

研究報告書

「光応答性細胞固定化剤表面を用いた1細胞操作技術の開発と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 山口 哲志

1. 研究のねらい

細胞は、周囲の細胞や細胞外マトリクスといった環境と相互作用することによって表現型を変化させる。この表現型は細胞内の複雑な遺伝子ネットワークによって応答・発現するため、限られた数のマーカー分子の増減を指標にしたスクリーニングでは正確に識別できないものも多い。そこで、注目する細胞の機能や振る舞いといった表現型自体を、イメージング技術を用いて一細胞ずつ直接定量し、その数値を指標に正確に選別することが未知の生命システム・疾患メカニズムの解明や有用な機能性細胞の獲得に重要である。

環境と相互作用する一細胞をその表現型に応じて網羅的に選別するには、任意の生物学的な表面に精緻に細胞を配置し、表現型の解析後に望みの単一細胞を回収しなくてはならない。そのためには、外部刺激によって細胞を自由自在に接着したり取り外したりする技術が必要である。一細胞レベルの空間的精度で自由に与えられる刺激としては、光刺激が最適である。光は高速で伝搬するため時間的精度も極めて高い。また、波長さを選べば、細胞への影響も極めて少ないことがこれまでのイメージング研究などで広く実証されている。しかし、光刺激を用いて望みの場所に細胞を接着する技術や、光刺激を用いて細胞を取り外す技術はそれぞれ単独で幾つか報告されているが、任意の細胞の接着と脱離の両方を光刺激によって同時に実現できる技術は未だ存在しない。

本研究では、光応答性の分子ツールを用いて、任意の一細胞を基板上の望みの位置に望みのタイミングで瞬時に固定したり、取り外したりすることができる技術を開発する。この一細胞光操作技術を用いて、細胞の高精度な高速ソーティングを行う。近年、細胞生物学の基礎研究から再生医療までの幅広い分野において、一細胞レベルで細胞を正確に高速選別する技術が求められている。求められる技術も様々であり、数10%程度ずつ含まれる数種類の細胞を全て分取しないといけない場合もあれば、数万個に一個程度の「レア」な細胞を少数確実に選別する場合まである。本研究で開発する技術を用いれば、光を用いて細胞を並べ、表現型を多角的に解析することによって正確に識別後、並列光照射によって少数でも多数でも目的の細胞のみを迅速に回収できる。また、この一細胞光操作技術を用いれば、選択的に目的の表現型の細胞のみを逆に固定化することも出来、「レア」な細胞の基板表面上への選別と培養、さらには、解析後の光回収を行うこともできる。さらに、光操作技術を用いて異種細胞を隣接させて並べれば、細胞間相互作用を人為的に誘起した状態で網羅的に解析することができ、細胞間で適切な相互作用を示した細胞のみを選択的に高速光回収することもできると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究によって、単一細胞を自由自在に固定化したりリリースしたりすることができる一細胞光操作技術に不可欠な二種類の新しい材料を開発した。まず、マイクロ流路内で単一細胞を確実に捕捉できる、固定化力の強い光分解性細胞固定化剤の開発に成功し、マイクロ流路内に精緻な一細胞アレイを構築できた。また、一定の流速下で光を照射することにより、この材料で固定した細胞をリリースすることも出来、現在、目的細胞の高速ソーティング技術に資する材料として応用研究を進めている。次に、光を照射して細胞を望みの位置に固定化後、別の波長の光を照射してリリースできる光スイッチ型の細胞固定化剤の開発にも成功した。紫外光による固定と、可視光によるリリースを繰り返して行うことが出来、望みの配置で培養後に目的の機能を有する細胞のみを回収するツールとしての応用が期待される。また、詳細を記載しないが、これらの技術を用いて作成した一細胞アレイ上で、特定の GPCR の局在変化を追跡し、細胞間でのトラフィッキングのばらつきを定量評価したり、匂いセンサー細胞をアレイ化して匂いに応答する蛍光ディスプレイを構築したり、一細胞光操作技術の有用性を示す応用研究においても成果を得ることができた。さらに、マイクロ流路内に固定化した細胞のリリース条件の検討中に、マイクロ流体を用いて固定化した細胞を瞬時に破砕できることを発見し、細胞膜の裏側の分子システムを一細胞レベルで定量解析できるユニークな技術へと発展させることができた。以上のように、本研究を通じて、今後幅広い応用が期待される一細胞光操作技術の基盤を構築でき、応用研究や発展研究も実施できた。

