

細胞融合用基板としての細胞マイクロアレイへの PEG 固定化と 表面性状の評価

今城 明典*1, 永岡 志穂*2, 崔 源煥*3, 永島 正嗣*3, 白石 浩平*4

Immobilization of PEG onto cell microarrays as a substrate for cell fusion and evaluation of their surface properties

Akinori IMAJO*1, Shiho NAGAOKA*2, Wonhwan CHOI*3,
Masatsugu NAGASHIMA*3, and Kohei SHIRAIISHI*4

To prepare a surface-modified microarray (μ Ay) on both PEG segments and specific protein binding sites as a substrate for high-efficiency cell fusion, PEG macromonomer (macPEG) [P(macPEG)] or/and N-succinimidyl arylate (NAS) and macPEG copolymer [P(macPEG-co-NAS)] with different compositions were selectively immobilized on the glass spots of the μ Ay by using surface-initiated radical copolymerization. Two kinds of selective immobilization methods of 3-aminopropyltrimethoxysilane were attempted on a glass substrate as a model of spots of μ Ay by using 1) vapor deposition and 2) immersion in the solution, and evaluated their surfaces from the scanning probe microscope (SPM) and water contact angle measurements. Poly(macPEG) and poly-(macPEG-co-NAS) chains as brushes were observed on the glass (g-glass). As a result, the SPM images and wettability based on the immobilized polymers on the g-glasses were changed by changing treated methods of alkoxy silane.

Keywords: PEG immobilization, Surface-initiated radical polymerization, Cell microarray, Cell fusion, Vapor deposition method

1. はじめに

体細胞から誘導可能となった人工多能性幹細胞(iPS)細胞の開発により, ①事故や病気等で失われた組織を自身の幹細胞を使って形や機能を再生する医療技術⁽¹⁾, ②疾患の機序解明や治療法選択^{(2),(3)}, ③DNAリプログラミング⁽⁴⁾や幹細胞研究等への様々な応用が21世紀の最先端医療及び科学技術等の飛躍的な発展が期待され, 角膜移植では実用化レベルとなっている⁽¹⁾. また, iPS細胞から分化誘導される細胞によって, 臓器特異的な患者自身の細胞の入手が可能となり, オーダーメイドな薬剤探索, 新薬開発の新しいルート形成及び関連研究が深化し加速すると考えられる⁽⁵⁾. さらに, 新薬開発スクリーニングでの動物実験の軽減, 機能性食品, 生理活性物質,

環境ホルモンの探査のハイスループット評価等多方面への波及が考えられ, 多くの新産業創出も見込まれている⁽⁶⁾.

ヒト人工染色体(HAC)技術⁽⁷⁾は, ①巨大遺伝子群の導入, ②宿主染色体上の遺伝子を破壊しない, ③導入遺伝子の過剰発現や発現消失が起きず発現が変化しない, ④導入遺伝子の発現を自由制御できる等の特長をもち, iPS細胞作製⁽⁸⁾を始め, 安心安全な再生医療技術の1つでもある. その他, ヒト型実験動物の作製, 筋ジストロフィー等の巨大遺伝子の欠損治療等の応用研究^{(9),(10)}を始め, 先端医療を担う技術として多大な注目をされている. 一方, HACベクターは微小核細胞(マイクロセル: MC)として生成し, 受容細胞との細胞融合による移入(微小核細胞融合

原稿受付 2016年5月7日

*1 近畿大学大学院 システム工学研究科 システム工学専攻 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

*2 近畿大学工学部 化学生命工学科 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

*3 エステック株式会社 技術部 (〒699-0101 島根県松江市東出雲町掛屋2797-3)

*4 近畿大学大学院 システム工学研究科 システム工学専攻 教授, 工学部 化学生命工学科 教授, 次世代基盤技術研究所 教授 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

