

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630428

研究課題名(和文) 特定の細胞集団のみを選択的に包括することを可能とする革新的細胞包括法の創出

研究課題名(英文) Development of the method of cell-selective encapsulation in hydrogel sheaths

研究代表者

境 慎司(Sakai, Shinji)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：20359938

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)：本研究では、さまざまな細胞を含む細胞集団から特定の集団に属する細胞のみを選択的に、細胞よりわずかに大きなヒドロゲル粒子に1個ずつ別々に包括する方法の創出に挑戦した。新たに開発した方法は、細胞方面の抗原に対する抗体に西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)を標識したものをを用い、抗原抗体反応を経て特定の細胞表面にのみHRPを固定化し、そのHRPの酵素反応を利用して細胞表面にヒドロゲルを形成させるものである。この方法では、約1マイクロメートルのヒドロゲルが細胞表面に形成した。また、それによる細胞への顕著な毒性は確認されなかった。さらに、形成した皮膜の存在を利用した細胞分離も可能であった。

研究成果の概要(英文)： We tried to develop a method realizing cell-selective encapsulation with a hydrogel sheath. The method is based on biospecific identification of the target cells through antigen-antibody reaction and subsequent enzymatic hydrogel sheath formation on the cell surfaces by horseradish peroxidase (HRP). The thickness of hydrogel sheath formed on cell surface was around 1 micrometer. The method was harmless for mammalian cells. In addition, the cells with and without the hydrogel sheath could be separate easily by incubating the cells on cell culture dish for several hours.

研究分野：生物化学工学

キーワード：細胞包括 抗原抗体反応 ヒドロゲル

1. 研究開始当初の背景

水を多量に含むハイドロゲル粒子に動物細胞を包括して利用する細胞包括カプセルは、免疫抑制剤の非投与下での非自己細胞の移植 (Lohr et al, Lancet 357:1591(2001)) や、バイオリアクター内で細胞を剪断力などの外部刺激から保護しながら物質生産させるためのツールとして 1970 年代より研究・実用化が行われてきた (Orive et al, Nat Med 9:104(2003)など)。また、最近では、積極的に細胞と相互作用するゲル素材を用いることで、各種幹細胞の分化制御用ツールとしての有効性も報告されている (Kim et al, Stem Cell Res 11: 978(2013) ; Davidovich et al, Biomaterials 32:4489(2011))。このように各種用途に関する研究・実用化が行われてきた一方で、細胞を包括する方法に着目すると、その原理は過去 40 年以上変わらず、細胞が存在しなくても進行する高分子水溶液のゲル化に細胞を巻き込むことで包括する方法が唯一、常識的に用いられてきた。我々もそのような「常識」に基づいて、10 年以上にわたり細胞包括ゲル粒子に関する研究を行ってきた (Sakai et al, Biomaterials 23:4177 (2002); 30:5937(2009); 33:6721(2012)など)。一方で、我々は、ヒト iPS 細胞からの分化制御に関する研究に取り組むなかで、分化誘導処理後に未分化で残存したり目的外のものに分化した細胞が混在する集団のなかから、意図した通りに分化した細胞の表面近傍にだけ、その後の分離を容易にしたり、増殖や更なる成熟した分化を導くような環境を構築できないか? と考えるようになった。なお、さまざまな細胞を含む集団から特定の集団に属する細胞のみを選別する方法の重要性は、セルソーターが基礎研究から応用研究に至るまで幅広い分野で使用されていることから容易に理解できる。一方で、集団のなかのある細胞にだけ、その他の細胞の生存に影響を与えることなく特異的な細胞外環境を構築することは既存の技術では極めて難しかった。

2. 研究の目的

本研究では、さまざまな細胞を含む細胞集団から特定の集団に属する細胞のみを選別的に、細胞よりわずかに大きなハイドロゲル粒子に 1 個ずつ別々に包括する方法の創出を目的とした。この方法の開発に成功すれば、これまでよりも簡便な細胞選別を可能としたり、機能や分化を制御するために細胞周囲の環境を細胞毎に構築したり、生体から得られたさまざまな細胞を含む試料のなかから特定の細胞のみを短時間で選別して 3 次元的な組織の作製を可能としたり、さらには選別された細胞を免疫抑制剤の非投与下にて血管から移植を可能にするなど、既存の技術では困難・不可能であったことが可能となる。すなわち本研究は、細胞の機能・分化に関する基礎研究から再生医療や細胞治療などの応用研究分野にまで寄与できる革新的細胞

