

平成22年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	細胞セパレータおよび細胞機能の診断用細胞マイクロアレイの開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：工学部・白石浩平 共同研究者：工学部・山田康枝，産業理工学部・河済博文	

1. 研究目的・内容

従来まで抗体特異性，増殖性等の類性質で集めた細胞集団としての細胞研究が行われていると考えられるが，個細胞での研究例は細胞の分取が困難な点から殆ど行われていない。①集団として評価されてきた細胞を個細胞としてアレイ基板上に固定化して，細胞毎の DNA 変異や RNAi の診断・機能評価を行う。②特定した細胞を温度等に応答して水に可溶—不溶を可逆的に変化する人工高分子材料等やレーザー照射によって，診断によって特定された同一機能をもつ細胞のみを非侵襲的に剥離・分取を目指す。iPS 細胞技術等で注目される細胞増殖の加速，キラーT 細胞等の有用細胞の分取，薬理効果の評価にも関連した医用デバイスとしても位置づけて，細胞機能に関して一度に大量の情報をもたらす解析法，すなわち high-throughput 解析を視野に入れ，固定化等に関連する基礎研究から実用化を目指した応用研究に展開する。

2. 研究経過及び成果

従来まででない，①低コストかつコンパクトサイズさらには診断情報を High-throughput で入手できる個細胞レベルの機能診断，②特定の細胞を選択的かつ細胞にダメージを与えない（非侵襲的）回収可能な新規な細胞アレイの開発を目的に平成 21 年度～平成 22 年度（2 年間）でその基礎となる以下の重要な知見と細胞アレイ (Figure 1) および細胞診断と回収用の顕微鏡レーザー装置 (Figure 2) を開発した。

なお，当該研究をベースとして，平成 21 年度末経済産業省に申請した「平成 22 年度地域イノベーション創出研究開発事業（地域資源活用型）：安心・安全な再生医療を実現する細胞回収自動化システムの開発」（平成 22 年～平成 23 年補助金総額約 45,000 千円に採択：平成 22 年 6 月 25 日付，近畿大学工学部，鳥取大学医学部，トーヨーエイテック株，エステック株，株chromocenter，広島和光株，管理法人ちゅうごく産業創造センター）に採択された。

	上期（4月～9月）	下期（10月～3月）
平成 21 年度	【1】 個細胞固定化基板の開発	【2】 細胞回収システムの開発
平成 22 年度	【3】 個細胞診断情報システムの開発	【4】 選択的細胞回収法の開発

【1】 (平成 21 年度上期)High-throughput な細胞診断のための個細胞(single cell)固定化用新規基板の開発

【1】-①：上記目的から，細胞播種のみで個細胞を簡便に接着・配列させる基板として，ガラス基板上に細胞サイズの円形の金スポットを等間隔で配置した細胞マイクロアレイを企業（トーヨーエイテック株式会社：広島市）と共同で開発した。このとき，例えば，HeLa 細胞であれば，大きさ(50 μ m)，ピッチ(150 μ m)等を最適化する必要があることを認めた。(Figure 1)

【1】-②：温度応答性ポリマー(PNiPAAm)および細胞非接着領域として細胞非接着性のリン脂質類似ポリマー(PMPC)を高密度にグラフトして，それぞれの性能を高めた。すなわち，重合開始剤を金およびガラス表面のそれぞれに固体化し，表面グラフト重合する方法を新規に開発した。

【2】 (平成 21 年度下期) 診断情報をベースに細胞を選択的かつダメージを与えない（非侵襲的）回収システムの開発

【2】-①：接着した細胞を選択的に剥離・回収するために，金スポットを局所的に加熱できるステージおよびレーザー照射して細胞死を誘導して目的外の細胞を除くためのレーザー照射システムを構築した。

