

研究課題別評価書

1. 研究課題名

時空間を制限した細胞内シグナルの発生とその計測

2. 氏名

中西 淳

3. 研究のねらい

細胞の内部には、さまざまな細胞外刺激に応じて然るべき応答をするために、シグナル伝達ネットワークが存在する。シグナルの担い手は、タンパク質や低分子化合物であり、これらの濃度や活性が時間・空間的に厳密に制御されることにより、多様な細胞応答が実現されている。この分子機構を解き明かすためには、各種生理活性物質の細胞内動態を計測する技術の開発とともに、細胞に対して時空間を制限した刺激を与える方法の開発が重要である。これらの技術は相補的な関係にあり、両者を駆使することで、より詳細な解析が可能となる。しかしながら、蛍光プローブを用いた細胞内イメージング技術を筆頭に、計測技術の進展が著しいのに対し、細胞の局所に任意の時間に刺激を与える技術については、その報告が限られている。本さきがけ研究では、時空間を制限して細胞に刺激を与えるための新規材料・技術の開発を行った。具体的には、光照射に応じて表面の細胞接着性が変化する機能性基板「ケージド基板」を用い、基板上的細胞接着を操作することによって、細胞移動や細胞増殖を自在に誘導する方法を開発した。また、生理活性物質を一時的に捕捉し、光応答的に放出する金ナノ粒子を合成し、当該物質を光応答的に産生させる方法、すなわちケージド化合物の新規合成原理を開発した。ここで開発した新材料・新技術を多様な計測技術と組み合わせることによって、新たな生命現象の発見への道を切り拓くことが本研究の究極の目標である。

4. 研究成果

(1) ケージド基板による細胞移動の時空間制御

細胞移動は、発達、免疫反応、表皮の再生などの正常な生命現象や、ガン細胞の浸潤・転移などの病態のいずれにも関与する重要な細胞活動である。細胞が周囲の物理的・化学的環境をいかに認識し、移動方向・速度を決定するのか、また、その際、細胞の内部にどのような分子機械が働き、細胞移動を制御しているのか、これらを理解することが、種々の遺伝病や癌の治療に糸口を与えると考えられている。従来の細胞移動の誘導法は、集団としての細胞を対象とするため、細胞同士の相互作用の影響を受け、一細胞の移動挙動のみを正確に評価するには適していなかった。本研究では、ケージド基板を利用して、基板の上にアレイ化した一細胞の移動を光で誘導する手法を開発した(図1)。ケージド基板は、光分解性の 2-ニトロベンジル基を有する化合物を修飾したガラス基板であり(図1a)、基板表面に合成高分子プルロニックなどの細胞接着抑制分子をコートすると、初めは細胞非接着性であるが、光照射により表面親水化が起こり、その結果、細胞接着抑制分子が除去され細胞接着面が形成されるという性質を示す。

まず、基板を $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ のスポットを有するアレイ状に光照射して NIH3T3 細胞を一細胞ずつ配置した後、細胞に接する幅 $25 \mu\text{m}$ および $5 \mu\text{m}$ の通路状領域を光照射し、フィブロネクチンを添加した。いずれの場合でも通路幅に沿って細胞が伸展・移動した(図

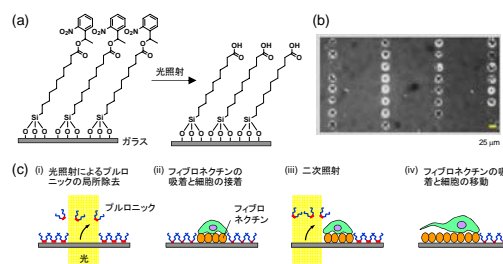


図1. ケージド基板を用いた細胞移動の光誘導法
(a) ケージド基板上の光化学反応. (b) 基板の上に形成した一細胞アレイ.
(c) 細胞移動の誘導法の原理.

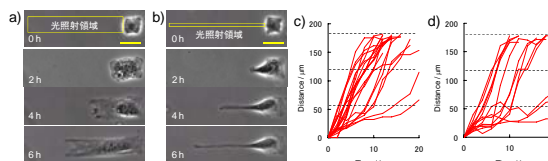


図2. ケージド基板上での細胞移動の誘導. 幅 $25 \mu\text{m}$ (a, c), $5 \mu\text{m}$ (b, d) の通路状上での一細胞の移動挙動の例(a, b), および各一細胞の先端の時間変化.

