

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18921

研究課題名（和文）浮遊したままの長時間培養と評価が可能な革新的浮遊細胞マイクロアレイの創成

研究課題名（英文）Creation of an innovative cell microarray for non-adherent cells which enables to study for long periods of time

研究代表者

境 慎司（SAKAI, SHINJI）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞マイクロアレイは、細胞応答の時間的な変動データを効率的かつ大量に採取するための強力なツールである。本研究では、既存の細胞マイクロアレイでは不可能であった、適切に培養液が交換された環境下で浮遊状態にて培養される浮遊細胞に関して、細胞応答の時間的な変動データを様々な条件下で採取することを可能とする革新的な浮遊細胞マイクロアレイの創成を目的として検討を行った。その結果、ガラス基板上に、細胞周期の変遷の観察や増殖の評価、導入した遺伝子による蛍光タンパクの発現などの評価が可能である浮遊細胞を内部に封入する長期間安定なゲル皮膜からなる中空マイクロドームの開発を達成し、その有用性を実証することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新しい浮遊細胞マイクロアレイ技術の開発に取り組み、従来技術では困難であった培地交換を行いながらの長期間の時間的な応答データの収集を可能とするデバイスの開発に成功した。このデバイスを使えば、細胞周期や増殖、遺伝子発現の評価が可能となり、細胞生物学の理解が深まると期待される。また、長期間安定なゲル皮膜の使用は、癌研究や再生医療の研究において重要となる長期間の評価を可能とすることから、新たな治療法の開発に貢献し、製薬開発の効率化の促進に寄与すると期待される。すなわち、本研究成果は、バイオテクノロジー産業の発展や基礎研究の深化にも寄与し、社会的・学術的に多大な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cell microarrays are a powerful tool to collect temporal variation data of cellular responses efficiently and in large quantities. In this study, we aimed to create an innovative floating cell microarray that enables us to collect temporal variation data of cellular responses under various conditions for floating cells cultured in a floating state in an environment where culture medium is appropriately changed, which was not possible with existing cell microarrays. As a result, we have developed a hollow microdome composed of a long-term stable gel film that encapsulates floating cells on a glass substrate, which enables observation of cell cycle transition, evaluation of cell proliferation, and evaluation of fluorescent protein expression by transfected genes.

研究分野：生物化学工学

キーワード：組織工学 スフェロイド セルドーム 薬物評価

1. 研究開始当初の背景

創薬分野では、ゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報を活用するゲノム創薬により、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されてきた。しかし、実際には、投入される研究費は年々増加しているにも関わらず、上市される医薬品の数は逆に減少している。これは、遺伝子機能と細胞応答として現れる表現系の間には大きなギャップが存在するためである。したがって、その相関関係推定のために、細胞に刺激を与えた際の応答の時間的変動データを効率的かつ大量に採取できる技術の開発が求められている。

細胞マイクロアレイは、ガラスなどの基板に細胞を配列(アレイ化)するものであり、各スポットで異なる遺伝子やタンパク質を導入すれば、それぞれのスポットの細胞に関して異なる時系列データを得ることができる。よって、この技術は、細胞応答の時間的な変動データを採取するための強力なツールであると考えられてきた(例えば Nature 411:107(2001))。このため、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫など血球系細胞や接着能を持たない浮遊細胞が関与する疾患の理解と、それに基づくより有効な治療薬、治療法の開発には、浮遊細胞のマイクロアレイが強力なツールとなると期待される。

浮遊細胞のマイクロアレイを作製する方法として、細胞膜に対するアンカー(脂質オレイル基)を基板表面に修飾することにより浮遊細胞を基板表面に固定する方法(Biotechniques 35:1014, 2003)がある。しかし、この方法は、細胞死を誘導することもある活性酸素産生をもたらすストレスを与えてしまうことがわかっている(Colloid Surf B, 147:336, 2016)。また、基板に微小な穴(ウェル)を作り、その中で浮遊細胞を培養する方法もある。しかし、この方法では、培養液の流動により生じる各ウェルからの細胞漏出の完全阻止は難しく、通常の細胞培養で行われる数日毎の培養液の交換を伴うような系での継続的な観察は極めて困難である。すなわち、研究開発当初には、細胞の増殖や機能化に必要な適切に培養液が交換された環境下において、培養される浮遊細胞に関して、スポット毎に異なる細胞応答の時間的変動データを採取することが可能な浮遊細胞マイクロアレイは存在しなかった。

