

博士論文（要約）

光応答性 PEG 脂質を用いた 一細胞配置・操作技術の開発

東京大学工学系研究科
バイオエンジニアリング専攻
長棟研究室

山平 真也

第一章 緒言

再生医療の現場から細胞生物学の基礎研究までの幅広い分野において、スマートマテリアルを用いて一細胞単位で細胞を配置・操作する技術が注目されている。例えば、細胞と相互作用するスマートマテリアルを、特異的な刺激によって一細胞レベルのサイズで基板表面に配置することによって、一細胞単位の配置が可能となる。この技術によって細胞をアレイ状に配置した一細胞アレイでは、規格化された一細胞単位の画像が容易に取得できるため、画像解析プログラムを用いたハイスループットな多角的定量解析が可能となる。さらに、刺激に応じて分解するスマートマテリアルによって構成された表面に一細胞アレイ状に細胞を接着させ、特定の一細胞の接着する表面を分解することによって、一細胞アレイ解析後に一細胞単位での遊離操作が可能となる。この手法を用いることにより、一細胞単位で有用細胞をソーティング可能である。また、刺激に応じて細胞が接着可能となるスマートマテリアル表面を用い、一細胞サイズの刺激と細胞播種を繰り返すことにより、複数種類の細胞の一細胞配置が可能となる。複数種類の細胞を、一細胞単位で任意の位置に配置できれば、一細胞単位の複数種間ネットワーク、組織、さらには複雑な構造を持つ臓器の精密再構築といった、基礎研究用の組織モデルや移植用臓器作製の強力なツールとなる。刺激の種類としては、光を用いる手法が時空間分解能に優れており、任意のタイミングで一細胞単位での細胞配置・操作を可能とする。また、広い面積に同時に刺激を与えることが可能であるため、一細胞単位の同時並列操作も可能であり、スループット性に優れる。スマートマテリアルを用いた、この”一細胞アレイ”、”一細胞操作”、”複数種類の一細胞配置”の三種類の一細胞配置・操作技術は、次世代の細胞研究である「一細胞研究」において非常に強力なツールとなると考えられている。

細胞研究において、以前は、細胞サンプルはおおよそ均一と考えられていたため、ウェル単位やディッシュ単位で細胞集団の平均値を求める研究が主要であった。しかし、近年、ガン幹細胞、血中循環腫瘍細胞(CTC)といった希少細胞の発見や、エピジェネティクスなどの分子レベルで個々の細胞を詳細に調べる研究によって、均一に見える細胞集団でも個々の細胞が個性を持つことが解ってきている。したがって、これまでの実験手法であった 1 ウェル=1 サンプルではなく、1 細胞=1 サンプルとしての研究を可能とする実験ツールが必要となっている。特に、生命現象の理解、有用な細胞の選択、組織モデルや再生医療用組織・臓器の構築といった、細胞生物学の根幹をなす重要な題目に直結する、細胞解析ツール、細胞選択ツール、そして複数種細胞の組織化ツールの三種類の一細胞配置・操作技術は、その開発が急務となっている。

既存の一細胞配置・操作技術を可能とする光駆動型のスマートマテリアルは、細胞と相互作用する分子として細胞接着性分子や接着阻害性分子を用い、細胞接着の制御を原理として配置・操作を行っている。そのため、これらの手法は、一部の幹細胞やがん細胞、免疫細胞など、学術的にも産業的にも重要な細胞を含む、弱接着性・非接着性の細胞には適用できない。したがって、これらの細胞にも適用可能な一細胞配置・操作を可能とするス

スマートマテリアルが必要とされている。そこで本研究では、ポリエチレングリコール(PEG)脂質に着目した。PEG 脂質は、細胞の接着性に依存せず細胞を固定化可能であるため、接着性細胞にも非接着性細胞にも利用可能と考えられた。また、抗体等のタンパク質と異なり、有機合成によって自由に分子をデザインすることが可能であるため、スマートマテリアルの骨格として大きな発展の可能性を備えると考えた。そこで、本研究では、接着性・非接着性細胞の一細胞研究に有用な研究ツールの創出のために、細胞の自発的な接着性を必要とせず一細胞の配置・操作を可能とする PEG 脂質を骨格としたスマートマテリアルの開発を目的とした。

第二章 光分解性 PEG 脂質を用いた一細胞アレイ法の開発

接着性・非接着性細胞に適用可能な一細胞アレイ法として利用可能な、PEG 脂質を骨格としたスマートマテリアルの開発を行った。そこで、細胞膜と相互作用する oleyl 基、光分解性リンカー、PEG、活性カルボン酸が直列につながった光分解性 PEG 脂質を設計・合成した。この光分解性 PEG 脂質を修飾した基板に細胞を作用させると、oleyl 基と細胞膜が相互作用し細胞を迅速に固定化できる。一方、この基板に紫外光を照射すると、光分解によって oleyl 基が脱離し、細胞が固定化されない表面となる。したがって、任意のパターンの光を予め照射することにより、非照射表面にのみ細胞が固定化された細胞パターンが作製できる。コラーゲン表面に光分解性 PEG 脂質を修飾し、スポットサイズの最適化された光パターンを、フォトマスクを用いたコンタクト露光により照射したところ、非接着性または接着性細胞が一スポットに一細胞ずつ高確率に固定化された一細胞アレイが作製できた。これより、接着性に関わらず幅広い細胞に応用可能な一細胞アレイ技術が開発できた。さらに、接着性細胞の一細胞アレイを培養したところ、細胞の伸展・運動・細胞間接触が観察された。従来法では、物理的・化学的に細胞の接着領域や遊走領域を制限することにより一細胞アレイを構築する。したがって、遊走や細胞間相互作用といった重要な細胞機能が大きく阻害されるため、解析対象にできる細胞機能が制限されてしまう。また、人為的な細胞形態・運動制御により、アーティファクトが起きてしまう可能性もあった。一方、本技術では、細胞は PEG 脂質によって一時的に仮止めされるだけで、伸展や遊走等の重要な細胞機能の発現が可能であるため、一細胞アレイ上で様々な細胞アッセイを行うことができる。実際に画像解析プログラムを作製し、一細胞アレイのタイムラプス画像に適用したところ、継時的な非接着性細胞の形態変化や接着性細胞のランダムウォークの定量化に成功した。