連絡先: 白石浩平 (研究代表者) E-mail siraisi@hiro.kindai.ac.jp

法：MMCT)のため、従来法で最大で0.0001%と融合効率は極めて低率である。ヒト細胞膜上の受容体結合性の麻疹ウイルスエンベロプタンパク質で処理したMC⁽¹¹⁾を用いて融合効率の向上が検討されているが、融合効率は0.001%程度とさらなる向上が求められる。また、麻疹ウイルス表面提示法は、ヒト型細胞に限定されるため、他細胞種への汎用性の高い手法も求められる。既存の細胞融合技術⁽¹²⁾として知られている高濃度のポリエチレングリコール(PEG)を用いたPEG法⁽¹³⁾⁻⁽¹⁷⁾や電気融合法⁽¹⁸⁾⁻⁽²²⁾は2種の細胞をランダムな混合状態で融合するため、目的とする2細胞が融合する事は極めて偶発的であり、同種の細胞や3個以上の細胞の融合、全く融合しない細胞が多数を占める。また、融合効率や細胞へのダメージまたは、使用できる細胞種などにも限界があることなどが課題として挙げられている。従来法では、細胞-細胞間の接触や膜融合を促進させるため、多数のHAC含有MCと受容細胞を使用して、30%~50%の高濃度ポリエチレングリコール(PEG)水溶液中で、数分間に限定して細胞融合している。受容細胞とMCの接触を高め、細胞へのダメージの大きい高濃度PEG溶液の使用を避け、融合効率を高めることはHAC技術を発展させるために最も重要な課題の1つである。

本研究では、融合助剤としてのPEG鎖を細胞接着面に固相化したマイクロアレイ(μ Ay)を調製し、 μ Ayへの細胞集積によるMCと受容細胞の接触効率の増大と、接着面でのPEG鎖により、低・非侵襲的な融合促進を目的とした。固相化PEGでは、集積した細胞接触面のみで細胞懸濁液全体は、通常の培養条件であるため、長時間の融合も可能である。さらに、細胞融合が促進される μ Ay基板上では、細胞サイズよりも微小となる遺伝子やタンパク質等の物質の移入はさらに容易であり、細胞内物質導入基板としての応用も可能であると考えられる。このとき、 μ Ay基板上の細胞接着面のガラススポットにガラス特異的なシランカップリング剤を固定化する。分子、微粒子、クラスターなどの微小要素が自発的に集合し、規則的な配列を形作ることを自己集積化現象といい、シランカップリング剤の固定化にはこの現象を利用した。固定化方法として蒸着法(気相法)や浸漬法(液相法)等がある。蒸着法の浸漬法と比較した場合の利点として、溶媒を使わないために廃液が出ないこと、有機シラン分子が重合してできる粒子状の堆積物が少ないことが挙げられ⁽²³⁾、本法ではこの蒸着法に着目し、固相化するPEGセグメントの高密度化を目指した。その後、PEGを固相化すると共に、PEGセグメント中には、細胞膜上のタンパク質のNH₂基との反応部位があるスクシンイミド基をもつN-succinimidyl acrylate(NAS)を導入した。PEGセグメ

ントを側鎖もつメタクリル酸系マクロモノマーPoly(ethylene glycol)methyl ether methacrylate(Mn: 1,100)[macPEG]を固相化したP(macPEG)及びP(macPEG-co-NAS)グラフト化ガラス及び μ Ayを調製した種調製したg μ Ayを走査型プローブ顕微鏡(SPM)測定及び水接触角(θ)測定から評価した。

2. 実験方法

2.1 試薬

硫酸(和光純薬(株)製)、過酸化水素(関東化学(株)製)、3-aminopropyltrimethoxysilane[APMSi](東京化成(株)製)、N,N-dimethylformamide(脱水)[DMF](和光純薬(株)製)、triethylamine[TEA](和光純薬(株)製)を塩化カリウムによって脱水したものを用いた。NAS(東京化成(株)製)、macPEG(Mn: 1,100)(Aldrich製)はジエチルエーテルに溶解後に-80°Cに冷却して再沈殿によって精製した。マイクロアレイ(μ Ay)はトーヨーエイテック(株)製を用いた。水はミリポア製Milli-Q synthesis型超純水製造装置を用いて精製して使用した。エタノール、クロロホルムの溶媒は、常法にしたがって精製した。

4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid chloride)[V501-Cl]は4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid)[V501](和光純薬(株)製)と五塩化リン[PCl₅](キシダ化学(株)製)から合成した。

2.2 浸漬法と蒸着法を用いたmacPEGグラフト化ガラス[poly(macPEG)-g-glass]とmacPEG/NAS共重合体グラフト化ガラス[poly(macPEG-co-NAS)-g-glass]の調製

ガラス製シャーレを用い、ピランハ溶液[30%過酸化水素/18 M 硫酸=1/3(v/v)] 8 mLにカバーガラス(Fisher Blau)を入れ1 h浸漬し、水でカバーガラスを洗浄した後、エアークンプレッサーで空気を吹き付けて乾燥した。

[APMSi固定化ガラスの調製]

