

分担研究報告書

軟骨細胞三次元培養におけるグリコサミノグリカン関連糖の添加効果

分担研究者

北海道大学大学院 工学研究科 教授
高木 睦

研究要旨

軟骨細胞の三次元培養において sGAG 構成糖の添加は Coll(II) 蓄積量を増大させる効果があると考えられた。

A. 研究目的

間葉系幹細胞 (MSC) を用いた軟骨再生プロセスでは、MSC を分化誘導して得た軟骨細胞を三次元培養し、細胞外マトリクス (ECM、軟骨では主としてアグリカンと II 型コラーゲン (Coll(II)) を著量蓄積させた組織を作成する必要がある。このうちアグリカンは、コアタンパクに多数の硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG、アグリカンでは主としてコンドロイチン硫酸 C (CSC)) が結合したプロテオグリカンの一種である。これまでに当研究室ではブタ初代軟骨細胞のゲル包埋型三次元培養において、CSC やその構成糖である D-グルクロン酸 (GlcA) と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の培地への添加は sGAG 蓄積量には影響を与えないものの、Coll(II) 蓄積量やその mRNA 発現量を顕著に増加させ、細胞数も約 1.5 倍に増加させることを明らかにした。一方、軟骨基質中に存在する CSC 以外のケラタン硫酸やヘパラン硫酸などの sGAG を構成する単糖として、GlcA や GalNAc 以外に L-イズロン酸 (IdoA)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、D-ガラクトース (Gal)、D-キシロース (Xyl) がある。そこで本研究では、ブタ初代軟骨細胞のゲル包埋型三次元培養におけるこれらの sGAG 構成糖の添加効果を調べることを目的とした。

B. 研究方法

I 型アテロコラーゲン溶液にブタ初代軟骨細胞を 5.0×10^6 cells/ml の細胞密度になるよう懸濁しゲル化した後、種々の糖を添加した 10%FBS 含有 MEM 培地

を重層し、37°C、5%CO₂雰囲気下で培養した。1週間毎に全量培地交換し、培養三週間後、細胞密度はトリパンブルー染色法、sGAG蓄積量はDMMB法、Coll(II)蓄積量はELISA法で各々測定した。また、培養上清中の一酸化窒素(NO)濃度をGriess法で、TGF-β1濃度をELISA法で各々測定した。

C. 研究結果

上記のsGAG構成糖4種類(DoAは5、50 mg/l、その他は5、50、500 mg/l)をそれぞれ単独添加した結果、GlcAやGalNAc添加と同様に細胞数は無添加に比べ少し増加したが、sGAG蓄積量にはほとんど影響しなかった。一方、Coll(II)蓄積量はDoA及びXyl添加では無添加の約2倍に、Gal添加では約4倍に、GlcNAc添加では約5倍に増加した。ところで、GlcNAcについてはNO産生抑制やTGF-β1産生促進などの効果が報告されており、それらを介したColl(II)蓄積量の増大が考えられた。そこで、各糖を添加し培養した際の上清中のNO及びTGF-β1濃度への影響を調べたが、糖添加による影響はほとんど認められなかった。一方、sGAGを構成していないD-フルクトースやD-マンノース(5、50、500 mg/l)を単独添加した結果、sGAG構成糖のような細胞密度やII型コラーゲン蓄積量を増加させる効果は認められなかった。

D. 考察

sGAG構成糖がII型コラーゲン遺伝子発現を促進する作用機作を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

軟骨細胞の三次元培養においてsGAG構成糖の添加はColl(II)蓄積量を増大させる効果があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

“High Inoculation Cell Density Could Accelerate the Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocyte Cells.”

Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, and Wakitani S.

J. Biosci. Bioeng. 2007;103:98-100.

“Fetal-calf-serum-free culture of Chinese hamster ovary cells employing fish serum.”

Fujiwara M, Tsukada R, Tsujinaga Y, and Takagi M.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007;75:983-987.

“Noninvasive Measurement of Three-Dimensional Morphology of Adhered Chinese Hamster Ovary Cells Employing Phase-Shifting Laser Microscope.”
Takagi M, Kitabayashi T, Ito S, Fujiwara M, and Tokuda A.
Journal of Biomedical Optics. 2007;12. in press.

“Effect of static pressure on intracellular pH of adhesive CHO cells.”
Fujiwara M, Koizumi S, and Takagi M.
J. Biosci. Bioeng. 2007. in press.

『接着動物細胞の形態解析による非侵襲的分化診断の試み』
高木 睦
生物工学会誌 (Seibutsukougaku-kaishi). 2007;85:435-437.

『セルプロセッシング工学－抗体医薬から再生医療まで－』 (Cell Processing Engineering (From Antibody Medicine to Regenerative Medicine)) (単著)
(コロナ社) (2007年10月18日) ISBN 978-4-339-06739-2.

