

令和元年9月19日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26702017

研究課題名(和文)細胞間接着を導くジッパー状分子の創製と細胞間相互作用の時空間的解析手法の確立

研究課題名(英文)Creation of zipper-like molecules for inducing intercellular adhesion and analysis of intercellular interaction

研究代表者

寺村 裕治(Teramura, Yuji)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：10365421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間相互作用は、発生から免疫反応あるいは癌の転移現象など、ほとんどの生命現象で重要な役割を担う基本現象の一つである。本研究では、両親媒性分子であるポリエチレングリコール結合脂質(PEG脂質)を骨格とするジッパー状分子を合成し、異なる細胞同士を自在に接着させ、様々な生物学的因子を利用して、細胞間相互作用を誘導する材料作製に取り組んだ。従来の二元細胞培養法の知見を生かし、新しいジッパー状分子の創製に成功した。この材料は、新しい分野である「3次元細胞間相互作用」を開拓できるものと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞間相互作用は、発生から免疫反応あるいは癌の転移現象など、ほとんどの生命現象で重要な役割を担う基本現象の一つである。本研究では、両親媒性分子を有するジッパー状分子を合成し細胞表面の修飾剤として利用することで、異なる細胞同士を自在に相互作用させることに取り組んだ。従来の二元細胞培養法の知見を生かし、新しいジッパー状分子の創製に成功した。この新しい材料は、新しい分野である「3次元細胞間相互作用」を開拓できるものと期待でき、再生医療やがん免疫療法などの分野に役立つものとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：Intercellular interaction is fundamental phenomenon which plays an important role in various biological events such as development, immunological reaction, and cancer metastasis. In this project, we synthesized zipper-like molecules based of poly(ethylene glycol)-conjugated lipid, which are amphiphilic polymers, and induced homogeneous and heterogeneous cell-cell attachment, and examined the possibility of inducing the intercellular interaction. And based on the conventional 2-D cell culture methods, we succeeded in the creation of new zipper-like molecules. These molecules are useful for the new research area "3-D intercellular interaction".

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：細胞表面修飾 PEG脂質 ジッパー状分子 細胞間相互作用 細胞融合 DNA

1. 研究開始当初の背景

細胞間相互作用は、ES 細胞や iPS 細胞をはじめとした幹細胞の分化誘導過程や胚の発生過程から癌の転移、細胞性の免疫反応、膵ランゲルハンス島（膵島）からのインスリン分泌などの様々な生体の反応において、重要な役割を担っている。しかしながら、この細胞間相互作用を調べる研究は重要であるものの、解析する手法はいまだ確立されていないのが現状である。培養ディッシュと種々の添加因子の組合せによる従来法の二次元培養法を用いたアプローチでは、生体内での細胞間相互作用を模倣できないことが近年の研究で明らかにされている。生体内では、細胞同士の直接接触による情報交換、また、液性因子が関与する場合でもパラクリンにみられるように細胞の近傍に存在する細胞から分泌された因子により強い影響を受けていることが知られている。つまり、細胞間相互作用は二次元平面上で起きるものではなく、3次元環境の中で時々刻々と進行するものであり、細胞の空間的な制御も必要であると考えられる。

研究代表者である寺村が、これまでに行ってきた試みを紹介する。細胞同士の接着を仲介するジッパー状分子(DNA が結合したポリエチレングリコール結合脂質、DNA-PEG 脂質) を合成し、これを用いて異なる細胞を配列した試みである。それぞれの細胞表面に相補配列の組み合わせである polyA と polyT を有するジッパー状分子を導入する。これらの細胞を混合することで、二種類の細胞を物理的に接着させることができ、交互に配列できることが分かった。この細胞接着手法を、様々な細胞同士の相互作用を引き起こす材料として利用できる可能性があった。例えば、インスリン分泌能を有する膵ランゲルハンス島の細胞凝集体の表面と培養細胞を用意し、polyA と polyT をそれぞれの表面に導入し、両者を混合する。導入された DNA 同士のハイブリダイゼーションにより膵島表面上に細胞が固定され、3 日後には膵島表面に接着していた細胞が伸展・増殖を行ない、固定した細胞による膵島のカプセル化が実現できた。ただ、これは特定の培養細胞でのみ実現できた例であり、他の多くの細胞では成功していない。また、マウス ES 細胞の胚様体と呼ばれる細胞凝集体の表面にフィーダー細胞を同様にして固定化し、細胞間相互作用による ES 細胞の分化誘導を試みた。数日後には神経系への分化誘導の促進が観察されたものの、期待した以上の分化誘導が見られず、細胞同士の相互作用が関与しているのが不明のままであった。