浸漬法: 0.179 g (1 mmol) APMSiのDMF溶液2 mLが入ったガラス製スクリュウ管にカバーガラスを入れ、60°C、3 h反応した。その後、DMFで15 min表面を洗浄した(Fig.1-A)。

蒸着-吊下げ法: 底が隠れる程度のAPMSiを褐色瓶に入れ、褐色瓶上部にピランハ処理を行ったガラス基板をクリップ等用いて吊下げ蓋をし、常温にて2 h静置し、反応した(Fig.1-B)。

蒸着-貼付け法: ガラス製シャーレに3 mLのAPMSiを入れ、蓋部分の内側に両面テープにてピランハ処理を行ったガラス基板を固定し、30°Cで2 h静置し、反応した(Fig.1-C)。

蒸着-静置法: ガラス製のシャーレに3 mLのAPMSiをとり、ピランハ処理を行ったガラス基板とシャーレを同密閉された容器に入れ、80°Cで2 h静置し、反応した(Fig.

1-D). いずれも固定化後は 80°C の乾燥機にて 30 min 乾燥させることにより焼き付けを行なった。

[重合開始剤固定化]

ガラス製スクリー管にアゾ開始剤 0.0315 g(0.1 mmol) V501-Cl を 1 mL のクロロホルムに溶解し, 30.6 μ L TEA を加えた。その混合したクロロホルム溶液に APMSi 固定化ガラスを浸し, 恒温槽で 30°C, 20 h 反応した。反応終了後, クロロホルムとメタノールに浸し, 室温で超音波洗浄した。

[表面開始グラフト重合]

ガラス製スクリー管に macPEG 1.65 g(1.5 mmol) はエタノール溶液 1 mL 加え, また, macPEG 0.99 g(0.9 mmol) と NAS 0.101 g(0.6 mmol) は 0.5 mL エタノールと 0.5 mL DMF の 1:1 混合溶液 1 mL 加え, V501-Cl 固定化ガラスを浸した。液体窒素浴中で凍結-脱気-窒素置換を繰り返した後, 恒温槽で 80°C, 20 h 重合した。重合後, エタノールに浸し, 室温で 3 回, 45 min 超音波洗浄した後, 真空乾燥し PEG 固定化 g-glass を得た。

管にアゾ開始剤 0.0315 g(0.1 mmol) V501-Cl を 1 mL のクロロホルムに溶解し, 30.6 μ L TEA を加えた。その混合したクロロホルム溶液に APMSi 固定化ガラスを浸し, 恒温槽で 30°C, 20 h 反応した。反応終了後, クロロホルムとメタノールで超音波洗浄した。ガラス製スクリー管に macPEG 1.65 g(1.5 mmol) とエタノール溶液 1 mL 加え, V501-Cl 固定化ガラスを浸し, 液体窒素浴中で凍結-脱気-窒素置換を繰り返した後, 恒温槽で 80°C, 20 h 重合した。重合後, エタノールに浸し, 室温で 3 回, 45 min 超音波洗浄した後, 真空乾燥し g- μ Ay を得た。



Fig.2. 蒸着-貼付け法による μ Ay への APMSi の固定化 (μ Ay: 図中長方形)

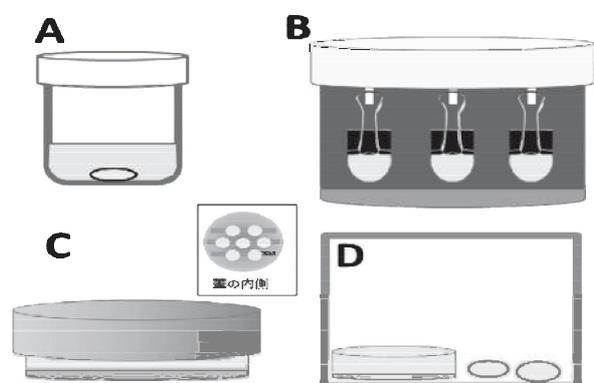


Fig.1. 浸漬法と蒸着法によるガラス基板への APMSi の固定化 (ガラス基板: 図中円)

2.3 蒸着-貼付け法を用いた macPEG グラフト化アレイ [poly(macPEG)-g- μ Ay] の調製

ガラス製シャーレを用い, ピランハ溶液[30%過酸化水素/18 M 硫酸=1/3(v/v)]8 mL にカバーガラスを入れ 1 h 浸漬し, 水でカバーガラスを洗浄した後, エアーコンプレッサーで空気を吹き付けて乾燥した。

