

光応答性材料を用いた1細胞アレイ技術

山口 哲志^{1*}・山平 真也²・長棟 輝行²

はじめに

近年、細胞生物学の基礎研究から病理検査、再生医療までの幅広い分野において、1細胞レベルで細胞を解析し、ハイスループットに選別する技術が求められている。たとえば、血中の循環がん細胞（circulating tumor cell, CTC）はその存在割合が非常に低いが、血液からCTCを検出し選別・解析することでがんの早期発見や、治療効果の評価、がん化のメカニズムの解明などが可能になると期待される。また、再生医療分野においては、ES細胞やiPS細胞を分化させて利用する際に、がん化するおそれのある未分化細胞を1細胞ずつ解析して検出し、確実に除去する必要がある。その他にも、細胞を用いたバイオ生産において、目的分子を大量に生産できる細胞を単離する技術は、生産性の高い細胞の育種にとってきわめて重要であり、製品コストの低減に直結する。このような背景から、1細胞解析・選別技術が現在盛んに研究されている。

上記のように、1細胞解析や選別にはさまざまな目的があり、多様な細胞群から目的とする細胞をたった一つ検出すれば良い場合から、該当する細胞をすべて確実に分取しないといけない場合まで、求められる技術もさまざまである。また、iPS細胞の発見および再生医療関連法の施行以降、日進月歩の再生医療、細胞加工産業において、どのような技術が産業上のコア技術として市場を席卷するのかまだ誰にも分からないのが現状である。したがって、従来の技術では及ばない、従来技術が不得意な「ニッチな」対象に対応可能な1細胞解析・選別技術を開発することも、汎用的な技術の開発と同じく重要であるといえる。本稿では、現在使用されている1細胞解析・選別技術の優れた点と苦手な点について述べた後、光応答性材料を用いた筆者らの試みについて紹介したい。

従来の1細胞解析・選別技術

フローサイトメーター 現在、もっとも利用されている1細胞解析・選別技術が、フローサイトメーターを用いる方法である。フローサイトメーターとは、細い流路を用いて細胞を一つずつ整列して検出器の前に流し、個々の細胞の情報を順に取得する1細胞解析技術であ

る。また、得られた情報をもとに、目的とする細胞のみを流路から選り分ける選別（ソーティング）システムを組み込んだフローサイトメーターが広く用いられている。このような技術のうち、特に、目的とする細胞を選択的に蛍光染色し、細胞の蛍光強度変化を指標に選別する技術をfluorescence activated cell sorting (FACS)と呼ぶ。FACSでは、市販の一般的な装置を用いて、1秒間に数千の細胞を定量解析することができ、高速1細胞解析・選別技術として現在もっとも普及している。

しかし、FACSにも用途によってはいくつかの課題が指摘されている。まず、偽陽性や偽陰性の問題である。FACSでは、蛍光検出器の前を通過した瞬間の蛍光強度の絶対値のみで細胞を識別しなくてはならない。したがって、蛍光強度変化が十分ではない場合、染色前から細胞が有する蛍光（自家蛍光）の高い細胞を、蛍光変化が陽性の細胞と誤って同定してしまう（偽陽性）。逆に、染色前後で蛍光が変化しているにも関わらず、染色後の蛍光強度の絶対値が小さいために、陰性の細胞と見なしてしまう（偽陰性）。このように、正確性の面での課題が問題となる場合がある。また、解析・選別の対象が、蛍光染色法で十分に染め分けられるものに限られてしまうという点も適用範囲の面で問題である。さらに、現在幅広い装置で採用されているセルソーティングシステムでは、流速を上げると回収率が下がるため、高い処理速度と高い選別の精度を両立することが難しい。また、精度を上げるために流速を最適化しても、高い回収率は実現できず、含有率がきわめて低い「レアな」細胞を単離することは不可能な場合が多い。

