

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：82704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600066

研究課題名(和文) 接着・伝達機能を有する細胞集合体モデルの創成

研究課題名(英文) Development of Assembled Cell Model by Using Liposome-Liposome Adhesions

研究代表者

大崎 寿久 (OSAKI, TOSHIHISA)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号：50533650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来の細胞をモデル化する研究は、単一細胞における機能(代謝や自己複製など)を再現し理解するために単一のリポソームを細胞容器として利用してきた。これに対して、本研究では生体組織の協奏的な機能発現を再現・理解することを究極的な目標とし、単一細胞モデルとなるリポソーム同士を接着することで「細胞集合体モデル」を創成することを目的とした。研究代表者の均一径リポソームアレイ形成研究を基盤技術(若手B 平成23～24年度)として、本研究では分子間相互作用を介してリポソーム同士を近接・接着したリポソーム集合体を作成した。

研究成果の概要(英文)：In former works, single liposomes, capsule forms of a lipid bilayer, were applied for studies on single cell models, playing a role of a compartment to isolate a cytoplasm model. Here we focused on the tissue structure rather than the individual cells, and developed an assembled cell model by taking advantage of the adhesion of multiple liposomes; we further aim to reproduce and understand the concerted functions expressed by the mass of cells in living tissues in the future work. Based on our previous works, which enabled the formation of cell-sized liposomes in array format, liposome-liposome assembly was implemented by using streptavidin-biotin connections.

研究分野：脂質膜、材料・表面化学、微細加工技術

キーワード：生体機能模倣 脂質 生体材料(リポソーム) マイクロ・ナノデバイス 合成生物学

### 1. 研究開始当初の背景

細胞を最小要素から組み上げることで生命やその起源に対する理解を深める合成生物学における細胞モデルの創成は、「単一の細胞」に着目した研究がこれまで行われてきた。その成果の一例を挙げると、細胞内の持続的な代謝モデル (Libchaber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011) から単純な細胞分裂モデル (Sugawara, Nat. Chem. 2011) に至るまで多岐にわたり、近年、その著しい発展を見ることができる。こうした研究においては、ジャイアントリポソーム (脂質二重膜の形状の一つで、直径が数~数百マイクロメートルのカプセル状の小胞) が、その構成分子・構造・サイズの類似性から細胞モデルとして広く利用されている。

一方で、多細胞から成る生命は細胞を組織化し、それぞれの細胞が機能を特化・専門化させることでより堅牢かつ柔軟なシステムを創りあげ、他者との生存競争や外的環境の変化に対応する力 (可塑性や頑健性) を得ていると考えられる。しかしながら、こうした組織的な機能を単純化し、細胞集合体モデルを創成する研究は盛んとはいえ、油中において脂質分子に囲まれた液滴同士を接触させ、集合体として組み立てた例 (Bayley, Science 2013) や、細管状の脂質二重膜でつながれた数個のリポソーム (Orwar, Nano. Commun. Netw. 2011) にとどまる。これは、細胞集合体モデルに不可欠な細胞容器、すなわちリポソームを任意に並べて作ったり、大きさを制御したりすることが容易にはできなかったためであると考えられる。

研究代表者は、先行の科研費研究などを通して細胞サイズのリポソームを均一径でアレイ化することに成功している (図 1)。この手法の特徴は、絶縁性・導電性の複合構造をもつ基板に対して、エレクトロスプレーを用いた脂質分子の塗布を行い、基板上に脂質の正確で微細なパターンングを実現する点にある。この脂質パターンに水溶液を加え、水和するだけで大きさが制御されたリポソームを基板上に整列した形で得ることができる。そこで本研究では、この成果を応用することで、リポソームを用いた細胞集合体モデルを作成することを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では生体組織の協奏的な機能発現を再現・理解することを究極的な目標とし、単一細胞モデルとなるリポソーム同士を接着することで「細胞集合体モデル」を創成することを目的とする (図 2)。研究代表者の均一径リポソームアレイ形成研究を基盤技術として、本研究では分子間相互作用を介してリポソーム同士を近接・接着したリポソーム集合体を作成する。

