

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650257

研究課題名（和文）細胞間相互作用の研究また組織再生に用いる細胞マニピュレーション方法

研究課題名（英文）Study of cell-cell interaction: Cell manipulation method for tissue regeneration

研究代表者

岩田 博夫 (IWATA HIROO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：30160120

研究成果の概要（和文）：ガラス基板上に一本鎖 DNA を結合し、DNA ハイブリダイゼーションを利用して細胞を 2 次元に配列させ、長期間培養を行って観察した。配列直後は、細胞は DNA ハイブリダイゼーションの効果のみで結合しているが、基板を血清含有培地に浸漬すると、血清中の接着性タンパク質により、本来の接着機構へと移行した。さらに、細胞が接着分子によって固定される力と、移動しようとする力の間で競合が起こり、最終的に移動する力が打ち勝つことがわかった。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for the 2-dimensional patterning of cells via hybridization of membrane-tethered single stranded oligonucleotides to complimentary single stranded oligonucleotides bound to optically transparent glass substrates which allowed us to characterize the long term culture of patterned cells. Patterned substrates immersed in FBS-containing media are shown to permit the adsorption of adhesive serum proteins which allowed for the spreading and engagement of natural cytoskeletal adhesion modes in cells initially attached only through DNA hybridization. We show that the coexisting modes of attachment result in competition between membrane-bound tethers and natural cytoskeletal adhesion machinery as cells attempt to migrate away from their initial points of attachment. This competition ends in the escape of cells from their designated patterns and the ‘winning out’ of cytoskeletal migration forces over the affinity of lipid inserts for the cell membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ナノバイオロジー・ナノメディスン、再生医療

1. 研究開始当初の背景

様々な細胞を二次元パターンに制御する細胞アレイは、工業的な薬剤のスクリーニングや、遺伝子の機能分析のためのアッセイ法としての利用が期待される。従来の研究における細胞アレイの作製方法としては、接着性の糖タンパク質や基板に固定化された抗原と抗体との結合などを利用する方法や、吸引

やマイクロ流路を利用して物理的に配列する方法、あるいはリソグラフィを利用する方法などがあげられる。これらの手法を用いることで、様々な細胞パターンングが実現してきたが、複数種の細胞を互いに影響しあうほどの距離で並べるような選択性が得られないこと、長時間を要するプロセス、高価な装置を必要とするなど、いくつかの重要な制限

が残っている。我々は、これまでの研究においてポリエチレングリコールを介して ssDNA とリン脂質が結合した ssDNA-PEG 脂質で細胞を修飾し、単純で迅速な細胞の固定化を行えることを報告してきた。本手法では、接着性タンパク質を介した本来の細胞接着機構とは独立に、ssDNA で修飾した表面に DNA ハイブリダイゼーションを介して結合することができる。また、インクジェットプリンタを用いることで、高精度に細胞の配列を制御することができる。しかし、これまでの研究では、5'末端にチオール基を有する ssDNA-SH を用い、金とチオールの結合で基板に結合していたため、ガラス基板を金薄膜でコーティングしなければならないという技術上の問題があった。金薄膜は光を強く吸収してしまうため、光学顕微鏡による細胞観察で明快な像を得ることができなかった。また、T 細胞リンパ腫由来の細胞である CCRF-CEM を用いていたため、これは浮遊細胞であり、接着細胞を用いた実験は行われていなかった。細胞膜の修飾が本来の細胞の活動に影響するかどうかをはっきりさせる必要がある。膜修飾を利用することによる、本来の形ではない細胞接着は、細胞死、細胞の運動性の抑制、細胞の変化など結果を引き起こすことが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、金薄膜を用いない ssDNA-SH の固定化法の開発と、ssDNA-PEG 脂質を接着剤として用いてパターンニングした HEK293 の振る舞いについて明らかにすることを目的とした。具体的には、モルフォロジー、移動速度、生存率、増殖率について調べた。