1細胞アレイ FACSの苦手な点を補完する技術として、近年、1細胞アレイを用いた1細胞解析・選別技術が盛んに研究され¹⁾、実用化され始めている^{2,3)}。1細胞アレイは、微細加工を施したチップ上に細胞を一つずつ規則正しく高密度に並べたものであり、顕微鏡観察による網羅的な単一細胞解析を可能にする。個々の細胞をアレイ上の位置で特定できるため、すべての細胞の経時的な情報を取得することができる（図1）。したがって、染色後の絶対値しか得られないFACSとは異なり、染色前後での変化量を指標に細胞を解析でき、偽陽性や偽陰性の問題を解決できる。実際に、1細胞アレイ研究を世

*著者紹介 ¹東京大学先端科学技術研究センター E-mail: yamaguchi@bioorg.rcast.u-tokyo.ac.jp

²東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻

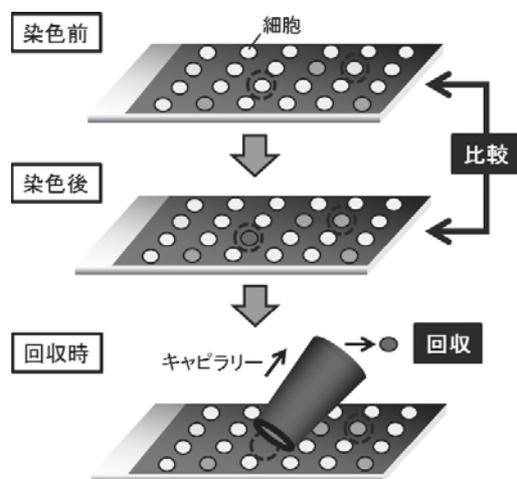


図1. 1細胞アレイを用いた細胞解析および選別の概念図. 染色前後での変化を指標に解析し、一つずつ選別・回収する.

界的にリードする山村らは、病原体特異的な抗体を発現するB細胞の選別において、FACSに比べてより正確に有望な細胞を選別できることを示している¹⁾。また、1細胞アレイ上では顕微鏡観察を利用した多角的な解析が可能であり、たとえば、細胞の形態変化や運動性、細胞上での分子の分布や動態変化など、従来のFACSでは解析できなかったパラメーターを指標にして細胞を識別することもできる。さらに、アレイ上で識別した目的細胞は、微細なキャピラリーを使って吸い取ることによって確実に回収できる。これにより、従来法では選別できなかった識別困難な細胞や「レアな」細胞を正確に選別できるようになると期待されている。実際に、1細胞アレイ技術を用いて有用な細胞を選別することに成功した例がいくつか報告されている^{2,3)}。

しかし、1細胞アレイを使った技術にも用途によっては課題がある。1細胞アレイを作製する技術として現在もっとも一般的なのは、マイクロウェルアレイを用いる手法である。細胞が一つだけ入る大きさのウェルが高密度に並んだ表面をチップ基板上に作製し、その表面に細胞懸濁液を流し込み、重力によって各ウェルに細胞が落ちるのを待つ。その後、ウェルに落ちなかった細胞だけが流れる程度の流速で表面を軽く洗うと、ウェル内だけに細胞が存在する1細胞アレイを作製することができる。この従来法では、ウェルとウェルの間に播種された多くの細胞が洗い流されてしまう。したがって、希少な目的の細胞を検体から失うリスクが高い。また、細胞の回収方法が煩雑で生産性を低下させるという課題もある。細胞回収用のキャピラリーを搭載したマイクロマニピュレーターを操作して、細胞を一つずつウェルから吸

い上げる現状の技術では、該当する細胞を多数選別する必要がある場合は、きわめて多大な時間と労力を必要とする。

光応答性材料を用いた1細胞解析技術

光応答性材料とは、光照射に応じてその物性が変化する材料である。主に光照射によって分解される化学構造や光照射によって異性化する化学構造を含む分子から成る。さまざまな刺激応答性材料の中で、光応答性材料を用いる利点は、光刺激が時間的・空間的に高い分解能を有しているという点にある。適当なマスクや集光システムを用いることで、1細胞レベルの微細な大きさの特定表面にのみ望みのタイミングで光を照射することができ、光応答性材料を塗布しておくだけで、その表面の物性を瞬時に変えることができる。中西らは、この利点に注目し、光応答性材料で被覆した基板を用いて、光照射を施した表面のみに細胞を選択的に接着させる技術を世界に先駆けて開発した⁴⁾。さらに、この材料を用いて、1細胞レベルで細胞を並べられることを示した。筆者らは、この先駆的な研究から、1細胞アレイの課題を解決できる光応答性材料が創出できるのではないかと着想し、研究を開始した。