蒸着-貼付け法: ガラス製シャーレに 3 mL の APMSi を入れ, 蓋部分の内側に両面テープにてピランハ処理を行った μ Ay 基板を固定し, 30°C で 2 h 静置し, 反応した (Fig.2)。固定化後は 80°C の乾燥機にて 30 min 乾燥させることにより焼き付けを行なった。ガラス製スクリー

2.4 g-glass 及び g- μ Ay 表面のキャラクタリゼーション

水に対する接触角は SImage Entry (エキシマ(株)製)を用いて室温(25°C)で測定した。基板上に 10 μ L の水滴を置いた。1 min 以内に水滴の左右の接触角を測定した。測定は計 5 回のうち, 最大値及び最小値を除いた平均を接触角とした。また, 走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の測定は Shimadzu 製 SPM-9500J3 型 (カンチレバーに Innovation Solutions Bulgaria Ltd. 製 Budget sensors Tap300AI-G) を用い, 大気雰囲気中で, 走査範囲: 30 μ m \times 30 μ m, 走査速度: 0.5 Hz とし, 位相検出システムによる表面の高低測定及び粘弾性測定から評価した。

3. 結果と考察

3.1 浸漬法と蒸着法を用いた macPEG グラフト化ガラス [poly(macPEG)-g-glass] と macPEG/NAS 共重合体グラフト化ガラス [poly(macPEG-co-NAS)-g-glass] のキャラクタリゼーション

浸漬法では, APMSi に混合するための溶媒や浸漬後の基板洗浄用有機溶媒等の廃液の増加や洗浄用有機溶媒の乾燥が必要である。また, APMSi の有機シラン分子が重合してできる粒子状の堆積物が多いため, ポリマー固定の足場となるアミノ基を密に固定化できないことが挙げられる。APMSi 固定化モデルとしては, ピランハ処理し親水性となったガラス基板にシラン分子が吸着することにより, 末端のアミノ基がガラス基板へ固定化され, ポリマー重合を行うための開始剤を固定化するための足場

となる。しかし、浸漬法ではこのシラン分子同士が重なり合って重合する可能性が高くなり、重合可能な末端アミノ基が埋もれ、基板表面に均一に固定化している状態とはいえ、結果としてガラス表面に APMSi が多数固定できて、開始剤を固定化可能なアミノ基の数が減少し、均一なポリマー固定が難しいと考えられる。一方、APMSi を蒸発させると、基板表面に SAM (Self-Assemble Monolayer) 膜と呼ばれる配向性を持つ自己修復膜が形成される。蒸着法では、溶媒の使用がなく廃液の減量となり、基板作製コストの削減や基板作製時間の短縮や工程も省略される。また、浸漬法での有機シラン分子の重合による粒子状の堆積物を減量できる利点をもつ。蒸着法を利用し、ガラス基板及び μAy のガラススポット上への高密度なポリマー固定法を検討し、新規開発した各蒸着法を浸漬法と比較を行なった。

作製したガラス基板でのポリマー修飾を確認するために、SPM 測定と水の接触角測定を行なった。水の接触角測定より未修飾ガラスでは $\theta=63^\circ$ であった。P(macPEG-co-NAS)-g-glass, P(macPEG)-g-glass での各 APMSi 固定化法における水の接触角を Table 1 に示す。APMSi 固定化法を変化させたそれぞれの g-glass は未処理ガラスと比べ全ての基板で表面の濡れ性が変化していた。P(macPEG) と P(macPEG-co-NAS) で比較すると、P(macPEG) がいずれも接触角が高く、疎水性となることが確認できた。これは、P(macPEG-co-NAS) に比べ、NAS の共重合によって、側鎖間の立体障害が低下し、基板表面上に固定化されている PEG 鎖の量・密度等が高くなったと推定している。表面開始重合後のガラス表面の poly(macPEG) と poly(macPEG-co-NAS) の修飾を確認するため、大気雰囲気下での表面での SPM 測定 ($30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$) の結果を Fig.3,4 に示す。未処理ガラスでは凹凸が無くナノスケールで平滑であることに対し、

