

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282148

研究課題名(和文) 光酸発生培養基材への精密光照射による接着細胞の物理プロセッシング

研究課題名(英文) Surgical processing of adherent cell culture by micro-patterned light irradiation on photo-acid-generating culture substrates

研究代表者

須丸 公雄 (SUMARU, KIMIO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号：40344436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞の切断・剥離・細分化操作等の自動化を目指して、新規光応答性培養基材を用いた細胞プロセッシング技術を開発した。可視光応答性の光酸発生(PAG)ポリマーを新規に開発、これを含む細胞培養基材への近紫外～可視光の面的な照射によって、細胞単層を切断し、均一な大きさのセルクランプを作製できること、局所的に細胞接着を低下させ、所定の個所の細胞のみを回収できること、これらをヒトiPS細胞の継代プロセスに適用できることを確認した。さらにこのポリマーを用いて、水溶性ポリマーの架橋、および架橋ゲル層の基材からの剥離を光照射で制御することで、ハイドロゲルからなる半立体マイクロ構造体を形成する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Aiming at the automation of cell manipulation to cut, detach and segment cell monolayer on a substrate, we developed novel cell processing methods by using photoresponsive culture substrates which generate acid upon light irradiation. We developed a novel photo-acid-generating (PAG) polymer and fabricated various photoresponsive culture substrates using the polymer. As a result of the examination to find suitable conditions of the polymer composition and light irradiation, we observed that cell monolayer can be cut into cell clumps with similar size, and be detached from the culture substrate by patterned mild light irradiation on substrates composed of the polymer. Using the methods, we also demonstrated the human iPS cell passage. Further, we developed to fabricate semi-3-dimensional microstructures composed of hydrogel by controlling both the crosslinking of water-soluble polymers and the detachment of the crosslinked layer from the substrate via patterned light irradiation.

研究分野：複合領域

キーワード：光細胞操作 光酸発生ポリマー 未分化維持培養

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品の開発において、動物実験を一部代替する形で、培養細胞を用いた様々なバイオアッセイ (cell-based assay) が既に行われてきているが、ヒト iPS 細胞の樹立によって同種・自家細胞利用への道が開けたことをきっかけに、薬物スクリーニングの高精度化のみならず、疾病メカニズム解明の手段としても、そのさらなる重要性が認識されてきている。こうした目的に最適化されたモデル細胞系を作製・標準化することへのニーズが急速に高まる中、接着状態で生存・機能発現する足場依存性培養細胞 (cell-based assay に用いられることの多い心筋細胞や肝細胞を含む体細胞の大部分) に対して、培養基材に接着した状態のまま、それぞれの位置・大きさ・形状・活性 (蛍光強度) 等の情報を自動的に取得、迅速に統計解析を行う技術 (imaging cytometry) が近年急速に普及しつつある (*Nature Methods*, 2007, 4, 175, *Methods Mol. Biol.*, 2011, 689, 51)。フローサイトメトリー (FACS) や磁気ビーズ法、光ピンセットなど、細胞を浮遊状態で扱う従来の方法とは異なり、基材からの剥離等に伴う足場依存性細胞への侵襲がほとんどなく、培養経過を追跡しながらの cytometry も可能である。さらにその解析結果に応じて、不要な細胞を高エネルギーパルスレーザーで選択的に殺傷する技術が、アメリカのベンチャー企業によってすでに実用化されている (*Cytometry A*, 2004, 61A, 153)。細胞殺傷が可能なレーザー光源は極めて高価であり、多数の細胞の処理には集光点の走査を要するが、cell-based assay の重要度が増すに伴い、それに供するモデル細胞作製への応用検討が、既に始まっている段階にある。

一方申請者らは、光の局所照射によって培養基上の細胞をオンデマンドに操作する技術の開発に 2002 年に着手、以来、光機能性高分子の設計・合成・物性解析、材料プロセス、細胞工学、照射光学系の設計・製作といった幅広い分野の研究ポテンシャルを結集しつつ、研究開発を進めてきた。そしてこれまで、様々な光応答性培養基材及び微小パターン照射装置を独自に開発、これらを組み合わせ、培養細胞の基材表面への選択捕捉 (*Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2356) や、パターン共培養系の構築 (*Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 103, 552) 等、従来になかった様々な細胞操作を実現するに至っている。しかしながら、通常の培養条件において細胞同士は面方向につながっている上、その結合は容易に分断できないため、これら基材表面と細胞間の接着のみの制御によって細胞分別が実現できる場面は、限定的と言わざるを得ない。実際、細胞培養の現場において