このように、同種のみならず異種細胞同士の物理的な細胞接着は実現できたものの、膵島や胚様体表面と相互作用できる細胞が限定されており、全ての細胞が細胞同士で生物学的に相互作用を引き起こす訳ではないことが示唆されていた。そこで、新しいジッパー状分子を創製し、異種細胞界面で起きる細胞間相互作用を制御し、より詳細に細胞間相互作用を解析・理解できれば、これらの問題点を解決できるものと考えた。

2. 研究の目的

細胞間相互作用は、発生から免疫反応あるいは癌の転移現象など、ほとんどの生命現象で重要な役割を担う基本現象の一つである。本研究では、異種細胞同士間で起きる生物学的な細胞間相互作用を調べる手法の確立が目的である。ここでは、両親媒性分子であるジッパー状分子を合成し、異なる細胞同士を物理的に接着させ、様々な生物学的因子を利用して、選択的に相互作用を誘導する。特に、正常細胞とガン細胞との細胞間相互作用の解析、あるいは膵ランゲルハンス島（膵島）と機能性細胞との相互作用、細胞同士の融合などに取り組むことを目指した。ここで提案するジッパー状分子を用いて、異種細胞を接着させることにより、多岐にわたる研究分野に大きなインパクトを与えることが期待できる。従来の細胞培養ディッシュ上で行われてきた知見を生かすことができるため、本手法が確立できれば、新しい分野である「3次元細胞間相互作用」を開拓することが可能になる。つまり、異種細胞同士間で生物学的な細胞接着を引き起こすことができるジッパー状分子を開拓し、細胞間相互作用の新しい研究が展開することが期待できる。

3. 研究の方法

ポリエチレングリコール結合脂質（PEG 脂質）を基本骨格とした材料を、ジッパー状分子として使用し、PEG 鎖末端に接着分子を結合させて細胞表面修飾に利用した。ここでは、接着分子（相補配列の DNA あるいは機能性のオリゴペプチド）が導入されたジッパー状分子の分子設計を行い、細胞間相互作用を阻害せず、誘導できる分子構造を探索した。ここでは、

- (1) 正常細胞とガン細胞との細胞間相互作用の解析
- (2) 膵ランゲルハンス島（膵島）と機能性細胞との相互作用の解析
- (3) 膜融合を目指した膜透過性ペプチドのジッパー状分子の開発を行なった。