### 3. 研究の方法

本研究では、まずリポソームの接触状態に

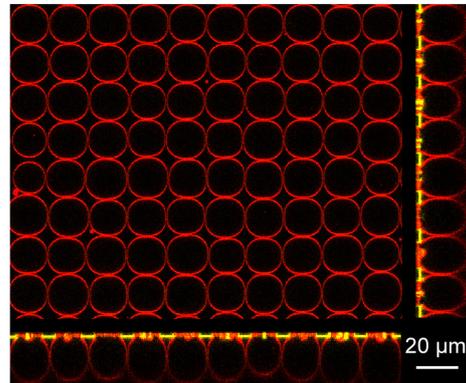
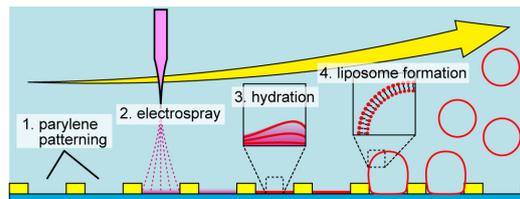


図 1 先行研究で開発した複合材料基板へのエレクトロスプレーによる脂質パターンング法 (上) と得られた細胞サイズの均一径リポソームアレイの共焦点顕微鏡写真。脂質を基板上に正確に微細パターンングすることで整然と配列したリポソームを形成できる。

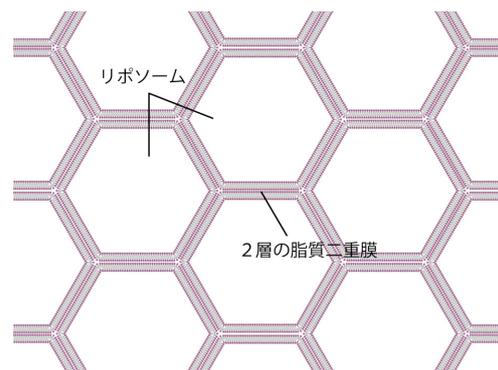


図 2 リポソーム同士が接着した細胞集合体モデル。リポソーム間は 2 層の脂質二重膜からなり、互いに接触・接着している。

ついて、脂質のパターンング条件を検討し、次に分子間相互作用によるリポソーム間の接着とその評価を行った。

#### (1) 複合材料基板の作製

研究代表者の先行研究 (若手 B) で研究開発を行った導電・絶縁パターンを施した基板を本研究でも用いた。ITO ガラス基板上に poly(chloro-*p*-xylylene) 高分子フィルムを化学気相蒸着 (CVD) 法によって厚さ 1 μm 積層した。次に一般的フォトリソグラフィプロセスを用いて、高分子フィルムに直径 10~20 μm のマイクロ孔を形成した。ITO 露出部分が導電性パターンとなる。

