

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22750066

研究課題名（和文） 特定細胞の連続的かつ選択的な分離・回収操作を可能とする機能的培養皿の開発

研究課題名（英文） Development of functional cell array for long-term survival and recovery of tissues

研究代表者 吉本敬太郎

(YOSHIMOTO KEITARO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：60392172

研究成果の概要（和文）：本研究課題に関連する、高効率にビオチン修飾分子を回収するストレプトアビジン磁性粒子の開発、DNA アプタマー表面における細胞接着性の評価、初代肝細胞の細胞塊培養、および癌細胞塊の共培養による評価を行った。

研究成果の概要（英文）：In order to develop the new method for cell recovery, a high-performance magnetic beads for biotinyl-compounds recovery was developed. In addition, assesment of cell attachement on DNA immobilized surface, spheroid culture of primary hepatocytes, and co-culture system of cancer spheroid were demonstrated.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2011年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学、分析化学

キーワード：細胞分離・細胞培養皿・核酸

1. 研究開始当初の背景

細胞研究を行う上で、まず重要なのが研究対象となる細胞の分離・精製である。細胞を精製・分離する手法は、①抗体を固定化したカラムや磁性粒子を用いる分子間相互作用を利用する手法と、②フローサイトメータのような蛍光染色法と物理化学を原理とする手法に大別される。磁性粒子やカラムを用いる手法は、細胞を遠心操作や長時間流速ある溶液環境にさらすため、細胞に大きなストレスを与えてしまい、細胞本来の機能の低下を引き起こすことが知られている。また、プライマリ細胞（初代細胞）のように目的の細胞以外の細胞も混入しており、生体から採取直

後直ちに使用しないとしない場合、長時間の分離操作は適切ではない。一方、フローサイトメータの場合、細胞の蛍光ラベル化が必要不可欠な手法であるため、ラベル化剤による細胞表面のレセプタータンパク質の封鎖や細胞内への蛍光物質の混入などが問題となる。

基材から細胞を剥離する際、ペプシン処理等のタンパク質分解酵素を利用し、基材表面に固定化した抗体の分解反応を利用することで細胞を剥がす操作が一般的である。しかしながら、同処理は細胞表面のタンパク質の損傷を伴うと同時にサンプルへの不必要な抗体の混入も引き起こし、細胞に対して高ス

トレスな分離手段である。したがって、混在物が極めて少なく、細胞に負荷やダメージを与えずに培養した後、培養皿上の特定領域の細胞（例えば分化誘導・遺伝子発現された細胞）のみを回収する機能性培養皿を開発することができれば、再生医療の研究に大きく貢献することができる。細胞を構成する主な主成分はタンパク質であるが、抗体とタンパク質分解酵素を併用することを原理とする従来の細胞分離・回収技術というのは、そもそも原理と期待する機能が矛盾した関係にある。申請者が着目したのは、抗体と同等の分子認識能の可能性を有し、ヌクレオチドを骨格とした分子認識能を有する“核酸”、アプタマーの利用である。核酸を固定化した基材表面を利用することで、下記図に示すような特定細胞の連続的な捕集→回収操作を可能とする培養皿、さらに、細胞に非侵襲な組織回収用基材のプロトタイプの開発が本研究期間内の目標である。

2. 研究の目的

医療分野で ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞の機能が大きな注目を集めている。このような特定細胞の機能を正確に評価するためには、(1)高選択的な細胞分離技術、さらに(2)時空間的な細胞回収技術の開発が重要となる。本研究課題では、従来の抗体固定化基材に大きく依存してきた細胞分離・回収技術から脱却し、本来遺伝子伝搬の役割を担う“核酸”を細胞マニピュレーション用の機能性材料として利用するという新しい着想のもと、高度且つ連続的な分離→培養→回収操作を可能とする機能性細胞培養皿のプロトタイプを開発を目標とする。上述のような細胞操作を可能とする基板として、申請者が独自に既に見出している核酸と機能性合成高分子を共固定した天然/合成高分子ハイブリッド界面を利用し、さらに、親和性の高いアプタマーを短時間で効率良くセレクションする新しい方法論、速度論的キャピラリー電気泳動法による KD-CE-SELEX を確立も並行して行う。