4. 研究成果

- (1) 正常細胞とガン細胞との細胞間相互作用の解析

ここでは、細胞同士の相互作用を調べるために、正常細胞とガン細胞に着目し、その細胞間相

相互作用を調べた。ジッパー状分子として、ssDNA-PEG脂質を用い、polyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質を用意する。まず、このジッパー状分子による細胞接着を詳細に調べた。ssDNA鎖の末端に赤色と緑色で蛍光標識したpolyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質を用意する。これらのPEG脂質で細胞をそれぞれ処理した後、2つの細胞を混合し、直ちに共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞同士が接着する直前、つまり2種類の細胞を混合した直後では、細胞膜がそれぞれ赤色と緑色蛍光で均一に標識されている。その後、細胞同士の接着に伴い、その接着界面において黄色の蛍光が観察された(図1(a))。つまり、polyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質が細胞同士の接着界面に自発的に集合する現象が見られた。さらに1時間後に細胞を観察したところ、接着界面にのみ黄色の蛍光が観察され、他の細胞膜部分には赤色蛍光と緑色蛍光は観察されなかった。つまり、細胞膜に導入されたpolyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質のほとんどが、細胞同士の接着反応に使われていた。次に、蛍光標識のないpolyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質を用いて、細胞同士の接着反応を調べた。ここでは、DNAに対するminor groove binderである4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた。DAPIはssDNAとの反応は起こらないため、二重らせん構造と反応した場合にのみ蛍光を発する。polyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質により細胞同士を接着させた後、DAPIを添加すると、その接着界面にのみDAPI由来の蛍光が観察された。つまり、polyA20とpolyT20より形成されたDNAの二重らせん構造が細胞同士の接着界面に存在していることを示している。また、この細胞同士の接着反応は、細胞表面に導入されたssDNAの導入量に大きく依存する(図1(b))。ここでは、細胞膜上のPEG脂質の導入量を一定にするために、末端がメトキシ基のPEG脂質とssDNA-PEG脂質を混合し、細胞表面にssDNAを導入する。これは、導入量によりPEG鎖のコンフォーメーションが変化して、細胞膜上でのssDNAの配置が変化することを懸念したためである。ssDNAの導入量が小さい場合には、細胞同士の接着状態は非常に弱く、小さい接着面で2つの細胞は接着している。しかしながら、ssDNAの導入量が大きくなると、細胞同士の接着面は増大する。このことは、細胞表面に存在するssDNA量が細胞接着を支配する因子であること示す。また、興味深いことは、ssDNAの導入量を大きくした場合でも、細胞融合が起きないことであった。ssDNAによりリポソームを接着させた場合には、リポソーム同士の融合が起きることが知られている。このことは、細胞膜には多くの膜タンパク質が発現しており、細胞膜が直接接合して、脂質分子の交換反応が起きないためと考えられた。細胞融合を引き起こすためには、さらなる工夫が必要である。

興味深いことに、細胞接着後の細胞間相互作用は、細胞の種類によって大きく異なる。浮遊系の細胞同士を接着させた場合には、細胞間の相互作用は見られないため、6時間経過した後も、接着状態を保持したままである。他方、ガン化した上皮系細胞(MCF7、赤色)と正常の上皮細胞(MCF10A、緑色)を、DNA結合PEG脂質を用いて接着させると、ガン化細胞が正常細胞を取り込む現象が観察できる(図2)。これは、血管内を移動しているガン細胞が上皮系細胞へ転移している現象を示唆するものであり、申請者が異なる細胞同士を接着させて、初めて明らかにした現象である。このように、異種細胞同士の接着挙動を時空間的に解析できることは、本研究の大きな特色である。細胞同士の接着界面に存在しているジッパー状分子が、細胞同士の相互作用に影響を与えることが懸念されたが、DAPIによる蛍光染色より、ジッパー状分子は、細胞内へ取り込まれず、細胞外へ排出されることが分かった。従って、細胞間のレセプター同士の相互作用を阻害する可能性は低いものと考察された。