第三章 ハイスループットな細胞光選択を可能とする光分解性 PEG 脂質表面

一細胞アレイ上で細胞の画像解析を行った後に、望みの細胞を回収する既存の手法としてマイクロマニピュレーターを用いた細胞回収法がある。しかし、この既存法では一細胞ずつの回収しかできず、スループット性に欠けるという課題がある。そこで、光分解性 PEG

脂質表面に一細胞アレイを作製して、望みの細胞に光を照射して光分解性 PEG 脂質の分解によって細胞を基板から遊離することを試みた。まず、細胞光遊離が可能な光分解性 PEG 脂質を修飾した BSA 表面を用いて実験を行ったところ、フォトマスクによる物理的接触によってタンパク質吸着表面が損傷したと考えられ、コンタクト露光による精密な一細胞アレイ作製ができなかった。一方、コラーゲンや APTES に修飾した表面では、一細胞アレイは作製できたが、光分解性 PEG 脂質を介さない細胞-基板表面間相互作用が起きたと考えられ、精密な光遊離は不可能であった。これらの結果を基に、安定した表面コート層作製が可能であり、光照射後に細胞不活性化表面となる新規の光分解性 PEG 脂質を設計・合成した。この分子をコートした表面では、コンタクト露光による一細胞アレイ作製が可能であった。さらに、流路を用いて均一なせん断応力を負荷することにより、任意の細胞を一細胞単位で同時並列的に光遊離することができた。このシステムでは、複数の細胞に光を短時間照射するだけで、ハイスループットに目的細胞の回収・不要細胞の除去ができる。市販のマイクロマニピュレーターとマイクロウェルアレイによる全自動細胞選択装置では、細胞選択に 30 秒/アレイスポットの時間を必要とするが、本手法では 5 秒/アレイスポット(3 分の光照射と 1 分の流速負荷/48 細胞含有スポット) の迅速な選択的細胞光遊離を実現した。

第四章 光活性化 PEG 脂質による複数種細胞の一細胞配置法

第一章で述べたとおり、刺激に応じて細胞が接着するようになるスマートマテリアル表面を用い、一細胞サイズの刺激と細胞播種を繰り返せば、複数種類の細胞の一細胞パターンニングが可能となると考えられる。実際に既存の手法として、光刺激に応じて細胞接着性を発現するスマートマテリアルを用いた、複数種類の細胞の配置方法が報告されている。しかし、既存の手法は細胞接着性を必要とするため、免疫の構築に重要となる B 細胞と T 細胞間の抗原情報の伝達における研究など、非接着細胞の複数種類一細胞研究には用いることができない。また、一種類の細胞を配置するのに、数時間以上かかる細胞接着を待たなければならず、細胞の種類数によっては、数日単位の作製時間がかかる。そこで、これまで用いてきた光分解性 PEG 脂質とは逆に、光で細胞固定化機能が活性化する PEG 脂質を骨格としたスマートマテリアルを開発することによって、非接着細胞にも適用可能であり、迅速な複数種類の一細胞配置が可能となると考えた。そこで、新奇な光活性化機構を備えた PEG 脂質を新たに設計・合成した。これを修飾したフィルムに光照射と細胞播種を繰り返すことによって、異なる蛍光色を示す非接着性細胞の一細胞アレイを同領域に構築することに成功した。細胞を配置するのに要した光照射・細胞播種・洗浄の時間は、一種類当たり 1 時間程度であった。

第五章 結言と展望

PEG 脂質への光応答性の付与を基礎とし、それぞれの課題の解決のために、適切な分子デザインを行い、一細胞研究に有用な 3 種類のスマートマテリアルの開発に成功した。ま

ず、光分解性 PEG 脂質を開発し、コラーゲンコート表面の細胞活性を活かした、接着性・非接着性細胞共に適用可能な一細胞アレイの構築を可能とした。次に、一細胞アレイからの細胞光遊離に適した新たな光分解性 PEG 脂質をデザインし、さらにマイクロ流路技術と組み合わせることによって、一細胞光遊離の同時並列操作を可能とした。最後に、新奇な光活性化機構を備えた PEG 脂質の開発に成功し、複数種類の一細胞配置を可能とした。以上の様に、本博士論文研究では、接着性・非接着性細胞の一細胞配置・操作に有用なツールとして光応答性 PEG 脂質の開発に成功した。また、本研究において発揮されたスマートマテリアルの特徴である、分子デザインによる自在な機能設計、デバイス等の他の技術との統合の容易さは、本技術のさらなる発展可能性を示すものであった。

今後、様々な分野の研究者と共同研究を行うことにより、幅広い医工学分野において、本技術の実用化が期待される。