3. 研究の方法

ssDNA-PEG 脂質による HEK293 および CCRF の細胞膜の修飾は、以下の手順で行った。トリプシン処理によって細胞を剥離後、PBS で 2 回洗浄し、PBS 中、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ssDNA-PEG 脂質存在下、室温条件で緩やかに攪拌しながら 1 時間作用させた。その後、PBS で 2 回洗浄したものを ssDNA-PEG 修飾細胞として用いた。

カバーガラスをピラニア溶液で 10 分間処理後、純水で 3 回、2-プロパノールで 3 回洗浄して乾燥させたものを準備し、5vol% の 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (AP-TEOS) 溶液 (水/エタノール = 1:9) に浸漬して室温で 30 分間反応させた。さらに水、エタノールで洗浄後、真空中 80 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間処理することで反応を完結させ、アミン修飾のガラス基板を作製した。これを末端にマレイミド基を持つ活性エステル sulfo-EMCS と 30 分間反応させ、マレイミド

基を導入した。ここに、インクジェットプリンタを利用して ssDNA-SH を噴霧し、室温で 1 時間反応させることで、ガラス基板表面に ssDNA を固定化した。基板への修飾剤の導入を確認するため、水の接触角測定と、XPS による元素比率の測定を行った。

ssDNA 修飾基板は、非特異吸着抑制のために BSA 溶液で処理した後、ssDNA-PEG 修飾細胞の分散液を作用させて細胞を基板上に固定化した。細胞配列の特異性を確認するため、異なるシーケンスの ssDNA で修飾した細胞を準備し、それぞれ PKH26 (赤) と PKH67 (緑) で標識して蛍光顕微鏡観察を行った。

細胞のモルフォロジー観察を行うため、細胞の免疫染色を行った。基板上に固定化した細胞は、血清含、および無血清の培地でそれぞれ 2 時間培養し、通常の免疫染色の手法にしたがって F-アクチンとビンキュリンを染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

また、細胞が DNA ハイブリダイゼーションを介して結合していることを確認するため、二本鎖 DNA (dsDNA) の染色も行った。細胞を DNA ハイブリダイゼーションで固定化後、dsDNA のらせんに結合することで知られるヨウ化プロピジウム (PI) 溶液で作用させて染色して共焦点顕微鏡で観察した。また、固定化してから PI を作用させずに 6 時間培養した後、PI を作用させたものについても共焦点顕微鏡観察を行って比較した。

細胞の移動について、タイムラプス顕微鏡を用いた観察を行った。DNA ハイブリダイゼーションで固定化した細胞のサンプル、ミスマッチの ssDNA ペアを用いたサンプル、および ssDNA を作用させなかったサンプルについてそれぞれ 10 分おきに 14 時間の撮影を行い、ImageJ ソフトを用いて細胞の移動距離を算出した。

細胞の生存率については、死亡細胞の核を PI 染色することで確認した。顕微鏡写真から生存細胞と死亡細胞の割合を計算した。また細胞の増殖率について、細胞カウント試薬を用いて 1 日、2 日、3 日培養の細胞数を測定し、倍化時間を計算した。

基板表面での DNA の相互作用を SPR 分析で検討するために、細胞モデルとしてリポソームを用いた実験を行った。リポソームは EggPC を用いて単純水和法で作製し、0.8 μm 、0.22 μm のフィルターでろ過したものを用いた。これを 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間 ssDNA-PEG 脂質と作用させることで ssDNA-PEG リポソームを作製した。SPR は研究室で自作のものを用い、SPR 分析用に金薄膜を蒸着したガラス基板を用いた。まず、ssDNA-SH の溶液に基板を浸漬して 1 時間反応させて ssDNA を導入し、SPR にセットした。PBS、ssDNA-PEG リポソーム溶液、PBS、FBS 溶液、PBS の

順に流し、その屈折率の変化から相互作用を観察した。同様に、ssDNA 修飾基板へのタンパク質の吸着についても観察を行った。

4. 研究成果

(1) 表面修飾による基板の物性変化

ピラニア溶液で処理した直後の基板の水の接触角は測定できないほど小さかったが、アミンを導入した表面では 61.8 度、マレイミドを導入した表面では 52.8 度となり、ssDNA を導入した表面では 44.4 度まで減少した。XPS による元素比率の測定では、それぞれ予想された元素の増加が確認できた。