は、除去したい細胞群をスクレーパーでまとめて削り取る、あるいはピペッティングやローラーカッターによってコロニーを細分化するといった、物理的手段による「力づく」とも言える細胞プロセッシングが日常的に行われているが、基材接着の制御のみでこれらに対応することは原理的に不可能であった。そこで申請者らは、より幅広い細胞操作に対応すべく、光照射に応じて酸を発生する機能性ポリマー (PAG ポリマー) を用いた検討を進め、マイルドな可視光の面照射によって効率的に培養細胞を殺傷する技術を開発、これに基づき、基材上の足場依存性培養細胞を、細胞単位で分別除去する手法を確立していた (*Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110, 348)。

### 2. 研究の目的

こうした知見に基づき、本研究では、細胞培養の現場で通常行われている「力づく」操作に加え、個々の細胞の精密分別も可能な物理的プロセッシングや、細胞のシグナル伝達の研究において最近検討され始めている酸による局所刺激といった新しい操作を、精密光照射に基づく上記スキームによって自動化する技術の開発を目指して検討を行った。具体的には、弱酸発生能や紫外応答性を有する新規 PAG ポリマーを開発、これを用いて細胞培養基材を調製し、面方向に互いにつながった足場依存性培養細胞を光で剥離し、光で切断する操作 (図 1) 条件を特定、一定サイズの細胞塊を多数作製する、指定した領域を切り取り回収する技術の開発を試みた。そしてこれらの手法をヒト iPS 細胞の継代プロセッシングへの応用を検討、さらに、このポリマーを含む光機能性材料と微小パターン光照射を組み合わせによる応用技術 (新規構造体の作製及び新たな細胞機能制御) の開発を行った。

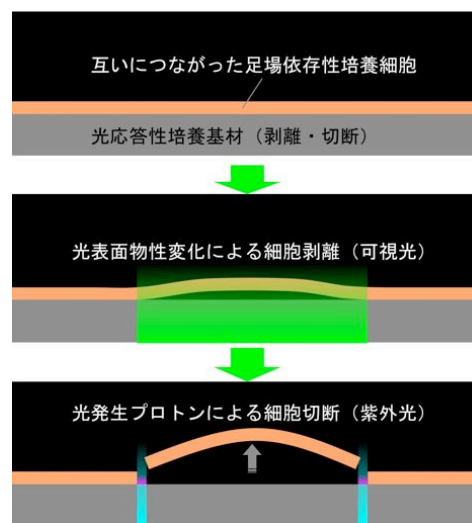


図 1 光応答性培養基材への光照射で細胞単層を切断剥離するスキーム

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規光応答培養基材の開発および細胞操作への応用検討

可視光応答性の PAG 基を側鎖に有する PMMA (pPAGMMA) をラジカル重合法により合成、他のポリマーとともに表面固定化を行うことで培養基材を作製、MDCK、NIH/3T3、ヒト iPS 細胞を用いて、微小パターン照射による細胞単層の細分化操作及び剥離制御の条件検討を行った。

#### (2) ハイドロゲルからなる半立体マイクロ構造体の形成

光酸架橋を行うプレゲルポリマーとして、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) と酸触媒架橋剤を含む溶液を、pPAGMMA 薄層の上にコート、プリベークしたのち、所定のパターンに沿って光照射、ポストベーク後の水による洗浄で、照射域のみで HPC が架橋、非照射域を洗浄除去できる条件を探索した。さらに、pPAGMMA が光照射に反応して溶解する溶媒条件を探索した。上記で見いだされた各条件で、架橋と剥離の両方について様々なパターンを選択、半立体的なマイクロ構造体の形成を検討した。

#### (3) ジアリアルエテン誘導体を用いた光細胞機能制御

別の光細胞操作手段として検討したジアリアルエテン誘導体 (龍谷大学内田欣吾教授提供) について、ジアリアルエテン誘導体の閉環体または開環体を 0.2ppm 添加した培地で MDCK 細胞を培養、閉環体を開環させる波長 436nm の青色光を局所照射し、細胞への影響を観察した。また、DNA インターカレーション試験や、カスパーゼ阻害剤を用いたアポトーシスアッセイによって、そのメカニズムを検討した。

