

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750179

研究課題名(和文)抗体固定化温度応答性表面を用いた細胞選別マイクロ流体デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of microfluidic device on antibody immobilized-thermoresponsive surfaces for cell sorting

研究代表者

小林 純 (Kobayashi, Jun)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20385404

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)：温度応答性高分子が温度変化に応答してコンフォメーション変化することを利用して、特定抗原を有する細胞を選択的に吸着したのち、温度変化のみで細胞脱着する抗体固定化温度応答性高分子修飾表面を設計した。CD90陽性Ty-82細胞とCD90陰性K562細胞の混合物を37℃で抗ヒトCD90抗体固定化温度応答性表面に接触させると、Ty-82細胞が選択的に接着した。接着したTy-82細胞は、温度低下とせん断応力付加より回収、濃縮することができた。マイクロ流体デバイスと組み合わせることによって、せん断応力および温度変化を同時に制御する、より精密な細胞分離システムの構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：Antibody-immobilized thermo-responsive surfaces were designed for achieving selective attachment and detachment of cells accompanied by temperature-dependent conformational changes of grafted thermo-responsive polymer. At 37 °C, anti-human CD90 antibody-immobilized thermo-responsive surfaces selectively held CD90-positive Ty-82 cells in the mixture of Ty-82 cells and CD90-negative K562 cells. Adhered Ty-82 cells were detached by both lowering temperature and applying shear stress, resulting in the enrichment of Ty-82 cells. More precise separation and purification of cells would be achieved by controlling the flow of shear stress within microfluidic channels.

研究分野：生体材料

キーワード：生体材料 再生医療 細胞分離 抗体 マイクロ流体

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの組織・臓器を細胞から人工的に再構築する再生医工学が世界的に注目されている。我々の研究所では、生体組織があたかもシートを積層したような構造であることに着目し、細胞シートの積層化によって組織構造を再構築する「細胞シート工学」に取り組んでいる。温度応答性高分子のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を20ナノメートルの厚みで均一に固定した温度応答性培養皿上で細胞を単層になるまで培養した後、温度を20℃に低下すると、PIPAAmが水和して細胞底面の細胞外マトリックスと培養皿表面との相互作用が減少し、シート状の細胞組織を回収することができる。この細胞シートを用いて、既に角膜上皮再生の臨床応用、日本での筋芽細胞シートによる心疾患治療の治験が開始、食道再生ではすでにヒト臨床応用に成功、歯根膜と軟骨に関しては臨床研究が開始した。

心臓や肝臓など細胞に富んだ組織あるいは臓器を組織工学的に作製し、再生治療を実現するためには、細胞供給源、細胞の大量培養方法、細胞選別、という主に3つの課題があると考えられる。具体的には、細胞供給源として胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)を利用し、細胞の大量培養方法としてバイオリアクターを用いた懸濁培養、マイクロキャリア表面での培養が有力と考え、我々の研究所で現在検討を進めている。一方、ES細胞やiPS細胞から大量培養した細胞群から目的の細胞を回収、あるいは未分化細胞を除去し、真に臨床応用可能な組織・臓器を作製するためには、細胞選別の技術開発がきわめて重要である。

ところが、現在主流のフローサイトメトリーや磁気ビーズを用いた方法では、細胞表面に蛍光ラベル化抗体あるいは磁性微粒子が付着した状態で回収されてしまう。理想的にはラベル化されず無傷な状態で細胞を回収することが望ましい。

近年、安価かつハイスループットな手法として、マイクロ流路を利用した細胞選別が試みられている。複数の分岐をもつマイクロ流路による水力学的フィルトレーションを利用することで、微粒子の水力学的なサイズに基づき連続的に分画できる(Yamada et al., Anal. Chem., 2006)。血球細胞の分離、肝実質細胞の単離が報告されているが、サイズのみであらゆる細胞を分画できるかどうかは未知である。現状、細胞純化という観点で最も有力な手段は、抗体やペプチド、タンパク質など細胞特異的な細胞接着ドメインを固相表面に導入し、特定の細胞を吸着させる手法である(例えばNagrath et al., Nature, 2007)。この手法は、特定の細胞を除去する、いわゆるネガティブセレクションには有効であるが、吸着させた細胞にダメージを与えずに回収する、いわゆるポジティブセレクションはきわめて難しい。一方、山岡らは抗体