包括技術の開発を目的とした。そして、具体的には、以下の 3 点を達成することを目的として研究を実施した。1) ターゲットとする細胞の表面を起点としたゲル形成が可能であることを明らかにする。2) 細胞表面ゲル層の物質透過特性や強度、厚み等を制御するための設計指針を明らかにする。3) ゲルで覆われた細胞とそうでない細胞とを容易に選別できることを明らかにする。

3. 研究の方法

1) ターゲットとする細胞の表面を起点としたゲル形成

ハイドロゲルは水溶液に溶解している高分子同士が架橋されることによって生じる。したがって本研究では、高分子同士の架橋反応の起点を細胞表面に形成させた。具体的には、細胞のハイドロゲル内への包括に細胞選択性を付与するために、細胞表面に存在する分子 (表面抗原) に対する抗原抗体反応を用いた。そして、この抗体に、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を標識したものをを用いることにより、細胞表面に HRP を固定した。ここで、HRP は図 1 のようなフェノール性水酸基間の架橋形成反応を触媒し、その官能基を有する高分子の水溶液からはハイドロゲルを得ることができる。図 2 に本研究で開発した方法を示す。抗原を提示している細胞を含む細胞群を HRP 標識した抗体を含む水溶液に 10~30 分間浸した後、洗浄し、その後、フェノール性水酸基含有高分子と微量の過酸化水素を含む水溶液に 10 分間程度浸すというものである。

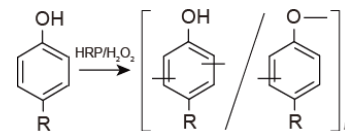


図 1. HRP による架橋形成反応。

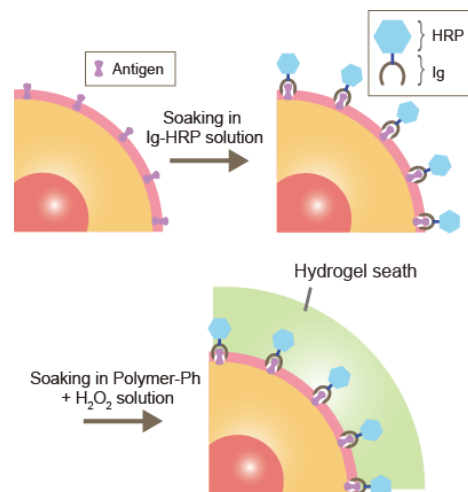


図 2. 抗原抗体反応と HRP を用いたゲル形成を組み合わせた選別的細胞包括法模式図。

2)細胞表面ゲル皮膜形成制御

本研究が成功することによって作製が可能となる細胞包括ゲル粒子の応用を考えると、細胞と外部環境との物質交換に関わる細胞表面に形成するゲル層の厚みや強度の制御に関わる設計指針を得ておくことは重要である。過酸化水素を消費しながら進行する HRP の酵素反応が、ゲル層の形成を導くことから、この酵素反応速度に関わる因子を操作することで、ゲル層の厚み制御を試みた。具体的には、細胞表面の HRP 密度に影響を与える HRP 標識抗体濃度、抗体を含む水溶液に細胞群を浸す時間、フェノール性水酸基高分子の濃度、および HRP が触媒するヒドロゲル皮膜形成反応を行わせる時間に関して検討を行った。

3)ゲルで覆われた細胞とそうでない細胞との選別

本研究で開発した細胞包括ゲル粒子作製法が広く使用されるようになるためには、得られるゲル粒子と包括されなかった細胞とを容易に選別できる方法の開発が必要である。蛍光標識したゲルを形成させることでセルソーターを用いて分離することも可能であると予想されるが、本検討では、培養皿上に培地に分散させて静置するだけの単純な方法について検討を行った。具体的には、ヒドロゲルが表面に形成した細胞とそうでない細胞が含まれる細胞群を培養液に分散させた後に、培養皿上で数時間インキュベートして、ヒドロゲルで包括されていない細胞だけが培養皿にくっついて分離できることを確かめた。