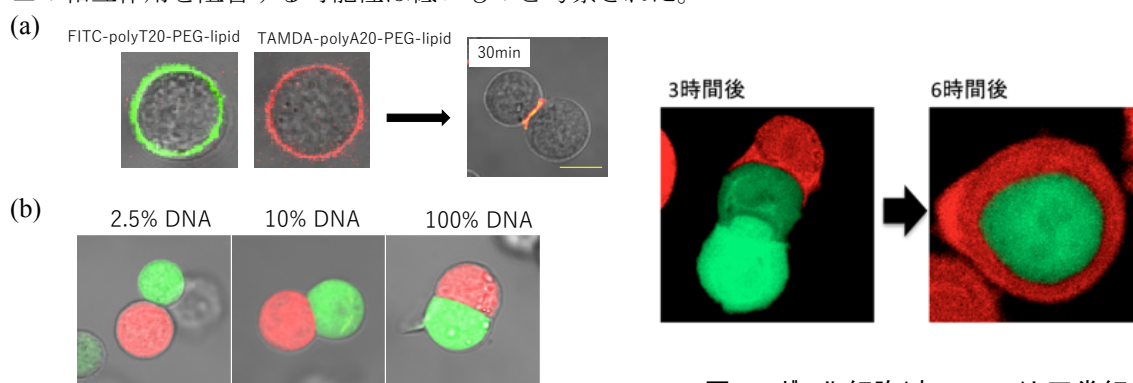


図1 ssDNA-PEG脂質による細胞接着

図2 ガン化細胞(赤, MCF7)と正常細胞(緑, MCF10A)との細胞間相互作用

(2) 臍ランゲルハンス島(臍島)と機能性細胞との相互作用

これまでの研究から、polyA20-PEG脂質とpolyT20-PEG脂質などのジッパー状分子により臍島表面に異種細胞を物理的に固定化することは可能であり、さらに、特定の培養細胞(HEK293)ではあるが、固定化した細胞が臍島表面で接着、伸展し、増殖することで、臍島表面を被覆することが可能になる。HEK293細胞では臍島表面を被覆できたものの、他の細胞では、物理的に固定化することは可能であるものの、培養するにつれ、細胞は接着・伸展せず、臍島表面か

ら脱落することが分かっている。ここでは、固定した細胞に対して生物学的な刺激を入れることで、臍島表面上で細胞接着を誘導することを試みた。臍島表面に、RGD やカドヘリン結合ペプチドもあらかじめ共に固定し、細胞接着を誘導することで臍島表面に伸展させ、生物学的に接着させる試みである。RGD、カドヘリン結合ペプチドなどの固定化は、PEG 脂質を利用することで、臍島表面に容易に導入できる。まず、分かったことは、RGD やカドヘリン結合ペプチドの固定化を臍島表面に固定しただけでは、細胞を臍島表面上に固定化することは不可能であった。これは、細胞のインテグリンと RGD・カドヘリン結合ペプチドとの相互作用が遅く、細胞同士の相互作用を実現するまでに、臍島表面から剥離してしまうためと考えられた。そこで、polyA20-PEG 脂質と polyT20-PEG 脂質のジッパー状分子を共修飾したところ、臍島表面上に、細胞を固定することができ、さらに RGD やカドヘリン結合ペプチドも同時に固定化することに成功した (図 3)。このジッパー状分子の組み合わせを用いて、臍島表面に異種細胞である血管内皮細胞、線維芽細胞などの様々細胞との 3 次元複合化に成功した。蛍光標識した細胞を用いて観察したところ、RGD を固定化した場合では、臍島表面に固定化された細胞は臍島内部へ移動している様子が観察された。RGD を固定化しない場合とは大きく異なる現象であり、固定化された細胞への細胞接着シグナルの影響が示唆された。このように、人工的に導入した分子を利用して細胞間相互作用を誘導することで、細胞の接着を引き起こすことに成功した。

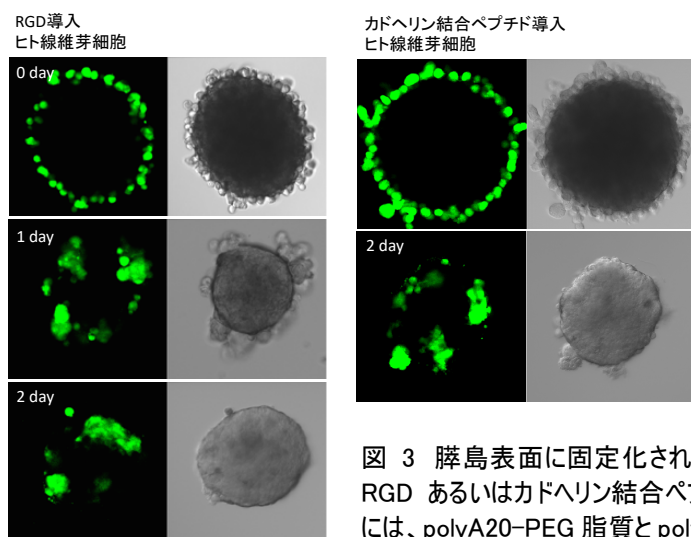


図 3 臍島表面に固定化された細胞の挙動解析。臍島表面には、RGD あるいはカドヘリン結合ペプチドを導入。細胞と臍島の細胞接着には、polyA20-PEG 脂質と polyT20-PEG 脂質を利用した。