#### (4) 新規光弱酸発生ポリマーの開発

紫外光に反応して弱酸を発生する残基をエステルおよびジアミドを介してそれぞれの側鎖に導入した PMMA およびポリ (*N,N*-ジメチルアクリルアミド) を合成、コート膜をリン酸緩衝液や培地に浸漬し、その光応答物性を解析し、さらに光細胞操作への応用検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規光応答培養基材の開発および細胞操作への応用検討

基材のコーティングおよび光照射の条件を様々に検討した結果、グリッドパターン照射によって培養細胞単層を、同じ面積に切断し、細分化できる条件が見いだされた。こうして切り出された細胞集塊は十分な

viability を保持してコロニーとして増殖することを確認した。この操作をヒト iPS 細胞に適用できる条件を特定し、不要細胞の致死除去による純化や細分化を伴う継代操作に応用できることを実証した。さらに、PVAc がオーバーコートした基材を用いて、MDCK 細胞または NIH/3T3 細胞からなる単層の切断と基材接着の低下の両方を光照射によって誘起できる条件を見いだした (図 2)。光発生酸による若干のダメージが避けられないが、本研究の主たる課題であった互いに接着し合った細胞培養系からの所定細胞群の切り抜き操作を実証した。

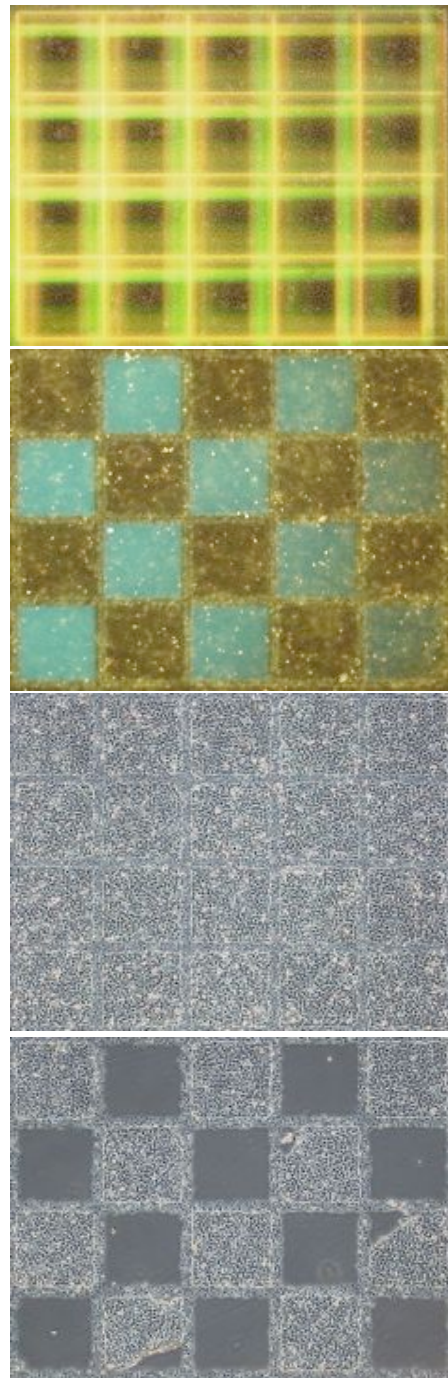


図 2 光応答性培養基材へのパターン光照射による MDCK 細胞単層の切断剥離

## (2) ハイドロゲルからなる半立体マイクロ構造体の形成

pPAGMMA 薄層の厚さ、オーバーコートするプレゲル溶液の組成、光照射条件を探索し、光照射域には架橋 HPC 層が残存する一方で、非照射域から未架橋ポリマーが溶解して除去され、現像できる条件を見いだした。また、エタノールと水の混合溶媒中で、上記と同様の光照射を行うことで、pPAGMMA をエリア選択的に溶解させ、こうして形成されたゲル層を基材から剥離できることを確認した。さらに、架橋と剥離の両方について照射パターンを検討、ハイドロゲルからなる種々の半立体的な新規マイクロ構造体をフォトリソグラフィの要領で多数形成できることを確認した(図3)。この知見に基づき1件の特許出願(国内および国際)を行い、これら構造体の作製及びバイオ応用への展開に関する研究課題を2016年度科研費(基盤B)において新たに開始するに至った。