【2】-②：細胞の温度刺激による剥離性能を向上させるため，PNiPAAm 鎖に PMPC 鎖を約 20%共存さ

せると、細胞の剥離率がほぼ 100%になった。

【2】-③：細胞アレイの表面への固定化によって、細胞膜表面の特異的抗原の認識により、抗原特異的に個細胞を接着させる素材を開発した。すなわち、抗原に対する抗体を固定化するスクシンイミド反応部位をもつ PMPC 共重合体と本素材の金あるいはガラス面への固定化法を開発した。PMPC 共重合体は PMPC のみには吸着しなかった抗体モデルを効率的に固定化できた。

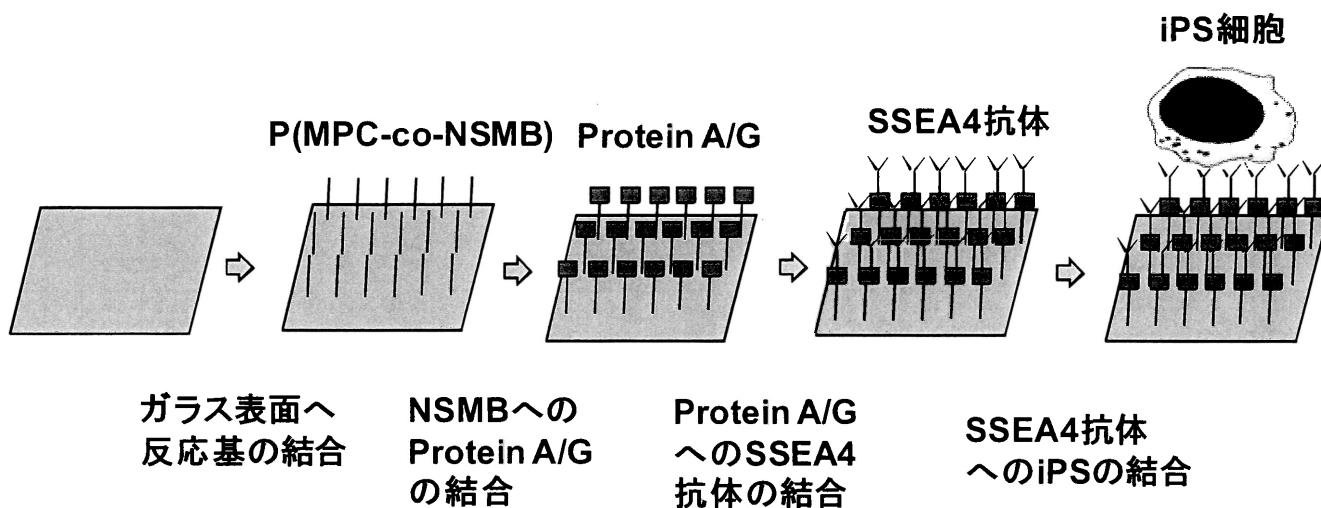
【3】(平成22年度上期)個細胞 (single cell) 接着後の光検出による同条件high-throughput診断

【3】-①血球系細胞の実験モデルとしてHL60を用いて、ガラス面上に細胞接着部としての金スポットが定序的(スポットサイズ: 50 μ m,ピッチ間隔150 μ m)に配列した細胞アレイ基板を作製した。このとき金を凸面として細胞接着面の凹面としたアレイの作製に成功し、光透過して個細胞が顕微鏡観察が可能となった。

【3】-②ガラス面には、細胞およびタンパク質等の生体物資が高度に非接着あるいは吸着しない人工リン脂質ポリマー(PMPC)、金スポットには温度応答性ポリマーの選択的固定化技術(表面開始グラフト重合法)を開発した。

【3】-③細胞接着前に細胞接着因子をアレイ表面に塗布して、緩衝液等でリンスすることによって温度応答性ポリマー表面(金スポット)のみに接着因子を吸着させる。また、細胞の機能および分化状態に特異的な抗体を固定化する方法を開発した。具体的には、抗体のN末端と反応するN-succinimidylmethacrylate(NSMB)と反応した抗体の変性を抑制するPMPCの共重合体[P(MPC-co-NSMB)]をガラス面の固定化した。次に、細胞特異性の抗体あるいはProtein A/Gを1次処理した後に目的の抗体を2次処理して抗体を配向させ固定化する技術を開発した。