光分解性PEG脂質 筆者らは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を用いて細胞を基板上に固定化する技術をそれまでに精力的に開発していた⁵⁾。この分子を脂質がつながっている側と逆のPEG末端を介して基板に修飾すると、基板表面に提示された脂質と細胞膜とが相互作用し、細胞が自発的に修飾表面に固定化される。特に、脂質としてオレイル基を用いると、強固に細胞が固定化されることが知られている。そこで、PEGとオレイル基との間に光分解性リンカーを挿入した分子を設計・合成した(図2上)⁶⁾。リンカーを挿入していないこれまでのPEG脂質と同様に、この分子を修飾した基板には細胞が自発的に固定化される。しかし、この基板に紫外光(365 nm)を照射すると(約1 J/cm²程度)、リンカーが分解してオレイル基がPEG鎖からはずれ、細胞に対して非接着性のPEGが露出する(図2下)。実際に、はずれたオレイル基を洗浄除去した後に細胞を作用させると、光照射を施した表面には細胞が固定されないことが示された。したがって、この分子で基板表面を被覆し、細胞を固定したい場所以外に光を照射することによって、自由に細胞の微細パターンを作製できる技術の創出に成功した。

さらに、この技術で固定化した細胞は、細胞膜と相互作用しているオレイル基を光照射によって切り離すこと

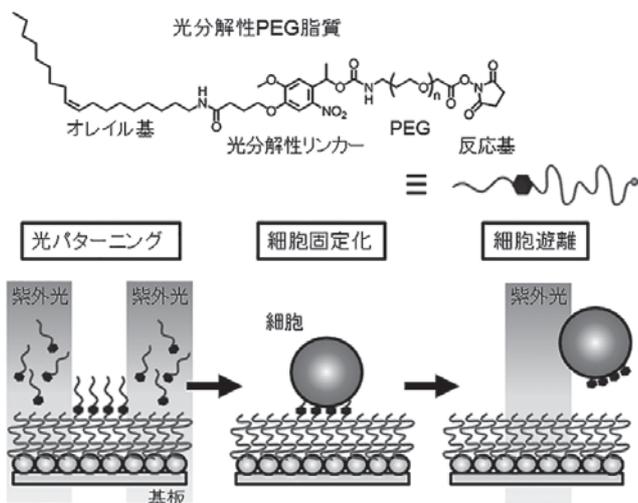


図2. 光分解性PEG脂質を用いた細胞の固定化と選択的遊離。(上) 光分解性PEG脂質の構造式。(下) 光分解性PEG脂質修飾基板への光照射と非照射領域への細胞の固定化、光照射による固定化細胞の選択的遊離の概念図。

により、基板表面から取り外すことができる(図2下)。筆者らは、マイクロ流路の底面に光分解性PEG脂質を修飾し、光パターニングによって浮遊細胞であるマウス proB 細胞株 BaF3 細胞の細胞クラスターアレイを作製した。このアレイ上の特定の細胞クラスターに光を照射したところ、照射したクラスターの細胞のみが選択的に基板から遊離する様子が観察された(図3)。また、複数のクラスターに対して光照射を施すことによって、特定の複数のクラスターから同時に光選択的に細胞を遊離することも確認している。このように、光分解性PEG脂質を用いることによって細胞を望みのパターンに配列することができ、並べた細胞の中から狙った場所の細胞のみを選択的に遊離させられることが分かった。