これに対して、研究代表者は、培養液の流動により生じる剪断力などの物理的外乱から隔離して動物細胞を育成可能なゲル皮膜からなる直径約 0.2 mm のマイクロカプセルの開発を行った(Biomaterials 30:5937(2009); Biotechnol Bioeng 109:2911(2012)など)経験をもっていた。そして、その過程で、物質透過特性を制御したゲル皮膜からなるマイクロカプセルを使用すると、細胞が3次元的に相互作用しながら増殖し、やがて中空部分を満たす組織体に成長することを報告していた(図3)。また、マイクロカプセル内にガン細胞を封入して培養すると、抗がん剤耐性が培養期間の経過とともに向上することを見出していた(Cancer Sci 6:549(2012))。すなわち、これまでの研究で、動物細胞を長期間培養する容器としてのゲル皮膜マイクロカプセルの有用性、ゲル皮膜の物質透過特性制御の重要性と効果、細胞機能の経時変化を理解することの重要性、さらに、細胞の元来の存在形態に近い状態を保った方がその細胞の機能発現に適していることを強く認識していた。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では、既存の細胞マイクロアレイでは不可能であった、適切に培養液が交換された環境下で浮遊状態にて培養される浮遊細胞に関して、細胞応答の時間的変動データを様々な条件下で採取することを可能とする革新的な浮遊細胞マイクロアレイの創成を目的とする。具体的には、ガラス基板上に、浮遊細胞を内部に封入するとともに物質透過特性を制御された長期間安定なゲル皮膜からなる中空マイクロドームおよび、それらを配列したマイクロアレイを開発し、有用性を実証することを目指した。

具体的には、浮遊細胞を浮遊状態で培養でき、さらに、隣接するスポットへの細胞漏出を完全に阻止し、また、培養液の交換を伴う観察も可能とするために、従来の細胞マイクロアレイの各スポットを半球状ゲル半透膜で覆い、内部に浮遊細胞を封入する「浮遊細胞マイクロドーム」を基板上に多数配列したアレイの開発を目的とした。また、この細胞浮遊マイクロドームアレイを革新的なものとするべく、ゲル材料の開発・ゲル皮膜の調製条件に関する検討により、安定性に優れ、オンデマンドな分解により細胞を回収可能であるとともに、細胞に導入したい物質をドーム外へ漏出させず、一方で細胞の生存や増殖に必要な酸素や栄養分を良好に透過するゲル皮膜作製のための設計指針を得ることを目的とした(図1)。

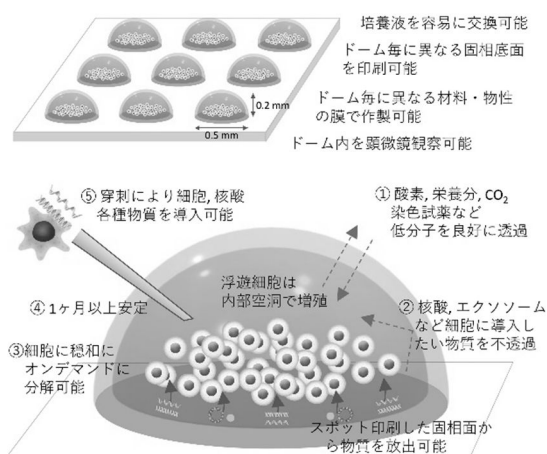


図1. 開発した浮遊細胞マイクロドームアレイ

3. 研究の方法

検討する浮遊細胞として、ヒト白血病由来 K562 細胞とヒトリンパ腫 TK 細胞を用いた。これらの細胞をそれぞれ、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) とゼラチンを含む水溶液と混合した後、直径 1 mm の撥水リングパターンを印刷したガラスのパターン中央に 1 μ L 配置し、冷却することで半球状の細胞含有ゼラチンゲルを作製した。その後、このゲル上にフェノール性水酸基導入アルギン酸やフェノール性水酸基導入ゼラチンなどの HRP の酵素反応により架橋可能な官能基を有する高分子の水溶液に、1 mM となるように過酸化水素を添加した溶液を 10 μ L スポットした。これにより、半球状の細胞含有ゼラチンゲル上に、HRP の酵素反応にフェノール性水酸基導入のゲル皮膜を形成させた。培地に浸した後 37 $^{\circ}$ C 下に静置することで内部のゼラチンゲルを溶解させるとともに、周囲の培養液に溶解したゲルを構成していたゼラチン分子を拡散させた (図 2)。このようにして得られたマイクロドーム中における K562 細胞、TK 細胞の増殖を評価することで、マイクロドーム中における浮遊細胞の培養可能性を評価するとともに、長期間の安定性を評価した。