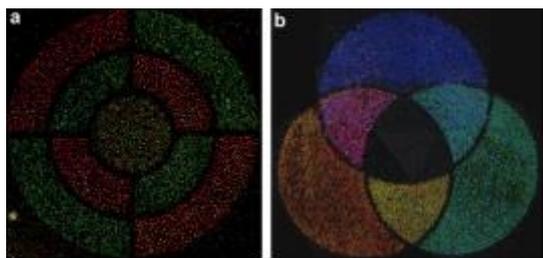


Fig. 1. インクジェットプリンタを利用して細胞をパターンニングした蛍光顕微鏡像。(a) 赤 (PKH26) と緑 (PKH67) で染色した 2 種類の細胞。(b) RGB の 3 色を重ね合わせた形で CCRF をパターンニング。

(2) 細胞の固定化

インクジェットプリンタを利用して ssDNA をパターンニングした基板上に ssDNA-PEG 修飾細胞を作用させたところ、それぞれの細胞を目的の位置に配列することができた。Fig.1(a)では、2 種類のシーケンスの ssDNA でダーツボード模様パターンニングした基板上で、赤と緑に染色した HEK293 をそれぞれ固定化することができた。Fig.1(b)では、さらにもう 1 種のシーケンスの ssDNA を加え、RGB の 3 色に染色した CCRF をそれぞれ基板上にパターンニングした図を示している。

(3) 細胞の免疫染色と形態観察

Fig.2 では、DNA ハイブリダイゼーションで固定化後に血清含、無血清の培地でそれぞれ培養した細胞を免疫染色した共焦点顕微鏡像を示している。ビンキュリンは結合部に集まってアクチン骨格とインテグリンまたはカドヘリンの間の結合に寄与する細胞骨格タンパク質で、通常の細胞接着では Fig2(a) に示すように細胞の淵の結合部位に集中し、そこからアクチンストレスファイバーが伸びている像が観察できる。一方、DNA ハイブリダイゼーションで固定化し、無血清の培地で培養した細胞では、通常の接着細胞のモルフォロジーは観測できず、Fig.2(b) のように神経突起の様に枝分かれ状にアクチン繊維が伸びたようなイレギュラーな形が観測

された。また、ビンキュリン細胞全体に分布し、結合部位に集合するような様子は見られなかった。また、DNA ハイブリダイゼーションで固定化後、血清を含む培地で培養した場合には、通常の細胞接着と同様の形が観察できた。この場合、Fig.2(c) に示す通り、ビンキュリンは結合部位に集中して発現し、アクチンストレスファイバーを形成した。

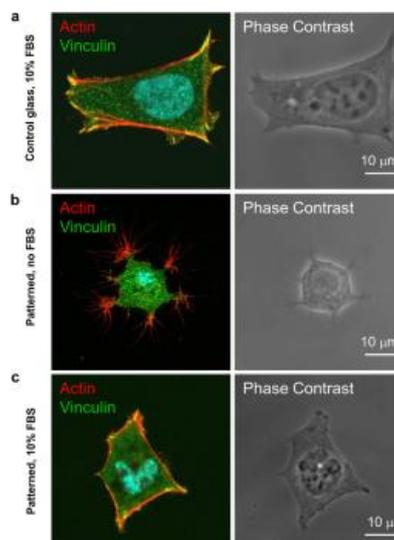


Fig. 2. HEK293 の免疫染色像。(a) 無修飾の細胞の基板上への接着。(b) DNA ハイブリダイゼーションで固定化後、無血清培地で培養した細胞と (c) 血清を含む培地で培養した細胞。