3. 研究の方法

高効率にビオチン修飾分子を回収するストレプトアビジン磁性粒子の開発、DNA アプタマー表面における細胞接着性の評価、初代肝細胞の細胞塊培養、および癌細胞塊の共培養による評価を行った。

4. 研究成果

キャピラリー電気泳動 (CE) を用いてタンパク質-核酸複合体を分離・分取した後に PCR 反応を行う CE-SELEX の検討を行った。細胞表面に存在する複数のマーカータンパク質と SELEX に用いる DNA プールの CE 分離挙動

条件の最適化を行い、タンパク質/DNA 複合体の回収に成功した。回収した DNA を用いて PCR 反応を行った結果、問題なく DNA が増幅されること、市販の磁性粒子を用いて一本鎖 DNA が回収できる条件を確立した。この過程で、自らが調整したストレプトアビジン/ポリエチレングリコール (PEG) 共固定表面をもつ磁性粒子を用いることにより、高効率に一本鎖 DNA が回収できることを見出した。さらに、同磁性粒子は本来ストレプトアビジンが失活する高温領域においても有効に機能することを明らかとした (Polymer J. 2011)。これは、共固定化した PEG がストレプトアビジンの熱変性を効率良く抑制し、ビオチン固定可能の失活を妨げたためであると考えられる。この他、ターゲットとなる細胞として、肝臓癌細胞 HuH7、肺癌細胞 a549、肺正常細胞 OUS-11、間葉系幹細胞などの細胞の立ち上げを行い、各種細胞の単独および共培養条件を検討した。その結果、肺癌細胞 a549 の細胞塊は肺正常細胞 OUS-11 上で共培養した場合のみ、効率良く細胞塊を形成することが明らかとなった (図 1C)。コントロール実験の内皮細胞上の肺癌細胞 a549 や肺正常細胞 OUS-11 上の肝臓癌細胞 HuH7 は効率良い細胞塊形成が観測されなかった。本結果は、同じ種類の細胞同士の組み合わせが、細胞塊形成を促進させる場合があるという新たな細胞塊三次元培養の培養指針を示すものである。

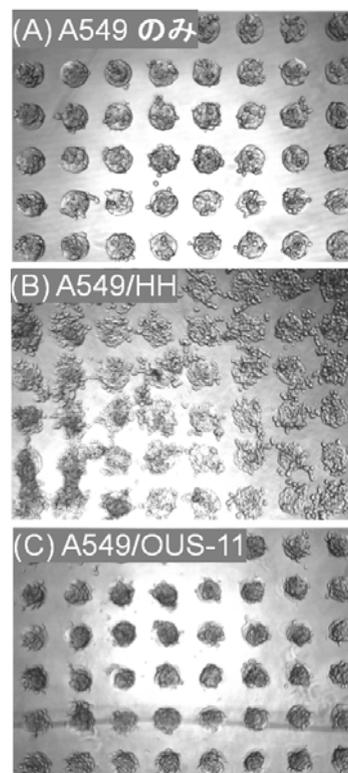


図1. (A) A549 のみを播種した場合、(B)フィーダー細胞として HH を播種した後に A549 を共培養、(C)フィーダー細胞として OUS-11 を播種した後に A549 を共培養したもの。HH の上に A549 を播種したものは凝集能が低く、OUS-11 の上に播種した A549 は凝集し易いことがわかる。

