

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810074

研究課題名(和文) 幹細胞の品質モニタリングを目指した酵素/高分子電解質複合体センサーアレイの開発

研究課題名(英文) Development of sensor arrays consisting of polyion complexes between enzymes and polyelectrolytes for markerless and noninvasive evaluation of stem cells

研究代表者

富田 峻介 (Tomita, Shunsuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：50726817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非破壊的かつマーカー分子を必要としない幹細胞評価法の開発を目指し、交差反応性の酵素/高分子電解質複合体ライブラリの開発を試みた。様々な疎水性官能基を導入したカチオン性ブロック共重合体を合成し、アニオン性酵素と複合体化させることで、多様な交差反応性を示す分子ライブラリを作製した。これを用いて細胞を培養した培地を分析することで、異なるヒトがん細胞の識別だけでなく、ヒト間葉系幹細胞の未分化・骨芽分化・脂肪分化の識別が可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We developed a library of polyion complexes between enzymes and polyelectrolytes for markerless and noninvasive evaluation of stem cells. Cationic block copolymers with various hydrophobic groups were first synthesized, and used to construct highly cross-reactive molecular libraries by the formation of complexes with anionic enzymes. Analysis of cell culture supernatants using these libraries allowed not only discrimination of different cancer cell lines but also lineage identification of osteogenic and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.

研究分野：分析化学

キーワード：幹細胞 酵素 高分子電解質 多変量解析 バイオセンサ ポリイオン複合体

1. 研究開始当初の背景

ヒト幹細胞を原材料として細胞加工品を製造し、細胞治療や再生医療に応用しようとする試みが、世界規模で推進されている。ところが、幹細胞は、培養条件が僅かに変化するだけでも、分化能や増殖能の低下・がん化が起こる性質をもつため、その実現が困難になっている。したがって、高品質な幹細胞製品の安定供給を実現するためには、培養細胞を継続的にモニタリングして、細胞が未分化状態を維持しているか、正しく分化しているかといった点を管理することが極めて重要である。マーカー分子(タンパク質や多糖、RNA など)の抽出あるいは染色を利用する従来の細胞評価法は、有効なマーカー分子の同定やプローブ開発が困難であることに加え、評価の際に細胞にダメージを与えるために、評価後の細胞の使用が困難であるという問題がある。そのため、非破壊的かつ継続的なモニタリングが可能な細胞品質評価法を開発するためには、マーカー分子に頼る従来法とは全く異なる視点が必要になる。

我々は、これまでに酵素と高分子電解質間で形成した交差反応性ポリイオン複合体(PIC)ライブラリを利用するタンパク質センサアレイを開発してきた。本手法は、タンパク質に対して特異的に結合する抗体のような分子を用いる従来のタンパク質検出法とは異なり、ライブラリとタンパク質間の交差反応的な相互作用を介して得られる応答パターンを利用する。このパターンを予め準備しておいたデータベースと照合することで、タンパク質を判別するというアプローチである(図1)。もし細胞が培地中に分泌するタンパク質群の情報を応答パターンとして獲得することができれば、マーカー分子に頼らず、非破壊的に幹細胞評価を実現できるのではないかと考えた。

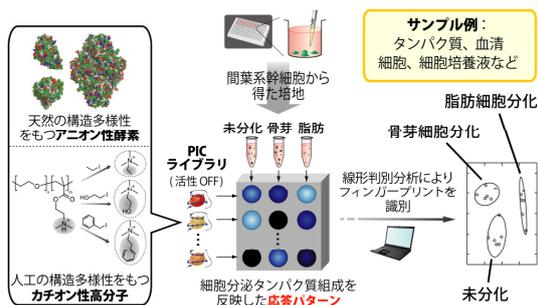


図1. 交差反応性PICライブラリを用いるタンパク質センサアレイの模式図。

2. 研究の目的

本研究では、細胞治療や再生医療の実現を強く支援する、幹細胞品質評価用のセンサアレイの開発を行う。具体的には、交差反応性のより高いPICライブラリの作製法を開発し、これを細胞を培養した培養液(馴らし培地)の判別に応用する。そして、ヒト間葉系幹細胞の分化誘導をモデルとした細胞品質評価

法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ポリエチレングリコール(PEG)/カチオン性高分子電解質のブロック共重合体に対して疎水性の異なる様々な官能基を修飾することで、タンパク質に対して多様な交差反応性を有した新規高分子化合物を合成し、PICライブラリの拡充を行った。作製したライブラリは、ヒト血漿タンパク質や異なる哺乳類由来のアルブミンホモログを用いて評価した。(2) ヒトがん細胞や分化誘導処理をしたヒト脂肪由来間葉系幹細胞をCD-CHO培地中で一定時間培養したあと、培地を回収した。合成したブロック共重合体を様々な性質のアニオン性酵素と混合し、新たなPICライブラリを作製し、得られた馴らし培地の判別を試みた。

4. 研究成果

(1) 人工の構造多様性を導入した高分子電解質を利用する交差反応性PICライブラリの開発

精度の高い交差反応型タンパク質センシングを実現するために重要なことは、ライブラリの多様性である。本研究に先立って、多様な交差反応性を有するPICライブラリを作るために、酵素がもつ天然の構造多様性に注目し、1種類のカチオン性ブロック共重合体と数種類のアニオン性酵素を使用したPICライブラリを構築した。酵素はPICを形成することで、一時的に触媒活性がOFFになる。調製したライブラリを分析対象であるタンパク質と混合すると、各タンパク質とPIC間で相互作用が起こり、その強弱を反映した酵素活性回復量の応答パターンが得られる。この応答パターンを線形判別分析法により解析した結果、100%の精度で7種類の血漿タンパク質を識別できることを見出した(Chem. Commun., 2013)。

本アプローチを、サンプル間の差異が小さく、より複雑な組成である馴らし培地に適用するためには、ライブラリとしてのPICの多様性をさらに拡張する必要があった。そこで本研究では、酵素のカウンターパートであるカチオン性ブロック共重合体に多様性を付与することを試みた(図2A)。Poly(*N,N*-dimethylaminoethylmethacrylate)(PAMA)ユニットの長さの異なるPEG-*b*-PAMAのほか、PAMAの3級アミンに対し様々な疎水性官能基をもつハロゲン化アルキルを修飾することで4級化したPEG-*b*-QPAMAの計5種類のブロック共重合体を準備した。得られたブロック共重合体を、アニオン性の麴菌由来βガラクトシダーゼ(GAO)と複合体化することで新規交差反応性PICライブラリを調製した。これを用いることで、ヒト血漿タンパク質5種類(アルブミン、イムノグロブリン、α₁-アンチトリプシン、トランスフェリン、フィブリノーゲン)の識別だけでなく、配列

の70%が同一のアルブミンホモログ4種類(ヒト、ウマ、ウサギ、ウシ)でも96%の精度で識別できることが見出された(図2B)(*Analyst*, 2014)。

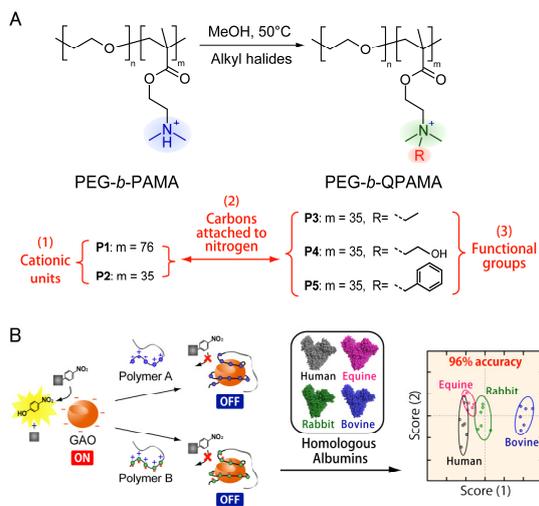


図2. (A) 合成したブロック共重合体、B) 構築したPICセンサアレイによるアルブミンホモログの判別。

(2) 交差反応性PICライブラリを利用する馴らし培地の識別

次に、合成したブロック共重合体を、異なる性質のアニオン性酵素(麴菌由来βガラクトシダーゼ(GAO)、大腸菌由来βガラクトシダーゼ(GEC)、麴菌由来リパーゼ(LAN))と混合して、新たな交差反応性PICライブラリを作製し、馴らし培地の判別を試みた。まず由来の異なる3種類のヒトがん細胞(A549:肺がん, MG63:骨肉腫, HuH7:肝臓がん)の識別を検討した(図3A)。細胞に触れていない培地の場合は、酵素活性はほとんど変化しなかったが、馴らし培地の場合はいずれのがん細胞でも酵素活性が回復し、そのパターンは各がん細胞に特徴的であった。構築した6種類のPICのうち、3種類を用いて得られた応答パターンを、線形判別分析により解析したところ、100%の精度で判別が可能であった。

異なる種類のがん細胞を用いた原理実証に成功したので、続いて、幹細胞の分化系譜の同定を試みた。モデル細胞として、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)を選定した。ADSCを21日間、骨芽および脂肪細胞に分化誘導をしたあとに、培地を交換して、馴らし培地を調製した。この馴らし培地を同様の方法で分析したところ、未分化・骨芽分化・脂肪分化を識別できるということが明らかになった(*Chem. Sci.*, 2015)。

本研究で開発した手法は、マーカー分子を必要としないうえに、馴らし培地をサンプルとするため、細胞にダメージを与えることなく細胞状態を評価できる。したがって、本手法は、従来のエンドポイント的な細胞評価法が抱える様々な問題をクリア可能であると

考えられる。本研究で開発した交差反応性PICライブラリは、血清中のプロテオームの識別にも応用可能であることを見出しており(*Anal. Sci.*, 2016)、複雑な組成のタンパク質溶液に広く適用できる可能性も示唆されている。さらに、酵素に対して多様な性質の酸無水物を修飾して、分析のその場で簡易にライブラリを作製する方法を検討したところ、タンパク質のほか、哺乳類血清や細胞の識別が可能なのも見出しており、本アプローチを推進することで幹細胞品質評価のさらなる応用範囲の拡大が期待できる。また、本研究を通して得られたタンパク質/高分子電解質複合体に関する知見は総説としても発表した(*Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2016, *Curr. Med. Chem.*, 2016)。

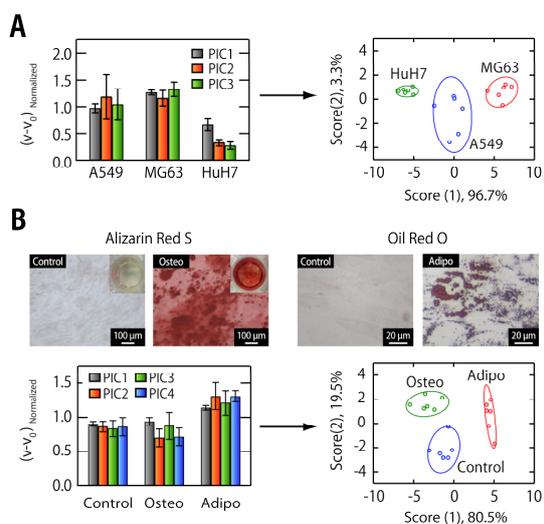


図3. (A) ヒトがん細胞の種類判別。(B) ヒト間葉系幹細胞を分化誘導した後の染色像とPICセンサアレイによる分化系譜の同定。

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8件)

(1) Kentaro Shiraki, Takaaki Kurinomaru, Shunsuke Tomita, Wrap-and-Strip technology of protein-polyelectrolyte complex for biomedical application, *Current Medicinal Chemistry*, 23, 276-289 (2016). (査読有)

(2) Kentaro Shiraki, Shunsuke Tomita, Naoto Inoue, Small amine molecules: Solvent design toward facile improvement of protein stability against aggregation and inactivation, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17, 116-125 (2016). (査読有)

(3) Shunsuke Tomita, Saki Yokoyama, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Keitaro Yoshimoto, The use of an enzyme-based sensor array to

fingerprint proteomic signatures of sera from different mammalian species, *Analytical Sciences*, 32, 237-240 (2016). (査読有)

(4) 富田 峻介、吉本 敬太郎、セクレトームフィンガーパターン分析を実現するバイオマテリアル設計、*バイオマテリアル—生体材料—*, 34, 46-49 (2016). (査読有)

(5) Shunsuke Tomita, Miho Sakao, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Keitaro Yoshimoto, A Polyion Complex Sensor Array for Markerless and Noninvasive Identification of Differentiated Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue, *Chemical Science*, 6, 5831-5836 (2015). (査読有)

(6) 富田 峻介、吉本 敬太郎、交差反応型センサアレイを用いるクルードなタンパク質溶液の評価、*生物工学会誌*, 93, 285-288 (2015). (査読有)

(7) Shunsuke Tomita, Tomohiro Soejima, Kentaro Shiraki, Keitaro Yoshimoto, Enzymatic fingerprinting of structurally similar homologous proteins using polyion complex library constructed by tuning PEGylated polyamine functionalities, *Analyt.*, 139, 6100-6103 (2014). (査読有)

(8) Toru Nakayama, Taro Sakuraba, Shunsuke Tomita, Akira Kaneko, Eisuke Takai, Kentaro Shiraki, Kentaro Tashiro, Noriyuki Ishii, Yuri Hasegawa, Yoichi Yamada, Reiji Kumai, Yohei Yamamoto, Charge - Separated Fmoc - Peptide β - Sheets: Sequence - Secondary Structure Relationship for Arranging Charged Side Chains on Both Sides, *Asian Journal of Organic Chemistry*, 3, 1181-1188 (2014). (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

(1) Shunsuke Tomita, Keitaro Yoshimoto, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Design of polyion complex sensor arrays that fingerprint secretomic signatures of cells for markerless and noninvasive cell identification, Pacificchem2015 (Marriott Waikiki Beach, United States) 2015/12/15-20

(2) Shunsuke Tomita, Osamu Niwa, Ryoji Kurita, Keitaro Yoshimoto, Enzyme-incorporated polyion complexes as novel materials for secretome fingerprinting of differentiated mesenchymal stem cells, 第 25 回日本 MRS 年次大会 (横浜市開港記念会館、神奈川県)

2015/12/8-10

(3) Hitoshi Furusho, Yusuke Iriyama, Norio Tanaka, Xiofei Yuan, Andrew Glidle, Huabing Yin, Akemi Sato, Naoko Aragane, Shinya Kimura, Shunsuke Tomita, Keitaro Yoshimoto, Micro-fluidic Device for Cancer Cell Sorting Based on Surface Enhanced Resonance Raman Scattering using DNA Aptamer Probe, 第 25 回日本 MRS 年次大会 (横浜市開港記念会館、神奈川県) 2015/12/8-10

(4) 富田 峻介、丹羽 修、栗田 僚二、吉本 敬太郎、ポリイオン複合体ライブラリを用いる分化間葉系幹細胞セクレトームのフィンガープリンティング、第 30 回 高分子学会関東支部茨城地区 若手の会交流会 (つくばセミナーハウス、茨城県) 2015/10/29-30

(5) Yuichi Furuhashi, Yuka Kikuchi, Shunsuke Tomita, Keitaro Yoshimoto, Spheroid formation on micro-patterned surface enhances IL-8 and VEGF-A secretion of adipose-derived stem cells, International Science & Nature Congress 2015 (Putra world trade center, Kuala Lumpur, Malaysia) 2015/9/21-23

(6) 富田 峻介、丹羽 修、栗田 僚二、酵素のその場修飾を利用する簡易なポリイオン複合体ライブラリ作製法の開発とアレイ型バイオセンシングへの応用、日本分析化学会第 64 年会 (九州大学伊都キャンパス、福岡県) 2015/9/9-11

(7) Shunsuke Tomita, Osamu Niwa, Ryoji Kurita, Keitaro Yoshimoto, Enzyme-incorporated polyion complexes as novel materials for secretome fingerprinting of differentiated mesenchymal stem cells, International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (ISNM) (WPI-MANA Auditorium, NIMS, Ibaraki-ken) 2015/7/29-30

(8) 富田 峻介、味覚に学ぶバイオ分析：マーカー分子に頼らない生体試料センシングを目指して、平成 27 年度日本分析化学会関東支部若手交流会 (晴海グランドホテル、東京都) 2015/6/26-27

(9) 富田 峻介、横山 沙樹、坂尾 美帆、副島 智大、吉本 敬太郎、ポリイオン複合体ライブラリを用いる味認識を模倣した生体サンプルセンシング、第 29 回高分子学会関東支部茨城地区若手の会交流会 (つくばセミナーハウス、茨城県) 2014/10/30-31

(10) 富田 峻介、横山 沙樹、坂尾 美帆、副島 智大、吉本 敬太郎、味認識を模倣した非特異的センシングによる生体サンプル判別法の開発、日本分析化学会第 63 年会（広島大学東広島キャンパス、広島県）2014/9/17-19

(11) 古旗 祐一、富田 峻介、吉本 敬太郎、三次元化脂肪幹細胞の機能評価：マイクロパターン培養が創傷治療関連遺伝子に及ぼす影響、第 74 回分析科学討論会（日本大学工学部、福島県）2014/5/24-25

〔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

<https://staff.aist.go.jp/s.tomita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 峻介 (TOMITA, Shunsuke)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員
研究者番号：50726817

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし