

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19917

研究課題名（和文）集積回路への細胞固定による生体反応の制御と検出

研究課題名（英文）Control and detection of biological reactions on integrated circuits through cell immobilization and in vivo sensing microenvironments

研究代表者

樋口 ゆり子 (Higuchi, Yuriko)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40402797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞を治療薬放出および生体反応の受信が可能なマシンとみなし、集積回路やセンサーと双方向に情報を交換することを想定している。その実現には、生きている細胞を基板上に固定する方法、複数の種類の細胞を自在に配置できる技術、生体内微小環境に反応する仕組みを細胞に搭載する必要がある。クリック反応する官能基のペアを利用し、基板上へ細胞を自在に配置固定できた。さらに、正常組織と比べてがんや炎症組織ではサイトカイン濃度が高いというような微小環境に反応する遺伝子スイッチを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立された細胞の配置固定法は、ガラス、金属などのマテリアルの表面と共有結合で安定に固定でき、また、独立して反応する官能基を組み合わせることで、複数の種類の細胞を自在に配置できる。この手法は、センサーへの固定、3D組織培養などへ展開が可能で研究開発の基礎を支える。微小環境反応遺伝子スイッチは、治療実験あるいは細胞治療への展開により新たな治療法の開発に繋がる。この研究は、学術的にも社会的にも大きな意義を持ち、今後の医療やバイオテクノロジーの発展に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conceptualize cells as machines capable of releasing therapeutic agents and receiving biological responses. We envision these cells to engage in bidirectional information exchange with integrated circuits and sensors. Achieving this requires methods to immobilize living cells on substrates, technologies for precise placement of multiple cell types, and mechanisms within cells to respond to microenvironments within living organisms. Utilizing pairs of click-reactive functional groups, cells were effectively immobilized and positioned on substrates. Furthermore, we engineered genetic switches that respond to microenvironments such as elevated cytokine levels in cancerous or inflamed tissues, in comparison to normal tissues.

研究分野：生体材料、医療薬学

キーワード：クリック反応 細胞固定 生体内微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品のモダリティは、この 20 年で低分子化合物から抗体、核酸・遺伝子、細胞と大きく変化した。細胞の複雑かつ整然と制御された分子機構を利用することで、これまでにない多様な治療法が可能になる。代表者樋口は、これまで、低分子化合物から細胞まで、様々なモダリティの薬物送達に携わってきた。その中で、スマート化される社会において、生体内の情報を収集し、適切な治療を行い、その結果を AI で解析制御できる仕組みが必要であり、それは、半導体チップのような人工物だけでなく、生きた細胞の機能と連携させることで、生体機能の制御とセンシング、さらには個別化治療の世界が拓けると考えるに至った。

2. 研究の目的

細胞は細胞外から受けたシグナルを細胞内で処理し、タンパク質分泌、チャネル開閉によるイオンの放出、酵素活性などにより外界に情報を発信する、優れたマシンと捉えることができる。生体内においては、疾患組織における微小環境に応答したタンパク質分泌や分化・遊走などの機能発現による双方向のコミュニケーションにより、治癒または増悪の一端を担っている。これを利用して疾患を治療するのが細胞治療である。細胞機能の発現を時空間制御できれば、細胞治療の効果を最大限に引き出すことができる。本提案では、細胞を治療薬放出および生体反応の受信が可能でマシンのみならず、集積回路と結合することにより、生体内へアクションを起こし、その結果を検出する、生体との双方向のコミュニケーションの実現を想定している。その実現に向けて、まず、生きている細胞を基板上に固定する必要がある。さらに、複数の種類の細胞を自在に配置できる技術も必要となる。また、生体内微小環境に応答する仕組みを細胞に搭載する必要がある。

本研究では、基板上への細胞の配置固定と微小環境応答する遺伝子スイッチの設計および開発を目的とする。

3. 研究の方法

ガラスへの DBCO またはテトラジンコーティング

13 mm φ ガラス (松浪硝子工業, Japan) をアルカリ溶液 ($\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{dH}_2\text{O}=1:1:5$) で洗浄し、ピラニア試薬 ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=4:1$) 中で室温 2 時間反応させた。その後シラン溶液 (MPTMS (同仁化学):EtOH:dH₂O=1:95:4) で室温 24 時間反応後、110 °C で 1 時間熱した。熱したガラスは Maleimide-PEG-NH₂ (creative PEGworks):Maleimide-PEG-Methyl (Sigma Aldrich)=7:3 で D-PBS (-) に 2mg/ml で溶解した溶液中で室温 24 時間反応させた。最後に DBCO-COOH と DMTMM (共に sigma aldrich) をそれぞれ 1.2 mM, 3 mM で D-PBS (-) に溶解した試薬に浸すことで、DBCO をガラス上にコーティングした。ガラス上の DBCO 基は、Texas-RED-PEG₃-Azide を 10 μM で 15 分反応させ、蛍光観察することで評価した。同様の方法で、テトラジンをコーティングした。

