

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14490

研究課題名(和文)「呼吸」をトリガーとする革新的1細胞包括技術の開発

研究課題名(英文) Single cell-encapsulation in hydrogels triggered by cellular respiration

研究代表者

境 慎司 (Sakai, Shinji)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞が「呼吸」に伴う副生物として産生する微量の過酸化水素を利用して、高分子とその高分子からのヒドロゲル形成反応を触媒する酵素などを含む1つの溶液に浸すだけで細胞をヒドロゲル被膜で1個ずつ別々に包括できる方法の創出に取り組んだ。その結果、細胞膜に細胞の生存を損なわない方法で刺激を加えて、細胞の呼吸活性を上昇させることにより、最大で系に存在する細胞の98%を、厚さ1マイクロメートル程度のヒドロゲル皮膜で覆うことに成功した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we tried to develop a novel method for enclosing mammalian cells in hydrogel sheath individually. Especially, we focused on the use of cell respiration as a trigger of the enclosing process. It is known that a small amount of reactive oxygen species is produced in respiration. Our idea is a use of the reactive oxygen species for the formation of hydrogel sheath on the individual cell surface. We used a certain biocompatible molecule for enhancing respiration activity. By soaking in the aqueous solution containing enzyme, polymer and the biocompatible molecules, 98% of fibroblast cells were successfully enclosed in a hydrogel sheath of around 1 micrometer in thickness.

研究分野：生物化学工学

キーワード：生体材料 生物化学工学 細胞包括

1. 研究開始当初の背景

ヒドロゲルは、水を大量に含有することから、生体や生体を構成する細胞との親和性が非常に高い。このため、ヒドロゲルを使った再生医療や組織工学に関するさまざまな研究が行われている。その中でも、粒子状のヒドロゲルに細胞を包括する細胞包括ヒドロゲル粒子は、ヒドロゲル部分を免疫隔離膜として利用した、免疫抑制剤非投与下での非自己細胞の移植 (Lohr et al, Lancet 357:1591(2001)) や、ヒドロゲル部分を物理的な保護材として、細胞をせん断力などの外部刺激から保護しながら培養するためのツールとして 1970 年代より検討・実用化が行われてきた (Orive et al, Nat Med 9:104(2003) など)。更に最近では、脂肪幹細胞や iPS 細胞、ES 細胞などさまざまな幹細胞の分化制御ツールとしての有用性も広く知られるようになりつつある (Kim et al, Stem Cell Res 11:978(2013) ; Davidovich et al, Biomaterials 32:4489(2011))。

このような多くの検討が行われてきたヒドロゲルへの動物細胞包括技術に関して、細胞をゲル内へ包括する方法に着目すると、過去 50 年間、ほぼ常識として行われてきたのは、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方法である。研究代表者自身も、過去 20 年近く細胞のヒドロゲル粒子への包括を行ってきたが、やはりその「常識」にもとづいた方法を採用してきた (Biomaterials 22:2827(2001); 23:4177(2002); 26:4786 (2005) 等)。

一方、最近、研究代表者は、過酸化水素を消費して進行する西洋わさび由来ペルオキシダーゼが触媒するフェノール性水酸基間の架橋形成反応を使い、さまざまな特性を有するヒドロゲルを、高分子水溶液から作製して利用する研究を行ってきた (Biomaterials 30:5937(2009); 33:6721(2012); 53:494(2015))。さらに、この西洋わさび由来ペルオキシダーゼによる架橋形成反応を使い、細胞が呼吸の過程で放出する活性酸素を検出することに関する研究も行ってきた (Anal Chem 86:11592(2014))。これらの研究を実施している中で、この 2 つの技術・方法を組み合わせれば、これまでのヒドロゲルへの細胞包括に関する「常識」の範囲外にある、細胞が存在することではじめて進行するゲル化を用いた細胞包括法が創出可能ではないか? と考え、本研究を着想した (図 1)。

なお、細胞を 1 個ずつ別々に高分子/ヒドロゲル薄膜に覆う 1 細胞包括は、ヒドロゲルに包括された細胞の移植部位選択性を広げるなど、従来、細胞包括ヒドロゲル粒子が適用されてきた用途での有用性を向上させるだけでなく、1 細胞レベルでの機能解析、機械的マニピュレーションなど新しい用途での利用が期待されている (Lee et al, Angew Chem Int Ed 53:8056(2014))。一方で、これまでにマイクロ流路のような液滴を形成さ