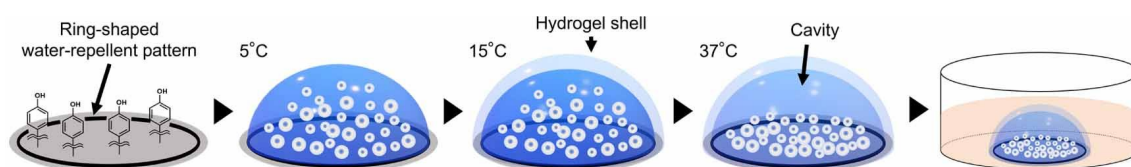


図 2. 浮遊細胞含有マイクロドームの作製法

また、マイクロドーム皮膜の高分子組成を制御して、皮膜の細胞接着性を制御することにより、マイクロドーム内の細胞に影響を与えるかを評価した。この検討では、浮遊細胞ではなくヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞を用いた。

さらに、マイクロドーム内の細胞への遺伝子導入可能性を評価するために、マイクロドーム作成時に蛍光タンパクの発現をもたらすプラスミドを底面にすぼった撥水リングパターン上にマイクロドームを作製し、マイクロドーム内細胞の蛍光タンパク発現を評価した。

4. 研究成果

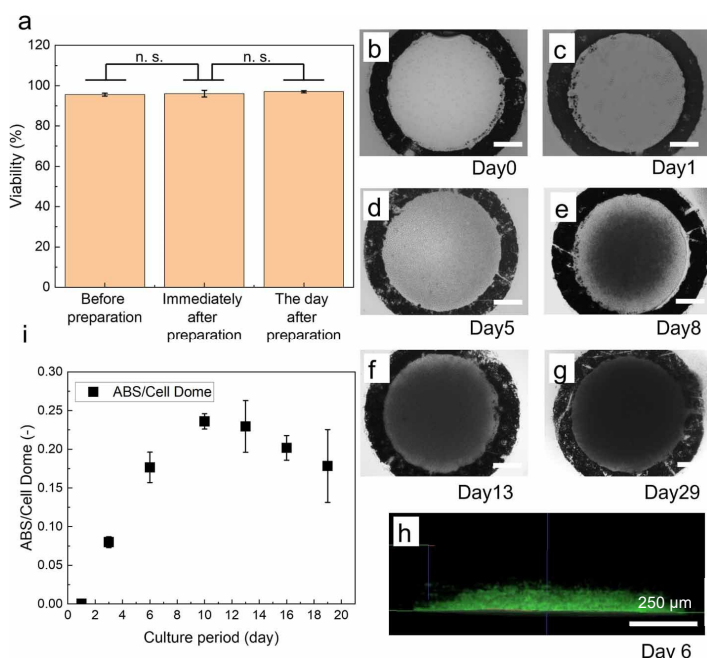


図 3. (a) ドーム作製前、作製直後、作製翌日の K562 細胞生存率。 (b)-(g) ドーム内 K562 細胞の増殖、(h) 6 日間培養後のドーム内細胞の 3D 画像、(i) ドーム毎の細胞ミトコンドリア活性の推移。

た (図 3h)。また、マイクロドームを作製する際に、細胞を染色する際に用いられる蛍光物質を撥水リング内に塗布しておき、その上に K562 細胞含有マイクロドームを作製したところ、図 4 に示されるように、それぞれのドーム内の細胞が異なる蛍光を示す浮遊細胞含有マイクロドームアレイを作製することができた。また、K562 細胞だけでなく、リンパ腫細胞である TK 細胞でも同様に、マイクロドーム内での増殖が確認された (図 5)。TK 細胞も、K562 細胞と同様に、マイクロドーム中の空間を満たすように増殖したことが、培養 10 日目のマイクロドームの断面のヘマトキシリン&エオシン染色により明らかとなった。なお、それぞれのドーム内の細胞について低酸素プローブを使い、低酸素状態を調べたところ、ドームの中心部の細胞ほど低酸素状態

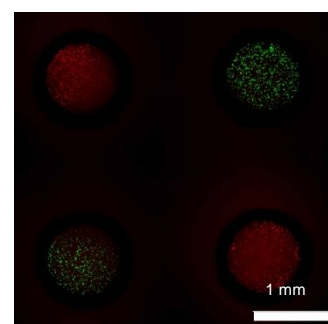


図 4. Calcein-AM(緑)と CytoRed(赤)をスポットしたリング上に作製したマイクロドーム中の K562 細胞。

HRP の酵素反応を経て得られるマイクロドームに包括することによって細胞の生存率が低下することは無く (図 3a)、ドーム内で細胞が増殖していることが写真とミトコンドリア活性から明らかとなった (図 3b-g, i)。また、作製 6 日後にドーム内の細胞分布を調べたところ、ドームの中空形状と同様の細胞分布が確認され

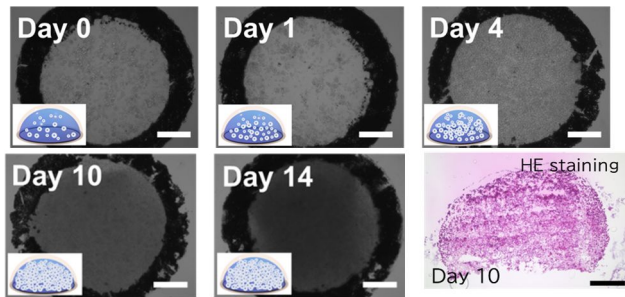


図5. マイクロドーム内のTK細胞の増殖挙動と断面のヘマトキシリン&エオシン染色写真.