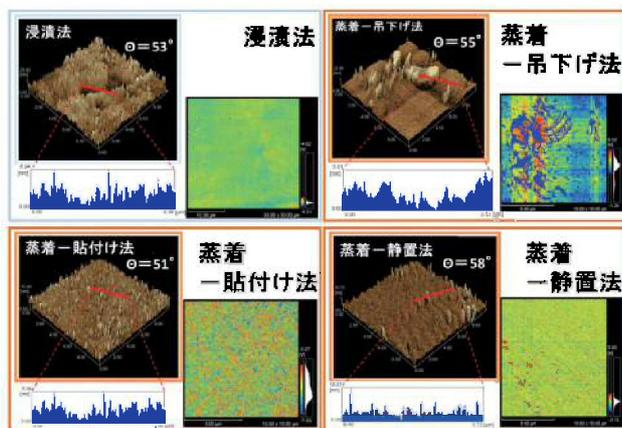


Fig.3. 浸漬法と蒸着法で作製した P(macPEG)-g-glass の SPM 像

APMSi 固定化法を変化した結果、吊下げ法、貼付け法、静置法で poly(macPEG) と poly(macPEG-co-NAS) をグラフト重合した g-glass では、それぞれ、これらにポリマー由来と考えられるナノスケールでのブラシ状の凹凸が表面上に観察された。

蒸着-吊下げ法では、P(macPEG)-g-glass 基板は相対的に粘性が低い部分が多く、基板表面にポリマー層が均一でない、下方からの APMSi 蒸気が基板に均一でなかったため、ポリマー固定化のムラが生じたと考えられる。また、蒸着-貼付け法では、P(macPEG-co-NAS)-g-glass, P(macPEG)-g-glass 全ての macPEG 鎖固定化基板において、浸漬法でのポリマー固定化基板よりも粘弾性変化、凹凸が少なく、浸漬法に認められる空隙様の凹凸も少ない。表面全体を均一にポリマー固定ができたと考えられる。これは、APMSi 蒸気が均一にガラス基板面に接触し、APMSi の SAM 膜が形成されたためと推定している。配向性の SAM 膜形成によってポリマー重合の足場となる APMSi のアミノ基末端が基板表面に均一に固定化されたため、ポリマー固定量及び表面の凹凸及び粘弾性像の均一性が高まったと考えられる。さらに、蒸着-静置法では、前述した蒸着法 2 法に比べ、基板から APMSi が離れて静置され、表面への固定化量の減少により、ポリマー固定量が低下し、他方と異なる表面性状に変化したと考える。従って、APMSi 蒸気の基板への均一な固定化基板と接触させるため、基板と APMSi の配置及び APMSi 蒸気流動性等の最適化が必要である。

Table 1. 異なる APMSi 固定化法により調製した PEG 鎖固定化ガラス表面の接触角

g-glass	従来法		蒸着法	
	浸漬法	吊下げ法	貼付け法	静置法
P(macPEG-co-NAS)-g-glass	43°	51°	38°	37°
P(macPEG)-g-glass	53°	55°	51°	58°

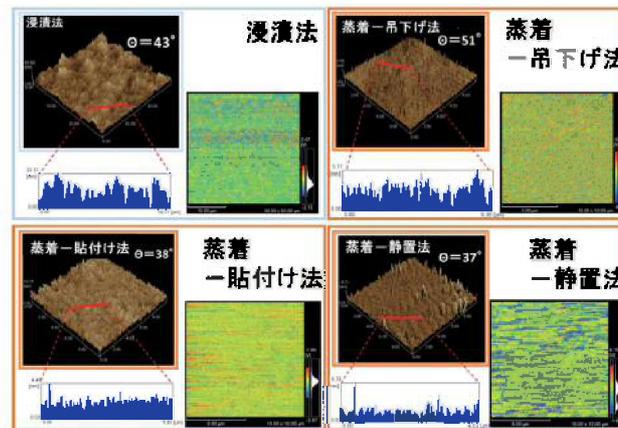


Fig.4. 浸漬法と蒸着法で作製した P(macPEG-co-NAS)-g-glass の SPM 像

3.2 蒸着-貼付け法を用いた macPEG グラフト化アレイ [poly (macPEG)-g- μ Ay] のキャラクタリゼーション

3.1 節の結果より、蒸着法を用いた APMSi の固定化法は蒸着-貼付け法が本研究では最適であると判断した。そこで、 μ Ay 基板への APMSi 固定化を蒸着-貼付け法により行い、本研究室で従来使用してきた浸漬法と比較・検討した。蒸着-貼付け法により、基板表面へのアミノ基固定化量を増やすことが可能で、ポリマー固定化密度や表面の均一性が増加すると考えられる。浸漬法と蒸着-貼付け法により作製した PEG ら鎖固定化 μ Ay の水の接触角測定の結果、未処理 μ Ay 基板は 75° であるのに対し、浸漬法、蒸着-貼付け法で作製した g- μ Ay はいずれも 55° と表面の濡れ性が向上した。浸漬法と蒸着-貼り付け法で接触角はほぼ同じの 55° であったが、浸漬法及び蒸着貼付け法で調製した μ Ay の SPM 測定による表面解析を行った結果、浸漬法で調製した μ Ay のポリマーブラシは、3.1 節の SPM 測定と同様に、表面の凹凸から、ポリマーブラシの均一性低下が考えられ、蒸着-貼り付け法により調製した μ Ay は凹凸が少なく均一な表面となり、接触角では判断できなかったが PEG 鎖が高密度していると考えられるが、詳細は現在検討中である。

また、蒸着貼付け法は浸漬法で作製した μ Ay よりも PEG 鎖を高密度に基板に固定することが可能であると考えられ、細胞融合による HAC 導入や DNA, siRNA, タンパク質等の導入用素材として有用性を検討している。

4. まとめ

①SPM 測定と水の接触角の測定結果により、各蒸着法のいずれもガラス面への PEG 鎖の固定化を認めた。

②浸漬法と蒸着法で作製したガラス基板では、P(macPEG-co-NAS)よりも P(macPEG)の濡れ性が増加した。

③蒸着法で調製したガラス及び μ Ay は浸漬法に比べて表面のポリマーブラシが均一化した。

④各蒸着法を検討した結果、蒸着-貼付け法が最適であると考えられる。

以上の結果から、浸漬法よりも蒸着法を用いて作製する基板が APMSi の基板表面への配向固定化により、ポリマーブラシが均一化と高密度化が可能であると考えられる。

本法を用いて作製する μ Ay は浸漬法で作製した μ Ay よりも細胞内への遺伝子導入補助剤である PEG 鎖の密度が増し、更なる遺伝子導入の効率化が期待される。

謝辞

本研究の一部は経済産業省地域イノベーション創出開

発事業 (H22 年度経済産業省) 及び戦略的基盤技術高度化推進事業 (H24 年度経済産業省) の支援によるものであり、ここに謝意を表します。

参考文献

- (1) S. Yamanaka *et al.*, *Cell*, 126 (4), (2006), 663, 高橋政代, 学術の動向, 14(8), (2009), p8-14.
- (2) T. Kondo *et al.*, *Cell Stem Cell*, 12, (2013), 487.
- (3) H. Chono *et al.*, *PLOS ONE*, 6(8), (2011), e23585.
- (4) T. Nakayama *et al.*, *RNA Biology*, 10(9), (2013), 1419.
- (5) H. Mizuguchi *et al.*, *PNAS*, 111(47), (2014), 16772.
- (6) 山中伸弥, “iPS 細胞の産業的応用技術”, シーエムシー出版, (2009).
- (7) 押村光雄ら, 生化学, 82(9), (2010), 846.
- (8) M. Oshimura *et al.*, *PLoS ONE*, 6(10), (2011), e25961.
- (9) 押村光雄ら, 臨床神経学, 52(11), (2012), 1139.
- (10) M. Oshimura *et al.*, *Molecular Therapy*, 18(2), (2010), 386.
- (11) M. Oshimura *et al.*, *BMC Biotechnology*, 10, (2010), 37.
- (12) 二見達ら, 東ソー研究・技術報告, 53, (2009), 11.
- (13) De St. Groth S.F *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 35, (1980), 1
- (14) N. Naoki *et al.*, *Polymer Journal*, 27(3), (1995), 211.
- (15) W. P. Thayer *et al.*, *Journal of Neuroscience Research*, 93(4), (2015), 572.
- (16) Arnab Sen *et al.*, *Research in Plant Biology*, 5(1), (2015), 20.
- (17) Cameron L. Ghergherehchi *et al.*, *Neural Regen Res*, 11(2), (2016), 217.
- (18) T. Nakamura *et al.*, *Plant Cell Physiol*, 20(7), (1979), 1441.
- (19) U. Zimmermann *et al.*, *Plant Physiol*, 67(4), (1981), 849.
- (20) U. Zimmermann *et al.*, *J. Biol. Phys.*, 10, (1982), 43.
- (21) Alexander M. Christov *et al.*, *Plant Physiol*, 100, (1992), 2008.
- (22) Eberhard Neumann *et al.*, *Journal of Cell Science*, 126(9), (2013), 2069.
- (23) 杉村博之, 表面技術, 61(2), (2010), 208.