固定化キャピラリー内腔における細胞のローリング現象を利用して、幹細胞の分離が可能であることを見出しており(Mahara et al., Biomaterials, 2010)、細胞ラベル化の不要な選別技術としての応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、温度応答性高分子が温度変化にตอบสนองしてコンフォメーション変化することを利用して、特定抗原を有する細胞を選択的に吸着したのち、温度変化のみで細胞脱着する抗体固定化温度応答性高分子修飾表面を設計する。一般に、抗原-抗体間アフィニティーは比較的強い相互作用のため、抗体を基材表面に固定化し、目的細胞を捕捉することは容易であるが、その細胞を無傷な状態で回収し、かつ細胞表面に付着した抗体を除去することはきわめて難しい。本研究は、抗体固定化温度応答性表面とマイクロ流体技術を組み合わせることで、抗体/抗原間アフィニティーを温度変化とせん断力で精密に制御する新たな試みである。すなわち、温度応答性表面の設計と流体環境制御を同時におこなうことで、目的細胞の選択的な捕捉および回収が実現する。また、回収した細胞表面には抗体等の分子が付着していないため、本提案における原理を用いることで臨床応用可能な細胞選別システムの創製が期待できる。さらに、ES細胞やiPS細胞から大量培養した細胞群から目的の細胞を回収、あるいは未分化細胞を除去し、真に臨床応用可能な組織・臓器を作製するための手法としての応用展開が期待される。

3. 研究の方法

(1) 抗体固定化温度応答性表面の設計

PIPAAmの表面グラフト方法および抗体固定化方法について検討を行う。具体的には、電子線重合合法により温度応答性表面を調製し、さらに抗体を固定化する際の結合様式についても最適化を行う。

(2) 抗体固定化温度応答性表面上への細胞接着性評価

調製した表面と細胞との相互作用をあきらかにするために、温度を変化させたときの細胞接着性を評価する。このとき、抗CD90抗体のみならず、様々な種類の抗体を固定化した温度応答性表面上で目的の細胞が接着するかどうかを検討する。

(3) マイクロ流体デバイスを用いた評価

マイクロ流路デバイスの特徴として、流路内部の流動状態が層流であり、かつ溶液体積が小さいため温度変化が速やかに起こる。この特徴を生かして、抗体固定化PIPAAm修飾表面を有するマイクロ流路デバイスを作製し、抗原-抗体間アフィニティーの強さおよび動的挙動を定量的に解析する。さらに、様々な細胞の混合物から目的細胞のみを選択的に吸着させ、温度を低下させて脱着した細胞の回収率および純度を評価し、新しい細胞

胞選別手法としての応用展開を図る。

4. 研究成果

(1) 抗体固定化温度応答性表面の設計

温度応答性高分子修飾培養皿表面に抗ヒト CD90 抗体を固定化し、温度変化にตอบสนองした細胞接着 / 脱着を検討した。具体的には、カルボキシル基を有する poly(IPAAm-co-2-carboxyisopropylacrylamide) [poly(IPAAm-co-CIPAAm)] 修飾表面に抗 CD90 抗体を固定化した。直接固定法、PEG スペース固定法、アフィニティー固定法により 3 種類の表面を調製した (図 1)。

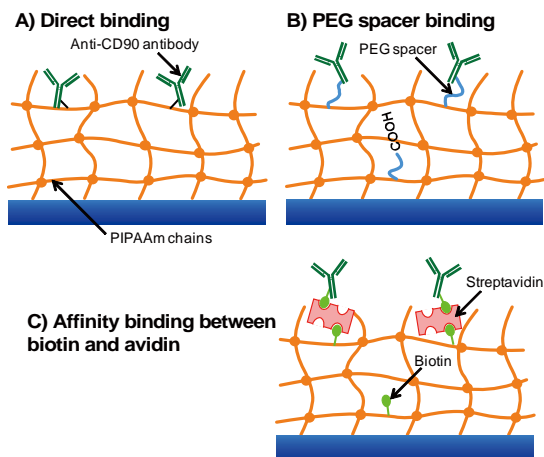


図 1. 抗体固定化温度応答表面

CD90 抗体に対しての蛍光標識二次抗体を用いて抗体固定化温度応答性表面を染色し、得られた蛍光顕微鏡像を画像解析し、相対的固定化抗体量を求めた (図 2)。直接固定法および PEG スペース固定法に比べて、アフィニティー固定法による表面上に多くの抗体が固定化された。これは、低分子のビオチンが効率的に表面固定化されたと同時に、アビジンがスペーサーとして働き、PIPAAm 鎖による立体障害を低減させ、その結果、抗体固定化量が増加したためと考えられる。

