

細胞を自在に動かし並べる技術 Technology for manipulation and array of cells

枝川 義邦

Yoshikuni EDAGAWA

(早稲田大学 生命医療工学研究所)

1. はじめに

生体内において細胞は秩序だって配置され、その場に応じた機能性を有している。まさに適材適所である。然るべき処に然るべき役者がおり、各自の持ち前を存分に発揮する様は、あたかも個々の持つ能力を最大限に活かす術を心得ているかのようである。またそれらが絶妙なバランスを保ちながら組織の効果を最大限に高めるためには、単に遺伝子に刻まれた情報が表現されるだけではなく、周囲の環境から得られた情報を元に各々の特徴を適応させていくことが必要であろう。生体にはこのようなダイナミックな調節系が備わっており、その調節機構は今もなお研究者の興味の対象である。科学研究における境界領域といわれる分野において新たに確立してきた医工学研究では、医学系・工学系のみならず、薬学系や理学系を含む様々な研究者の参入により、これまでには考えも及ばなかったような切り口からの研究が展開されてきている。生体を生体のまま扱うことは、その自然な形を理解するためには必要なことではあるが、生体を構成するひとつひとつの細胞を並べて組織を再構築した場合には、それまでには見えてこなかった新しい知見が得られることがある。本稿では医工学分野において最近大きな展開をみせている細胞を操作し配列させる技術についてまとめる。

2. 生きた細胞を並べるということ

生きた細胞を実験者の思いのままに配置するということには、どのようなメリットが含まれているのであろうか。

まず、実験をデザインする上では、観察者が解析の行いやすい実験系を組むという方向性に寄与することができよう。すなわち、これまでの生理学的な研究や細胞生物学的な研究で汎用されている実験系においては、細胞レベルでの実験を行う際には臓器などの組織を薄切片にした標本や多くの細胞を培養して細胞同士の結合をランダムに形成させた標本を用いる場合が多かった。しかし、実験者の意のままに生細胞を配置することができれば、解析の行いやすいより単純な実験系をデザインすることができ、さらに実験者が観察したい相互作用のみを取り出すことが可能となる。すなわち、目的とする観察対象以外の成分がもたらす多様なノイズ情報を取り除くことで、望むべき情報のみを得ることが期待できるということである。

さらに、このような実験系を構築するというメリットのみではなく、希望する細胞種を希望する場所に配置可能であれば、人工的に機能性を持った組織片を形成することが可能となり、実験室において臓器様の性質を示す構造体を構築することが可能となるであろう。このような研究はいずれ人

工臓器の形成に繋がるのが想定されている。このような切り口から、臓器様の構造体を形成し生体への移植を行うことで機能不全を回復させる再生医療を見据えての細胞配置の制御研究が展開されている¹⁾。

また、一方で移植等による再生医療を目指すのではなく、細胞を適切な位置に配置することによりデバイス化し、分析・診断に用いるという方向性も考えられている。このような間接的な方法の開発を行うことで医療や環境保護に寄与することも考えられる。例えば、生体において毒物を摂取した際に活動状態を変化させる肝臓の細胞を用いることにより、毒性試験のためのデバイスとして活用することができる²⁾。これは、栄養液の流路に細胞を配列し構築したデバイスを、栄養液中に混在している毒性成分の検出装置として見立てることで可能となった。すなわち、配列した細胞が栄養液中の毒性成分のセンサーとして働き、細胞の生存を観察したり分泌成分を分析することで毒性成分存在下での細胞の状態をモニターすることができるということである。このようなデバイスを開発することは毒性判定の目的で使用する実験動物の犠牲死数を顕著に減らすことが可能であり、また装置の形状を工夫することで使用細胞数や計測にかかる時間も大幅に短縮することができるため有用性が高い方法であると思う。

3. 細胞を意のままに配置する方法

生体内・実験室を問わず、多くの場合細胞が生存・生育するためには細胞を取り巻く周囲の基質に接着することが必要である。このような細胞が生育する条件を利用して、細胞が接着することができる領域を予め実

験者の希望するパターンに配置しておくことで、生細胞を実験者の希望する位置に配列させることが可能である。このような技術は細胞アレイ (Cell array) と呼ばれ、現在様々な分野において多くの応用例が提示されている。例えば、前述のように再生医療を見据えた臓器形成や多くの検体を同時に扱うようなスクリーニングを実現する細胞デバイスの開発がそれにあたる。細胞アレイの技術は細胞を培養する基板表面のパターニング法に大きく依存しているので、まず代表的な表面パターニング法であるソフトリソグラフィー技術についてまとめてみたい。