4. 研究成果

1)ターゲットとする細胞の表面を起点としたゲル形成

ヒト肝臓がん由来細胞株 HepG2 細胞を培養皿から剥離後、細胞染色赤色蛍光試薬を用いて染色したものと、培養皿から剥離させたマウス胎児線維芽細胞株 10T1/2 細胞を同濃度で混合した後、HRP 標識したヒト CD326 抗体を含む生理食塩水に 30 分間浸した。なお、CD326 は HepG2 細胞表面に存在する細胞表面タンパク質である。洗浄後、1.0%の緑色蛍光標識フェノール性水酸基導入アルギン酸 (Alg-fPh) と 0.1 mM 過酸化水素を含む生理食塩水に 10 分間浸した。洗浄後、蛍光顕微鏡での観察、フローサイトメーターでの計測を行った。その結果、赤色の蛍光を示す HepG2 細胞の表面にだけ、緑色の蛍光を示す Alg-fPh のヒドロゲル皮膜が形成していることが確認された (図 3a-c)。また、フローサイトメーターでの計測からも、HepG2 細胞の表面に選択的にヒドロゲル皮膜が形成していることが確認された (図 3f, g)。

続いてこの方法の汎用性を実証するために、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞 (Huve 細胞、CD31 を発現) と 10T1/2 細胞を混合した細胞群を、HRP 標識抗 CD31 抗体を含む生理食塩

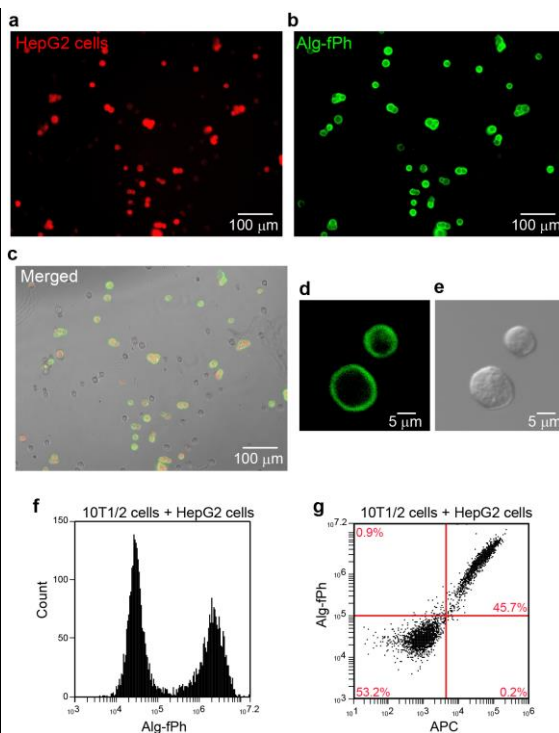


図 3. 抗原抗体反応と HRP 酵素反応を組み合わせることで HepG2 細胞と 10T1/2 細胞の細胞から HepG2 細胞のみを Alg-fPh ゲル皮膜で包括した実験結果。

水に浸した後、フェノール性水酸基導入ゼラチン (Gelatin-Ph) と過酸化水素を溶解した生理食塩水に浸した。その結果、Huve 細胞表面にのみ Gelatin-Ph ゲルの皮膜が形成した。これらの結果から、抗原抗体反応による細胞認識と HRP が触媒するヒドロゲル形成反応を用いることにより、細胞選択的なヒドロゲル内包括に成功したことが示された。

この方法で細胞をヒドロゲル内へ包括することが細胞へ与える影響を調べるために、処理後の細胞の生存率と、皮膜を除去した後の細胞の培養皿上での増殖速度を評価した。その結果、HepG2 細胞の生存率は処理後 30 分で 94%、24 時間後でも 87%と高く、また、ヒドロゲルに皮膜 2 日間および 6 日間包括された状態であった細胞の皮膜除去後の増殖速度は、未処理の細胞とほぼ同じであった。これらの結果より本方法およびヒドロゲル薄膜内への包括は、細胞に対して穏和であることが明らかとなった。