(2) 詳細

研究テーマ A「細胞固定化力の高い光分解性細胞固定化剤の開発」

任意の表面に一細胞アレイを調製でき、並べた細胞から光照射によって目的の細胞を回収することもできる光分解性細胞固定化剤の開発を行った。ポリエチレングリコール (PEG) と脂質とからなる高分子材料 (PEG 脂質) を基板に修飾すると、基板表面に提示された脂質部分と細胞膜とが相互作用し、細胞が自発的に固定化される。また、PEG と脂質との間に光分解性リンカー (photocleavable linker: PL) を挿入した分子 (光分解性 PEG 脂質) を合成し、この分子を修飾した基板に光を照射すると、リンカーの分解に伴って脂質がはずれ、細胞と非接着性の PEG が露出する。従って、この分子で基板表面を被覆し、細胞を固定化したい場所以外に光を照射すると、非照射領域のみに細胞が固定化される (図 1A)。さらに、固定化した細胞は、細胞膜と相互作用している脂質部分を光照射によって切り離すことにより、基板表面から取り外すこともできる (図 1A)。この光分解性 PEG 脂質を用いて、マイクロ流路内に並べた細胞から目的の細胞のみを光照射によって高速で選別するシステムの構築を目指して研究を行った。この目標を達成するには、光照射前はマイクロ流体のせん断応力を上回る固定化力で細胞を捕捉し、光照射後はその細胞固定化力がせん断応力を下回って細胞をリリースする必要がある。プロトタイプ的光分解性 PEG 脂質 (PEG-PL-oleyl) は、PL を挿入していない PEG 脂質 (PEG-oleyl) と比較して細胞固定化力が弱く、光照射後に細胞をリリースさせるのに必要な流速下 (1 mL/min) では、細胞を安定に保持し続けることが困難であった。そこで、細胞膜と相互作用する脂質部分 (oleyl 基) と PL との間の分子構造 (図 1B, X) を最適化し、細胞固定化力の向上を

目指した。その結果、oleyl 基と PL との間にオリゴエチレングリコール構造を挿入すると、細胞固定化力が向上し、5 mL/min の流速下でも 80%以上の細胞が底面に残存することが示された (図 1C)。また、オリゴエチレングリコールの長さを最適化した結果、8 回繰り返し構造が最適で、細胞残存率は 90%を超えた。さらに、固定化した細胞に光を照射したところ、光依存的なリリースが確認され、3 J/cm² 以上の照射により、ほぼ全ての細胞がリリースされた。本研究成果は、特許出願し、現在論文投稿中である。本成果をもとに、企業と共同で細胞ソーティング装置の開発を実施している。

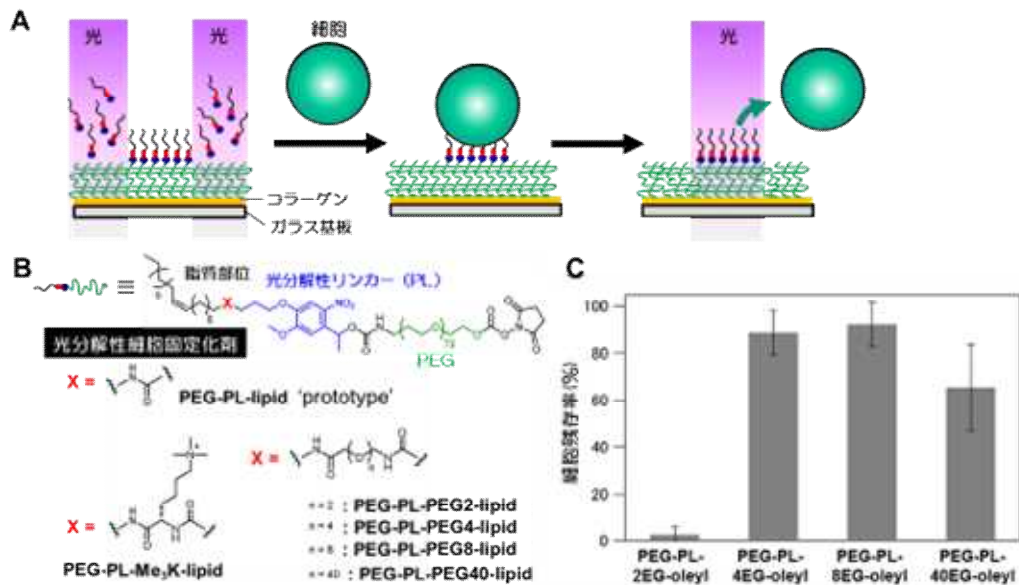


図 1 細胞固定化力の高い光分解性細胞固定化剤の概念図(A)と構造式(B)、細胞固定化時の細胞残存率(流速 5 mL/min 下)

研究テーマ B「光スイッチ型細胞固定化剤の開発」

上記の「研究のねらい」で書いたとおり、細胞の固定化とリリースのどちらか一方を光誘起する材料は多く報告されているが、異なる二波長の光を用いて脱離と固定のどちらも誘起できる光スイッチ型の細胞固定化剤はほとんど報告されていない。特に、細胞の接着性を利用せず、任意の細胞に応用可能な技術は皆無である。そこで、PEG 脂質骨格を用い、任意の細胞と基材表面との相互作用を光によってスイッチできる化合物の開発を試みた。我々は、これまでの研究の中で、脂質部位の疎水性が高過ぎると PEG 脂質修飾表面に細胞を固定化できないことに気が付いていた。そこで、脂質部分の疎水性を光照射に応じて可逆的に変えることにより、光スイッチ型の PEG 脂質修飾表面が開発できると考えた。ここで、光異性化に伴って疎水性が変化するスピロピランに注目した。スピロピランは、紫外光を照射すると開環して疎水性の低いメロシアン(MC)構造をとり、可視光を照射すると再度閉環して疎水性の高いスピロピラン(SP)構造に戻る。PEG 脂質の脂質部位にスピロピランを導入すれば、疎水性の高い SP 構造時に細胞を固定化しないが、MC 構造に変換すると固定化するようになると思った(図 2A)。

まず、PEG と oleyl 基との間に分岐リンカーを介して、スピロピランを導入したプロトタイプの化合物(図 2B、[0Sp2]-NHS)を設計・合成した。この化合物を基板表面に修飾し、紫外光(360 nm)または可視光(520 nm)を照射後、細胞を作用させ、表面に捕捉された細胞の数を定量し

た。その結果、固定化力を「オフ」にするはずの可視光照射によっても細胞が固定された(図 2C)。これより、プロトタイプでは、「オフ」の SP 構造時の疎水性の高さが不十分であると考え、より疎水性の高い 5 つの化合物を合成して同様の実験に供した。その結果、スピロピランをつなぐリンカーを長くすることによって疎水性を強めた化合物の 1 つ ([0Sp6]-NHS) が、望み通りのきれいなオンオフ制御を示した(図 2C)。この分子を修飾した表面を用いて空間的な制御を試みたところ、紫外光照射領域のみへの選択的な固定や(図 2E 左)、可視光照射領域のみからの選択的な脱離が可能であった(図 2E 右)。また、本手法を用いて細胞を固定・脱着させた細胞の生存率を調べたところ、未処理の細胞と全く同じであった。さらに、紫外光と可視光とを交互に照射して細胞の固定と脱着を繰り返し行ってみた。その結果、10 回程度のオンオフ制御に成功した(図 2D)。本研究成果は、特許出願後、ACS Applied Bio Materials 誌に掲載された。