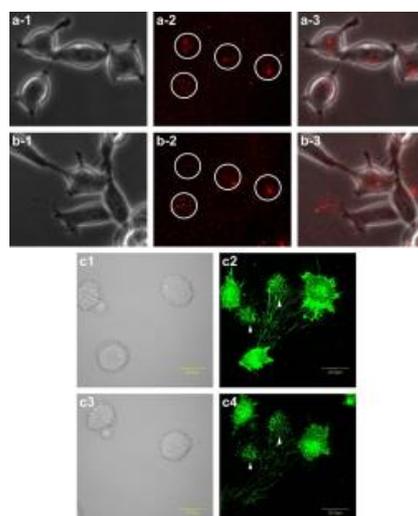


Fig. 3. 細胞—ガラス界面での dsDNA の観察と細胞の形態。(a) DNA ハイブリダイゼーションで固定化後、血清を含む培地で 10 分間培養、および (b) 6 時間培養後の顕微鏡像。PI で dsDNA を染色。(c) PKH67 で細胞膜を染めたサンプルの顕微鏡像。(c-1)、(c-2) は 10 分間培養後、(c-3)、(c-4) は 4 時間培養後をそれぞれ示す。

(4) 細胞—ガラス基板界面での dsDNA の観察

細胞と基板の界面付近の dsDNA を PI で染色して共焦点顕微鏡で観察した写真を Fig.3(a), (b) に示す。Fig.3(a) は DNA ハイブリダイゼーションによる固定化の 10 分後の様子を示しており、PI は細胞のちょうど真下に集まっている様子が観測できる。一方、この後 6 時間培養し、再び PI で染色して観察すると、細胞は別の位置に移動するが、PI は最初に細胞が固定化された位置に観測できる。(Fig.3(b)) この結果は細胞が移動後も、dsDNA が元の位置にとどまり続けることを示している。

同様の条件で、PKH67 で細胞膜を染色して観察した像を Fig.3(c) に示す。4 時間の培養の間に細胞移動が起こり、細胞は元の位置から離れた位置に観測されるが、蛍光色素は細胞の元の位置から移動した経路上に残存している。6 時間の培養後には蛍光色素の足跡はほとんど観測できなくなる。これは、ssDNA-PEG 脂質が細胞膜内にそれほど長時間は保持されていない可能性を示唆しており、後の項で述べるように、細胞の移動速度の増加とも整合性がある。

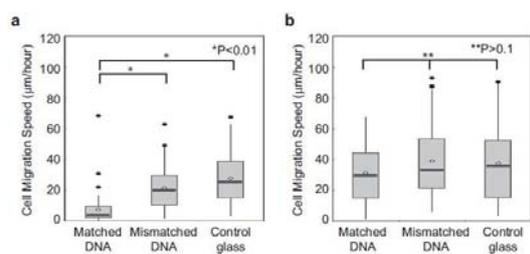


Fig. 4. 細胞の移動速度。(a) 培養開始直後から 1 時間。(b) 固定化後 6 時間培養後。

(5) 細胞の移動速度

細胞移動速度を計算し、ボックスプロットの形でグラフ化したものを Fig.4 に示す。DNA ハイブリダイゼーションで固定化直後の移動速度は、4.1–9.6 $\mu\text{m}/\text{h}$ であり、ミスマッチの ssDNA を修飾した基板で培養した細胞、および無修飾の細胞の速度がそれぞれ 10.4–29.7 $\mu\text{m}/\text{h}$ 、14.9–38.8 $\mu\text{m}/\text{h}$ であるのに対して非常に小さく抑制されている。DNA ハイブリダイゼーションを利用した固定化は、細胞接着と展開を加速させるが、元の場所に固定する効果によって移動を抑制することが示唆される。

Fig.4(b) に示すように、固定化後に 6 時間培養した後の移動速度の平均値は、DNA ハイブリダイゼーションで固定化した場合、ミスマッチの DNA を用いた場合、および無修飾の細胞でそれぞれ 29.3、33.7、35.4 $\mu\text{m}/\text{h}$ となり、差はほぼなくなる。