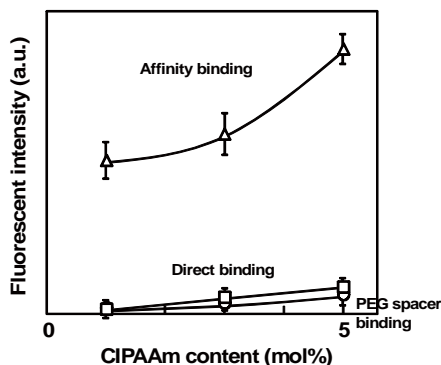


図 2. 蛍光標識二次抗体を用いた抗 CD90 抗体表面固定化量の相対値

(2) 抗体固定化温度応答性表面上への細胞接着性評価

CD90 を発現する Ty-82 細胞を無血清培地中 37 で培養したところ、アイソタイプ抗体固

定化表面上では接着せず、抗ヒト CD90 抗体固定化表面では選択的に接着した。また、Ty-82 細胞を 30 分間培養したところ、抗体が未固定温度応答性表面にはほとんど接着しなかったのに対し、アフィニティー固定化表面では約 80%、直接固定法および PEG スペース固定法表面では約 50% の Ty-82 細胞が接着した。以上のことから、Ty-82 細胞は抗 CD90 抗体とのアフィニティー結合より接着したことを示す。また、細胞接着率の差は、表面の抗体結合量およびその活性の違いにより生じたものと考えられる。さらに、温度を 20 に低下し、かつピペッティングすることで、細胞を培養基材表面から回収することができた。温度低下にともないアフィニティーが減少し、ピペッティングによるせん断力が細胞に付加され、Ty-82 細胞が脱着したのと考えられる。

また同様に、無血清培地中で CD90 陽性のヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を 37 で播種したところ、抗ヒト CD90 抗体固定化表面に接着し、シート状になるまで培養可能であった。また、温度を 20 に低下することで、剥離する際に生じる NHDF シート自身の収縮力と相俟って、シート状に回収することができた。さらに、低温処理により脱着した NHDF をフローサイトメトリーで解析したところ、アフィニティー固定表面から回収した細胞に抗体およびストレプトアビジンが高頻度で残存していたが (図 3C, D)、直接固定表面 (図 3A) と PEG スペース固定表面 (図 3B) から回収した細胞には抗体等は付着していなかった。よって、抗体固定化方法を最適化することにより、抗体フリーの状態での細胞を接着 / 脱着制御可能であることがあきらかになった。

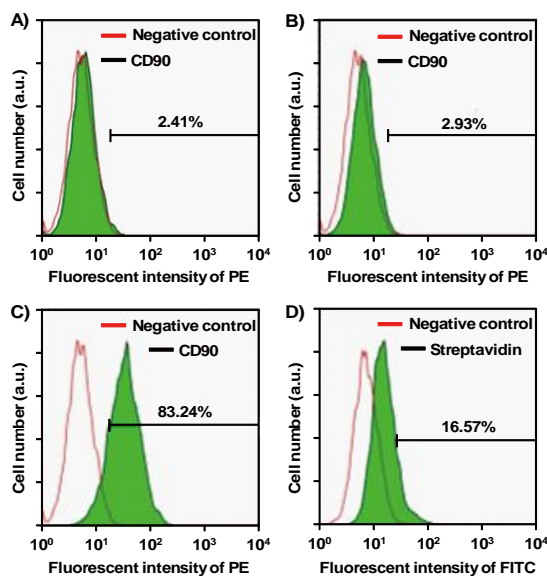


図 3. 直接固定法表面(A)、PEG スペース固定表面(B)から回収した NHDF 上の残存抗体、およびアフィニティー固定法表面から回収した NHDF 上の残存抗体(C)と残存ストレプトアビジン(D)のフローサイトメトリー解析

以上のことから、本研究で設計した抗体固定化温度応答性表面は、表面固定化された抗体と細胞表面上の抗原と間のアフィニティ相互作用を温度変化によって制御できることがわかった。37 で PIPAAm 鎖が収縮している際には、抗原 - 抗体間アフィニティ結合によって細胞が接着する（図 4 上）。一方温度を相転移温度以下の 20 に低下させると、PIPAAm 鎖が水和、膨潤し、固定化抗体付近の立体障害が増加し、抗原 - 抗体間アフィニティ結合が弱まる。さらに、せん断力あるいは細胞自身の収縮力が働くことによって、抗原 - 抗体間アフィニティ結合が切断し、細胞が脱着したと考えられる（図 4 下）。

