

近畿大学 理事長 殿
近畿大学 学長 殿

1. 研究者名 工学部・教授 白石浩平
2. 課題番号 KD06
3. 研究課題名 細胞セパレータおよび細胞機能の診断用マイクロアレイの開発
4. 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。

5. 研究の経過

従来まででない、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と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 年度はその基礎となる以下の重要な知見を得た。

【1】 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（トヨーエテック株式会社：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。

【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】 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ニ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。

これらの結果を踏まえて、細胞診断および細胞回収システムを装置化する研究を平成 22 年度研究最終年度に展開する。

6. 本研究と関連した今後の研究計画

(1)個細胞 (single cell) 接着後の光検出による同条件high-throughput診断

(1)-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 μm,ピッチ間隔150 μm)に配列した細胞アレイ基板を作製する。

(1)-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、金スポットには温度応答性ポリマーを前年度確立した手法にて固定化を行う。

(1)-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。

(1)-④次に、HL60を塗布して、個細胞を固定化する。

(1)-⑤細胞特異的な診断用の1次抗体(細胞の分化状態等によって1次抗体の結合が異なることを利用)を塗布した後、蛍光標識した2次抗体を塗布する。

(1)-⑥細胞アレイ基板全体の蛍光をCCDカメラで撮像して、PCによりイメージングを行い、培地や反応条件が全く同一かつ多数の細胞をhigh-throughputな診断を行うシステム開発を行う。

(2)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

(2)-①上記細胞情報から、有用な細胞を非侵襲的に取得するため、不要な細胞を光吸収性官能基をもつ抗体で染色する。

※同時に細胞特異的な抗体を温度応答性ポリマー表面(内面含む)の固定化して、接着時に細胞を選択できる素材開発する。

(2)-②個細胞単独を標的として高強度の可視光レーザーを他の細胞に影響しないように照射して細胞死を誘導して除去する。

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行う。

(2)-③細胞除去後に残った有用細胞を温度刺激によって、同時に多量の細胞を選択的に取得するシステムの開発を行う。

上記の研究結果をベースに共同研究企業(トーヨーエイテック株式会社: 広島市)らと細胞診断および回収装置のプロトタイプを作製を行う。

7. 成果の発表

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)	添付(済・未)
(社) 高分子学会	口頭	平成21年5月27日	添付(済・未)
(社) 高分子学会	口頭	平成21年9月16日	添付(済・未)
(社) 日本化学会	口頭	平成22年3月27日	添付(済・未)
特許庁	特許	平成21年11月11日	添付(済・未)
			添付(済・未)

※現時点において別刷または著書等の現物が添付できない場合は、発表され次第すみやかに提出してください。