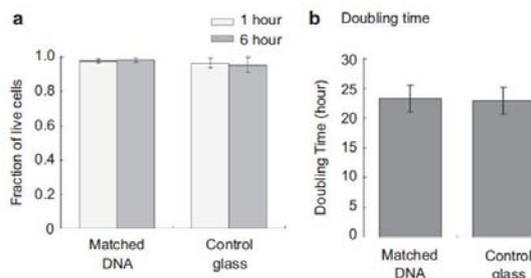


Fig. 5. DNA ハイブリダイゼーションで固定化した HEK293 の生存率と倍化時間。(a) 細胞の生存率。(b) 細胞の倍化時間。

(6) 細胞の生存と増殖速度

DNA 修飾による細胞機能への影響を確認するため、細胞生存率 (Fig.5(a)) および細胞の増殖速度 (Fig.5(b)) を測定した。1 時間後、6 時間後それぞれにおいて、DNA 修飾した細胞および無修飾の細胞のどちらも 95% 以上の生存率を示し、明確な差は得られなかった。

増殖速度は倍化時間によって比較を行った。倍化時間は DNA 修飾と無修飾の細胞でそれぞれ 23.3 時間と 22.9 時間となった。

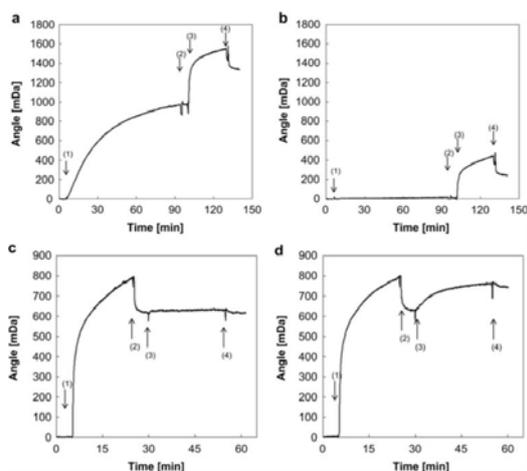


Fig. 6. 表面プラズモン共鳴分析。(a) (dA)₂₀ 修飾基板に(1) (dT)₂₀-PEG リポソーム溶液、(2) PBS、(3) 10% FBS 溶液、(4) PBS の順に作用。(b) (dA)₂₀ 修飾基板に(1) (dA)₂₀-PEG リポソーム溶液、(2) PBS、(3) 10% FBS 溶液、(4) PBS の順に作用。(c) (dT)₂₀ 修飾基板に(1) 10% FBS 溶液、(2) PBS、(3) 0.4% ウサギ血清溶液、(4) PBS の順に作用。(d) (dT)₂₀ 修飾基板に(1) 10% FBS 溶液、(2) PBS、(3) 0.4% 抗ビトロネクチン IgG 溶液、(4) PBS の順に作用。

(7) SPR 測定結果

リポソームを細胞モデルとして用いた SPR の測定結果を Fig.6 に示す。(dA)₂₀ で修飾した基板に (dT)₂₀-PEG リポソームを作用させると、SPR アングルが大きく増加したの

に対し、(dA)₂₀-PEG リポソームを作用させた場合は増加しなかった。この結果は、(dT)₂₀-PEG リポソームが特異的に(dA)₂₀ 修飾基板に結合することを示している。10%のFBS溶液を流した場合では、いずれの場合も共鳴角の増加がみられ、タンパク質の基板上への吸着が見られた。

さらに、血清中のタンパク質のうち、特にビトロネクチンの吸着について SPR 分析を行った。まず、(dT)₂₀ 修飾基板に 10%の FBS 溶液を流すと 600 mDA 以上の共鳴角増加が起こり、これは 300 ng/cm² のタンパク質吸着が起こったことを示す。続いて、抗ビトロネクチン IgG を含む溶液を作用させると、共鳴角の増加が起こったため、これは基板上のタンパク質層にビトロネクチンが含まれることを示している。

(8) 考察

従来の研究では、細胞膜の修飾は細胞骨格には結びつかず、これらの失敗から、アノキスとして知られるアポトーシスが起きていた。本研究で血清を含む培地と無血清培地で細胞を培養したところ、これらの 2 種類の条件において、DNA ハイブリダイゼーションで固定化した細胞の形態と広がり方が明らかに異なることが示された。この結果と SPR での結果を合わせると、DNA ハイブリダイゼーションで固定化した細胞は、その後基板上に吸着した血清中のタンパク質とインテグリンを介して結合することが示唆される。さらに、パターンニング後に 24 時間培養した結果から、細胞の生存率および増殖率は、無修飾の細胞の場合と差がないことが示された。長期間培養の結果、アノキスは起こらず、パターンニングされた細胞は基板上に吸着した血清中のタンパク質と結合し、通常細胞骨格による結合が起こる。

