

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656498

研究課題名(和文) 光分解性PEG脂質を用いた細胞選択回収法の開発

研究課題名(英文) Development of selective cell collection method using photo-degradable PEG-lipid

研究代表者

長棟 輝行 (Nagamune, Teruyuki)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20124373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞アレイは顕微鏡による一細胞のハイコンテンツ解析のための有望な技術である。本研究では、光解離性PEG-脂質を修飾したコラーゲン被覆基板を開発し、これを用いた非接着性細胞、接着性細胞の双方に応用可能な汎用的な単一細胞アレイを作製した。細胞がこの基板上で細胞接着、細胞分裂、細胞移動などの細胞固有の機能を示すことを明らかにした。さらに、この基板表面での接着性細胞の運動性や非接着性細胞の形態変化などを一細胞毎にハイスループットかつ定量的にイメージング解析し、特定の細胞を光照射によって基板から遊離させ回収することに成功した。この汎用的な単一細胞アレイは、細胞工学研究分野の有用なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：Single-cell array is a promising technology for microscopy-based high-content analyses. In this study, we constructed a versatile single cell array for both non-adherent and adherent cells by developing a photo-cleavable PEG-lipid/collagen coating material. On this material surface, we confirmed that cells behave similar to their native functions such as cell adhesion, mitosis and migration. Furthermore, we succeeded in high-throughput single cell quantitative imaging analysis on the motility of the adherent cells and that on the morphological changes of non-adherent cells using this PEG-lipid/collagen-based single-cell array, and the recovery of a target cell by photo-irradiation of this cell. This versatile single-cell array shall be invaluable tool for the research in the fields of cell engineering.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：光分解性PEG脂質 細胞パターンニング 単一細胞アレイ 細胞分離回収

1. 研究開始当初の背景

再生医療から細胞生物学の基礎研究までの幅広い分野において、目的とする細胞種を選択し、正確に分離回収する技術が必要不可欠となっている。しかし、既存のフローサイトメーター等を用いた手法では、抗体などを用いて識別可能な細胞種にしか適用できないこと、また、擬陽性や擬陰性の細胞も分取してしまうことが問題として挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、光応答性材料をコートした基板上に一細胞ずつ並べた細胞アレイを作製し、特定の細胞のみを光照射によって迅速簡便に回収する技術の開発を目的とする。一細胞アレイ上では一細胞ずつを正確に多角的に解析可能であり、従来法では分けられなかった細胞種を分離でき、正確性の向上も期待できるため、細胞集団から目的細胞を迅速に選択し、本技術が有用であることを実証する。

3. 研究の方法。

BSA(牛血清アルブミン)を物理的に吸着させた基板表面を光分解性 PEG 脂質(オレイル基-ニトロベンジル基誘導体光分解性リンカー-ポリエチレングリコール-NHS 基)で修飾し、この表面にフォトマスクを介して近紫外光(365nm)を照射することによって、光非照射スポット部位が光分解性 PEG 脂質スポット表面、それ以外の光照射部位が PEG 表面となる基板表面の作製を行う。この際、光分解性 PEG 脂質スポット表面のスポット直径を種々のフォトマスクを用いて 2~22 μ m の範囲で変化させた基板を調製する。これらの基板を用いて、血球系プロ B 細胞である Ba/F3 細胞の一細胞アレイを作製し、光分解性 PEG 脂質スポット表面のスポット直径が、スポット上への細胞の固定化率、細胞固定化スポット数に占める一細胞スポット数の割合などに及ぼす影響を評価する。

流速付加条件下で一細胞が固定化された光分解性 PEG 脂質スポットに近紫外光を照射し、細胞の生存率を低下させることなく遊離させる線流速と光照射条件の最適化を行う。

緑と赤の蛍光タンパク質をそれぞれ発現させた Ba/F3 細胞の 2 つの集団を混合し、これをマイクロ流路内に一細胞アレイ化する。この一細胞アレイをレーザー共焦点蛍光顕微鏡によって観察し、特定の蛍光タンパク質を発現する細胞を認識し、この細胞に光照射して遊離、回収するための操作を自動化するためのプログラム開発を行う。

また、リガンド刺激によって運動性を亢進するシグナルを伝達するキメラ受容体の遺伝子を導入した Ba/F3 細胞とこの遺伝子が未導入の Ba/F3 細胞の混合集団の一細胞アレイを作製し、リガンド添加後のアレイ上に固定化された個々の細胞の動きを顕微鏡観察によって定量化し、キメラ受容体が発現している Ba/F3 細胞を認識して光照射により回収する

一連の操作を自動化するためのプログラム開発を行う。

4. 研究成果

再生医療から細胞生物学の基礎研究までの幅広い分野において、目的とする細胞種を選択し、正確に分離回収する技術が必要不可欠となっている。しかし、既存のフローサイトメーター等を用いた手法では、抗体などを用いて識別可能な細胞種にしか適用できないこと、また、擬陽性や擬陰性の細胞も分取してしまうことが問題として挙げられる。そこで、本研究では、光応答性材料をコートした基板上に一細胞ずつ並べた細胞アレイを作製し、目的に合う細胞のみを光照射によって迅速簡便に回収する技術の開発を目的とした。