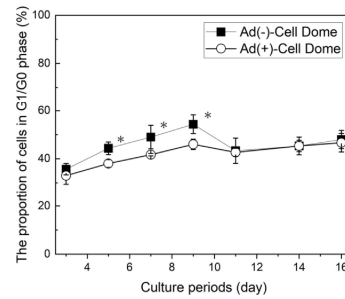


図6. 細胞接着性のあるゼラチン誘導体ゲル(Ad(+))と細胞接着性のないゲル(Ad(-))を皮膜とするマイクロドーム内のHeLa細胞の細胞周期推移.

にあることがわかった。さらに、この低酸素状態に起因すると考えられる、抗がん剤耐性の向上が確認された。これらの検討期間中は、2、3日毎に培養液の交換を行い、その間もマイクロドームの形状が維持されたことから、マイクロドーム皮膜が安定性に優れていることも明らかになった。

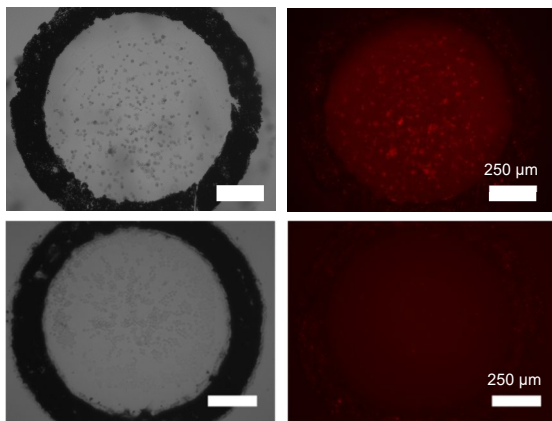


図7. 蛍光タンパク発現に関わるプラスミドとリポフェクトアミンの複合体を撥水リングにスポットした後に作製したマイクロドーム内のK562細胞写真. 上段: キトサン誘導体ゲル皮膜, 下段: アルギン酸誘導体ゲル皮膜.

続いて、マイクロドームの皮膜の細胞接着性を制御することによって接着細胞の細胞周期を制御できるかを調べた。その結果、図6に示すように、細胞接着性のあるマイクロドームとそうでない場合とでは、細胞増殖に関わる細胞周期に関する挙動に差が生じた。このことから、皮膜の物性を制御することにより、内部の細胞の挙動を制御できることが明らかになった。

これらの検討に加えて、マイクロドーム内の細胞への遺伝子導入の可否を調べるために、蛍光タンパク発現に関わるプラスミドとリポフェクトアミンの複合体を撥水リングにスポットした後に K562 細胞を含むマイクロドームを作製した。その結果、ドーム内で浮遊細胞への遺伝子導入が可能であることが明らかとなった(図7)。

以上の結果より、本研究において目的とした、適切に培養液が交換された環境下で浮遊

状態にて培養される浮遊細胞に関して、細胞応答の時間的変動データを様々な条件下で採取することを可能とする革新的な浮遊細胞マイクロアレイの創成を達成することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazama Ryotaro, Sato Ryuta, Fujiwara Hiroyuki, Qu Yanfei, Nakahata Masaki, Kojima Masaru, Fujita Satoshi, Sakai Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of non-adherent cell-enclosing domes with enzymatically cross-linked hydrogel shell	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 015002 ~ 015002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ac95ce	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 Kazama Ryotaro, Fujita Satoshi, Sakai Shinji	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell Dome as an Evaluation Platform for Organized HepG2 Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 69 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010069	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 風間遼太郎・堀口一樹・小嶋勝・藤田聡史・境慎司
2. 発表標題 Cell Domeシステムを用いた非接着細胞への遺伝子導入手法の開発
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryotaro Kazama, Ikki Horiguchi, Masaru Kojima, Satoshi Fujita, Shinji Sakai
2. 発表標題 The development of hemispherical cell-enclosing domes for culture and evaluation of non-adherent cells
3. 学会等名 3rd Asian Congress for Alternatives to Animal Experiments (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
---------	---------