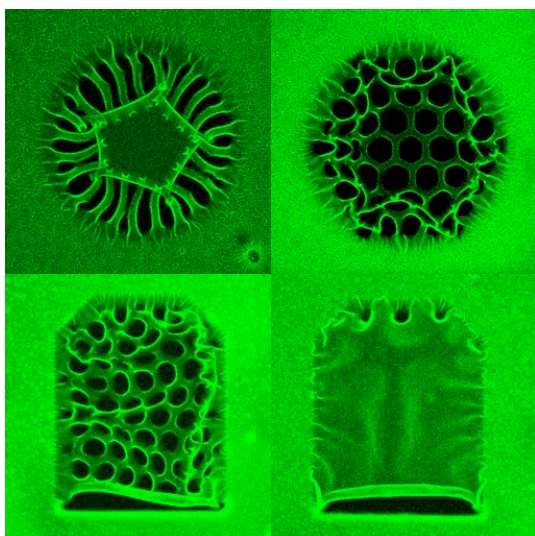


図3 光架橋剥離制御によって形成されたハイドロゲルからなる半立体的なマイクロ構造体

## (3) ジアリールエテン誘導体を用いた光細胞機能制御

ジアリールエテン誘導体のうち、閉環体と共存させた細胞が、波長436nmの青色光照射によって著しくviabilityが低下した(図4)一方、開環体を共存させた系では光の影響が認められないことを確認した。カスパーゼ阻害剤を用いたアッセイにより、低強度照射によって誘起されるviabilityの低下が、カスパーゼカスケードを介したポトシスに細胞を至らしめることが示唆された。これにより光細胞毒性の光スイッチという新たな光生体制御スキームが実証された。これらの知見に基づき2件の特許出願を行い、成果はChem. Comm. 誌に2件掲載された。

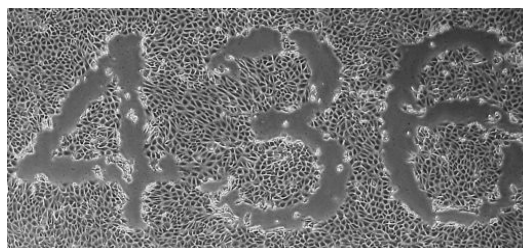


図4 閉環ジアリールエテン誘導体共存下でのパターン照射によるMDCK細胞の致死

## (4) 新規光弱酸発生ポリマーの開発

ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)にジアミドリンカーを介して光弱酸発生基を導入した新規ポリマーについて、その薄膜が光に反応して中性から塩基性の水系に溶解する条件を特定した。このポリマーコート表面に培養細胞が接着すること、培養半日程度までの期間に光照射すると、照射域から膜状の物質とともに細胞が基材から浮き上がり、ピペッティングによって膜とともに回収できることを実証した。この知見に基づき1件の特許出願を行った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ①Moriyama K, **Sumaru K**, Takagi T, Satoh T, Kanamori T “Dynamically controlled construction of microstructures based on photo-induced phase transition of a spirobenzopyran-modified polymer solution” *RSC Adv* 6, 44212, 2016, DOI: 10.1039/C6RA06281D (査読あり)
- ②Satoh T, **Sumaru K**, Takagi T, Kanamori T “Light dose-dependent thickness control of photoacid generator-bearing hydrogel” *Macromol Symp* 358, 52-58, 2015, DOI:10.1002/masy.201500067 (査読あり)
- ③須丸 公雄, 高木 俊之, 金森 敏幸 “PAGポリマー薄膜担持基材を用いた培養細胞単層の光マニピュレーション” *膜*, 40, 130-136, 2015 (査読あり)
- ④Okuda JY, Tanaka Y, Kodama R, **Sumaru K**, Morishita K, Kanamori T, Yamazoe S, Hyodo K, Yamazaki S, Miyatake T, Yokojima S, Nakamura S, Uchida K. Photoinduced cytotoxicity of a photochromic diarylethene via caspase cascade activation. *Chem Commun* 11;51(54):10957-60, 2015, DOI:10.1039/c5cc02200b (査読あり)
- ⑤ Kodama R, **Sumaru K**, Morishita K, Kanamori T, Hyodo K, Kamitanaka T, Morimoto M, Yokojima S, Nakamura S, Uchida K. “A diarylethene as the SO<sub>2</sub> gas generator upon UV irradiation.” *Chem Commun* 51(9):1736-8, 2015, DOI: 10.1039/c4cc07790c (査読あり)

⑥Sumaru K, Kanamori T. “Cell patterning by micro-pattern projection of UV light through photoinduced enhancement of cell adhesion (PIECA).” **Methods Cell Biol** 120:185-97, 2014, DOI: 10.1016/B978-0-12-417136-7.00012-4

[学会発表] (計 55 件)

①Selective elimination, clump production and patterning of hiPSCs by light on PAG-polymer-functionalized substrates, **Sumaru K**, Morishita K, Takagi T, Satoh T, Kanamori T, World Biomaterial Congress 2016, 2016/05/18, Montreal (Canada)

② Photofabrication of 2.5-dimensional microstructures composed of hydrogel sheet, **Sumaru K**, Takagi T, Satoh T, Kanamori T, PacifiChem2015, 2015/12/16, Honolulu (USA)

③Surgical Processing of Human iPS Cells on Photo-Responsive Culture Substrate (招待講演), **Sumaru K**, Morishita K, Takagi T, Satoh T, Kanamori T, 第 25 回日本 MRS 年次大会, 2015/12/10, 神奈川県横浜市

④Photo-induced cutting and detachment of cultured cell monolayer on PAG-polymer-functionalized surface, **Sumaru K**, Morishita K, Takagi T, Satoh T, Kanamori T, The 10th SPSJ International Polymer Conference, 2014/12/03, 茨城県つくば市

⑤Photoresponsive hydrogels - reseverible and irreversible-, PN&G2014, **Sumaru K**, Satoh T, Takagi T, Sugiura S, Kanamori T, 2014/11/14, 東京都

⑥Surgical Manipulation Of Cultured Cell Monolayer Using Photo-Acid-Generating Substrate And Micro-Projection System, **Sumaru K**, Morishita K, Takagi T, Satoh T, Kanamori T, MicroTAS 2014 Conference, 2014/10/27, San Antonio (USA)

[図書] (計 2 件)

①**Sumaru K**, Takagi T, Sugiura S, Kanamori T “Spiropyran- functionalized hydrogels” **SOFT ACTUATORS: MATERIALS, MODELING, APPLICATIONS, AND FUTURE PERSPECTIVES**, Springer, (2014) 219-229

②**須丸 公雄**, 高木 俊之, 杉浦 慎治, 金森 敏幸 ” 光で駆動するハイドロゲルアクチュエータ” 「新版ゲルテクノロジーハンドブック」, エヌ・ティー・エス, 74-79, 2014

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 4 件)

①「高分子化合物およびこれを用いた細胞操

作方法」, 特願 2016-114432, **須丸 公雄**, 高木 俊之, 森下 加奈, 金森 敏幸, 産業技術総合研究所, 2016 年 6 月 8 日出願 (国内)

②「光応答性細胞殺傷剤および光線力学療法用薬剤」, 特願2015-114244, 内田 欣吾, **須丸 公雄**, 森下 加奈, 金森 敏幸, 龍谷大学・産業技術総合研究所, 2015年6月4日出願 (国内)

③「架橋ポリマー構造体の製造方法及びその利用」, 特願2015-085322, PCT/JP2016/62099, **須丸 公雄**, 高木 俊之, 森下 加奈, 金森 敏幸, 産業技術総合研究所, 2015年4月17日出願 (国内及び国際)

④「光応答性細胞処理剤、細胞培養基材および細胞培養方法」, 特願2014-231044, 内田 欣吾, **須丸 公雄**, 森下 加奈, 金森 敏幸, 産業技術総合研究所, 2014年11月13日出願 (国内)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須丸 公雄 (SUMARU, Kimio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員

研究者番号: 40344436

### (2) 研究分担者

高木 俊之 (TAKAGI, Toshiyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号: 10248065

金森 敏幸 (KANAMORI, Toshiyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・研究グループ長

研究者番号: 50356797