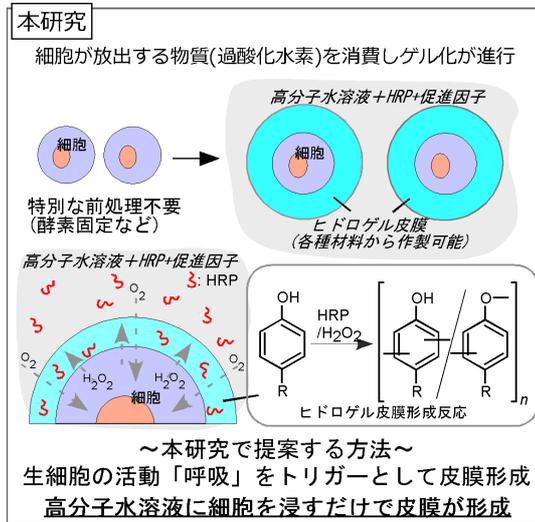


図 1. 本研究で提案した方法 .

せるデバイスを用いず、かつ 1 つの水溶液 (酵素・高分子などを同時に含む) に浸すだけの極めて簡単な操作で 1 細胞包括を実現できる方法はない。よって、本方法の開発に成功すれば、その容易さから多くの研究者が利用することになると期待され、上記の各分野の発展に大きく寄与することにつながるだけでなく、細胞包括ヒドロゲル粒子の新しい用途開拓につながる可能性も高い。

2. 研究の目的

本研究では、細胞が「呼吸」に伴う副生物として産生する微量の過酸化水素を利用し、分子とその高分子からのヒドロゲル形成反応を触媒する酵素などを含む 1 つの溶液に浸すだけで細胞をヒドロゲル皮膜で 1 個ずつ別々に包括できる方法の創出に取り組む。この方法は、既存の方法と比べて極めて容易な操作での 1 細胞包括を可能とするだけでなく、用途に応じて皮膜の特性を制御することも可能とする。これは、1 細胞レベルでの機能解析や分化シグナル付与、1 細胞ごとの機械的マニピュレーション、非自己細胞の血管からの移植等の用途において有用となると期待される。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にまで寄与する革新的な 1 細胞包括技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 簡便な刺激付与による活性酸素産生速度の制御可能性の検討

細胞の呼吸を制御する方法として、脂質に着目した。一方で、一般に脂質は培養液と混ぜにくいいため、細胞に脂質による刺激を効率的に与えるためには、脂質を可溶化する必要がある。そこで、オレイル基にポリエチレングルコール鎖を付与した細胞膜修飾剤 (BAM) を用いて、細胞の活性酸素産生挙動を制御することを試みた。具体的には、まず、緑色蛍光蛋白 (GFP) と BAM を結合させた分子を作製し、この溶液に細胞を浸すことで、

GFP-BAM 濃度と細胞の浸漬時間と細胞表面への GFP-BAM の固定化量の相関を明らかにした。その後、過酸化水素特異的蛍光プローブを細胞内へ取り込ませ、BAM 溶液に浸漬することで、過酸化水素産生速度の変化を測定した。さらに、BAM と結合させる蛋白質（アルブミン (BSA)、オパールブミン、カゼイン) の種類を変えることで、BAM の活性酸素産生誘導性が変化するかを調べた。検討の対象としては、マウス線維芽細胞 (10T1/2 細胞、STO 細胞)、ヒト肝臓がん由来細胞 (HepG2 細胞)、ヒトさい帯静脈内皮細胞 (HUVE 細胞) を使用した。さらに、細胞への影響も調べた。

(2)細胞表面へのヒドロゲル皮膜形成評価

BAM と BSA を結合させた BSA-BAM を細胞に作用させた後、アルギン酸とチラミンを水溶性カルボジイミドを使用して結合させたフェノール性水酸基導入アルギン酸と西洋わさび由来ペルオキシダーゼを含む水溶液に浸した。15~60 分間に洗浄し、フローサイトメーターを用いて皮膜が形成した細胞の割合を測定した。また、西洋わさび由来ペルオキシダーゼと BAM を結合させた HRP-BAM を同様に作用させた後、西洋わさび由来ペルオキシダーゼを含まないフェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液に浸した。ヒドロゲル皮膜の形成の評価には、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターを使用した。

4. 研究成果

(1) 簡便な刺激付与による活性酸素産生速度の制御可能性の検討

マウス線維芽細胞 (10T1/2 細胞) を培養皿から剥離後、15 nM、150 nM、1.5 μ M の GFP-BAM 溶液に 1~15 分間浸した後の、細胞表面の蛍光強度を測定した結果を図 2 に示す (15 nM GFP-BAM 溶液に 1 分間浸した場合の蛍光強度を 1 とした相対蛍光強度)。その結果、浸漬 15 分以内に細胞表面に存在する GFP-BAM 量はほぼ一定値となっていることがわかった。続いて、BSA-BAM 濃度および溶液への浸漬時間を操作した場合の、細胞内活性酸素量を、細胞に蛍光プローブを取り込ませることで測定した。その結果を図 3 に