光分解性PEG脂質を用いた1細胞アレイ 光分解性PEG脂質を修飾した基板を用いて、1細胞アレイを作製した。修飾基板に非照射領域がドットパターンになるように光を照射し、細胞を播種すると、ドット状に細胞を並べることができる。直径が平均約10 μm 程度のBaF3細胞を用いた場合、一つのドットの直径を8~10 μm 程度にするときれいに1細胞ずつが並んだアレイが作製できた(図4)⁷⁾。ドットの直径がこれよりも小さいと、細胞が相互作用できる表面が小さすぎて弱くしか固定できず、固定化率の低い細胞アレイになってしまい、逆に、直径が大きいと、一つのドットに細胞が複数個固定されたところが出てしまった。この最適なドット径は細胞の大きさによって変わるが、最適なドット径のパターンを用いることによって試したすべての細胞におい

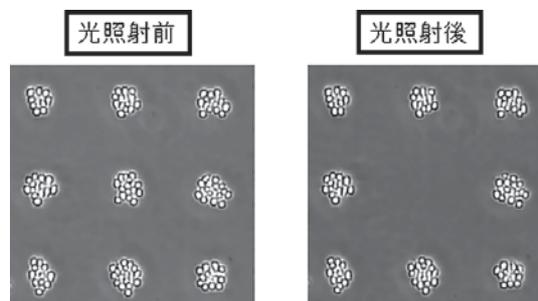


図3. 光分解性PEG脂質修飾基板上に固定化したBaF3細胞に光照射を施す前後の顕微鏡画像。(左) 光照射前の画像。(右) 真ん中の細胞クラスターにだけ光を照射した後の画像。

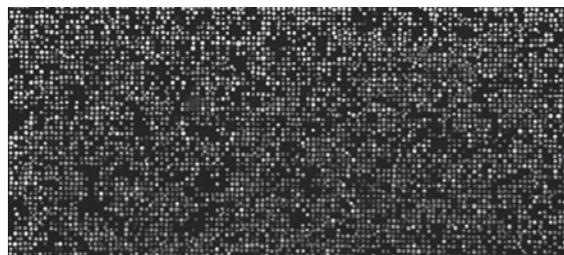


図4. 光分解性PEG脂質修飾基板上に作製した1細胞アレイの蛍光顕微鏡画像。

てきれいな1細胞アレイを作製することができた。

この光分解性PEG脂質を用いた1細胞アレイ技術では、マスクを通して光のパターンを照射するだけで、細胞固定化領域と非固定化領域を平面基板上に作るができる。したがって、高密度のパターンを照射するだけで、簡便に高密度細胞アレイを作製することもできる。このように高密度にすることにより、従来の1細胞アレイ法で問題となっていた、ウェル間の細胞検体を失ってしまうという問題が解決される。アレイを作る表面のほぼすべてに細胞が捕捉されるため、表面に多層に細胞が積層されるほどの高い細胞密度で播種しない限り、ほとんどすべての細胞検体を失うことなく並べることが可能である。もちろん、従来のマイクロウェル法においても、ウェル密度を高めることで原理的には同じような結果が得られると予想されるが、鋳型を用いてウェルを作る際に、ある程度のマージンが技術的に必要となり、高密度化には限界があるのが現状である。

1細胞アレイ上での解析 PEG脂質は、オレイル基と脂質二分子膜との相互作用を介して細胞を固定化する。したがって、細胞の生物学的な接着性を利用した従来の細胞パターニング法と異なり、浮遊細胞や接着性の弱い細胞もパターニングすることができる。血球細胞など接着性の乏しい細胞には疾患や重要な生命現象に関わ

る細胞が多く含まれるため、弱接着性の細胞に応用可能な点は本技術の長所の一つである。そこで、本1細胞アレイ技術を用いて、血球系の細胞の網羅的な解析を試みた。筆者らは、血球の形態変化に着目した。血球の形態変化は走化性や浸潤性と強く相関し、その定量的な解析は抗炎症剤の評価や免疫療法の研究に直結する。しかし、浮遊している状態では細胞の場所移動や回転などにより形態変化の定量解析はきわめて困難であり、また、浮遊細胞の固定化に用いられるポリリジンコート基板に吸着している状態ではダイナミックな形態変化が妨げられる。一方、光分解性PEG脂質を用いた1細胞アレイ上では、細胞の一部分だけが基板上に捕捉され、形態変化

を強く制限することなく固定化できると考えられた。細胞の形態変化を指標に運動性が評価できるかどうかを調べるために、特殊な人工のリガンドが作用すると運動性が大きくなる人工受容体の遺伝子を導入したBaF3細胞と、何も細工していないBaF3細胞とを混ぜて1細胞アレイを作製し、リガンド添加時の応答を調べた。この際、二種類の細胞は蛍光染色であらかじめ染め分けておいた。経時変化観察と画像解析の結果、運動性が大きくなる遺伝子導入BaF3細胞を、形態変化率によって網羅的に識別できることが示された(図5)⁷⁾。このように、今回紹介した1細胞アレイ上では従来にないパラメーターも定量することができ、多角的な解析によって正確に目的の細胞を同定することも可能であると期待される。

まとめ

1細胞アレイ技術は、迅速かつ多角的に単一細胞を解析し、目的の細胞を正確に選別することができる。筆者らは、光分解性PEG脂質を用い、光照射によって簡単に密度の異なる1細胞アレイが構築できることを示した。また、この1細胞アレイ上で、細胞の運動性や遊走性をユニークな手法で網羅的に解析できることも示しており⁷⁾、免疫細胞の走化性に関わる因子の探索や浸潤性の高い悪性のがん細胞の検出に応用可能であると考えている。さらに、並べた細胞パターンから光照射によって狙った細胞だけを遊離できることも紹介した。現在、この成果をもとに、マイクロ流路内に作製した1細胞アレイから、光照射によって狙った細胞のみを高速選別するシステムの開発を行っており、検体から多くの細胞を正確に選別できる技術としての応用が期待される。

文 献

- 1) Yamamura, S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **77**, 8050 (2005).
- 2) 良元伸男ら: *生物工学*, **89**, 72 (2011).
- 3) Yoshimoto, N. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 1191 (2013).
- 4) Nakanishi, J. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16314 (2004).
- 5) Kato, K. *et al.*: *BioTechniques*, **35**, 1014 (2003).
- 6) Yamaguchi, S. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 128 (2012).
- 7) Yamahira, S. *et al.*: *Macromol. Biosci.*, **14**, 1670 (2014).

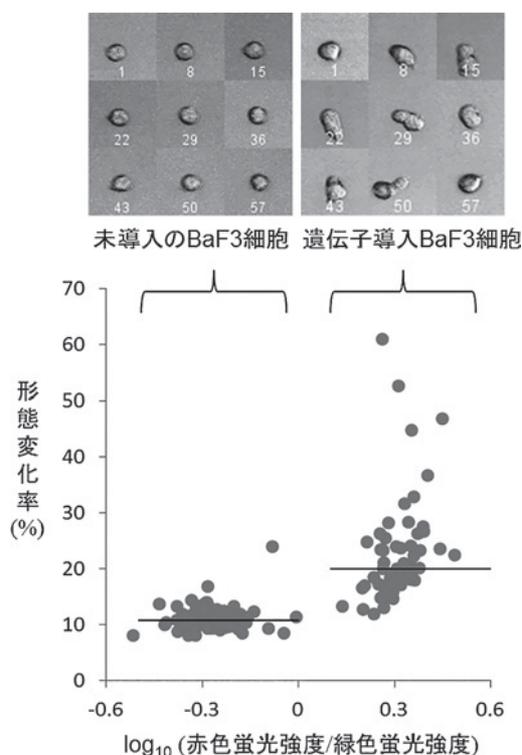


図5. 光分解性PEG脂質を用いた1細胞アレイ上でのBaF3細胞の形態変化率の網羅的解析。赤色蛍光染色を施した遺伝子導入細胞と緑色蛍光染色を施した未導入の細胞を並べて時間変化を観察した。(上) 遺伝子導入細胞と未導入の細胞の1細胞顕微鏡時間変化画像。図中の数字は経過時間(分)を表す。(下) 蛍光強度の比と形態変化率の関係。