5)。この結果から、開発した turn-on 型プローブは細胞種が混在する状態でも乳がん細胞を検出可能であることが分かった。

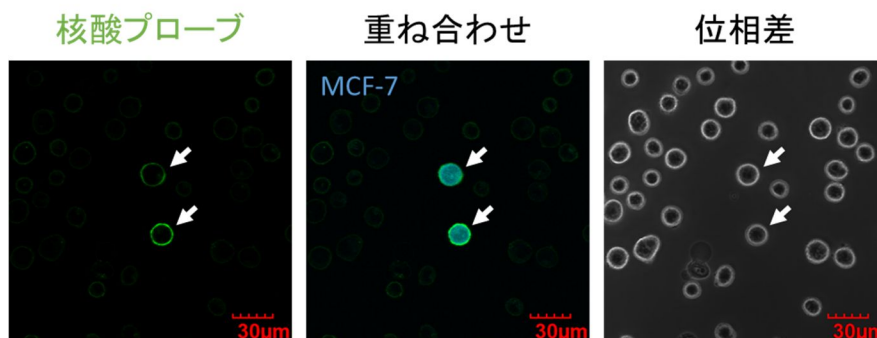


Fig. 5 MCF10A 細胞と MCF-7 細胞の混合懸濁液を Turn-on 型核酸プローブで処理したのちの共焦点蛍光顕微鏡像。緑：核酸プローブ、青：蛍光標識 MCF-7 細胞。矢印は MCF-7 細胞を表す。

以上のことから、開発した膜局在型の核酸プローブを用いることで、複数種の細胞数が混在するなかから特定の細胞を検出することに成功した。蛍光陽性・陰性の細胞を分取することも可能なため、各細胞の特性を評価することも可能である。また、核酸配列を変更することで、他の分子に鋭敏なプローブの設計も期待できる。本課題で開発した核酸プローブは、多細胞生体システムの理解やがん細胞の特性分析など、生物学・医学分野への活用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 有馬 祐介, 平井 千晶, 後藤 彩香, 玉田 薫
2. 発表標題 細胞表面の核酸修飾における細胞種依存性
3. 学会等名 第52回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有馬 祐介
2. 発表標題 材料 - 細胞および細胞 - 細胞接着界面の解析
3. 学会等名 化学工学会 第54回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有馬 祐介
2. 発表標題 材料 - 細胞, 細胞 - 細胞間相互作用の解析と制御
3. 学会等名 日本分析化学会 第72年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Arima
2. 発表標題 Imaging of Cell-Attached Interface to Study Cell-Material and Cell-Cell Interactions
3. 学会等名 The 16th International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤 彩香, 玉田 薫, 有馬 祐介
2. 発表標題 生細胞を分類するポリエチレングリコール-リン脂質複合体の設計
3. 学会等名 第45回 日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺戸 美樹, 玉田 薫, 有馬 祐介
2. 発表標題 キレートを紹介した細胞表面のタンパク修飾による細胞間相互作用の誘導
3. 学会等名 第45回 日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 秀太郎, 玉田 薫, 有馬 祐介
2. 発表標題 細胞膜由来ベシクルを用いたモデル平面膜の形成
3. 学会等名 第45回 日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 秀太郎, 玉田 薫, 有馬 祐介
2. 発表標題 細胞膜由来ベシクルを用いたモデル平面膜の形成
3. 学会等名 第71回 応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 有馬祐介, 大野友輔, 玉田薫
2. 発表標題 DNAを介した細胞膜間相互作用における塩基長の影響
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022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83回応用物理学会秋期学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺戸美樹, 玉田薫, 有馬祐介
2. 発表標題 キレートを介した細胞表面のタンパク質修飾
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有馬祐介, 平井千晶, 萩尾蓮, 玉田薫
2. 発表標題 細胞表面への核酸修飾の細胞種依存性
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 2022年度九州ブロック研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Arima, Chiaki Hirai, Kaoru Tamada
2. 発表標題 Cell-cell attachment by cell surface-anchored nucleic acids and its cell-type dependence
3. 学会等名 The 15th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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