今年度は、一細胞アレイを用いて、一細胞ずつの動的な性質をハイスループットに画像解析した。一細胞アレイ上では細胞の位置が規格化されているため、簡便なプログラムによって高速に一細胞解析を実施できる。我々の開発した一細胞アレイと画像解析プログラムにより、非接着性細胞の経時的な形態変化を網羅的に解析し、膜受容体からのシグナル伝達に応じた細胞運動の定量化に成功した。これは、一個の細胞の一部を固定することで細胞の運動性に応じた形態変化を観察する本技術でしか得られない新しい細胞評価パラメーターである。また、既存の一細胞アレイでは解析が困難な接着性細胞のランダムウォークの定量化も一細胞ずつハイスループットに行うことができた。

また、光分解性 PEG 脂質/BSA 表面に一細胞アレイを作製して観察・解析後、望みの細胞に光を照射して光分解性 PEG 脂質の分解によって細胞を基板から遊離させ、細胞を回収することを試みた。共焦点顕微鏡での観察下で、複数の細胞に対して光を照射し、流路を用いて均一なせん断応力を細胞に負荷したところ、光を照射した細胞の選択的遊離が確認された。この手法では、複数の細胞に光を短時間照射するだけで、ハイスループットに目的細胞の回収・不要細胞の除去ができた。

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)

[雑誌論文](計 2件)

Yamahira, S., Takasaki, Y., Yamaguchi, S., Sumura, K., Kanamori, T. and Nagamune, T., "Dynamic PhotoChemical Lipid Micropatterning for Manipulation of Nonadherent Mammalian Cells", *Methods in Cell Biology*, 査読有, 120, 2014, 131-144

DOI: 10.1016/B978-0-12-417136-7.00008
-2

Yamaguchi, S., Komiya, S., Matsunuma, E., Yamahira, S., Kihara, Y., Miyake, J. and Nagamune, T., "Transfer Printing of Transfected Cell Microarrays from Poly(ethylene glycol)-oleyl Substrates onto Biological Hydrogels", *Biotechnol. Bioeng.*, 査読有, 110, 2013, 3269-3274
DOI: 10.1002/bit.25010

〔学会発表〕(計 10 件)

高橋裕美 他 3 名, "光分解性 RGD-PEG を用いた細胞接着の時空間制御", 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 30 日, 名古屋大学東山キャンパス, 名古屋

山平真也 他 4 名, "光分解性 PEG 脂質修飾コラーゲン表面を用いた一細胞アレイ法の開発とその応用", 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 30 日, 名古屋大学東山キャンパス, 名古屋

山平真也 他 4 名, "光分解性 PEG 脂質を用いた一細胞アレイ化技術と細胞解析への応用", 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 2013 年 12 月 6 日, イーグレひめじ, 姫路

山平真也 他 4 名, "Light-controllable Cell Patterning using Photo-cleavable Poly(ethylene glycol)-Lipid for Photoreleasable Cell Microarray", 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム, 2013 年 6 月 8 日, 東京大学, 東京

山平真也 他 4 名, "光分解性 PEG 脂質表面上での一細胞レベルマニピュレーション技術の開発", 化学工学会第 78 年会, 2013 年 3 月 17 日, 大阪大学豊中キャンパス, 大阪

山口哲志, 長棟輝行, "PEG 脂質を用いた次世代細胞マイクロアレイの開発", 第 29 回医用高分子研究会講座, 2012 年 11 月 21 日, 産総研臨界副都心センター, 東京

Yamaguchi, S. 他 4 名, "Spatio-temporal Cell Micro-Patterning with Photo-Cleavable PEG-lipid", *AIChE annual meeting*, 2012 年 11 月 2 日, Pittsburgh, USA

Yamahira, S. 他 4 名 "Light-controllable Cell Patterning using Photo-cleavable Poly(ethylene glycol)-Lipid for Photoreleasable Cell Microarray", The 19th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2012 年 10 月 27 日, 徳島大学, 徳島

Yamahira, S. 他 4 名, "Spatio-temporal cell patterning technology using a photocleavable cell anchoring reagent", 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012)", 2012 年 9 月 19 日, Daegu, Korea

Yamaguchi, S. 他 4 名, "Spatio-temporal control of cell micro-patterns on photo-cleavable PEG-lipid surfaces", The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012), 2012 年 7 月 5 日, Southern Beach Hotel & Resort, 沖縄

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1) 研究代表者

長棟 輝行 (NAGAMUNE, Teruyuki)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：20124373

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

山口 哲志 (YAMAGUCHI, Satoshi)
東京大学・先端科学技術研究センター・講師
研究者番号：80398106