2a,b)。光照射は、アレイ状に配置した細胞全てを対象に行っているため(図1b)、各一細胞の移動挙動を同時に観察することができる。実際に、二種類の通路幅に対する細胞の先端の移動挙動をまとめたのが図2c, dである。同一通路幅上における細胞の挙動に注目すると、個々の細胞で移動開始のタイミングは異なるもののほぼ一定の移動速度を示すことを見出した。また、二種類の通路間で移動速度を比較したところ、5 μm の通路上より 25 μm の通路上の方が速く細胞が移動することが分かった。この結果は直感とは異なる予想外の結果であるが、おそらく、幅が狭い通路上では細胞骨格の再構築が起こりにくいなど、何かしらの内的な要因が細胞移動に重大な影響を及ぼしていることを示唆している。この点については、細胞骨格系のタンパク質の動態観察などを行うことで詳細な解析が可能であろう。

(2)新規ケージド基板の開発と細胞増殖の光制御

(1)の結果は、ケージド基板によって細胞に時空間を制限した刺激を与えることを示している。しかしながら、この基板上にパターン化した細胞は、数日の内に初めに指定したパターンから逸脱してしまうため、短時間の観察では支障はないものの、増殖や分化のような比較的長期間の培養を要する研究には適していなかった。この主な原因は、基板表面に物理吸着させたプルロニックが、時間の経過とともに解離することであった。そこでこの点を改善するために、細胞接着抑制性のポリエチレングリコール(PEG)を、共有結合を介して光分解性基に直接連結した新規基板の開発を行った(図3)。

接触角、全反射赤外吸収、エリプソメトリー、AFM の測定を通し、同基板への PEG の固定化および光解離を確認した。次に、作製したケージド基板上的円形領域を光照射し、血清培地で NIH3T3 細胞を播種すると、細胞は光照射領域に選択的に接着した(図4a,b)。この細胞を続けて培養すると、細胞は円形領域内で増殖をしつつも 17 日間以上パターンは維持された(図4c)。また、別途用意した円形の細胞パターンに対して、近接する円形領域を二次照射したところ、細胞は元の領域から新たに光照射された領域に移動しながら増殖し、ダンベル型の細胞パターンを形成してコンフルエントに達した(図4d,e)。以上のように、本基板では、2 週間以上に渡って細胞のパターンを維持することが可能であり、尚かつ、培養の最中に光照射を行うことで、自在に細胞接着領域を拡張できることが分かり、より広範な用途での実用可能性が示された。また、アレイ中の特定の一細胞の近接領域のみに二次照射を行ったところ、当該細胞が選択的に増殖し、コロニーを形成した(図4f-i)。光照射を行わなかった周囲の他の細胞とは、明らかに増殖速度が異なった。以上より、二次照射による細胞接着領域の拡張を利用して、細胞増殖を光制御できることが示された。形成されたコロニー中の細胞は、全て元の一細胞と同一クローンと考えられるため、この技術は、ヘテロな細胞群から、特定細胞を単離増殖する技術などへの展開も期待できよう。

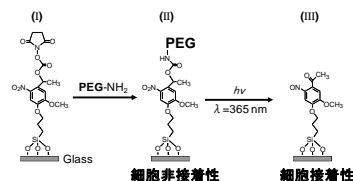


図3. 光解離性PEGに基づくケージド基板

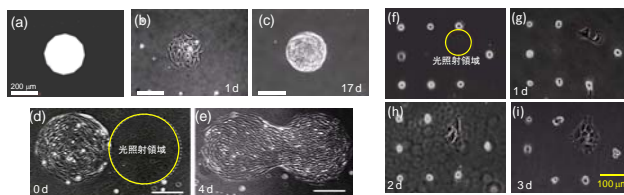


図4. 光分解性PEGに基づくケージド基板上での細胞接着制御。(a)光照射領域。(b)1日後および(c)17日後の細胞の位相差像。(d,e)光照射による細胞移動・増殖の誘導。(f-i)特定一細胞の選択的増殖。