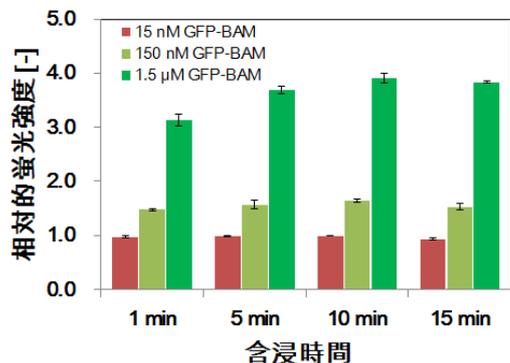


図 2. 濃度の異なる GFP-BAM 溶液への浸漬時間と細胞の蛍光強度。

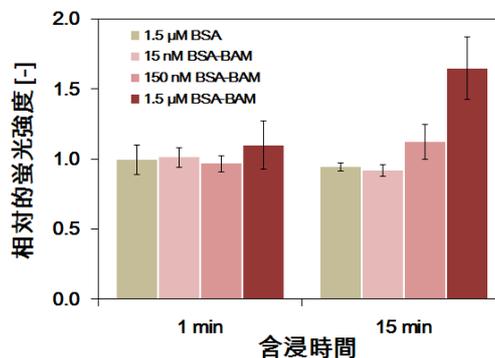


図 3. 濃度の異なる GFP-BAM 溶液への浸漬時間と細胞の活性酸素産生にもとづく蛍光強度。

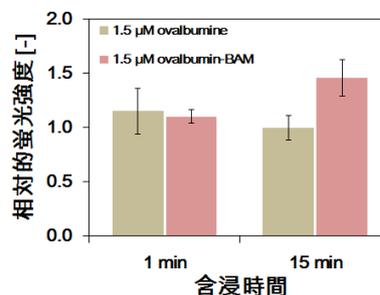
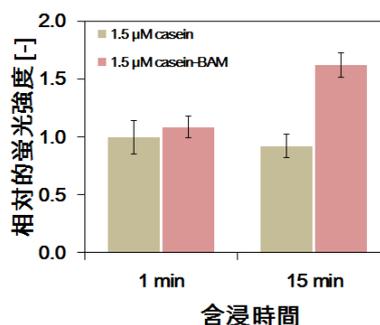


図 4. カゼイン-BAM、オパールブミン-BAM 溶液への浸漬時間と細胞の活性酸素産生にもとづく蛍光強度。

示す。浸漬時間 1 分では、いずれの条件でも細胞の活性酸素産生に差は確認されなかった。一方で、15 分間浸漬した条件では、15 nM と 150 nM の BSA-BAM ではほとんど活性酸素産生に差が見られなかったのに対して、1.5 μ M では 15 nM の場合の約 1.5 倍の蛍光強度を示した。なお、BSA と結合させていない BSA では活性酸素産生速度の向上は確認されなかった。さらに、この活性酸素産生速度の向上は、蛋白質に依存しないことを明らかにするために、カゼインとオパールブミンと結合させた BAM を用いて、活性酸素の産生評価を行ったところ、いずれの場合にも 15 分後には、活性酸素産生の増大に起因する蛍光強度の増大が確認された (図 4)。これらの結果より、脂質成分を細胞膜に接触させることによって、細胞の呼吸活性が増強され、それにより生じる活性酸素産生も増大することが明らかとなった。

細胞周囲へのヒドロゲル皮膜を形成させるにあたって、細胞の生存が阻害されていることは細胞包括技術として意味をなさないこと

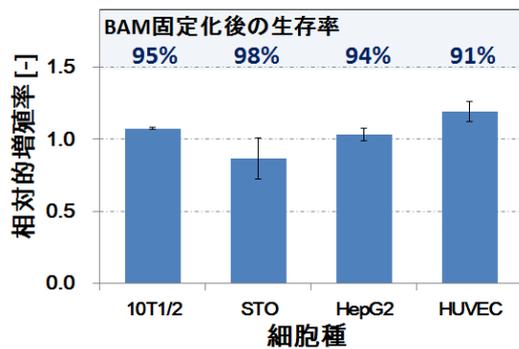


図 5. BSA-BAM 溶液への浸漬後の細胞生存率と正常細胞との増殖率比較。

から、1.5 mM の BSA-BAM 溶液に 60 分間浸漬した後の細胞の生存率を評価した。さらに 1 日以上経過後に顕著になってくる影響を調べるために、正常な細胞と 4 日間の増殖を比較した。その結果、図 5 に示されるように、10T1/2 細胞、STO 細胞、HepG2 細胞、HUVEC 細胞のいずれも BSA-BAM 溶液への浸漬により、生存率が著しく低下することはなく、90% 以上を維持していた。また、正常細胞の値を 1 とした相対増殖率は、正常細胞とほぼ同じ値であり、この結果からも、脂質成分の付与による悪影響は確認できなかった。以上より、オレイル基を含む BAM での処理は、細胞の生存に影響を与えず、活性酸素産生を促進できることが明らかとなった。