細胞へのアジド基または TCO 修飾

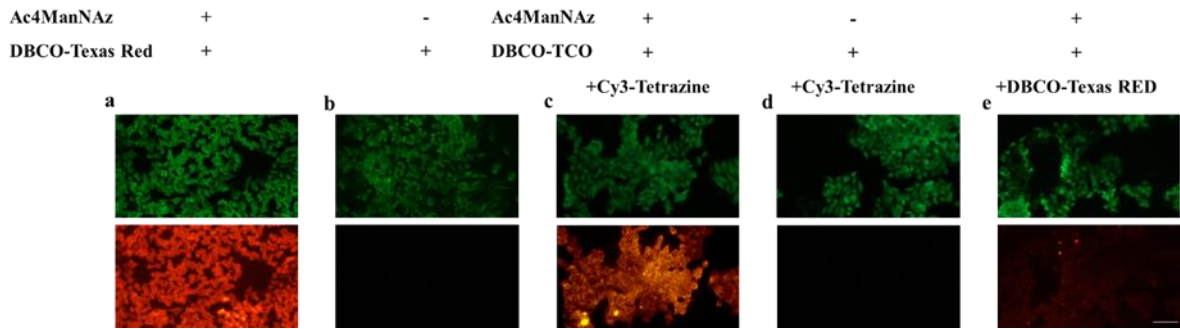
細胞を 10 cm ディッシュに 2×10^5 cells/mL の濃度で播種し、10% (v/v) FBS および 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 10 mL 中で 24 時間培養した。培地を 40mM Ac₄ManNAz を含む DMEM に交換し、48 時間培養した。TCO 修飾する場合は、アジド標識細胞を、40 μM TCO-PEG₁₂-DBCO を含む DMEM 中で 40 分間インキュベートした後、1mL の D-PBS (-) で洗浄した。その後、1mL のアキュターゼを加えて細胞を剥離し、10%FBS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 中で細胞懸濁液を回収した。

ベクター構築および遺伝子導入

IkBα の一部の配列とリプレッサーの融合タンパク質を発現するベクターを構築した。細胞を播種した翌日、FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI) を用いてトランスフェクションを行った。Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) 中で、DNA-試薬の複合体を調製し [transfection reagent (μL):pDNA (μg)=4:1]、DMEM 培地に希釈した上で、ウェル内の培地と交換した。

4. 研究成果

Ac₄ManNAz を添加または無添加でインキュベートした後、GFP-HeLa 細胞を DBCO-Texas Red で処理した。テキサスレッドの蛍光は、Ac₄ManNAz で処理した GFP-HeLa 細胞では検出されたが (図 1a)、未処理の GFP-HeLa 細胞では検出されなかった (図 1b)。これらの結果は、Ac₄ManNAz による代謝標識後、アジド基が HeLa 細胞表面に存在することを示している。細胞の TCO 修飾は、テトラジン-Cy3 を用いて検出した。Cy3 蛍光は、DBCO-PEG-TCO 処理したアジド-GFP-HeLa 細胞 (図 1c) では確認されたが、DBCO-TCO 処理した GFP-HeLa 細胞 (図 1d) では確認されなかった。これらの所見は、細胞膜へのアジド基、TCO 官能基の順次導入に成功したことを示している。遊離のアジド基が TCO 細胞上に残っていると、直交選択性が阻害される可能性がある。しかし、DBCO-PEG-TCO で処理したアジド-GFP-HeLa 細胞を DBCO-Texas Red とインキュベートしたところ、遊離のアジド基は TCO 細胞上に観察されなかった (図 1e)。