【3】-④上記の、HL60を塗布して、アレイのガラススポット上に個あるいは数個細胞を固定化することに成功した。また、Protein A/Gを1次処理した後、マウスiPS細胞に特異的なSSEA4抗体を2次処理して、iPS細胞とHT20細胞を混合(iPS/HT20=1/10個数比)後播種した。iPS細胞のみ95%以上の確率で結合できることを見出し、細胞の選択的回収が可能であることを明らかにした。(Scheme 1)



Scheme 1 マウスiPS細胞の選択的な固定化

【3】-⑤細胞アレイ基板に固定化した生細胞を細胞特異的な1次抗体で固定化後蛍光をCCDカメラによる撮像あるいはフォトマルチプライヤー(PM)による蛍光強度をして、PCによりイメージング等による細胞機能を診断のシステムを開発した。同一の細胞アレイ上での数万個の細胞の光検出診断に必要な時間は1時間以内のhigh-throughputとなった。

【4】(平成22年度下期)個細胞の選択的接着と光レーザー照射による目的細胞の非侵襲的な選択的取得

【4】-①有用な細胞を非侵襲的に取得するため、不用な細胞を蛍光ラベル化抗体で染色した。

【4】-②個細胞単独を標的として高強度の可視光の固体パルスレーザー(532nm)を他の細胞に影響しないように照射して、細胞死を誘導することが可能となった。(Figure 2, 3)

