

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24686094

研究課題名(和文) 刺激応答性ナノシェルによるケージド細胞の調製

研究課題名(英文) Stimuli-responsive nano-shells for caging living cells

研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI, Satoshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：80398106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円、(間接経費) 6,300,000円

研究成果の概要(和文)：刺激応答性の高分子複合体から成る殻(ナノシェル)で細胞を覆い、刺激を与えられて初めて機能を発揮するような「ケージド細胞」を調製する方法の開発を行った。本研究では、細胞の制御に用いる外部刺激として、時間的・空間的分解能が極めて高い光刺激を選択し、光分解性のナノシェルを開発した。ナノシェルの材料として、光分解性リンカーを介して生体適合性の高い高分子を集合化し、光分解性のヒドロゲルを開発した。この光分解性の集合体を交互積層法によって細胞表面に被覆する技術を開発し、被覆したケージド細胞は、光照射によってその伸展や接着、貪食がコントロールできることを示した。

研究成果の概要(英文)：We developed methods for preparing "caged cells", which are covered with the nano-shell consisting of stimuli-responsive polymer complexes to control the cellular functions with external stimuli. In this study, light stimulation was selected as the external stimulus because of its high spatio-temporal resolution, and photo-cleavable nano-shells were challenged to be developed. For the cell-coating material, a photo-degradable hydrogel was produced by self-assembly of biocompatible polymers through a photo-cleavable linker group. Then, the method for coating cellular surfaces with the present photo-degradable self-assembly materials was optimized for tightly caging living cells, and the functions of caged cells such as elongation, adhesion and phagocytosis were successfully confirmed to be controlled by light irradiation.

研究分野：化学生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：細胞工学 光応答性材料 細胞パターンニング 細胞接着 自己集合

1. 研究開始当初の背景

近年、ES 細胞や iPS 細胞といった分化万能細胞を細胞源とした有用細胞の調製法が確立し、分化誘導した細胞を用いた再生医療や創薬用の人工組織モデルの構築、細胞移植療法、養子免疫療法など様々な分野への応用が期待されている。しかし、再生医療や組織工学分野においては、心筋や皮膚などの単純な構造の組織については構築法が確立しつつあるが、肝臓の肝小葉などの複雑な構造の組織については未だに組み立てる方法論が確立していないのが現状である。また、細胞移植や養子免疫療法においても、生体防御系による拒絶をすり抜けて目的の位置に細胞を送達する技術が不十分であり、細胞の本来有する機能を十分に有効利用できていないと言える。

細胞は細胞表面の膜タンパク質を介して周辺環境や他の細胞と相互作用する。従って、細胞が接着してほしい場所でのみ細胞表面の膜タンパク質がマトリクスと相互作用できるように個々の細胞を制御できれば、一細胞ずつを複雑な構造に配置することが可能である。同様に、生体内で目的の位置に到達するまでは細胞表面が他の細胞に認識されないように保護されていて、到達後に他の細胞や周辺環境と相互作用するように時空間的に制御できれば、免疫防御網をすり抜けて目的の部位のみで細胞を働かせる。このように、細胞表面の相互作用を人為的に制御できれば、生体内外で自由自在に細胞を制御できると考えられる。

近年、生体分子に光分解性の保護基を修飾し、一時的にその機能を抑制する方法(ケージング)が注目されている。この保護された分子(ケージド分子)は、光照射によって保護基が分解されて本来の機能を取り戻す。従って、ケージド分子を生体内に導入し、望みのタイミングに望みの場所のみ光を照射することによって、その機能を時空間的に制御できる。そこで、刺激分解性の殻(ナノシェル)を細胞に被せれば、細胞表面と外部との相互作用が抑制された「ケージド細胞」が調製でき、細胞の機能を生体内外の刺激で自由自在に制御できるのではないかというアイデアを着想した。

2. 研究の目的

刺激応答性のナノシェルで細胞を被覆することによってその機能を抑制したケージド細胞を調製する技術を開発し、ケージド細胞を用いることによって刺激に応じて細胞機能を制御することを目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 光分解性材料の合成と集合化