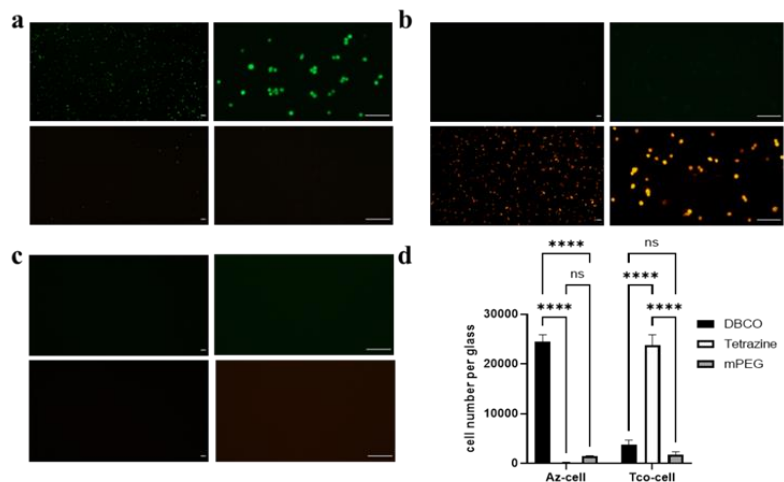
(図 1)

アジド/DBCO と TCO/テトラジンは、それぞれ直交クリック化学と共有クリック化学のペアである。DBCO-PEG でコートしたカバーガラスには、コントロールのメチル PEG をカバーしたガラス表面よりも多くの細胞が固定化された (図 2a、2b)。この結果は、DBCO でコートしたカバーガラスにアジド基修飾細胞をうまく固定化し、非特異的結合を最小限に抑えたことを示している。さらに、固定化されたアジド基修飾細胞の密度は、添加する細胞数の増加とともに増加し、 2×10^6 細胞/mL 以上をカバーガラス付きウェルに添加すると細胞数はほぼ一定になった (図 2c)。同様の傾向は、TCO 修飾細胞とテトラジンコートカバーガラスのペアでも観察された (図 2d、2e、2f)。

(図 2)

直交性のクリック反応による選択的な細胞固定化を確認するため、アジド-GFP 細胞と TCO-RFP 細胞の混合物を DBCO、テトラジン、メチル-PEG コートカバーガラス上でインキュベートした。アジド基修飾 GFP 細胞または TCO 修飾 RFP 細胞は、それぞれ DBCO (図 3a) またはテトラジン-PEG コートカバーガラス (図 3b) でのみ観察された。アジド基修飾 GFP 細胞とテトラジン-PEG コートカバーガラスの交差反応はほとんど観察されなかった (図 3a)。TCO 修飾 RFP 細胞と DBCO-PEG コートカバーガラスの組み合わせでも同様の結果が得られた (図 3b)。mPEG コートしたカバーガラス上では、アジド基修飾細胞も TCO 修飾細胞もほとんど観察されなかった (図 3c)。

選択的に固定化された細胞数を、カルセイン-AM 標識 (アジド基修飾細胞) またはカルセイン-赤-オレンジ標識 (TCO 修飾細胞) を用いて定量的に評価した。カルセイン-AM 蛍光シグナルは DBCO でコートされたカバーガラス上でのみ検出されたが、カルセイン-赤-オレンジ標識 TCO 細胞はテトラジン-PEG でコートされたカバーガラス上でのみ蛍光シグナルを示した。注目すべきは、mPEG でコートした表面で

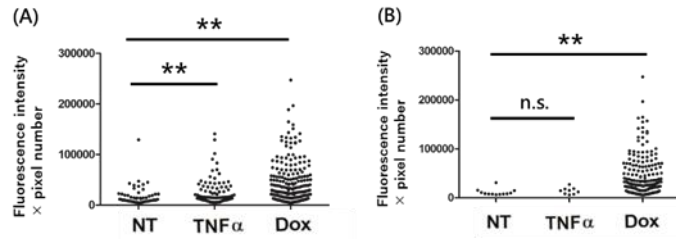


(図 3)

は、非特異的な細胞結合が最小であったことである (図 3d)。

がんや炎症組織においては、正常組織と比較して TNF α などのサイトカイン濃度が高いことが知られている。このようながんや炎症組織に特徴的な微小環境を検出することを目的に以下の研究を行った。リプレッサーと I κ B α フラグメントを融合した TetR-Fra I κ B α 、あるいは Tet リプレッサーと I κ B α フラグメント間に GS リンカーを挿入した TetR-GS-Fra I κ B α を発現するプラスミドベクターを構築した。

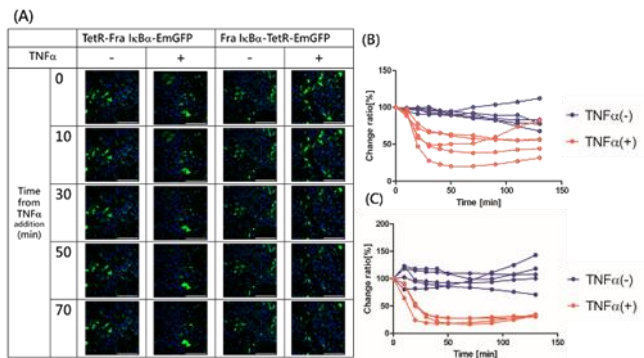
次に、TetO 配列が挿入されたプロモーターの下流に、レポータータンパク質として mK02-PEST を配した TetO-mK02-PEST のベクターを構築した。この TetO-mK02-PEST のベクターといずれかの融合リプレッサーを細胞にコトランスフェクションし、TNF α 添加後の mK02 の発現を蛍光顕微鏡で観察し、得られたデータを解析した (図 4A, B)。