上記の方法では、1 次抗体に HRP を標識したものをしたが、手法としての汎用性が増すためには、1 次抗体で細胞の識別を行い、2 次抗体で HRP の固定化を行える方が望ましい。そこで、HepG2 細胞と 10T1/2 細胞の混合細胞群に対して検討を行ったところ、HRP 標識 1 次抗体のみを使用した場合と同様に、HepG2 細胞の選択的包括ができた。さらに、この方法は、培養皿に接着した状態の細胞に対しても有効であった。

2)細胞表面ゲル皮膜形成制御

ヒドロゲル薄膜の形成を制御するための検討として、HepG2 細胞と HRP 標識 CD326 抗体、Alg-fPh を用いて検討を実施した。HRP

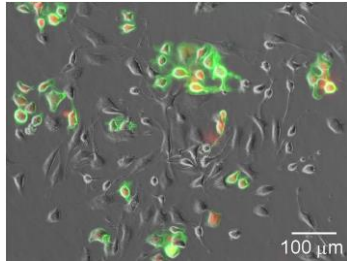


図 4. 培養皿接着 HepG2 細胞 (赤色) と 10T1/2 細胞に対して本研究の方法を適用した結果。

標識 CD326 抗体濃度を 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、この抗体を含む生理食塩水への浸漬時間を 30 分間、Alg-fPh 濃度を 1.0%、この高分子と 0.1 mM 過酸化水素を含む生理食塩水への浸漬時間を 10 分間というのを基本条件として、各因子の値を 1 つずつ変化させたところ、図 5 に示す結果が得られた。CD326 抗体の濃度を高くすると、それにしたがって細胞表面上の Alg-fPh の蛍光強度の増加により示される皮膜形成量も増大した (図 5a)。また、この抗体を含む溶液に浸す時間を 5~30 分で操作すると、浸漬時間の増加に伴い皮膜形成量が増加した (図 5b)。これらの結果は、細胞表面の CD326 抗体の増加、すなわち細胞表面に固定化された HRP の増加によると考えられる。Alg-fPh の濃度および Alg-fPh 溶液の浸漬時間に関しても、それらを増加させることで、皮膜形成量が増加した。これらの結果より、容易に操作可能な抗体濃度、高分子濃度および処理時間を操作することで、形成する皮膜の特性を制御できることが明らかとなった。

3)ゲルで覆われた細胞とそうでない細胞との選別

細胞の元来有する接着性の違いによる影響を排除した検討を実施するために、HRP 標識 CD326 抗体を含む溶液に浸漬した HepG2 細胞とそうでない HepG2 細胞を混ぜた後に、

