

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620136

研究課題名(和文)リポソーム型細胞架橋剤：迅速セルソーティング法と機能化自在マトリックスの創製

研究課題名(英文)Liposomal crosslinker for cell sorting and functional matrix

研究代表者

森 健 (Mori, Takeshi)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体を修飾したリポソームにより、標的細胞を架橋することで、細胞のソーティングを行い、さらにはオルガノイド作製のためのマトリックスとして用いることを検討した。上皮細胞では、リポソームによる架橋に加えて、内在性の接着分子による凝集も含んでいることが示された。そこで、接着しにくい浮遊細胞の架橋を検討したところ、凝集がほとんど起こらなかった。原因の一つとして、凝集操作中にリポソームから抗体が脱離することを考えた。そこで、2年目後半から、リポソームに抗体などの高分子を強く修飾するための脂質の開発に切り替えた。脂質がリポソームに分散して存在することまでを示した。

研究成果の概要(英文)：I studied the usage of antibody-modified liposome for cell sorting and matrix. Epithelia form aggregate not only by liposome but also by endogenous adhesion molecules. On the other hand, I found that floating cell (K562) can not be crosslinked by this method. I attributed this to the dissociation of antibody during cell aggregation process. Thus, I developed new lipid molecule which stable anchor on liposomal membrane. I found that the synthesized lipid was homogenously dispersed in the membrane.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：セルソーティング マトリックス

1. 研究開始当初の背景

多種の細胞の混合物中から、目的の細胞を分離する技術は、細胞生物学や医学の実験で重要である。例えば、再生医療の分野では、多種多様な細胞への分化能を有する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の応用が期待されている。しかし、移植を目的とする場合には、未分化細胞が有する腫瘍誘発のリスクが懸念される。¹ そこで、iPS 細胞が目的の細胞に分化した後、これを迅速かつ高精度で選別することが重要である。細胞の分離には、一般に FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) を用いるが、コスト、処理速度や細胞へのストレスなどの面で大きな問題があった。

2. 研究の目的

リポソームを細胞どうしの架橋剤として利用することで、再生医療において重要な 2 つの技術、すなわち細胞ソーティング法 (ダイレクトセルソーティング法: DCS 法) および増殖・分化促進のための細胞外マトリックス (リポソーム型 ECM) を開発する。DCS 法は、従来のソーティング法 (FACS、MACS) の欠点を克服し、かつ両者の利点 (迅速、ダメージフリー、コンタミフリー、高純度) を併せ持つ方法になると期待される。また、リポソーム型マトリックスは、従来の固体あるいは溶液性のマトリックスの欠点を補う多くの利点 (表面・内部の機能化自在性、均一浸透性、自己支持性) を有すると期待される。

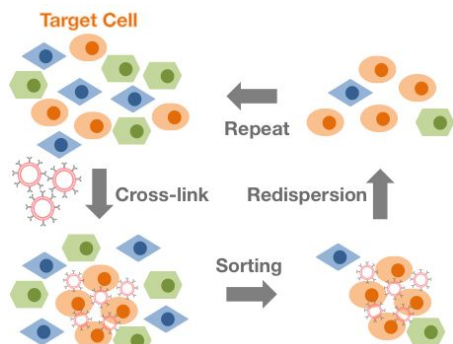


図 リポソームを架橋剤とするセルソーティング

3. 研究の方法

(1) スクシンイミド修飾ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS) (2.5 μg, 0.84 nmol) を EpCAM 抗体と反応させ、EpCAM 抗体修飾 DSPE (DSPE-PEG₂₀₀₀-EpCAM) を調製した。

卵黄由来ホスファチジルコリン (32 μg, 44 nmol) とコレステロール (11 μg, 28 nmol) 及び脂質結合性蛍光試薬 DiD (全脂質の 1 mol%) を用いて水和法にてリポソームを調製した。そして、直径 800 nm のエクストルーダーを通過させ粒径を調整した。最後に、調製したリポソームに DSPE-PEG₂₀₀₀-EpCAM を修飾し、目的の抗体修飾リポソームを得た¹⁾。リポソームの粒径は動的散乱法 (DLS) に

より評価した。

(2) リン脂質 (DOPC、Egg PC、DMPC、DPPC、DSPC)、コレステロール、および蛍光修飾した 1 を 56:38:1 のモル比で混合した薄膜を作製し、これを水和することでリポソームを調製した。粒径をエクストルージョン法により調節し、動的散乱法により粒径を測定した。また、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定し、1 のリポソーム膜への導入を評価した。次に、同組成の脂質を用いて、静置水和法によりマイクロメートルサイズのリポソームを調製し、蛍光顕微鏡観察により 1 の膜への導入を評価した。

4. 研究成果

(1) DLS によってリポソームの粒径を測定した結果、エクストルーダーによる粒径の調整直後は 650 nm 程度となった。次に、抗体を修飾した直後では 450 nm 程度となった。最後に、超遠心分離 (10⁵ G) 操作後の粒径を測定すると、大きな変化はなく 450 nm 程度となった (Table 1)。以上より、抗体修飾後、遠心分離後もリポソームの存在が確認された。