4. スタンプとインクで細胞を並べる

ソフトリソグラフィー技術は 1990 年代中頃に半導体分野での技術を応用して開発され³⁾、現在では生物学的な研究分野において広く活用されている。この方法はマイクロコンタクトプリンティング (μ CP) 法と呼ばれており、まず希望するパターンとなるようにポリジメチルシロキサンを用いて微細な凹凸を作製し、それをスタンプに見立て、インクにあたる様々な物質を基板表面上に転写する方法である。プリントする表面の物質には金、ガラス、シリコンなどが挙げられ、インクにあたる物質にはアルカンチオール、シラン化合物、タンパク質、ペプチドなどを挙げるができる。

真核細胞や多くの原核細胞は、生きたまま乾燥させたり、パターニングするために直接スタンプを押しつけることはできない。しかし、 μ CP 法ではリガンドやタンパク質のパターンを作り出すことができるので、基板表面の特定領域にそれらを限局させて

スタンプすることにより、結果として多くの付着性細胞のパターニングが可能となる。

これらの技術を用いることにより、細胞のサイズや形状を制御することができ、細胞の機能や性質と細胞の状態との相関性が明らかにされてきている。その中でも、基質に接着・伸展した際に細胞がとる形態が細胞増殖や細胞死を制御しているという報告³⁾は、これまでの細胞生物学的なアプローチでは解明が難しい内容であった。基板表面の性質を変化させ細胞と表面との相互作用を操ることで初めてその性状を詳細に明らかにすることができたというわけである。また逆に、表面を修飾する μ CP法を利用することにより、このような現象を人工的に制御することが可能となるのである⁴⁾。

5. 自ら組織化し並び立つ表面分子

ソフトリソグラフィを用いてタンパク質や細胞のパターニングを行った研究の多くは、金表面上へのアルカンチオール化合物の自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayers; SAMs) に関するものである⁵⁾。

SAMs は固体表面に種々の分子を配向・集積させる方法のひとつである。アルカンチオール化合物は金表面と反応して Au-S 結合を形成するが、このときアルカンチオール分子が有する長鎖アルキル基の分子間力と疎水性相互作用により、結合したアルカンチオールが高い配向性をもつ単分子膜として金表面上に非常に密な状態で並ぶことになる。疎水性相互作用は、水溶媒中において疎水性基が水分子を排除することに起因するものであるが、この作用によりアルカンチオール分子が基板表面に対して垂直方向に伸展した状態で配位することが実

現する。アルカンチオール化合物を用いた SAMs の場合、金表面との結合部位とは反対側のアルキル鎖末端に種々の機能性部位を導入することで、種々の機能を固体表面上に導入することができる。例えば、末端がアミノ基やカルボキシル基のアルカンチオールは、種々のペプチドやタンパク質、その他の分子認識サイトを導入することができるので有用性が高い。

タンパク質や細胞のパターニングを目的とする殆どの実験系においては金表面の SAMs が用いられているが、それは化学的に安定であり、さらに扱いが容易であるというだけではなく、生体適合性を有するからである。特に、細胞培養で使用することができる点、またそのような条件下においてはしごく安定である点で他の材料より優れている。例えば、銀表面は比較的速やかに酸化されてしまうことに加えて、一価の銀は細胞毒性を持っているので細胞を用いた研究には使用できないことから金表面の有用性が伺える。

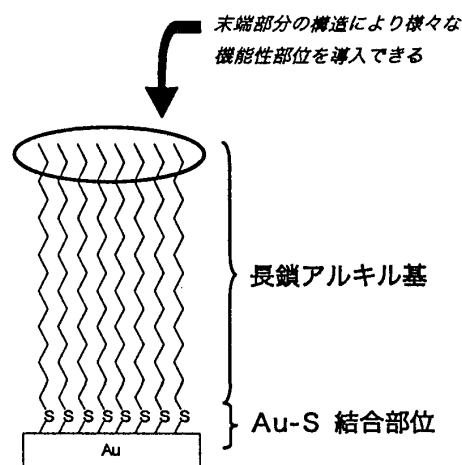


図 1 金表面に構築したアルカンチオール SAMs の模式図

6. インテリジェントであるということ

外部からの刺激に応答して、その構造や荷電密度などの物性を変化させる材料をインテリジェント材料と呼ぶ。このような材料を基板表面の性質を変えることに応用し、細胞を培養する表面を温度や光、pH、電場などの外部環境の変化に応答するように修飾することを表面のインテリジェント化という。インテリジェント化された表面では、その物性を動的に変化させた結果として、タンパク質などの生理活性物質や細胞との相互作用を変化させることが可能である。この性質を利用して、細胞の培養を行う際に細胞の接着・伸展を行う領域を外部からの刺激誘発的に形成させることができる。