光分解性リンカーを介して末端にビオチンを修飾した四分岐ポリエチレングリコール(PEG)を合成し、この光分解性ビオチン

化四分岐 PEG (photo-cleavable biotinylated 4arm PEG: PB-PEG)とアビジンを生理条件の緩衝液中で種々の濃度条件、混合比率で混ぜ、これらの自己集合によるゲル形成を倒置法およびレオメーターを用いた粘弾性測定によって巨視的に評価した。また、マイクロサイズの蛍光ビーズをこの混合水溶液中に懸濁させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてそのブラウン運動を解析することにより、ゲル化に伴う自己集合体の形成を微視的に追跡した。得られたヒドロゲルに対し、種々の強度で紫外光(365 nm)の照射を行い、その光応答性を上記と同様の方法で巨視的および微視的に評価した。

浮遊細胞であるマウス proB 細胞株 BaF3 細胞を PB-PEG 水溶液中に懸濁させ、上記と同様にアビジン水溶液と混合することによってゲル内に包埋した。また、ゲル中で培養後に蛍光試薬による染色法を用いて生死判定を行った。さらに、細胞を包埋したゲルに光照射を施してゲルを溶解させた後、溶けた水溶液から回収した細胞の生死判定も上記と同様に行った。

(2) ビーズへの光分解性材料の被覆

細胞表面に(1)で開発した光分解性材料を被覆するための方法を検討するために、まずは細胞の代わりに、アビジン修飾されたマイクロサイズのビーズに対して材料の被覆を試みた。平均粒径が 2 μ m のアビジン修飾ビーズを PB-PEG 水溶液に懸濁させて静置し、その後遠心操作によって上清を分離除去した。次に、この PB-PEG 修飾を施したアビジン修飾ビーズをアビジン水溶液に懸濁させ、静置後同様に上清を分離除去した。このように、ビーズ表面に PB-PEG とアビジンとを交互に積層し、ビーズ表面を光分解性自己集合体で被覆した。ビーズへの材料の被覆は、動的散乱測定法による粒子径の測定と、フローサイトメーター解析による蛍光標識アビジンの定量によって確認した。また、このビーズ上のコーティングが、光照射によって分解脱離することも同様の方法で調べた。

(3) 細胞表面被覆のための足場分子の検討

細胞膜上に自発的に集積することが知られている PEG 脂質にビオチンを修飾した。このビオチン化 PEG 脂質を細胞表面に作用させた後、蛍光標識アビジンを添加し、共焦点レーザー顕微鏡および蛍光フローサイトメーターによりアビジンの細胞膜上への導入を確認した。また、PEG と脂質との間を光分解性リンカーでつないだ光分解性 PEG 脂質にもビオチン修飾を行い、上記と同様に、細胞表面にアビジンを導入することができるかを調べた。さらに、(1)と同様に光照射を施した後、細胞表面からアビジンが消失するかどうか顕微鏡観察により調べた。また、光分解性 PEG 脂質と細胞膜との相互作用の光依存性を調べるために、ガラス基板上にこの PEG

脂質を修飾し、種々の量の光を照射後に細胞を播種し、せん断応力をかけた際の細胞の残存率を求めた。

(4) 細胞のケーシング法とその評価法

(3) で検討した方法を用いて細胞表層に光分解性ビオチン化 PEG 脂質(photo-cleavable biotinylated biocompatible anchor for membrane: PB-BAM) を介してアビジンを導入し、(2) で開発した方法を用いて、PB-PEG とアビジンとの交互積層を行った。その際に、上記と同様にアビジン水溶液に蛍光標識アビジンを含ませ、細胞表層に(1) で開発した光分解性自己集合体材料が積層されることを共焦点レーザー顕微鏡観察および蛍光フローサイトメーター解析により評価した。また、この細胞に対して光照射を施した後、全く同様の評価を行った。

ケーシングを施したヒト子宮頸癌 HeLa 細胞の伸展を評価するために、コラーゲンコート表面に対して播種し、15 分後の細胞の形態を観察した。また、接着を評価するために、ケーシングを施した細胞と施していない細胞をそれぞれ異なる色の蛍光色素で染色してスライドガラス上に播種し、生理条件の緩衝液に繰り返し浸漬することによって、接着していない細胞を表面から洗い流した。その後、それぞれの色の細胞の残存率を蛍光顕微鏡観察によって算出し、接着性を評価した。全く同様の方法で、ケーシング後に光照射を施した細胞の接着性も定量した。