KB 細胞に対して抗体修飾リポソームを添加することで、100 個程度の細胞からなる凝集体が多数観察された。また、リポソーム由来の赤色蛍光が凝集体上から観察された (下図)。一方、抗体未修飾のリポソームではこのような凝集体は観察されなかった。以上より、抗体修飾リポソームが架橋剤として機能し、細胞同士が凝集していることが示された。また、PI 染色法より抗体修飾リポソームは細胞毒性を示さないことがわかった。また、一旦凝集した細胞は、ピペティングによって一細胞レベルまで容易に再分散できることを確認した。これは分子集合体であるリポソームを架橋剤として用いることの利点と考えられる。本手法は細胞分取の新たな方法となることが期待される。

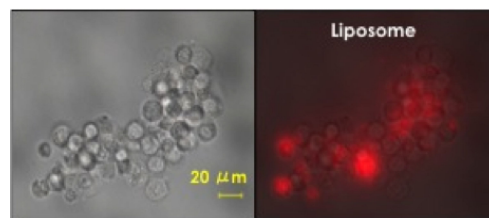


図 細胞凝集体中のリポソーム由来蛍光

この凝集がリポソームを加えずとも起こる内在性の接着分子による凝集であることが示唆された。そこで、凝集の起こりにくい細胞を探索することからはじめた。その結果、上皮系の細胞は、リポソームがなくとも凝集してしまうことが分かった。一方で、白血病由来の浮遊細胞 (K562、赤血球) は、リポソームでの架橋が起きなかった。これは、細胞表面が分厚い糖たんぱく質で覆われている

ため、細胞間をリポソームでは架橋できないためと考えられた。また、リポソームに修飾した抗体が細胞凝集体を作る操作（遠心）中に脱離する可能性も考えられた。

(2) 2年目の後半には、リポソームに強力に抗体を修飾する方法を検討した。抗体などの分子量の大きい分子を修飾した脂質分子は、リポソーム膜から脱離しやすいという問題があった。そこで本研究では、リポソーム膜への修飾を安定化するために、膜との相互作用を強化できる膜貫通型脂質 **1** を開発する(下図)。本分子は、疎水的な長鎖アルキルの両端に、親水性のアルギニンを修飾した構造をもつ。アルギニンのグアニジノ基は、脂質のリン酸エステルと強く水素結合するため²、**1**は膜と高い親和性を示すと期待される。また、**1**が膜から脱離する際には、親水性の頭部が二分子膜を通過することによる抵抗力が働くため、脱離を抑制できると期待される。また、本分子は固相合成で簡便に合成可能であり、機能の付加が容易という利点がある。

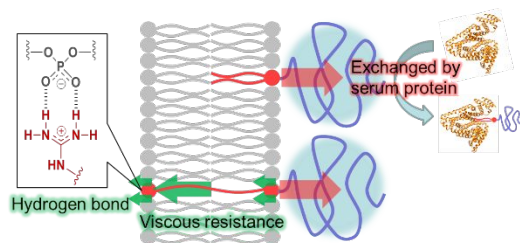


図 高安定性脂質

脂質の両端にリン脂質と相互作用するグアニジノ基を修飾した分子 **1** を設計した。サイズエクストルージョンにより得られた五種類のリポソームは、いずれも同程度の粒径を示した。蛍光スペクトルより、不飽和リン脂質 (DOPC、Egg PC) を用いた二重膜において、**1** の強い蛍光が観察されたことより、**1** が膜に導入され、分散していることが示唆された。

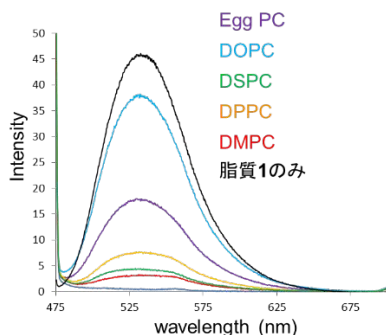


図 分子 **1** を分散したリポソームの蛍光スペクトル

また、マイクロメートルサイズのリポソームを蛍光顕微鏡で観察したところ、不飽和リン脂質二重膜上に **1** 由来の蛍光が観察され、

1 のリポソーム膜内への導入が示された。飽和の脂質の方が、機械的強度は高いと考えられる。そのためには脂質分子のアミド結合をエーテル結合のように親水性の低い結合に切り替えればよいと考えられる。

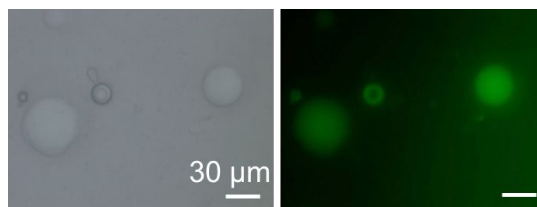


図 リポソームの蛍光顕微鏡写真

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

富中涉他、リポソームを用いたダイレクトセルソーティング法の開発、2014 年 5 月 28 日、高分子学会年次大会、名古屋

富中涉他、抗体修飾リポソームを用いたダイレクトセルソーティング法の開発、2014 年 9 月 24 日、高分子学会年次大会、長崎

〔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

森 健 (MORI, Takeshi)
九州大学工学研究院応用化学部門・准教授
研究者番号：70335785