次に、DNA アプタマー固定化基板の作成を行い、その機能評価を行った。DNA 固定化基板は、予め biotin-BSA をポリスチレンシャーレ上に固定化した後、streptavidin を介して 5' 末端を biotin 修飾した DNA アプタマーを反応させることで作製した。固定化する DNA として、がん細胞表面に発現するスクレオリンとの高い結合能を有するアプタマー (AS1411) とチミンが 70mer 連続した配列を有するもの (T70) を選択し、作製した基板上に数種のがん細胞を播種して細胞の接着挙動を観察した。まず、培地に含まれる血清成分が DNA に与える影響を電気泳動により検討した結果、血清ありの培地中では 6 時間以上経つと AS1411 アプタマーがほぼ分解されてしまうが、血清なしの培地中では分解されないということが分かった。この結果を踏まえ、DNA 固定化基板上で細胞を培養する際は血清を加えない培地を用いることとした。さらにコントロールとして RGD ペプチド配列を末端に有する PEG を固定化した表面を作製した。その結果、DNA を固定化していない基板や T70 固定化基板に比べて AS1411 固定化基板でより多くの細胞の接着が確認できた。RGD ペプチド配列固定化表面と比較して細胞接着能が低いことがあきらかとなったが、DNA 固定化基板上に分子認識能を付与させると効率良く細胞培養が可能であることを見出した。

また、細胞接着領域がマイクロレベルで規制されている機能性培養皿を用いてラット初代肝細胞の共培養系の構築・評価を行ったところ線維芽細胞との共培養系で肝機能が著しく上昇することを見出した。

研究期間内において、確立した技術の融合・評価までは検討できなかったが、今後も継続して本研究を進めていく。細胞接着後にスクレアーズを用いてアプタマーを分解することにより、細胞を非侵襲的に回収することを試みる。また今回は、各物質をポリスチレンシャーレ上にスポット状に滴下することで基板を作ったが、基板を作る容器を工夫することでスフェロイドや細胞シートなどの細胞構造体を回収できる可能性があるため、検討する予定である。

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) Kubota, M., Yoshimoto, K., Yuan, X., Nagasaki, Y., "Improvement of the thermal stability of streptavidin immobilized on magnetic beads by the construction of a mixed-poly(ethylene glycol) tethered-chain Layer" *Polymer Journal*, 43,

493-496(2011).

(2) Ikeda, Y., Jomura, T., Horiuchi, U., Saeki, J., Yoshimoto, K., Ikeya, T., Nagasaki, Y., "Long-term survival and functional maintenance of hepatocytes by using a microfabricated cellarray", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 97-100 (2012).

[学会発表] (計 6 件)

吉本敬太郎 小島綾太 長崎幸夫 “胎生肝細胞の長期培養と分化誘導法” 第 59 回高分子学会年次大会 (2010 年 5 月 28 日, 横浜)

吉本敬太郎 “生体高分子構造の空間制御に基づく高性能診断法の開発” 日本分析化学会第 59 年会 (2010 年 9 月 16 日, 東北大学)

(1) Keitaro Yoshimoto “Structural Analysis and Molecular Recognition Behavior of Bio-macromolecular/Polymer Hybrid Interface” ICAS2011, 2011/05/24, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

(2) Keitaro Yoshimoto “3D Cell Co-culture System on Hydrogel Micro-Patterned Surface” MRS Fall Meeting, 2011/11/29, Boston, USA.

(3) Yukio Nagasaki, Motohiko Nishio, Keitaro Yoshimoto “Fab'/mixed-PEG co-immobilized gold surface -The role of a PEG tethered layer in molecular recognition events-” ICTF15, 2011/11/08, Fukuoka.

(4) 吉本敬太郎 「培養細胞の構造制御と高機能化—細胞も 3D の時代!？」 第 1 2 回機能構造と分析化学シンポジウム (2011 年 11 月 19 日, 東北大学)

(5) 吉本敬太郎 長崎幸夫 「分子認識の選択性を高めるソフト界面設計」 日本分析化学会第 60 年会 (2011 年 9 月 14 日, 名古屋大学)

(6) 吉本敬太郎 「高分子修飾表面の界面力—生体高分子・細胞に与える不思議な環境」 第 1 2 回表面力セミナー (2012 年 3 月 3 日, 東北大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 敬太郎 (YOSHIMOTO KEITARO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：60392172

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：