ケーシングを施したマウスマクロファージ細胞株 J774 細胞の貪食を評価するために、蛍光マイクロビーズの細胞内への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡観察によって評価した。

4. 研究成果

(1) 光分解性材料の開発とその機能評価

PB-PEG 水溶液とアビジン水溶液とを両者が一定濃度以上で等モル量になるように混合すると、ビオチン-アビジン相互作用を介して迅速にゲル化することが分かった。また、ゲル化後、包埋したマイクロサイズのビーズのブラウン運動が完全に停止することより、サブマイクロの大きさのメッシュ状集合体が形成され、立体障害的にマイクロサイズの物質の動きを制御できることが示唆された。このヒドロゲルに対し、細胞毒性の無い弱い強度の光 (365 nm , 5 J/cm^2 以下) を照射したところ、ゲルの溶解が確認できた。また、光照射後、ビーズのブラウン運動も再開することより、ゲル内部に形成されたメッシュ状の自己集合体の分解も示唆された。このように、マイクロサイズの物質の制御に利用可能な微細な自己集合体から成る光分解性ゲルの開発に成功した(投稿準備中)。

このゲルに BaF3 細胞を包埋し培養したところ、ゲル内で細胞の動きは抑制されるが、3 日後もほぼ全ての細胞が生存していること

が分かった。また、上記の検討で用いた弱い強度の光を照射したところ、マイクロビーズと全く同様に、細胞の運動が再開され、溶解した水溶液から細胞を回収したところ、ほぼ全ての細胞の生存が確認された。このように、タンパク質と親水性ポリマーから成るこの自己集合材料は生体適合性が高く、また、光感受性が高いため細胞毒性の無い条件で細胞の運動を光制御可能であることが分かった(投稿準備中)。

また、本研究を進めるにあたり、ビオチン化光分解性基に嵩高いアビジンやストレプトアビジンが強固に結合することによる立体障害に着目し、この立体障害によってタンパク質の機能が制御できることも確認した(発表論文 2)。従って、細胞表層のタンパク質が外部と相互作用するのを防ぐのに、数層の集合体があれば十分に制御可能であることが示唆された。

(2) ビーズを用いた被覆法の検討

PB-PEG とアビジンから光分解性材料を細胞表層に被覆する方法について、マイクロビーズを用いて検討を行なった。アビジン修飾ビーズを、PB-PEG 水溶液とアビジン水溶液とに数分間ずつ交互に 4 回浸漬させることによって、ビーズの粒子径が数百マイクロメートル大きくなるのが動的散乱測定法により確認された。さらに、この材料被覆ビーズに光を照射すると、(1) と同様に弱い強度の光で、粒子径が被覆前と同じ大きさに戻った。また、交互積層の際に、アビジン水溶液中に蛍光標識アビジンを一部含ませたところ、積層回数を増やすごとに、ビーズの蛍光強度が増加した。光照射後は、蛍光強度が積層前と同じ程度まで低下した。これより、設計通りに PB-PEG とアビジンとの集合体によって被覆され、光分解性リンカーの分解によってその集合体が分離してビーズ表面から消失したことが示唆された。

(3) 細胞表層被覆のための足場分子の検討

細胞表面を(2) で開発した方法でビーズと同様に被覆するために、細胞表層上にアビジンを導入するための足場分子について検討を行なった。ビオチン化 PEG 脂質を種々の濃度で細胞上に作用させたところ、数 $100\text{ }\mu\text{M}$ 以上の濃度を培地に加えると、数分以内に最大導入量に達することが分かった(発表論文 3, 4)。また、ビオチン化光分解性 PEG 脂質を用いて同様の検討を行なったところ、全く同様の結果が得られた。さらに、導入後に光を照射したところ、照射量に応じて、細胞膜上のアビジンの量が減少し、光照射によるアビジンの放出が確認された。また、基板に修飾した光分解性 PEG 脂質と細胞との相互作用は、光の照射量に応じて変化し、 1 J/cm^2 以上の光でほぼ完全に相互作用が無くなることも確認できた(発表論文 1)。

(4) 細胞のケージング法の開発と評価

細胞膜上に PB-BAM を介してアビジンを導入し、(2) で開発した方法を用いて (1) で開発した光分解性自己集合体を細胞表面に修飾した。その結果、四回以上の交互積層により、細胞表面に厚みのあるシェルを形成することができた。また、このシェルが光照射によって溶解し、細胞表面から拡散して消失することも明らかにした。

そこで、ケージド HeLa 細胞をコラーゲン表面の基板に播種し、細胞の伸展と接着が制御できるかを調べた。その結果、光照射を施した細胞のみ伸展し、接着性も向上する様子が顕微鏡観察によって明らかにされた。さらに、ケージド J774 細胞も調製し、貪食作用を光制御できるかも検討したところ、光照射を施したケージド細胞のみが蛍光ビーズを貪食して細胞内に取り込む様子が顕微鏡観察によって示された。以上のように、ケージド細胞を調製し、その機能を評価することができた (投稿準備中)。

このように、光分解性材料で細胞を被覆し、その機能を光制御した例は未だ無く、極めて独創的な成果であると言える。また、今後、このケージド細胞技術を用いて、生体内外で様々な応用が期待できる。

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 4 件)

S. Yamahira, Y. Takasaki, S. Yamaguchi, K. Sumaru, T. Kanamori and T. Nagamune, Dynamic photochemical lipid micropatterning for manipulation of nonadherent mammalian cells, *Methods Cell Biol.*, **120**, 131-144, 2014.

S. Takamori, S. Yamaguchi*, N. Ohashi and T. Nagamune*, Sterically bulky caging for light-inducible protein activation, *Chem. Commun.*, **49**, 3013-3015, 2013.

U. Tomita, S. Yamaguchi*, Y. Maeda, K. Chujo, K. Minamihata and T. Nagamune*, Protein Cell-Surface Display Through In Situ Enzymatic Modification of Proteins With a Poly(Ethylene Glycol)-Lipid, *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 2785-2789, 2013.

U. Tomita, S. Yamaguchi, Y. Sugimoto, S. Takamori and T. Nagamune, Poly(ethylene glycol)-Lipid-Conjugated Antibodies Enhance Dendritic Cell Phagocytosis of Apoptotic Cancer Cells, *Pharmaceuticals*, **5**, 405-416, 2012.

[学会発表] (計 27 件)

中条 一貴, 山口 哲志, 大橋 紀之, 長棟輝行, 「光分解性バイオ制御ツール (4)

細胞制御を志向した光分解性シェルの開発」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 30 日

大橋 紀之, 山口 哲志, 南畑 孝介, 長棟輝行, 「光分解性バイオ制御ツール (3) 蛋白質 リガンド架橋型光分解性ヒドロゲルを用いた細胞の微小環境の制御」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 30 日

高崎 裕美, 山口 哲志, 山平 真也, 長棟輝行, 「光分解性 RGD-PEG を用いた細胞接着の時空間制御」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 30 日

談 莫東, 山口 哲志, 山本 晃康, 蘭 婉君, 山平 真也, 中村 元直, 長棟輝行, 「N 末端特異的蛍光ラベリングによる pH 応答性 GPCR の細胞内動態解析」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 30 日

山平 真也, 山口 哲志, 河原 正浩, 長棟輝行, 「光分解性 PEG 脂質修飾コラーゲン表面を用いた一細胞アレイ法の開発とその応用」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 30 日

石渡 晟, 高森 智史, 南畑 孝介, 山口 哲志, 長棟輝行, 「光分解性バイオ制御ツール (2) 光溶解性タンパク質凝集体の開発」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 28 日

高森 智史, 山口 哲志, 南畑 孝介, 河原正浩, 長棟輝行, 「光分解性バイオ制御ツール (1) 嵩高い光分解性保護基を用いたタンパク質の in vivo 光制御法の開発」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 28 日

坂井 洋子, 山口 哲志, 岡本 晃充, 「光分解性ゲル被覆細胞の作製と評価」, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2014 年 3 月 27 日

Satoshi Yamaguchi, 「Biotinylated photolabile linker-based photo-switchable tools for regulating biopolymers and living cells」, 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (ICFPAM2013), University of Auckland, Auckland, Newzealand, 2013 年 12 月 10 日

石渡 晟, 山口 哲志, 高森 智史, 南畑 孝介, 長棟輝行, 「光溶解性タンパク質凝集体の開発」, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2013 年 9 月 28 日