(図 4)

Tet リプレッサー単体の抑制を解除する薬剤であるドキシサイクリン (Dox) を添加した群は、何も刺激を加えなかった群と比較して mK02 の発現が高かった (図 4A, B)。

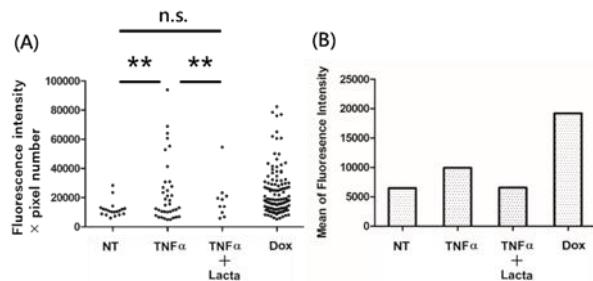
よって、融合リプレッサーはGS リンカーの有無に関わらず mK02 の発現を抑制したことが示された。また、GS リンカーのない TetR-Fra I κ B α では、TNF α を添加した群は非添加群と比べて mK02 の蛍光シグナルが強かった (図 4A)。一方、GS リンカーを有する TetR-GS-Fra I κ B α では、TNF α を添加しても mK02 の蛍光シグナルはほとんど検出されなかった (図 4B)。この結果から、TNF α 刺激による遺伝子発現の抑制の解除には、GS リンカーのない融合リプレッサーの方が有効であることが明らかになった。



(図 5)

TetR-Fra I κ B α -GS-EmGFP あるいは Fra I κ B α -GS-TetR-EmGFP を一過性発現させた HeLa 細胞に、炎症性サイトカイン TNF α を添加した直後からタイムラプスイメージングを行った。いずれの EmGFP 融合リプレッサーを発現させた細胞においても EmGFP の蛍光シグナルは減退した (図 5A)。各群の画像の 5 個の細胞について蛍光強度を時間に対してプロットすると、TNF α 添加後 40 分ほどで蛍光が減少したことがわかった (図 5B, C)。

ユビキチンプロテアソーム経路による分解を不可逆的に阻害する薬剤として知られるラクタシスチンで 4 時間の前処理を行った後に、TNF α を添加すると、mK02 の発現はほとんど認められなかった (図 6A)。一方、ラクタシスチンの前処理をせずに TNF α を添加した細胞では mK02 の発現が認められた (図 6A)。また、mK02 発現量の定量評価を目的に、フローサイトメーターで蛍光強度を測定すると同様の結果が得られた (図 6B)。本結果より、融合リプレッサーの抑制解除はユビキチンプロテアソーム経路を介していることが示唆された。



(図 6)

以上、クリック反応を利用することで生き残っている細胞を基板の上に固定でき、さらに、異なる 2 組の官能基のペアを利用することで、細胞を自在に配置できるようになった。また、がんや炎症組織では正常組織と異なりサイトカイン濃度が高いことを利用し、このような組織微小環境を検出する遺伝子スイッチを構築した。本研究で得られた成果を展開することで、生体機能のセンシングや制御の実現に繋がると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhu Chengyuan, Takemoto Hiroyasu, Higuchi Yuriko, Yamashita Fumiyoshi	4. 巻 699
2. 論文標題 Programmed immobilization of living cells using independent click pairs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149556 ~ 149556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2024.149556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 ○樋口ゆり子、朱 程遠、山下富義
2. 発表標題 生体直交反応する官能基の細胞膜への導入によるクリック反応を介した細胞の固定
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Improvement of cell-cell interaction by site-directed modification of antibody to the cell membrane using non-natural amino acid
3. 学会等名 4th International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○Zhu Chengyuan, Kazunori Tomita, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Selective immobilization of the VHH introduced cells for preparation of double cell layer
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○Yuriko Higuchi
2. 発表標題 Regulation of therapeutic cell kinetics by ligand modification to cell membranes
3. 学会等名 The 31st international conference on photochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新津 葵一 (Niitsu Kiichi) (40584785)	京都大学・情報学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------