(3)ナノ粒子を基盤としたケージング担体の開発

ケージド化合物は、光分解性保護基の修飾により一時的に活性が抑制された生理活性物質で、保護基の光切除により元の活性を取り戻す。この特徴は、細胞に対して時空間を制限した刺激を与えるのに適しているが、保護基の有無による生理活性の厳密なスイッチングを達成するためには、対象の生理活性物質ごとに精密な分子設計が不可欠であり、さらに合成・精製にも労力を要した。本研究では、表面に光分解性リンカーを介して反応性の官能基を有するナノ粒子を開発し、ケージド化合物合成用の担体(ケージング担体)としての可能性を探った。この設計では、ナノ粒子は、固定化する生理活性物質の活性を抑えるための嵩高いケージ基として機能すると同時に、ナノ粒子自体がケージング用固相担体となり、その合成・精製を容易にすると期待した。このことを念頭に、光分解性基を介してスクシンイミジルエステル基を有する金ナノ粒子を作製した(図5a)。活性エステルであるスクシンイミジルエステル基はアミンと反応するが、近紫外光照射に応じ

てカルバミン酸を放出させる。カルバミン酸は不安定であるため、程なく自発的に脱炭酸反応を受け、元のアミンに戻る。

初めに、粒径 5 nm の金ナノ粒子の表面に前記光応答性分子および PEG の混合単分子膜を形成し、その赤外吸収測定からナノ粒子へのアミンの固定化と光放出を確認した。また、吸光度・蛍光測定、熱重量分析から、ナノ粒子表面の分子膜の組成および光放出反応の量子効率を求めた。次に生理活性アミンの例として、ヒスタミンのケージド化合物の作製を試みた。光照射に伴いナノ粒子表面から切り離されるヒスタミンを、*o*-フタルアルデヒドと 2-メルカプトエタノールとの反応による蛍光誘導体化により評価したところ、確かに光照射時間に依存してヒスタミンが放出されることが分かった(図5b)。最後に、ヒスタミン受容体を発現する HeLa 細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬の Fluo 3 を取り込ませた後に、合成したナノ粒子を細胞外に添加した。すると、100 ms の光照射により、細胞内 Ca^{2+} の増大が見られ(図5c)、この応答は光刺激を繰り返しても再現した。一方、ナノ粒子を細胞に振りかけるだけで、光照射を行わなかった場合には、このような Ca^{2+} 応答は見られず、このことは、ナノ粒子に固定化されている時点では、ヒスタミンは失活しており、ナノ粒子から切断されることにより、初めて活性を発現する、いわゆるケージドヒスタミンとして機能していることが分かった。このケージドヒスタミンに対する光照射の位置・タイミングを制御することで、細胞間での Ca^{2+} シグナルの伝播に関する詳細な追求が可能であろう。本手法は、種々のペプチドや神経伝達物質、アミンを有する阻害剤などにも応用可能と期待される。また、金ナノ粒子の特徴として、他の修飾基の導入も容易であるため、ドラッグデリバリーシステムで使用される標的化ペプチドを導入することで、特定細胞への選択的な取り込みも実現可能と期待している。

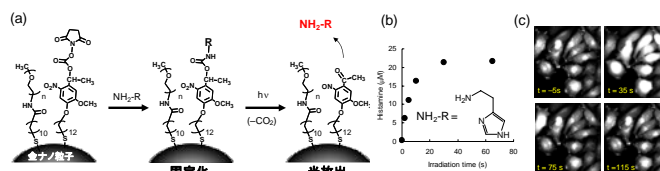


図5. 金ナノ粒子に基づくケージング担体(a)原理。(b)ヒスタミンの光応答的放出。(c)Fluo3-導入HeLa細胞での光照射($t=0, 100\text{ ms}$)に対する Ca^{2+} 応答。

5. 自己評価

本さがけ研究では、①細胞に対して時空間を制限した刺激を与える新規材料・技術を開発する、②それによって誘起された細胞応答を観察し、細胞内シグナル伝達機構を解析する、という二点を目的に研究を行った。三年半の研究期間で、「研究成果」で述べた以外にも多数の光応答性基板(ケージド基板)を開発し、細胞移動、細胞増殖、細胞間相互作用など細胞の基本的な活動を人為的に誘導する技術を確認した。また、光応答性ナノ粒子を合成し、生理活性物質を光応答的に産生させる方法を確認し、ケージドヒスタミンの合成に成功した。また、研究開始時に中心的な課題として掲げていたケージドタンパク質の開発については、詳細は述べないが、核となる材料開発に成功している(特許出願)。この課題については、細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質を対象に、戦略の妥当性を検証する作業が残されている。以上のように、目標とした細胞内シグナルの発生活法の開発に関しては、概ね本研究の目標が達成できたと言える。