これまでにいくつものインテリジェント表面を構築する技術が開発され、表面の種類も豊富になってきた。ここでは、これらのうち表面の性質を温度により制御した例と光により制御した例について紹介する。

7. 温度変化を感じ取る表面

まず、表面をインテリジェント化することで細胞の接着・脱着をコントロールし、再生医療の世界を変革しつつある例として温度応答性の基板表面を紹介したい。

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)は、水溶媒中において周囲の温度変化に伴い相転移を生じ溶媒である水との親和性を大きく変えることが知られている。臨界温度である32°Cを境にして、それよりも高温側では疎水性、低温側では親水性を示す⁶⁾。この特徴的な性質を細胞の培養系へ応用するためには培養皿への固定化が必要であるが、PIPAAmの場合は比較的簡便な方法により実現する。モノマーで

あるN-イソプロピルアクリルアミドを通常実験室で用いるポリスチレン製の培養皿上に満たし電子線照射を行うことで、培養皿表面から生じるラジカルによってモノマーが重合しポリマーを生成すると同時に基板表面に固定化するのである⁷⁾。

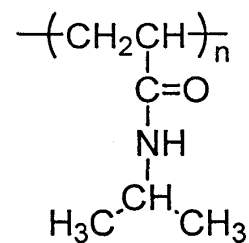


図2 PIPAAmの構造式

細胞が基板表面に接着し、伸展・増殖するためには、培養皿の表面が適度に疎水性であることが必要であるが、PIPAAmの場合には、細胞を培養する生理学的な温度である37°C付近では培養皿の表面が疎水性であり、培養に用いる血清由来のタンパク質や細胞自体が分泌するタンパク質が基板表面に吸着し、細胞の接着が促進される。培養液の温度を相転移温度よりも低温(例えば20°C)にすると細胞は培養皿の表面から剥離する。さらに驚いたことに、細胞をこのPIPAAm固定化表面上で培養し、全ての細胞が接触した飽和状態(コンフルエント)になった後に培養液を低温にすると、細胞は横方向の細胞間接触を保ちながらシート状で回収することができる¹⁾。これは従来の実験室で行われている細胞の回収法であるタンパク分解酵素トリプシンを用いた方法では、各々の細胞が単離した状態では回収できないことと比較して大きなメリットとなる。実際、このようなPIPAAm

を用いた温度応答性培養皿を用いて様々な細胞をシート状に培養することで再生医療への応用が展開されている^{1) 8)}。

8. 光の刺激を感じる表面

外部からの刺激によって表面の性質を大きく変えるためには、先のように表面に固定化した高分子化合物の相転移を利用する方法以外にも、分子構造の一部が変化または解離することによって残された部分に異なる性質を発揮させるという方法もある。例えば、UV照射により構造の一部が分解するシラン化合物をガラス表面に固定化すると、その表面のUV照射部だけに新しい性質が生まれる。ここでは、ニトロベンジル基を有したアルキルシロキサン化合物をガラス表面に結合させ細胞の接着をコントロールした例⁹⁾を挙げたい。このような修飾を行った場合、UV刺激前の状態では表面には疎水性のベンジル基が露出しているので血清アルブミンなどのタンパク質を吸着させることにより細胞は基板表面に接着できなくなる。しかし、希望するある一部分にのみUV照射を行うとニトロベンジル基の部分が分離しカルボキシル基が露出するので表面が親水化する。この新しくできた表面に細胞接着分子であるフィブロネクチンを吸着させることによりその部分にのみ細胞が接着する様にコントロールできる。この技術の優れている点は、空間的に制御された部分に細胞の接着を実現できるだけでなく、いちど細胞が接着した後に、時間的にタイミングをずらして次の接着部位を露出することができるところである。このことにより、異種細胞や分化のステージが異なる細胞を同一表面上で培養することが可