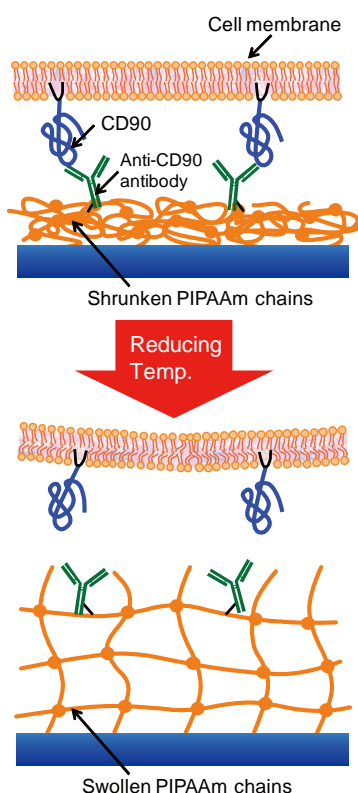


図 4 . 温度応答性高分子 PIPAAm 鎖の膨潤 / 収縮にともなう抗原 - 抗体間アフィニティ結合力の変化

(3) マイクロ流体デバイスを用いた評価

抗ヒト CD90 抗体固定化温度応答性表面を有する培養皿を用いて、CD90 陽性細胞の選択的な細胞分離が可能かどうか検証した。具体的には、CD90 陽性 Ty-82 細胞と CD90 陰性 K562 細胞の懸濁液（混合比 3:7）を培養皿上に播種し、37 で 3 時間インキュベートした。非接着の細胞を回収するためゆっくりと培養液を除去し、20 で 2 時間インキュベートしたのち、ピペッティングすることでせん断力をかけて細胞を回収した。フローサイトメトリーにより CD90 発現細胞の存在比率を測定したところ、細胞播種前の懸濁液は 33%であったのに対し、ピペッティングで回収した細胞懸濁液は 76%であった。抗ヒト CD90 抗体の

アフィニティ相互作用によって Ty-82 細胞が選択的に接着し、その結果、ピペッティングで回収した細胞懸濁液中の Ty-82 細胞が濃縮されたことが示唆された。

さらに、温度応答性培養皿表面上でのマイクロ流体デバイスの構築を行った。まず、既有的なマスクレス露光装置を用いて、フォトマスクを使用せずに、パーソナルコンピュータの画面上でデザインしたポリジメチルシロキサン製マイクロ流路を作製した。作製したマイクロ流路を温度応答性培養皿上に載せ、液漏れが起こらないよう治具によって圧着させて、底面が温度応答性表面のマイクロ流体デバイスを構築した（図 5）。マイクロ流体デバイスと抗体固定化温度応答性表面を組み合わせることによって、せん断応力および温度変化を同時に制御する、より精密な細胞分離システムの構築が期待される。

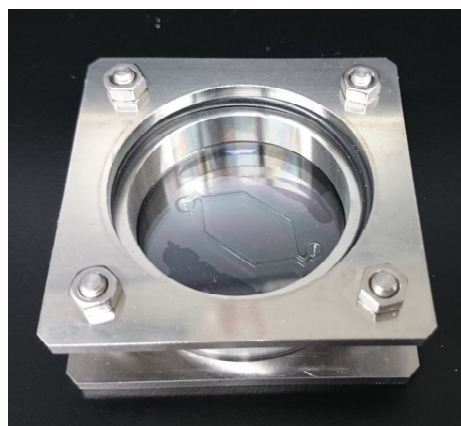


図 5 . 作製した温度応答性マイクロ流体デバイスのマクロ像

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Jun Kobayashi, Masaki Hayashi, Takahiro Ohno, Masanori Nishi, Yoshinori Arisaka, Yoshinori Matsubara, Hiroshi Kakidachi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Akihiro Horii, Teruo Okano, Surface design of antibody-immobilized thermoresponsive cell culture dishes for recovering intact cells by low temperature treatment, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 査読有、102 巻、2014、3883-3893
DOI: 10.1002/jbm.a.35064

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小林 純 (KOBAYASHI, Jun)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20385404