このとき、顕微鏡ステージを移動させて個細胞へのレーザー照射をピンポイントで行う顕微鏡システムを開発した。

【4】-③細胞除去後に残った有用細胞を温度刺激によって、細胞の非侵襲的な回収が可能で、同時に多量の細胞を選択的に取得するシステムとなった。

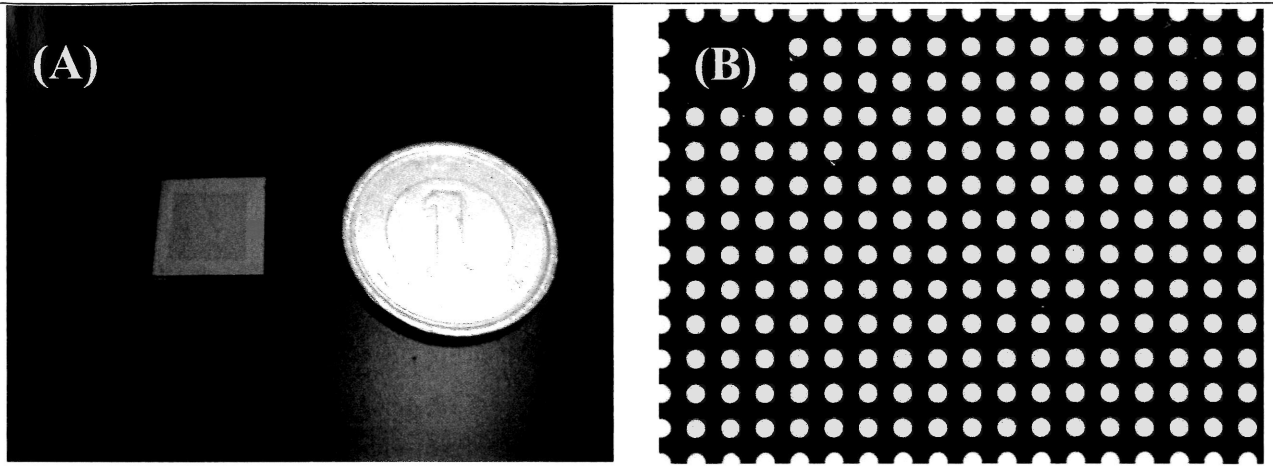
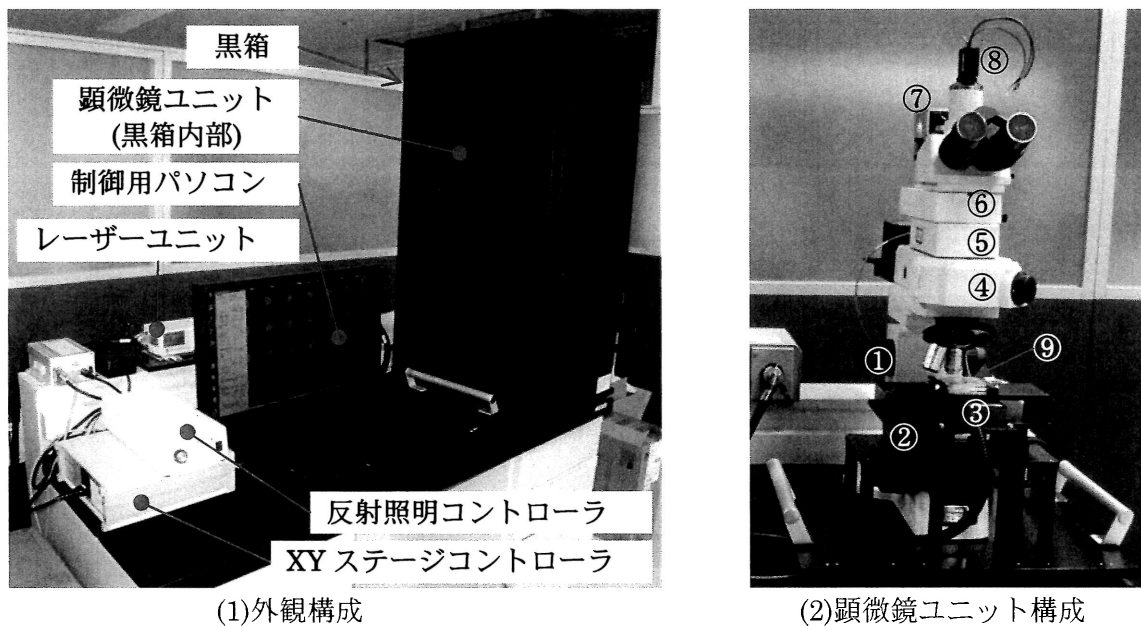


Figure 1 Au マイクロアレイの外観写真(A), スポット径 $50\mu\text{m}$ 、ピッチ $100\mu\text{m}$ の Au マイクロアレイの顕微鏡写真(B)



顕微鏡ユニットの構成
 ①顕微鏡本体 ②XY ステージユニット ③バックライト④反射照明装置
 ⑤レーザー導入ユニット ⑥ダブルポート ⑦CCD カメラ
 ⑧フォトンカウンティングヘッド ⑨4 穴ウェルプレート