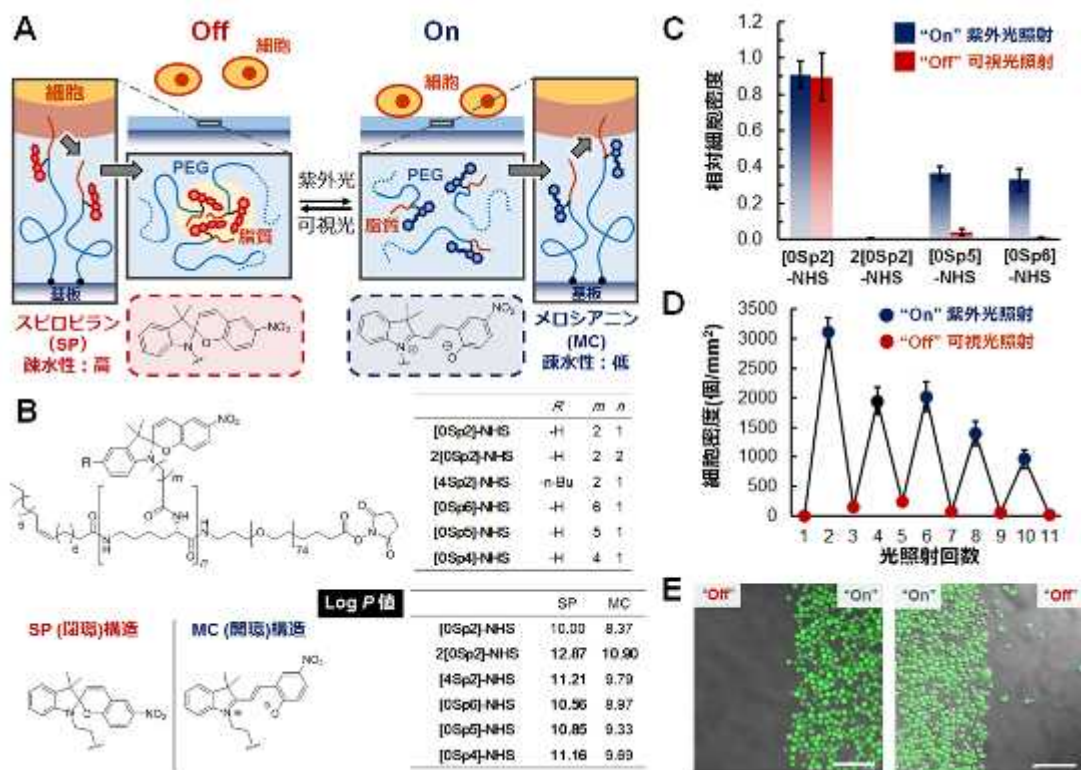


図 2 光スイッチ型 PEG 脂質による細胞固定化の概念図(A)と構造式(B)、細胞固定化時の細胞固定化密度の光依存性(C)(D)、光に応じた固定化またはリリース後の顕微鏡画像(E)。

研究テーマ C「細胞膜の裏側観察技術の開発」

細胞膜の細胞質側表面近傍にはシグナル伝達の鍵となる因子が多く存在しており、その分子ネットワークの解明は、細胞生物学の基礎研究や創薬における重要な研究課題である。しかし、細胞膜の選択的な透過性により、細胞外から細胞膜の細胞質側表面上の因子に分子デバイスをアクセスさせることが制限される。従って、細胞表層の分子と同じように、抗体や合成阻害剤ライブラリーを作用させ、可視化したり機能制御したりするのは困難である。そこで、本研究では、細胞膜内面に簡単にアクセスする方法として、マイクロ流体の剪断応力を用いて瞬時に細胞を破碎し、直前まで生きていた細胞の細胞膜内面を観察する方法を開発した(図 3a)。マイクロ流路の底面に PEG 脂質を用いて細胞を固定化した後、マイクロ流路に種々の流