(3) 膜融合を目指した膜透過性ペプチドのジッパー状分子の開発

次に、細胞同士の融合を引き起こすことを目指して、膜透過ペプチド (CPP) の利用を思い付いた。CPP を有するジッパー状分子で細胞表面を修飾することで、細胞膜同士が容易に相互作用しやすくなることを期待したためである。ここで使用した CPP は、Tat や R8 など既に報告されているものである。また、コントロールのペプチドとして、RGD や RDG、REDV ペプチドを結合させた。短鎖ペプチドの N 末端あるいは C 末端にはシステインを導入し、PEG 鎖の末端がマレイミド基を有する PEG 脂質に結合させた。ここで使用した PEG 鎖の分子量は、1, 5, 20, 40kDa である。まず、浮遊系細胞である CCRF-CEM 同士の細胞融合を試みようとして、Tat-PEG 脂質で細胞を表面修飾して観察した。いずれの分子量の Tat-PEG 脂質を用いた場合も、細胞同士の融合は見られず、また細胞—細胞同士の相互作用も見られなかった。ただ、興味深いことに、分子量が 20, 40kDa の Tat-PEG 脂質で修飾した浮遊系細胞の CCRF-CEM が、基板へ接着する現象が観察された。当初の目的である細胞融合は引き起こさなかったものの、Tat-PEG 脂質による細胞接着の誘導が見られたため、この新規物質について、詳細に調べることにした。まず、処理した細胞を、組織培養用ポリスチレンプレート (TCPS) と未処理のスライドガラス上に播種し、顕微鏡にて観察した。Tat (FITC 標識) を CCRF-CEM へ添加すると、膜透過性ペプチドであるため、細胞内部へ拡散する様子が見られ、時間の経過と共に、細胞外へ拡散して細胞内部から完全に消失する。一方、Tat-PEG 脂質 (FITC 標識 Tat) を用いると、細胞膜部分にのみ蛍光が見られ、Tat ペプチドが PEG 脂質により細胞膜上に導入されていることが分かる。この現象は、PEG 鎖の分子量 5k と 40k の場合において同様に見られ、反応直後では大きな違いが見られなかった。しかしながら、時間の経過とともに、細胞の挙動は大きく異なった。分子量 5k の Tat-PEG 脂質 (5k) で処理した CCRF-CEM では、細胞同士の凝集がわずかに見られたものの、多くの細胞では浮遊状態を維持していた。他方、分子量 40k の Tat-PEG 脂質 (40k) で処理した場合には、細胞が大きく伸展しながら、基板上へ強く接着した。この接着現象を詳細に調べるために、PEG 鎖分子量の異なる Tat-PEG 脂質 (1k, 5k, 20k, 40kDa) を用意し、細胞接着挙動の比較を

行った(図4)。PEG鎖分子量1kと5kの場合では、細胞の浮遊状態が維持されており、細胞が接着することは無かった。他方、分子量20kと40kでは細胞の接着が見られ、いずれの場合においても、細胞の伸展に伴う強い細胞接着が観察された。PEG鎖分子量を5kから20kへと増大させることで、細胞接着が引き起こされたことが分かる。また、このTat-PEG脂質による細胞接着は、ヒト赤血球、初代T細胞、B細胞でも同様に観察された現象であった。