(2)細胞表面へのヒドロゲル皮膜形成評価

(1)の検討結果にもとづいて、細胞表面にヒドロゲルを形成させる検討を実施した。1.5 μ M BSA-BAM 溶液に浸した後に、蛍光修飾フェノール性水酸基導入アルギン酸と 1.5 μ M の西洋わさび由来ペルオキシダーゼ溶液に 15 分間浸したところ、BSA-BAM で処理をしなかった細胞の包括率 8% が 20% に上昇した (図 6)。しかし、包括率 100% にはほど遠かったことから、次いで、BSA の代わりに西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を BAM と結合させ、細胞が産生した活性酸素がすぐに高分子の架橋反応に利用できるようにした (図 6)。その結果、包括率は約 70% に向上した。さらに高い包括率を得るために、1.5 μ M の HRP-BAM 溶液に 15 分間浸した細

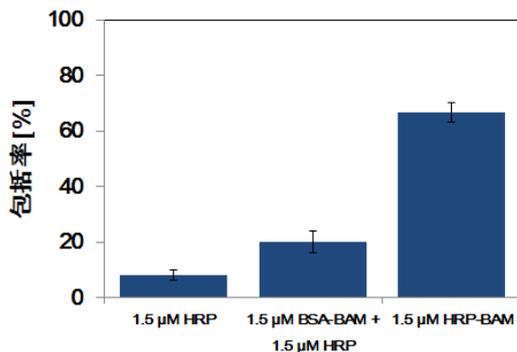
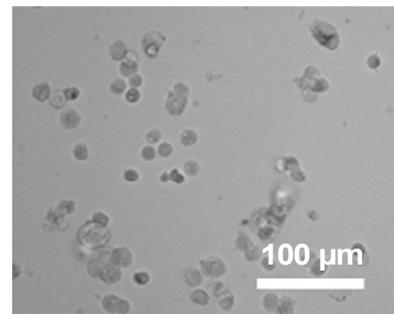
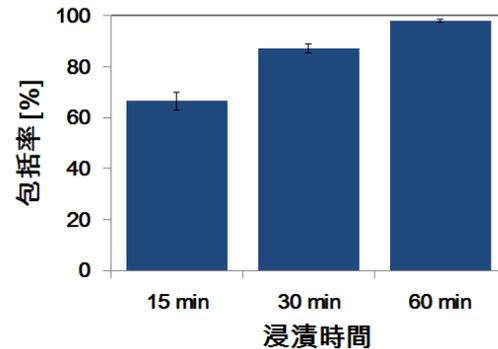
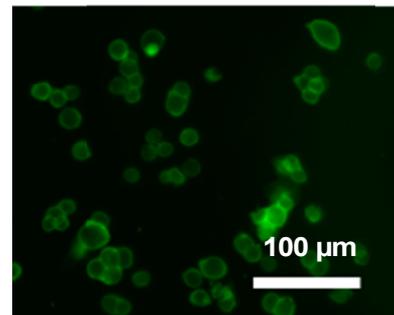


図 6. HRP を含む溶液もしくは HRP-BAM を含む溶液に浸漬した細胞のヒドロゲルへ包括率。

胞を、蛍光修飾フェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液に浸す時間を 60 分まで延長した。その結果、30 分間浸した場合には 87%、60 分間浸した場合には 98% とほぼすべての細胞をアルギン酸ヒドロゲルで覆うことに成功した (図 7)。



明視野撮影：60min 浸漬条件



蛍光撮影：60min 浸漬条件

図 7. 蛍光修飾フェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液への浸漬時間と包括率 (上)、60 分浸漬時の明視野像 (中)、蛍光観察像 (下)

以上の検討結果より、本研究で開発を目指した細胞の呼吸により生成する活性酸素を利用した、新しい細胞包括技術の開発に成功したと言える。この方法は、特別な機器を必要とせず、単に溶液に複数回浸すだけであるという容易さから多くの研究者が利用することになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔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/home.html>

6. 研究組織

(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・教授

研究者番号：20359938