能となり、より多彩な組み合わせでの培養を実現することができる。

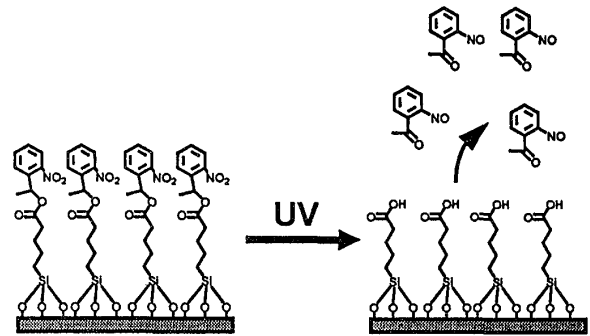


図3 光分解性の保護基を有したアルキルシロキサン SAMs の光分解

9. 細胞を意のままに動かす方法

これまでに紹介した技術は、予め実験者が細胞の接着面を形成しておくことで、その領域に細胞が接着した結果、希望する配列が実現するという方法であった。ここでは、既に接地している細胞を実験者の意のままに動かす技術について紹介する。

生きた細胞を操作するためには、タンパク質などの高分子化合物を扱う場合と比較して格段に高いレベルでの低侵襲性が求められる。これは細胞の形態や機能を生きた状態で維持しながら操作を行うことが必要となるからである。

このような条件を満たす技術として注目を集めているのが光ピンセット (Optical tweezers) 技術である¹⁰⁾。これは、光が波の性質をもつと共に粒子としての性質も持ち、粒子の性質が現れる条件下において、光の粒子 (光子) が物体に衝突した際に生じる反作用力を利用したものである。すなわち、ある物体を光が通過する場合、その

界面において屈折や反射という現象が起きる。光子の屈折は新たに運動量を発生させるのであるが、運動量保存の法則により系全体の運動量は保存される。物体を構成している物質の比誘電率が周囲媒体よりも高い場合には、その物体の界面で生じた光放射圧の合力は光の焦点に向く性質があるので、高誘電体はその焦点に向かって引き込まれることになる。つまり、光が通過する対象である物体自体が実際に運動を起こすことで全体の運動量が保存されるという仕組みである。この技術によって従来の方法では掴むことのできなかつた微粒子などを捕捉・操作することができるようになった。この技術は非接触操作による微生物の運動に関する研究や細胞融合に応用されているばかりではなく、広く医工学領域への応用が展開されている。

ところで、生きた細胞を取り扱う際には侵襲性が低いことが条件であった。しかし、一般に光の吸収は熱を発生させる。この光ピンセット技術では細胞を動かす際にレーザー光を照射するので、その条件設定には気を遣う必要があるが、多くの細胞や生物粒子は近赤外領域スペクトルにおいてわずかのエネルギーしか吸収しないことを踏まえて、この捕捉用のレーザーには近赤外の波長のレーザーを使用している。このように、細胞にダメージを与えることなく捕捉することができることもこの技術の優れた点である。

10. おわりに

本稿では、生きた細胞を意のままに配置し、移動させる技術についてまとめた。細胞アレイの技術は、材料科学をはじめ様々

な研究分野を応用することにより臨床応用されるまでに大きく発展したものである。また、光ピンセット技術は非常に強力な技術であり、例えば一分子のタンパク質やひとつの細胞を移動させるためには有効な手段である。最近ではレーザーを分光し一度に二百個もの対象物を独立に操作できるようになった。このような技術革新は異分野の科学が融合することにより生まれ、社会からの要請により育まれていくのであろう。

【参考文献】

- 1) Yamato M, Okano T, Cell sheet engineering, *Materials Today* 7: 42-47 (2004)
- 2) Tanaka Y, Sato K, Yamato M, Okano T, Kitamori, T, Drug response assay system in a microchip using human hepatoma cells, *Anal Sci* 20: 411-413 (2004)
- 3) Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DI, Whitesides GM, Ingber DE., Engineering cell shape and function, *Science* 264:696-698 (1994)
- 4) Dike LE, Chen CS, Mrksich M, Tien J, Whitesides GM, Ingber DE, Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 441-448 (1999)
- 5) Bain CD, Whitesides GM, Molecular-level control over surface order in self-assembled monolayer films of thiols on gold, *Science* 240: 62-63 (1988)
- 6) Heskins M, Guillet JE, Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide), *J Macromol Sci - Chem* A2: 1441-1455 (1968)
- 7) Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y, Thermoresponsive polymeric surface - control of attachment and detachment of cultured-cells, *Makromol Chem Rapid Commun* 11: 571-576 (1990)
- 8) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y, Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium, *N Eng J Med* 351: 1187-1196 (2004)
- 9) Nakanishi, J., Kikuchi, Y., Takarada, T., Nakayama, H., Yamaguchi, K., Maeda, M., Photoactivation of a substrate for cell adhesion under standard fluorescence microscope, *J Am Chem Soc* 126: 16314-16315 (2004)
- 10) Askin, A., Dziedzic, J.M., Bjorkholm, J.E., Chu, S., Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Opt Lett* 11: 288-290 (1986)