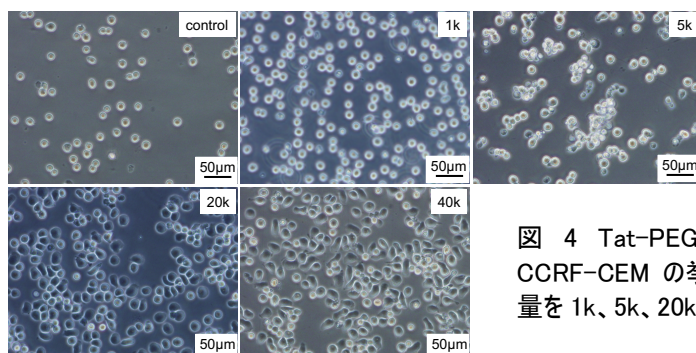


図4 Tat-PEG脂質で表面を処理したCCRF-CEMの挙動。ここでは、PEG鎖の分子量を1k、5k、20k、40kと変化させた。

次に、Tatペプチド以外のペプチドをPEG鎖末端へ結合させて、同様の実験を行った(図5)。コントロールのペプチドであるRGDやRDG、REDVなどでは、PEG鎖の分子量に依らず細胞接着はみられない。また、R4やGPIペプチドはカチオン性ペプチドであるにもかかわらず、PEG鎖分子量20kと40kを用いた場合でも、予想に反して細胞が接着することは無かった。他方、興味深いことは、他のCPPであるK8、R12、R16、HIV-1 Rev、HTLV-II RexペプチドをPEG鎖分子量20kと40kのPEG脂質に結合させた場合には、CCRF-CEMの接着が認められたことである。これらのペプチドはカチオン性であり、細胞膜透過性CPPに分類される。このことから、カチオン性と膜透過性を有するCPPを利用した場合にのみ、細胞の接着が引き起こされることが示された。PEG脂質末端に固定化されたCPPは、その特性から細胞膜をシャトルの様に自由に透過していることが推察される。つまり、カチオン性ではあるものの、細胞膜との相互作用はほとんどなく、細胞膜上でフリーに存在していることになる。ただ、負電荷のガラスやプラスチック表面に接触すると、CPPが基板表面と静電相互作用して、CPPが細胞と基板との界面に固定される。ここで、CPPと基板表面との静電相互作用は不可逆であり、また、多点で相互作用するために強い細胞接着が起きたものと考えられた。接着した細胞が大きく伸展していた理由は、時間の経過と共にCPPと基板との相互作用が増加したために、細胞と基板との接着界面が増加したものと推察される。また、PEG鎖によるスペーサー効果は重要であり、分子量20k以上のPEG脂質にCPPを結合することで、周囲を取り囲む膜タンパク質よりも高い位置へCPPを配置できたために、基板表面と静電相互作用ができた。一方で、膜透過性が無く、カチオン性であるR4やGPIペプチドでは、細胞接着が引き起こされなかった。この理由については、R4やGPIペプチド自体が負電荷の細胞膜と強い相互作用したことが原因と考えられる。細胞膜へ導入されたR4やGPIペプチドでは細胞膜との強い結合により固定され、フリーな状態でペプチドが存在せず、基板表面との静電相互作用が起こらない。そのために、細胞接着が見られなかったものと考察された。ここで示した結果は、TCPSとガラス表面の結果であるが、酸素プラズマ処理を施さないポリスチレンディッシュ上でも、細胞の接着が誘導できることは確認している。