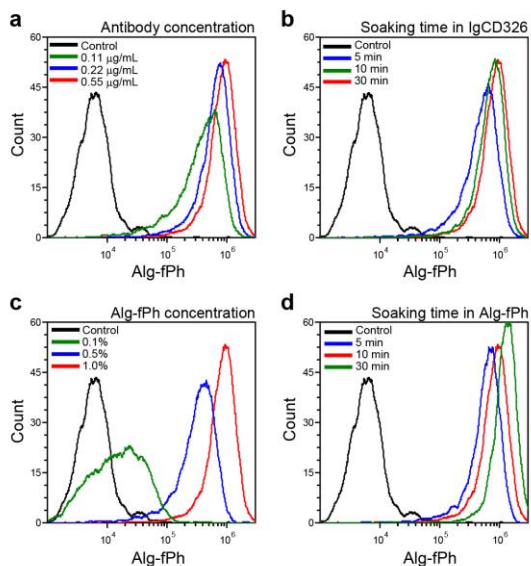


図 5. 抗体濃度、抗体溶液への浸漬時間、高分子濃度および高分子溶液への浸漬時間と皮膜形成量の相関に関する実験結果。

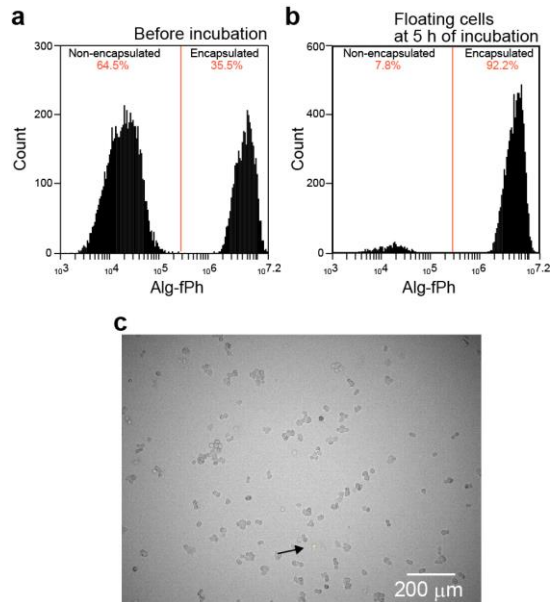


図 6. 表面の Alg-fPh 皮膜の有無による HepG2 細胞の分離に関する実験結果。

Alg-fPh と過酸化水素を含む生理食塩水に浸し、得られた細胞群を細胞培養液に分散させた後、培養皿上に静置した。37 度のインキュベーター内で 5 時間静置したところ、皮膜形成処理後には皮膜のある細胞と無い細胞がそれぞれ 35.5% と 64.5% 含まれていた (図 6a) ものが、インキュベート後には皮膜のある細胞が 92.2% になった。蛍光顕微鏡を用いて、培養皿に接着している細胞を観察したところ、フローサイトメーターの結果と同様に、1% 以下の皮膜形成細胞しか存在しなかった (図 6c, 図中の矢印は皮膜で覆われた細胞)。すなわち、形成した皮膜が物理的に細胞の接着を阻害することおよび、元来細胞が有する接着性を利用することで、極めて簡単な方法で細胞をゲルで覆われた細胞とそうでない細胞を選別できることが明らかとなった。

以上の検討結果より、本研究で開発を目指した細胞選択的なヒドロゲル薄膜内包括法およびそれを用いた細胞の分離法の開発に成功したと言える。この方法は、既存の技術では困難・不可能であったことを可能としたものであり、細胞の機能・分化に関する基礎研究から再生医療や細胞治療などの応用研究分野にまで寄与できる可能性を有していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Shinji Sakai, Yang Liu, Mikako Sengoku, Masahito Taya: Cell-selective encapsulation in hydrogel sheaths via biospecific identification and biochemical cross-linking, 査読有り, *Biomaterials*, **53**, 494-501(2015). DOI: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.119

[学会発表] (計 6 件)

1. 境慎司, 仙石未佳子, 劉楊, 田谷正仁: 細

- 胞選択的ヒドロゲル内包括法の開発, 第 80 回化学工学会年会(芝浦工業大学豊洲キャンパス, 東京都港区), 2015 年 3 月 21 日.
2. Shinji Sakai, Masahito Taya: Individual cell surface coating with a biocompatible thin hydrogel jacket, ICMAT2015 (Suntec Convention Center, Singapore), 2015 年 6 月 8 日.
 3. Shinji Sakai: Individual cell-coating through on-cell surface enzymatic cross-linking, Annual Meeting of the Korean Society for Nanomedicine 2015 (Seoul Medical University, Seoul, Korea), 2015 年 9 月 22 日.
 4. 仙石未佳子, 境慎司, 田谷正仁: 細胞を選択的に包括する高分子架橋薄膜形成法の開発, 第 67 回 日本生物工学会大会(城山ホテル, 鹿児島県鹿児島市), 2015 年 10 月 26 日.
 5. 境慎司, 田谷正仁: ヒドロゲルによる細胞選択的な 1 細胞コーティング技術, 第 67 回 日本生物工学会大会(城山ホテル, 鹿児島県鹿児島市), 2015 年 10 月 26 日.
 6. 境慎司: 1 細胞のヒドロゲル薄膜内包括による細胞識別、分離、制御, BMB2015 (神戸ポートピアホテル, 兵庫県神戸市), 2015 年 12 月 4 日.

[図書] (計 1 件)

1. 境慎司, 田谷正仁: 細胞を選択的に包括する高分子架橋ヒドロゲル薄膜形成法の開発, ケミカルエンジニアリング 60 巻, 6 号, 404-409 (2015), 2015 年 6 月.

[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.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/>

(1)研究代表者

境 慎司 (SAKAI, Shinji)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号: 20359938