高森 智史, 山口 哲志, 長棟輝行, 「嵩高い光分解性保護基を用いた生体分子活性の光制御」, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 名古屋大学東山キ

- キャンパス, 2013 年 9 月 27 日
- 山口 哲志, 大橋 紀之, 中条 一貴, 長棟 輝行, 「バイオインターフェースを包む合成化学ツールの開発」, 化学工学会第 45 回秋季大会, 岡山大学津島キャンパス, 岡山, 2013 年 9 月 16 日
- 石渡 晟, 山口 哲志, 高森 智史, 南畑 孝介, 長棟 輝行, 「光溶解性ケージドタンパク質凝集体の開発」, 第 23 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京, 2013 年 7 月 31 日
- 山口 哲志, 高森 智史, 石渡 晟, 南畑 孝介, 長棟 輝行, 「嵩高い光分解性保護基を用いたケージドタンパク質」, 第 23 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京, 2013 年 7 月 31 日
- 大橋 紀之, 山口 哲志, 山平 真也, 南畑 孝介, 長棟 輝行, 「細胞制御のための光応答性ピオチン アビジンゲルの開発」, 日本化学会第 93 春季年会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 草津, 2013 年 3 月 24 日
- 中条 一貴, 山口 哲志, 山平 真也, 長棟 輝行, 「細胞制御を志向した光分解性ナノシエルの開発」, 日本化学会第 93 春季年会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 草津, 2013 年 3 月 24 日
- Satoshi Yamaguchi and Teruyuki Nagamune, 「Photo-cleavable chemical tools for externally controlling biointerfaces」, 化学工学会第 78 年会, 大阪大学豊中キャンパス, 大阪, 2013 年 3 月 18 日
- Satoshi Yamaguchi and Teruyuki Nagamune, 「Photo-cleavable chemical tools working at biointerfaces for externally controlling biomolecules and living cells」, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京, 2012 年 11 月 29 日
- 山口 哲志, 長棟 輝行, 「PEG 脂質を用いた次世代細胞マイクロアレイの開発」, 第 29 回医用高分子研究会講座, 産業技術総合研究所 臨界副都心センター, お台場, 2012 年 11 月 21 日
- Satoshi Yamaguchi, Satoshi Takamori, Toshiaki Furuta and Teruyuki Nagamune, 「Sterically-Caging of DNA with a Biotinylated Photolabile Protection Group and Streptavidin」, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2012), 名古屋, 名古屋大学東山キャンパス, 2012 年 11 月 15 日
- 21 Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Kimio Sumaru, Toshiyuki Kanamori and Teruyuki Nagamune, 「Spatio-temporal Cell Micro-Patterning with Photo-Cleavable PEG-lipid」, 2012 AIChE annual meeting, David L. Lawrence Convention Center, Pittsburgh, USA, 2012 年 11 月 2 日
- 22 山口 哲志, 高森 智史, 長棟 輝行, 「嵩高い光分解性保護基を用いた生体高分子の光制御」, 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸国際会議場, 神戸, 2012 年 10 月 26 日
- 23 Noriyuki Ohashi, Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Teruyuki Nagamune, 「Light-responsive biotin-avidin hydrogel for cell manipulation」, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Daegu, Korea, 2012 年 9 月 19 日
- 24 Satoshi Takamori, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune, 「Sterically caging for light-induced activation of proteins」, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Daegu, Korea, 2012 年 9 月 19 日
- 25 Satoshi Yamaguchi, So Nakajima, Yanjie Chen, Teruyuki Nagamune, 「Light-induced regulation of gene expression using caged nucleotides with a biotinylated photo-cleavable protection group」, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Daegu, Korea, 2012 年 9 月 19 日
- 26 高森 智史, 山口 哲志, 長棟 輝行, 「嵩高い光分解性保護基を用いた蛋白質活性の光制御法の開発」, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 北海道大学 高等教育推進機構, 札幌, 2012 年 9 月 7 日
- 27 S. Yamaguchi, S. Yamahira, K. Sumaru, T. Kanamori, T. Nagamune, 「Spatio-temporal control of cell micro-patterns on photo-cleavable PEG-lipid surfaces」, The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012), Southern Beach Hotel & Resort, 沖縄, 2012 年 7 月 5 日
- 〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・講

師

研究者番号：80398106

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：