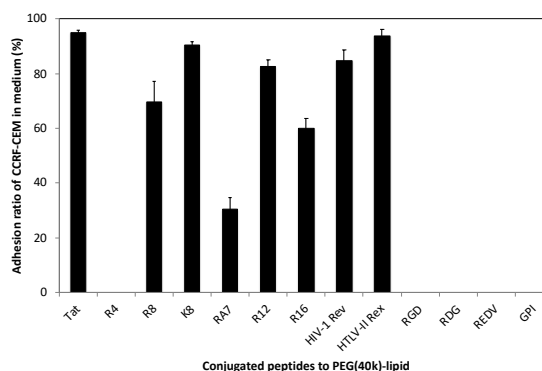


図5 様々なペプチドを結合させたPEG脂質で表面を処理したCCRF-CEMの接着率。膜透過性の無いカチオン性ペプチドであるR4とGPIペプチドも利用した。

このように、ジッパー状分子の探索から、新しい細胞表面修飾剤の発見に繋がり、今後新しい展開が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Yuji Teramura, "Cell surface modification with ssDNA-PEG-lipid for analysing intercellular interactions between different cells" *Biomaterials*, **48**, 119-128 (2015).
2. Toshihiro Yamamoto, Yuji Teramura, Toru Itagaki, Yusuke Arima and Hiroo Iwata, "Interaction of poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipids with supported lipid membranes and their influence on protein adsorption" *Sci Technol Adv Mater*, **17**, 677-684 (2016).

3. Yuji Teramura, Kohei Kuroyama, Madoka Takai, “Influence of molecular weight of PEG chain on interaction between streptavidin and biotin-PEG-conjugated phospholipids studied with QCM-D” *Acta Biomaterialia*, **30**, 135-143 (2016)
4. Ryuichi Ohgaki, Yuji Teramura, Daichi Hayashi, Suguru Okuda, Shushi Nagamori, Madoka Taka and Yoshikatsu Kanai, “Ratiometric fluorescence imaging of cell surface pH by poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugated with fluorescein isothiocyanate” *Sci Rep*, **7**, 17484 (2017).
5. Yuji Teramura, Sana Asif, Kristina Nilsson-Ekdahl, Elisabet Gustafson, Bo Nilsson, “Cell Adhesion Induced Using Surface Modification with Cell-Penetrating Peptide-Conjugated Poly(ethylene glycol)-Lipid: A New Cell Glue for 3D Cell-Based Structures”, *ACS Appl Mater Interfaces*, **11**, 244-254 (2017).
6. Makoto Noiri, Keiichiro Kushiro, Shodai Togo, Ken Sato, Hiroshi Y. Yoshikawa, Madoka Takai and Yuji Teramura, “Influence of cell adhesive molecules attached onto PEG-lipid-modified fluid surfaces on cell adhesion” *Colloid Surface B*, **175**, 375-383 (2018).

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Yuji Teramura, Sana Asif, Kristina Ekdahl, Elisabet Gustafson, Katarina Le Blanc, Bo Nilsson “Heparinization of cell surface with short peptide-conjugated PEG-lipids for regulation of thromboinflammation”, 2nd International Conference on Immune Responses to Biosurfaces: Mechanisms and Therapeutic Interventions, Rhodes, Greece, 2016 年 10 月 29 日
2. 寺村裕治、「高分子による細胞の表面修飾技術を利用して、細胞・臓器移植における免疫反応の制御に挑む」、第 56 回茨城地区活動講演会、日立、2017 年 6 月 16 日
3. Yuji Teramura, “Cell surface engineering for biomedical application” Seminar series in Crossing-Borders, Karolinska Institute, Stockholm Sweden 2018 年 10 月 9 日
4. Yuji Teramura, “Cell surface engineering for attenuating thromboinflammation in cell and organ transplantation”, Stockholm-Tokyo University Partnership, Multidisciplinary collaboration for sustainable development, Workshop on Nano-Biomaterials, 東京大学 2018 年 10 月 30 日
5. 寺村裕治 「臨床で役に立つ医工学研究を目指して -細胞移植と臓器移植を中心に-」10 年後の医用高分子 第 69 回医用高分子研究会 2019 年 3 月 1 日
6. Yuji Teramura “Cell surface engineering using amphiphilic polymers for cell manipulation” Symposium for Crossing Borders in Medical Nanoscience and Biomaterials, Karolinska Institute, Stockholm Sweden 2019 年 3 月 8 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：培養基材への細胞の固定を促進する化合物

発明者：寺村裕治、高井まどか

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2015-205254

出願年：2015 年 10 月 19 日

国内外の別： 国内

名称：細胞融合促進剤

発明者：寺村裕治

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2019-120612

出願年：2019 年 6 月 28 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ：<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/celly/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。