一方、開発した材料・技術を利用した生命現象の探求については、ケージド基板により周囲の細胞との相互作用を積極的に排除した一細胞の細胞移動を誘導することで、単純な流体とは異なり、細胞内骨格などの内的な要因の関与を示唆する移動挙動を見出すことができた。この観点での主要成果はこれくらいであるが、細胞内シグナルネットワークの解析において、時空間を制限して刺激を細胞に与えることの重要性を支持する重大な結果と考える。蛍光イメージング技術を利用して、細胞骨格に関わる分子群の時空間動態を調べることで、細胞移動の分子機序に関するより詳細な解析が可能となると期待しており、今後の展開が楽しみである。また、当初は予定していなかったが、ケージド基板の細胞クローニング技術への応用可能性を示すことができた。この技術自体は、生命現象の追求という訳ではないが、特定細胞の単離は多くの生物学研究において不可欠のステップであり、その簡便化・効率化を実現する本技術は、それら生物学研究に重要な貢献を果たすと期待している。

ケージド基板に関してはさがけ研究以前にも取り組んでいたが、研究成果(2)で示した基板の開発により、長期間のパターン維持が可能でありつつも、光照射によって瞬時に細胞接着性が変換可能という、相反する機能を実現できたのは、飛躍的な進歩と言える。基材が通常のカバーガラスである上、細胞接着性の変換が標準的な蛍光顕微鏡の水銀光源による光照射で実施する

ため、本研究で得られた技術革新により、実証した細胞活動に限らず、より広範な生命現象を対象にできると確信している。また、光応答性ナノ粒子については、ケージドヒスタミンの例を示したが、原理的に、他のさまざまな生理活性アミンにも応用可能であると考え。ナノ粒子と対象のアミンを混合し、その後に脱塩や遠心分離処理を行うだけで、簡単に自前で望みのケージド化合物を合成・精製できる点は特筆に値する。多くの生化学・細胞生物学研究者に普及することで、ケージド化合物を利用した研究が見つめ直されるのではないかと思う。

6. 研究総括の見解

本研究は光照射に応じて表面の細胞接着性が変化する機能性基板「ケージド」基板を開発し、基板上の細胞接着を一細胞レベルで制御することによって、細胞移動や細胞増殖を誘導・制御する手法を開発した。また、表面に光分解性リンカーを介して反応性の官能基を有する金ナノ粒子をケージング担体として開発しその有用性を示した。ケージド化合物の概念を広げた極めて優れた成果が得られている。合成化学、表面化学、細胞生物学、計測技術などを総合させた独創性の高い優れた研究成果として評価したい。応用範囲は広い。特定の細胞の単離増殖の制御などへの応用も期待される。

7. 主な論文等

(A) さきがけ研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, "Spatiotemporal Control of Migration of Single Cells on a Photoactivatable Cell-Microarray", *Journal of the American Chemical Society*, 129, 6694-6695 (2007)

・J. Nakanishi, T. Takarada, K. Yamaguchi, M. Maeda, "Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences", *Analytical Sciences*, 24, 67-72 (2008)

・Y. Kikuchi, J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, Y. Yoshino, K. Yamaguchi, Y. Yoshida, and Y. Horiike, "Grafting Poly(ethylene glycol) to a Glass Surface via a Photocleavable Linker for Light-induced Cell Micropatterning and Cell Proliferation Control", *Chemistry Letters*, 37, 1062-3 (2008)

・Y. Kikuchi, J. Nakanishi, H. Nakayama, S. Inoue, K. Yamaguchi, H. Iwai, Y. Yoshida, Y. Horiike, T. Takarada, M. Maeda, "Arraying Heterotypic Single Cells on Photoactivatable Cell-Culturing Substrates", *Langmuir*, 24, 13084-95 (2008)

・J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, Y. Kikuchi, K. Yamaguchi, Y. Horiike, "Light-Regulated Activation of Cellular Signaling by Gold Nanoparticles That Capture and Release Amines", *Journal of the American Chemical Society*, 131, 3822-3823, 2009.