本研究での細胞膜修飾は、DNA ハイブリダイゼーションの速度論によって通常細胞接着よりも早い基板への接着を実現する。接着性の糖タンパク質による通常細胞接着は、2 段階であらわすことができる。まず、①不十分な接着点形成され、②その接着点が接着帯へと成熟する。典型的な接着性の細胞株の培養では、このプロセスは播種後 1-3 時間のうちに完了し、細胞の周囲が基板上に沿って伸展していく、接着点の展開へと移行する。Fig.3 の dsDNA の観察結果から、ssDNA 修飾細胞は、基板上に固定化後、10 分以内に迅速に細胞は展開と伸長が起こることがわかる。このことから、初期の接着点の形成と伝播は DNA ハイブリダイゼーションによる固定化で加速されることを示唆している。

この細胞パターンニング法は、工業的な製薬のハイスループットなスクリーニングに適

用できる。例えば異種細胞間の相互作用について調べるときに、正確で効率的なアッセイを行うためには、細胞が互いにより多くの異種細胞と近接していることが重要となる。インクジェットの汎用性から、様々なパターンへのヘテロな配置が可能である。今までの技術と比較して、基板の高い光透過性から、細胞の観察を行うプラットフォームとして利用できる。例えば、カドヘリン-カドヘリン相互作用、上皮間葉系移行、細胞移動や癌の転移などの研究、複数の細胞を組み合わせた組織形成の研究などに有用である。細胞は自発的に移動する傾向があるため、長期間の培養においては、これが制限となる。それゆえ、本手法は短時間での利用に最適である。

(9) 結論

我々は細胞膜に修飾した ssDNA を利用してガラス基板上に異なる種類の細胞をパターンニングする新しい手法を開発した。ガラス基板の透明性から接着細胞の長期間の観察が可能となった。ssDNA-PEG 脂質を用いた細胞膜修飾は、本来の細胞の性質と比較して、基板への迅速な細胞の接着を行うことができる。長時間の培養を行う中で、細胞接着と移動を含む本来の機構と人工的な固定化の競合が起こり、接着性タンパク質を介した自然な細胞接着へと移行する。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Luan NM, Iwata H., Inhibition of instant blood-mediated inflammatory responses by co-immobilization of sCR1 and heparin on islets. *Biomaterials*, 査読有, 2013, online 9 April, in press.

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.041

(2) Sakurai K, Hoffecker IT, Iwata H., Long term culture of cells patterned on glass via membrane-tethered oligonucleotides.

Biomaterials, 査読有, 34(2), 2013, 361-370

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.080.

(3) Sakurai K, Teramura Y, Iwata H., Cells immobilized on patterns printed in DNA by an inkjet printer. *Biomaterials*, 査読有, 32(14), 2012, 3596-3602

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.066

[学会発表] (計 3 件)

(1) Kitamura, N., Nakai, R., Iwata, H., Surface-labeling of pancreatic islets with

ssDNA-modified magnetic nanoparticles for MR imaging. 6th International Symposium on Nanomedicine. 2012年11月30日, くにびきメッセ島根県立産業交流会館 (松江市)

(2) 北村成史, 岩田博夫, ランゲルハンス氏島の移植後 MRI 診断を指向した造影剤の開発. 第41回医用高分子シンポジウム, 2012年6月25日, 東京大学先端科学技術研究センター (東京都)

(3) 北村成史, 岩田博夫, 表面修飾酸化鉄ナノ粒子を用いたランゲルハンス氏島の MR 画像化. 第61回高分子学会年次大会, 2012年5月29日, パシフィコ横浜 (横浜市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te03/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 博夫 (IWATA HIROO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 30160120

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし