

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20963

研究課題名(和文) 光活性化PEG脂質を用いた、迅速かつ一細胞単位の多種細胞パターンニング技術の開発

研究課題名(英文) Photo-activatable PEG-Lipid surface for versatile and high-throughput patterning of multi-types of cells at single-cell resolution

研究代表者

山平 真也 (YAMAHIRA, Shinya)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特別研究員

研究者番号：70750652

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)：複数種類の細胞を、種類ごとに望みの位置に配置する技術は、迅速な複数種細胞のアクセスや生体の細胞配置を模した人工組織構築など、次世代の細胞研究において強力なツールとなる。本研究では、そのような多種細胞パターンニングを可能とする分子として、光に応答して細胞を基板上に固定化できる光活性化PEG脂質を開発した。本分子を修飾した表面上では、細胞種ごとに光照射と細胞播種・洗浄を繰り返すことで、どのような細胞でも迅速に一細胞単位で多種細胞パターンニングすることが可能であった。さらに、この表面上で目的の細胞のみを光捕捉することで、血中循環がん細胞といった医療において重要な細胞を捕獲・単離することができた。

研究成果の概要(英文)：The technology of patterning of multi-types of cells has expected as a powerful tool in next-generation cell research. In this study, we developed a photo-activatable PEG-lipid which can immobilize cells by light irradiation, as a molecule that enables multi-patterning of cells. On the surface modified with this molecule, versatile and high-throughput patterning of multi-types of cells were performed by repeating a process of light irradiation, seeding of arbitrary types of cells and washing. Additionally, by light-trapping only the target cells on this surface, it was possible to capture and isolate important cells such as circulating cancer cells from peripheral blood.

研究分野：材料工学

キーワード：PEG脂質 ケージド化合物 多種細胞パターンニング 血中循環がん細胞 光応答性化合物 界面科学

1. 研究開始当初の背景

複数の種類の細胞を、種類ごとに一細胞単位で望みの位置に配置する多種一細胞パターンニング技術は、次世代の細胞研入において重要なツールになると期待されている。多種の細胞が一細胞単位でパターンニングされたチップを用いることにより、多種の細胞における一細胞単位の詳細な細胞画像解析を、ハイスループットに行うことが可能となる。また、多くの種類の細胞を一細胞レベルで生体内と同様に配置することにより、生体内に近い機能を持った組織・臓器の再構築が可能となると考えられている。

これまでに、様々な複数種類の細胞パターンニング技術が研究されているが、これらには主に細胞の自発的な接着性を利用した原理が用いられている。そのため、既存法は接着性を持たない細胞には利用できないという、汎用性に関する問題点があった。さらに、細胞が任意の位置に配置されるには、細胞接着を長時間待つ必要があったため、多種細胞パターン作製のスループット性が課題とされていた。そこで、迅速かつ汎用的に、一細胞単位で複数種細胞をパターンニングできる研究ツールが必要とされている。

2. 研究の目的

PEG脂質¹⁾を修飾した表面は、脂質がアンカーとして細胞膜と相互作用するため、細胞の接着性に依存せず、迅速にどのような細胞でも基板に固定化することができる。本研究では、PEG脂質を骨格とした、照射によって迅速に細胞を固定化できる光活性化PEG脂質を新規合成し、これを用いた迅速かつ一細胞単位の多種細胞パターンニング技術の開発を目的とした。このPEG脂質を修飾した基板には、照射前は細胞が固定化されないが、照射によって細胞を数分以内に固定化できる。したがって、任意の位置への照射と任意の種類の細胞播種・洗浄を繰り返すことで、迅速な多種細胞パターンニングが可能となる(Fig. 1)。

また、光活性化PEG脂質表面の細胞選択技術への応用の可能性も見出し、末梢血からの血中循環ガン細胞^[2,3]の単離も試みた。さらに、光活性化PEG脂質の駆動原理に関する知見を得ることも目的とした。

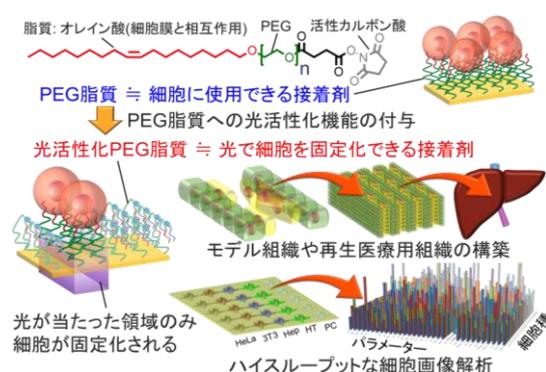


Fig. 1 光活性化PEG脂質を用いた複数種細胞パターンニング技術

3. 研究の方法

(1) 光活性化PEG脂質の開発

光活性化PEG脂質の候補化合物として二種類の化合物を合成した。一つは、PEG脂質に光分解性リンカーとしてメトキシニトロベンジル⁴⁾を介して長鎖のPEGを結合させた化合物(Fig. 2a)であり、もう一つは同様に光分解性リンカーを介してPEG脂質に脂質をもう一本結合させた化合物(Fig. 2a)である。これらのPEG脂質誘導体を修飾した表面上で、照射前後での細胞固定化密度を計測した。まず、基板表面を牛血清アルブミン(BSA)でコーティングし、BSAのリジン残基のアミノ基とPEG脂質の活性カルボン酸との縮合反応によってPEG脂質を修飾した。このPEG脂質修飾基板上に非接着性細胞のマウス proB 細胞株 Ba/F3 細胞を播種し、固定化されていない細胞を洗浄除去した。顕微鏡により観察したところ、長鎖PEGを結合させたPEG脂質の表面では、照射前でも細胞が固定されてしまうことが確認された(Fig. 2b 左)。一方、脂質をもう一本結合させたPEG脂質の表面では、照射前は全く細胞が固定されず、照射後に初めて固定されるようになることが確認された(Fig. 2b 右)。そこで、この脂質をもう一本結合させたPEG脂質を「光活性化PEG脂質」として研究を進めた。

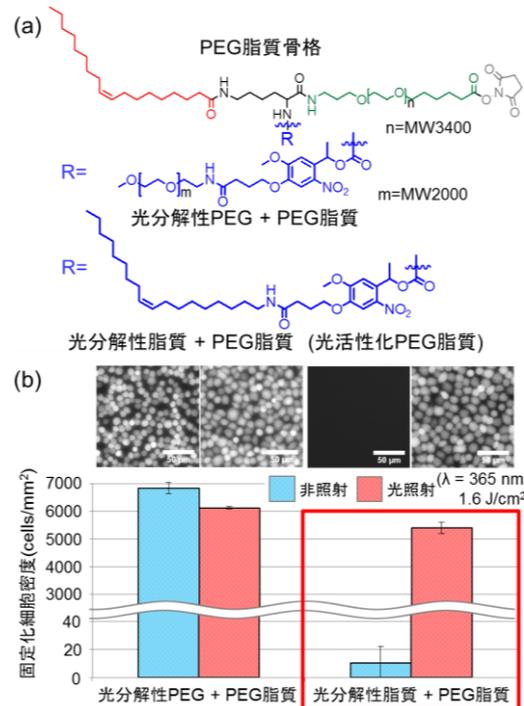


Fig. 2 光活性化PEG脂質の開発

(2) 複数種細胞のパターンニング

光活性化PEG脂質を修飾した表面に光の微細パターンを照射した後、細胞を播種・洗浄することにより、光が当たった表面にのみ細胞が固定され、細胞の微細パターンが作製できると考えた。そこで、光活性化PEG脂質を修飾したコラーゲンコート表面に、一細胞サイズのスポットのアレイ状パターン

($\lambda=365$ nm)を照射した。非接着性の Ba/F3 細胞を播種・洗浄したところ、細胞同士が隣接するほどの高密度で精密な一細胞アレイが構築された(Fig. 3b)。同様の手法によって、接着性のヒト皮膚線維芽細胞(NHDF 細胞)の高密度一細胞アレイ(Fig. 3c)や、細胞と同様に脂質表面を持ったリポソームや量子ドットのパターン(Fig. 3d,e)も作製できた。この時、NHDF 細胞は、接着や伸展といった、通常の培養環境と同様の挙動を示した。さらに、別の領域に光を照射して二種類目の細胞をパターンニングしたところ(Fig. 3a)、接着性細胞と非接着性細胞、リポソームといった異種の細胞や脂質集合体からなる一細胞共パターンが作製できた(Fig. 3f)。デモンストレーションとして、7色に染め分けた Ba/F3 細胞のパターンニングを行ったところ、3 時間以内に7色の一細胞パターンが自在に構築できた(Fig. 3g)。また、光活性化 PEG 脂質表面で接着性細胞を3日間培養したところ、市販の培養ディッシュと同様の生存率や細胞増殖率であり、高い細胞適合性も確認された。

以上のように、当初目的とした、迅速かつ汎用的な複数種一細胞パターンニング技術の開発を達成した。

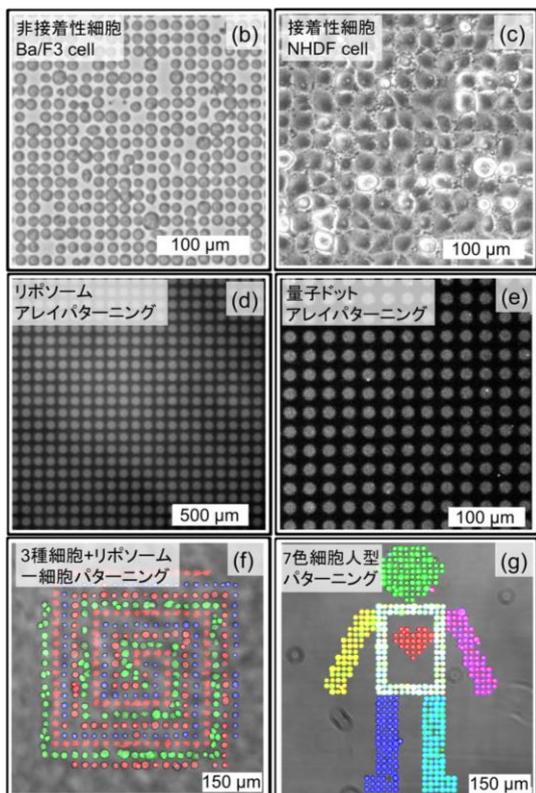
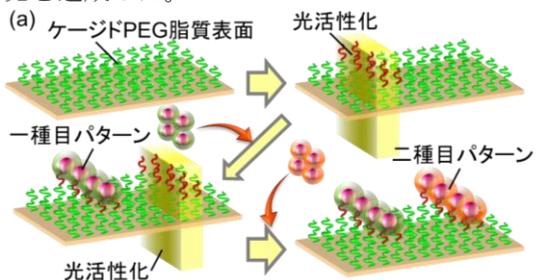


Fig. 3 各種細胞パターンニング

(3) 細胞選択

近年、血管中を循環するガン細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) が新たなガンマーカーとして注目されている。CTC を末梢血中から単離することによって、低侵襲で体内のガン組織の現状把握や、効果的な治療法の検討が可能となると考えられている。そこで、CTC 単離のモデル実験として、担ガンマウス末梢血からのガン細胞の単離を行った。ヒト結腸腺癌 DLD1 細胞を担ガンしたマウスから採取した末梢血に前処理を施し、抗体を用いて CTC を蛍光標識した。光活性化 PEG 脂質を修飾したマイクロ流路にこの検体を導入し、蛍光を指標にして顕微鏡で検出した CTC へのみ光を照射した。数分後に流路内を穏やかに洗浄したところ、光を照射した数個の CTC のみの固定化が確認され、数万以上におよぶその他の細胞からの単離が実現できた(Fig. 4)。

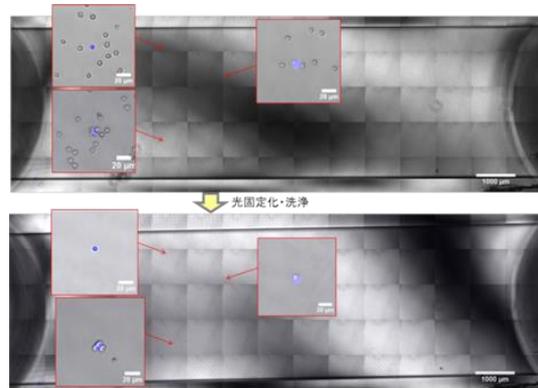


Fig. 4 光活性化 PEG 脂質を用いた CTC の単離

(4) 光活性化 PEG 脂質の構成要素

「(1) 光活性化 PEG 脂質の開発」における実験では、PEG 脂質に PEG ではなく、脂質を結合することにより、細胞の固定化を阻害できることが示された。その阻害メカニズムにおける脂質の必要条件を調べるため、様々な種類の脂質等を PEG 脂質に付加し、その細胞固定化機能に対する影響を調べた。その結果、短鎖脂肪酸では細胞固定を阻害しきれず(Fig. 5 化合物 1,2)、長鎖脂肪酸やコレステロールといった高い疎水性を持つ化合物によって完全に阻害可能であることが解った(Fig. 5 化合物 4~8)。

また、光活性化 PEG 脂質の細胞結合性に関して、細胞への作用環境について検討を行った。光活性化 PEG 脂質を基板表面ではなく、蛍光色素に結合し、溶液中において細胞に作用させた。その結果、光を照射せずとも細胞表面が染色されたため、光活性化 PEG 脂質が光応答性を発揮するためには、基板(固相)表面に修飾されていることが重要であることが解った。

今後、光活性化 PEG 脂質の駆動メカニズムの解明の為に、光活性化 PEG 脂質表面の物理的パラメーターの観点からも研究を進める。

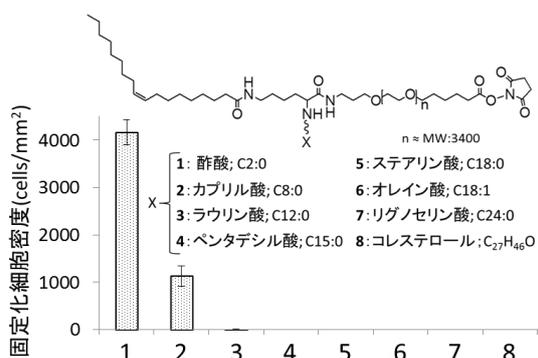


Fig. 5 PEG 脂質へ付加する化合物の、細胞固定化機能への影響

4. 研究成果

本研究では、光活性化 PEG 脂質の合成に成功し、迅速かつ汎用的な一細胞単位の複数種細胞パターンニング技術を開発した。さらに、本分子を修飾した表面において、末梢血から CTC を光単離することも可能であった。

我々が確認している限りでは、この光活性化 PEG 脂質は、PEG 脂質の脂質膜結合機能を光活性化可能とした世界で初めての分子である。本分子は、多種細胞が配置されたハイスループットアッセイ用チップの開発や、生体を精密模倣した再生医療用・モデル研究用組織の作製、さらには細胞選択技術など、広範な分野における応用の可能性を有する。本分子に関する、国際特許出願も行っており、今後企業等との共同研究により社会実装を進める予定である。

また、本来は活性部位となるはずの脂質を余剰に導入することで光活性化が達成された事例は、刺激応答性材料、特にケージド分子⁵研究において新奇であり、本分子の駆動機構解明に関する今後の研究は、貴重な知見をもたらすと期待される。

<引用文献>

- [1] K. Kato, K. Umezawa, M. Miyake, J. Miyake, T. Nagamune, Transfection microarray of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified glass slide. *BioTechniques*. 2004;**37**(3):444-8, 450, 452.
- [2] T. R. Ashworth, A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death, *Australian Medical Journal* 1869;**14**: 146-7.
- [3] G. P. Gupta, J. Massagué, Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006;**127**(4):679-95.
- [4] C. P. Holmes, Model Studies for New o-Nitrobenzyl Photolabile Linkers: Substituent Effects on the Rates of Photochemical Cleavage. *J. Org. Chem.* 1997;**62**(8):2370-80.
- [5] G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods*, 2007;**4**(8):619-28.