(2) 特許出願

・発明者: 中西 淳, 山口和夫

発明の名称: 光照射によって細胞付着性を付与可能にする細胞付着・培養用基材

出願人: 物質・材料研究機構, 神奈川大学

出願日: 2007.9.15(未公開)

出願番号: 特願 2007-240292

・発 明 者:中西 淳, 山口和夫
発明の名称:光応答性薬物輸送体及び薬物付き光応答性薬物輸送体
出 願 人:物質・材料研究機構, 神奈川大学
出 願 日:2008.7.15(未公開)
出願番号:特願 2008-184326

(3)受賞

・2006 年 9 月 イノベーション賞(日本分析化学第 55 年会)

(4)著書

・宝田徹, 中西淳, 前田瑞夫, 「ケージド細胞培養基板を用いる細胞アレイ作製」, バイオインダストリー, 23, 6-11, 2006.

・中西 淳, 前田瑞夫, 「新規細胞アレイ作製法」, 医学のあゆみ, 218, 125-128 (2006)

・中西 淳, 「ケージド細胞培養基板を用いた細胞接着制御」, 分子イメージング:蛍光プローブが拓くライフサイエンスの未来(別冊『化学』), 43-47 (2007).

・中西 淳, 「ケージド化合物を利用した細胞の微小環境の制御」, 蛋白質核酸酵素, 52 1613-1618 (2007).

・山口和夫, 中西 淳, 中山秀一, 「光分解性シランカップリング剤による自己組織化単分子膜のパターニング」, 未来材料, 7, 18-26 (2008).

(5)学会発表

学会発表(国際)

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, S. Inoue, K. Yamaguchi, M. Maeda, "Controlling cell adhesion, migration and protrusion on a functional cell-culturing substrate", 第20回国際生化学・分子生物学会議, 2006.

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, "Spatiotemporal control of cell protrusions and cell migration on a photoactivatable cell-culturing substrate", Gordon Research Conference -Signal Transduction by Engineered Extracellular Matrices-, 2006.

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, H. Nakayama, T. Shimizu, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, Y. Horiike, "Dynamic Cell Patterning on a Glass Functionalized with an Alkylsiloxane Having a Photocleavable Group", 1st Asian Biomaterial Congress, 2007

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, K. Yamaguchi, Y. Horiike, "Dynamic Micropatterning of Biomolecules and Cells Based on Substrates Presenting a Succinimidyl Ester via a Photocleavable Group", 8th World Biomaterials Congress, 2008

・J. Nakanishi, "Photoresponsive Biointerfaces for Cell Analysis", MANA International Symposium, 2009

学会発表(国内)

・中西淳, 菊地由希子, 井上敏, 山口和夫, 宝田徹, 前田瑞夫, 「光応答性基板上に形成した一細胞アレイを用いた細胞移動の顕微観察」, 日本分析化学会 第 55 年会, 2006

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, Y. Horiike, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, "Spatiotemporal control of migration of single cells on a photoactivatable cell-microarray", 第 49 回日本発生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会, 2007

・中西 淳, 菊地由希子, 中山秀一, 清水貴弘, 山口和夫, 堀池靖浩, 「光応答性培養基板を用いた細胞クローニング」, 第 69 回日本分析化学討論会, 2008

・中西 淳, 中山秀一, 清水貴弘, 石田晴久, 菊地由希子, 山口和夫, 堀池靖浩, 「特定タンパク質を捕捉し光放出する金ナノ粒子」, 第 18 回バイオ・高分子シンポジウム, 2008

・中西 淳, 中山秀一, 清水貴弘, 石田晴久, 菊地由希子, 山口和夫, 堀池靖浩, 「光切断できる反応基を提示する金ナノ粒子」, 第 57 回高分子討論会, 2008

(6) 招待講演

招待講演(国際)

・J. Nakanishi, "Dynamic Control of Cellular Microenvironment Based on Caged Compounds", First International Symposium on Interdisciplinary Materials Science, 2008.

・J. Nakanishi, "Photo-induced cell patterning technology", 2nd Int. Symposium on Atomic Technology for Biomaterials Science, 2008.

招待講演(国内)

・中西 淳, 「細胞の光ナビゲーション」, 第 1 回バイオ医工学シンポジウム, 2006

・中西 淳, 「光機能表面による細胞接着の制御」, 日本薬学会第 127 年会, 2007

・中西 淳, 「光機能基板上での細胞の動的パターンニング」, 第 22 回茨城地区「若手の会」交流会, 2007

・中西 淳, 「光応答性基板を用いた細胞の動的パターンニング」, ライブセルモデリングシンポジウム, 2008

・中西 淳, 「光応答表面での細胞配置・操作技術」, バイオメカニクス研究会第 126 回研究会, 2008

(B) その他の主な成果 なし