#### (2) 脂質のエレクトロスプレー

上記基板の導電パターン部分に選択的に

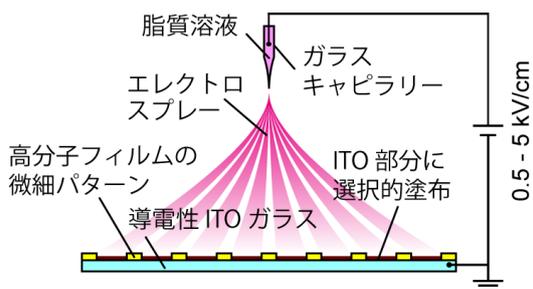


図3 エレクトロスプレー法。基板の絶縁性マスク(高分子フィルム)がない導電性部分にのみ物質を塗布できる。

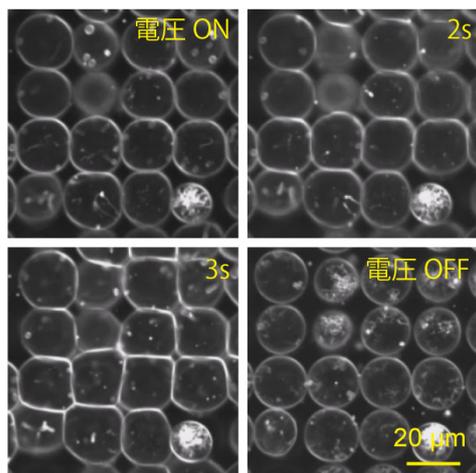


図4 接触したリポソームアレイに対して、直流電圧を印加した際のリポソームの形状変化。基板に対し正電圧を印加すると即座に変形が起こり、方形や八ニカム状の形状となった。

脂質を塗布し、脂質の微細パターンを得る方法として、先行研究で開発したエレクトロスプレー技術を用いた(図3)。ガラスキャピラリーを先端にもつシリンジに脂質のクロロホルム溶液を封入し、このキャピラリーと基板との間に直流高電圧を印加することでキャピラリー先端からスプレーが発生する。スプレーされた脂質溶液は、溶媒であるクロロホルムを揮発させながら基板の導電性部分であるITOが露出した表面にのみ堆積する(高分子フィルムによりマスクされた部分は回避される)。スプレー時間について、導電パターンの露出面積比率に応じて検討を行った。

### (3) リポソーム形成と接着

リポソーム形成は、エレクトロスプレーによりパターンニングされた乾燥脂質を、静置水和することによって行った。

分子間相互作用によるリポソーム同士の接着を行うため、ビオチン-アビジン結合を利用した。親水部分にビオチンが修飾された脂質(Biotin-PEG-DSPE)を混合した。ビオチンと脂質間にはリンカーとしてポリエチレングリコール鎖(45量体)が挿入されてい

るものを用いた。条件検討により、5wt%を用いた。リポソーム形成後、終濃度が25 μg/mLとなるようにストレプトアビジンを添加した。

リポソーム形成の様子や接着の経時変化評価などは倒立型顕微鏡、共焦点顕微鏡により行った。

## 4. 研究成果

### (1) リポソームの集積化

脂質パターンの脂質量は、スプレー時の脂質濃度、スプレー速度と時間によって規定される。濃度と速度を一定とした場合、脂質量はスプレー時間に比例する。本研究では水和後のリポソームが接触する状態となる条件を探索した。

上記の方法を用いてリポソームを密に形成した状況であっても、リポソーム形状は球形に近く、接触面積は一定程度までしか大きくならない(図1)。一方で、基板に正の直流電圧を印加すると押しつぶされる形となり、強制的に接触面積を大きくできることが分かった。これは、リポソームを構成する脂質分子は中性pHの環境において若干負電荷を帯びており、直流電圧によって基板側に誘引されたためと考えられる。この際、リポソームは近接するもの同士が密に接触し、方形や八ニカム構造となった(図4)。

### (2) リポソーム集合体の作成

接触・集積化したリポソームに対してストレプトアビジンを滴下すると、ビオチン-ストレプトアビジンの結合(分子間相互作用)を介してリポソーム同士が接着する現象を確認することが出来た。

ストレプトアビジン滴下後、接触したリポソーム同士で接着が始まり、5分程度の間接触面積が増大しながら接着が起こり、その後定常状態となる様子が観測された(図5)。一方で、隣接するリポソーム間で接着が起こり、接着に伴ってリポソームの重心位置が変化したためにこれらと近接するリポソームで接着が進行しない現象も見られた。こうした現象は、接着速度を緩やかにすることにより接着面の偏りを小さくし、回避できると考えられる。形成されたリポソーム集合体は、少なくとも1時間は安定に存在できることが確認された(図6)。

本研究により、リポソーム同士の集合体形成の基盤となる条件等について知見を得ることが出来た。今後はサイズや配列、脂質組成の異なるリポソームによる細胞集合体モデルの作成へと発展させていきたい。