速で層流を1分間流し、その前後で底面を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、流速の増加に伴い、基板上にシート状の細胞膜だけが残ることを確認した。この細胞膜シート上に、細胞膜内面が露出しているかを確認するために、予め細胞質側だけにタグ配列を導入した膜タンパク質を発現させておき、タグ配列に対する抗体を作用させたところ、高速の層流を流した場合のみ抗体染色が見られた(図 3c)。また、この細胞膜シートを電子顕微鏡で観察したところ、細胞側面で切断されている像が得られた(図 3b)。また、シート表面に繊維状や球状の構造体が残存していることも観察された。さらに、この細胞膜シート上で、細胞破碎直前にリガンド刺激をした受容体の細胞内ドメインのリン酸化を一細胞レベルで可視化・解析することにも成功した。以上の結果より、本技術を用いて直前まで生きていた細胞の細胞質側の分子システムを観察できることが確認された。本研究成果は、*Scientific Reports* 誌に掲載された。

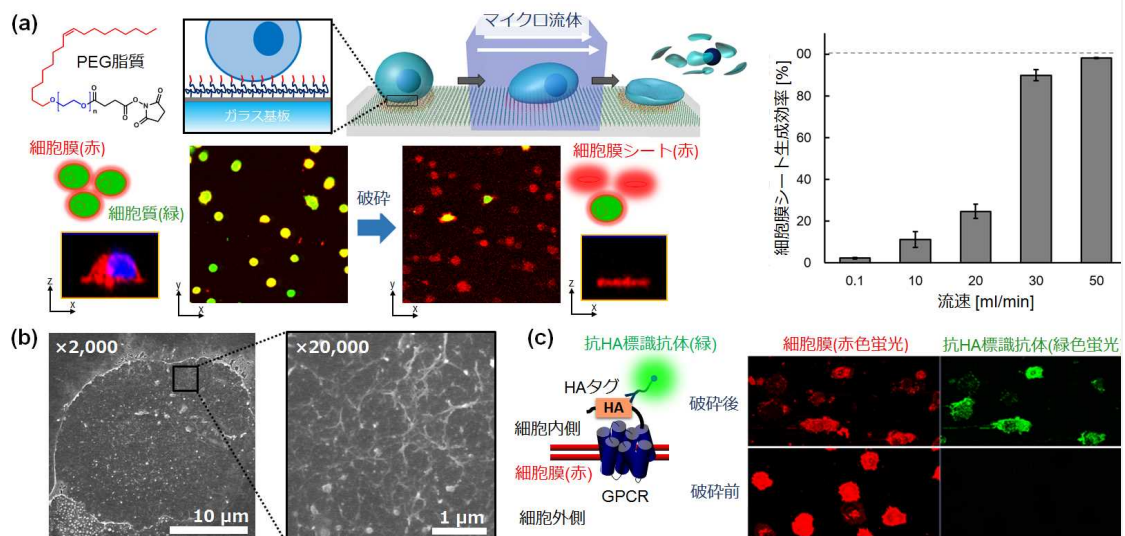


図 3 細胞膜の裏側解析技術の概念図と破碎前後の細胞の蛍光顕微鏡像および細胞膜シートの生成率(a)、細胞膜裏側の電子顕微鏡像(b)、裏側の GPCR のドメイン染色(c)。

3. 今後の展開

今後は、本研究で開発した一細胞光操作技術を基盤として、精緻に配置した細胞アレイ上で継時的なイメージングを指標にして識別した細胞を、高速かつ正確に選別できる技術や装置を開発する。このような装置を使って、従来法では選別出来なかった疾患関連の細胞を正確に単離して調べ、新しい薬剤標的の探索や疾患の分子メカニズムの解明に応用する。また、疾患の悪性度や治療効果に直結する表現型を指標にして細胞を選別し、確度の高い細胞診断や治療効果の高い細胞療法の実現に資することを示す。このように、創薬や診断、治療を支援する新しいプラットフォーム技術として、一細胞光操作技術の社会実装を実現したい。

4. 自己評価

任意の一細胞を基板上の望みの位置に望みのタイミングで瞬時に固定化したり、リリースしたりすることができる技術を開発するという本研究目的は、固定化力の高い光分解性細胞固定化剤や光スイッチ型細胞固定化剤の開発により、当初の計画とは異なる方法ではあるが、達成できたと言える。また、当初計画した方法でも開発を進めており、上記の成果とは異なるメリットを