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)

1) “Quantitative image cytometry for analyzing intracellular trafficking of G protein-coupled receptors on a chemical-trapping single cell array” Modong Tan, Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune, *Lab Chip*, (2017), in press 【査読有り】

2) “Cell-Based Odorant Sensor Array for Odor Discrimination Based on Insect Odorant Receptors ” Maneerat Termtanasombat, Hidefumi Mitsuno, Nobuo Misawa, Shinya Yamahira, Takeshi Sakurai, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune, Ryohei Kanzaki, *J. Chem. Ecol.*, **42**(7), 716-724. (2016) 【査読有り】

[学会発表] (計 16 件)

1) Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune: 「Patterning of Multi-Types of Cells on Caged Poly(Ethylene Glycol)-Lipid Surface」, Ito Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, ICBS2016, 2016.11.24, 【国際会議】

2) 山平真也, 山口哲志, 長棟輝行: 「ケージド PEG 脂質表面を用いた複数種細胞光配置技術の開発」, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016.11.21, 【国内会議】

3) Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune: 「CAGED POLY(ETHYLENE GLYCOL)-LIPID SURFACE FOR PATTERNING MULTI-TYPES OF CELLS」, Ito Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016.11.16, 【国際会議】

4) Ryuji Misawa, Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune: 「Development of novel light responsive PEG lipid for multiple cell types patterning and cell recovery」, Ito Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016.11.16, 【国際会議】

5) 山平真也: 「光応答性 PEG 脂質を用いた細胞光操作技術」, 東京都 東京ウィメンズプラザ(東京都渋谷区), 特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム第 91 回ワーキンググループ会議, 2016.9.27, 【国内・招待講演】

6) 山平真也, 山口哲志, 長棟輝行:「ケージド PEG 脂質の開発と複数種細胞の光配置技術」, 神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県横浜市), 第 65 回高分子討論会, 2016.9.14, 【国内会議】

7) 山平真也, 山口哲志, 長棟輝行:「PEG 脂質のケージングによる細胞のマルチパターンニング」, 千葉県幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市), 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会, 2016.9.6, 【国内会議】

8) 山口哲志, (山平真也):「1 細胞解析のための光応答性細胞操作ツール」, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市), 日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.27, 【国内・招待講演】

9) 山口哲志, (山平真也):「生命現象の操作と可視化のための刺激応答性分子ツール」, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市), 日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.26, 【国内・招待講演】

10) 山平真也, 山口哲志, 長棟輝行:「Turn on 型 PEG 脂質表面の開発と複数種細胞の光配置技術」, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市), 日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.25, 【国内会議】

11) 三澤龍志, 山平真也, 山口哲志, 長棟輝行:「新規光応答性 PEG 脂質による多種細胞パターンニング及び細胞回収」, 関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市), 化学工学会第 81 年会, 2016.3.13, 【国内会議】

12) 山平真也, 山口哲志, 長棟輝行:「光活性化 PEG 脂質の開発と、複数種細胞の光配置技術」, 関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市), 化学工学会第 81 年会, 2016.3.13, 【国内会議】

13) Modong Tan, Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Motono Nakamura, Teruyuki Nagamune:「Development of the image cytometry method to analyze G-protein coupled receptor kinetics in the cell」, Hawaii, USA, Pacificchem 2015, 2015.12.15, 【国際会議】

14) Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Masahiro Kawahara, Teruyuki Nagamune:「Collagen surfaces modified with photo-cleavable polyethylene glycol-lipid for versatile single-cell array available for both non-adherent and adherent cells」, Hawaii, USA, Pacificchem 2015, 2015.12.15, 【国際会議】

15) 談莫東, 山口哲志, 山平真也, 中村元直, 長棟輝行:「一細胞アレイを用いた pH 応答性 GPCR の細胞内動態解析」, 鹿児島市城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 第 67 回日本生化学会大会, 2015.10.26, 【国内会議】

16) Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Masahiro Kawahara, Teruyuki Nagamune:「Single cell array on photo-cleavable PEG-lipid surface for high-throughput cell imaging analysis」, Chuncheon, Korea, YABEC2015, 2015.10.14, 【国際会議】

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 脂質膜含有物を固定化するための化合物、当該化合物で修飾された基材、及び当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法の提供

発明者: 長棟輝行, 山口哲志, 山平真也

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-070210

出願年月日: 2015 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

名称: 脂質膜含有物を固定化するための化合物、当該化合物で修飾された基材、当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法及び脂質膜含有物を当該基材上で単離する方法

発明者: 長棟輝行, 山口哲志, 山平真也

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/57852

出願年月日: 2016 年 3 月 11 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/nagamune/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山平 真也 (YAMAHIRA, Shinya)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特別研究員

研究者番号: 70750652