## 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1件)

神谷厚輝、大崎寿久、竹内昌治、人工細

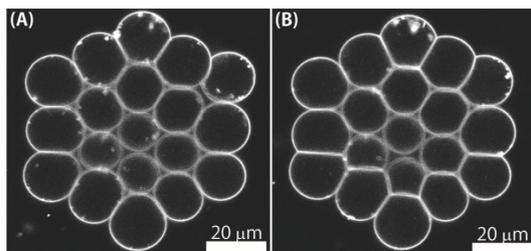


図 5 ビオチン-ストレプトアビジン分子間相互作用によりリポソームの接着。ストレプトアビジン滴下により接触面積の増大が確認された。(A) 滴下前、(B) 滴下 5 分後の共焦点顕微鏡写真。

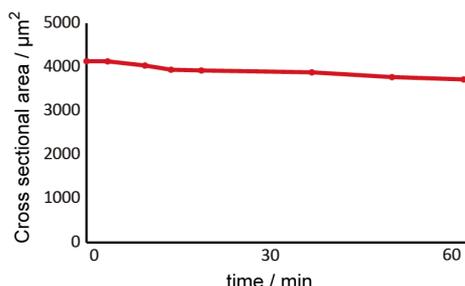


図 6 図 5 観察像におけるリポソームの総断面積推移。

胞膜作製とシングルイオンチャネル計測、*Electrochemistry*, 2015, 83, 1096-1100.  
(査読有)

DOI: 10.5796/electrochemistry.83.1096

〔学会発表〕(計 6 件)

Toshihisa Osaki, Microfluidics for biosensing and healthcare applications, ISPlasma2016/IC-PLANTS2016, 2016 年 3 月 8 日 名古屋大学 (愛知・名古屋) (招待講演)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, Non-Spherical Liposomes Formed By Molecular Structure And Deposition Micropattern, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2015 年 10 月 28 日 慶州 (韓国)

大崎寿久、生体膜デバイスの創薬・センサ応用、第 14 回国際バイオテクノロジー展、2015 年 5 月 13 日 東京ビッグサイト (東京・江東区)

Hiroshige Hamano, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Liposome Arrangement Connected with Avidin-Biotin Complex for Constructing Functional Synthetic Tissue, The 28th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2015 年 1 月 20 日 エストリル (ポルトガル)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Kosuke Shibasaki, Shoji Takeuchi, Artificial

Cell Membrane Devices for Pharmaceutical Applications, 8th International Symposium on Nanomedicine, 2014 年 12 月 5 日 愛媛大学 (愛媛・松山) (招待講演)

Hiroshige Hamano, Taishi Tonooka, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Microfluidic Hydration of Dry Lipid Patterns for Developing Epithelial Cell Model, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014 年 10 月 28 日 サンアントニオ (米国)

〔図書〕(計 2 件)

Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Shoji Takeuchi, Synthetic Biology Volume 1, The Royal Society of Chemistry, 2014, 275-291.

外岡大志、大崎寿久、竹内昌治、生体の科学、医学書院、2014、500-501.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.newkast.or.jp/innovation/lab\\_o/takeuchi\\_project.html](http://www.newkast.or.jp/innovation/lab_o/takeuchi_project.html)

[https://www.researchgate.net/profile/Toshihisa\\_Osaki](https://www.researchgate.net/profile/Toshihisa_Osaki)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大崎 寿久 (OSAKI, Toshihisa)  
公益財団法人神奈川科学技術アカデミー  
人工細胞膜システムグループ・研究員  
研究者番号：5 0 5 3 3 6 5 0

(2) 連携研究者

三浦 重徳 (MIURA, Shigenori)  
東京大学生産技術研究所・研究員  
現 京都大学再生医科学研究所・助教  
研究者番号：7 0 5 1 1 2 4 4

(3) 研究協力者

濱野 洋茂 (HAMANO, Hiroshige)