Figure 2 細胞診断・回収用の顕微鏡レーザー装置

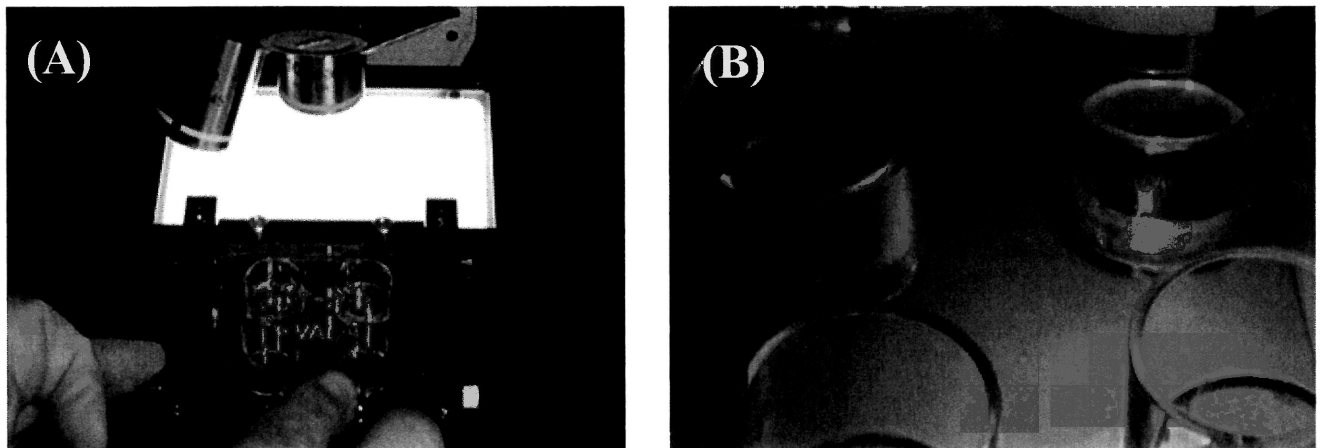


Figure 3 市販4穴培養シャーレ中に固定化した細胞マイクロアレイの装着の様子(A), 細胞破壊用レーザー照射の様子(B)

3. 本研究と関連した今後の研究計画

上記の研究結果をベースに共同研究企業(トーヨーエイトック株式会社:広島市, エステック株式会社:島根県八東郡等), 大学(鳥取大学医学部)らと①～③のテーマを深化させる。

①細胞診断のみに特化したシステム開発

②細胞回収の自動化

③iPS 細胞等の求められる遺伝子導入の効率化を本アレイとレーザー照射アレイシステムを用いて開発等を進める。本年度には, 更に細胞回収の自動化を効率化するために, 細胞の観察とレーザー照射が安価かつ容易となる倒立型の細胞診断およびレーザー照射システムを開発する。事業化を視野に入れて, 平成23年6月末開催の国際BioExpo(於:東京ビックサイト)に出展し, 市場調査とユーザー要求を十分に調査した後, 装置やアレイの仕様を固める。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
(社) 高分子学会	口頭	平成21年5月27日
(社) 高分子学会	口頭	平成21年9月16日
(社) 日本化学会	口頭	平成22年3月27日
特許庁	特許	平成21年11月11日
特許庁	特許	平成23年1月28日
特許庁	特許	平成23年2月15日
(社) 高分子学会	口頭	平成22年5月27日
(社) 高分子学会	口頭	平成22年9月15日
(社) 高分子学会	口頭	平成23年5月25日
(社) 高分子学会	口頭	平成23年5月25日
フォトポリマーコンファレンス(CPST)	論文	印刷中
フォトポリマーコンファレンス(CPST)	口頭	平成23年6月23日
第10回国際バイオ Expo (東京ビックサイト)	口頭(機器展示)	平成23年6月29日～ 平成23年7月1日(予定)
(社) 高分子学会	口頭	平成23年9月29日(予定)
(社) 高分子学会	口頭	平成23年9月29日(予定)
(社) 高分子学会	口頭	平成23年9月29日(予定)
広島テレビ・平成23年6月21日・16:00台報道	メディア発表	平成23年6月21日
中国新聞・平成23年6月22日・朝刊26面(社会)	メディア発表	平成23年6月22日
日本経済新聞・平成23年6月22日・朝刊12面(広島経済)	メディア発表	平成23年6月22日
読売新聞・平成23年6月22日・朝刊31面(地域)	メディア発表	平成23年6月22日
電気新聞・平成23年6月23日・朝刊9面(電力・地域)	メディア発表	平成23年6月23日
日経産業新聞・平成23年6月23日・朝刊12面(医療バイオ)	メディア発表	平成23年6月23日
日刊工業新聞・平成23年6月24日・朝刊27面(大学産学連携)	メディア発表	平成23年6月24日