有する技術が開発できる目途は立った。研究実施体制や研究費執行状況についても、概ね計画通りに進行し、研究の遂行に必要な人員の確保と最低限の機器の整備が行えた。一方で、高速細胞操作を可能とする精密な光照射装置については、予算内では当初想定していた能力の装置が購入できず、応用研究の面で小規模な原理の証明までしか達成できなかった要因の一つとなった。しかし、今回開発した一細胞光操作技術を基盤として、単一細胞の光ソーティングや、異種細胞間相互作用の人為的な創出・解析についての萌芽的な技術が構築できた。この成果は、従来法では単離できなかった疾患関連細胞や治療用細胞を選別でき、難治性疾患の創薬標的の探索や確度の高い次世代診断・治療技術の実用化に大きく貢献できる。このような創薬や診断、治療を支援する新しい技術は、手術の要らない投薬による在宅治療の拡充や、正確なコンパニオン診断による効果的な初期治療、超早期診断による未病治療などを通じて、高齢化社会の医療費問題を解決できると考えられる。さらに、健康寿命を延ばすことにより、国民全員が生涯現役で働き続けられる健康で豊かな未来社会の創造にも貢献できると考えられる。

また、本「統一細胞」領域では、実験計画に過度に捕らわれない柔軟な研究の遂行が理解され、条件検討の過程で偶々見つけた細胞破碎現象から、細胞膜の裏側解析システムを創出するに当たり、細胞膜の裏側を高解像度で観察する技術の提供や想定される応用分野についての多くのアドバイスを頂いた。加えて、我々の要素技術を活用する共同研究も5件実施しており、領域内の異分野の研究者との人的交流を積極的に行った成果の一つであると自負している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shin Izuta, Satoshi Yamaguchi, Akimitsu Okamoto. Reversible and photoresponsive immobilization of nonadherent cells by spiropyran-conjugated PEG-lipids. *ACS Applied Bio Materials*. 2019, **2**, 33–38.
2. Shin Izuta, Satoshi Yamaguchi, Ryuji Misawa, Shinya Yamahira, Modong Tan, Masahiro Kawahara, Tomoko Suzuki, Tomoko Takagi, Kae Sato, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune, Akimitsu Okamoto. Microfluidic preparation of anchored cell membrane sheets for in vitro analyses and manipulation of the cytoplasmic face. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 14962.
3. Mondong Tan, Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune. Quantitative image cytometry for analyzing intracellular trafficking of G protein-coupled receptors on a chemically trapping single cell array. *Lab on a Chip*. 2017, **17**, 1933–1938.
4. Mondong Tan, Satoshi Yamaguchi, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune. Real-time monitoring of pH-dependent intracellular trafficking of ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 in living leukocytes. *Journal of Bioscience Bioengineering*. 2018, **126**, 363–370.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件

公開済み1件

1.

発明者:山口 哲志, 岡本 晃充, ナタリア・テレサ・ヤジェンブス, 泉田 森, 山平 真也,
長棟 輝行

発明の名称 :光分解性細胞固定化剤

出願人:国立大学法人東京大学

出願日:2017/11/7

出願番号 :2017-214107

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(招待講演)

1. 山口 哲志,

光応答性分子ツールを用いた細胞操作および解析,

化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会, 群馬, 桐生市民文化会館, 10月2017年.

2. Satoshi Yamaguchi,

Chemical tools working at bio-interfaces for Bioengineering,

Asian Engineering Dean's Forum, Singapore, March 2017.

(国際学会口頭発表)

3. Satoshi Yamaguchi, Shin Izuta, Shinya Yamahira, Teruyuki Nagamune, Akimitsu Okamoto,

Photo-responsive cell immobilizing reagents for single-cell manipulation,

The 18th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2018), Montréal, Canada,

August 2018.

(著作物)

4. 細金 剛, 山口 哲志, 岡本 晃充,

光応答性分子を用いた1細胞解析・選別技術,

化学とマイクロ・ナノシステム学会誌, 17, 2017.