『再生医療教科書シリーズ第4巻「再生医療のための バイオエンジニアリング－遺伝子工学・細胞工学・組織工学－』 (共著) [赤池 敏宏 監修]
2章 セルプロセッシング工学 (コロナ社) (2007年4月12日)

『再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性 (Assessment and Safety of Cells and Tissue Engineered Products for Regenerative Medicine)』 (共著) [大串 始 監修] 第10章間葉系幹細胞 2 間葉系幹細胞の評価
(シーエムシー出版) (2007年6月29日) ISBN 978-4-88231-690-9

2. 学会発表

化学工学会秋季大会

演題番号 : 30F068 要旨集ページ: -

『グリコサミノグリカン関連糖添加による軟骨細胞のⅡ型コラーゲン蓄積の促進』

池田昌弘、鍵田恵梨奈、藤原政司、脇谷滋之²⁾、高木 睦

(北海道大学工学研究科生物機能高分子専攻、大阪市大 医・整形²⁾)

2007年 9月 13日－ 9月 15日 (北海道大学)

日本生物工学会年会

演題番号 : 2F11-1 要旨集ページ: 139

『グリコサミノグリカン関連糖添加による軟骨細胞のⅡ型コラーゲン蓄積の促進』

池田昌弘、鍵田恵梨奈、藤原政司、脇谷滋之²⁾、高木 睦

(北海道大学工学研究科生物機能高分子専攻、大阪市大 医・整形²⁾)

2007年 9月 25日 - 9月 27日 (広島大学)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2007-216494

発明の名称: 魚類血清を含む細胞培養用培地

発明者 : 高木 睦、塚田亮平、藤原政司

出願人 : 高木 睦

出願日 : 2007. 7. 23

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

分担研究報告書

細胞工学技術による高機能 Scaffold 開発

分担研究者

大阪大学産業科学研究所 特任准教授（常勤）
齋藤 敬

研究要旨

細胞へ機能性マーカー等の物質を導入する、また細胞から物質を取り出す技術はバイオの基盤技術として、様々な研究が行われている。しかしながら、単に微小な細胞の操作装置を開発しても、そのような操作が細胞死を誘発するという問題が顕在化している。

我々は細胞死を誘発しにくく、かつ成功率の高い細胞膜穿孔法を発見し、その応用を進めている。この技術はマイクロインジェクション法の一種で、局地的な光酸化反応により化学的に細胞膜を穿孔する。またパッチクランプ法のような細胞膜の吸着を伴わないため、キャピラリーを細胞から外す作業も比較的容易である。

現在までの成果として、微小ガラスキャピラリーによるマイクロインジェクションに穿孔法を応用し、高い生存率や遺伝子導入を達成、更に大規模な自己組織化による棒状酸化亜鉛結晶で同様の膜穿孔に成功している。本年度は脳循環系の細胞治療に適した細胞標識化ないし細胞改変を行えるよう、医療応用に向けて新たに量産性の高い細胞膜穿孔体を開発、またその運用条件の最適化を容易にする、自動システムを作成した。このシステムにより、付着性・浮遊性いずれの細胞集団に対しても、大規模物質導入に有意な成果を得た。

A. 研究目的

細胞集団への物質導入法は、近年特に重要度を増している。その一例として、京都大学山中グループによる誘導性多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell, iPS 細胞(Ref. 1)を挙げることが出来る。これは受精卵を破壊して作成するため生命倫理上の問題がある胚性幹細胞 embryonic-stem-cell (ES 細胞)によらない、新たな幹細胞であり、その開発は世界的なニュースとなった。iPS 細胞の作成には、細胞に対し4つの遺伝子の同時導入が必要である。このような遺伝子導入には現在、ウイルスの細胞融合機能を利用したウイルスベクターが用

いられている。しかしながら、この方法では発ガン性など安全性の面での懸念があるため、非生物的な遺伝子導入法が求められている。

実際的な物質導入法に必要なのは、日常的に実施できる価格で、大量の細胞を、高い確率で処理できることにある。しかしながら現在、非生物的な遺伝子導入法は、成功率が一般に低く、また細胞の性質に強く依存するため、汎用性が低いという問題がある。

これに対し我々は、細胞膜に局地的に酸化反応を引き起こすことで、細胞死を誘発しにくい細胞膜穿孔が可能であることを発見し、応用を進めてきた（図1）。一例としてはマイクロインジェクション法に光化学的な細胞膜穿孔法を組みあわせ、任意の細胞に100%近い確率で mRNA の導入と発現に成功している（Ref. 2）。一昨年には、局地酸化反応による細胞膜穿孔を大規模に実施することに成功した。細胞膜穿孔には自己組織化材料である酸化亜鉛ナノロッドを使用、また光酸化反応を触媒する光増感剤はナノロッド先端に自己組織化により修飾される。このため、細胞膜穿孔体は安価に作成が可能である。

特長としては、基本素材が無機材料であるため、長期保存や、滅菌しての再利用も可能と考えられる。使用法も、細胞膜穿孔体を細胞に接触させ、適当な圧力下で微弱な紫外線を照射するのみで、簡便である。加えて、穿孔には細胞膜リン脂質の連鎖的な酸化反応を利用するため、特に細胞の種類には依存しないと考えられる。

しかしながら、酸化亜鉛基板においては均一に剣山状結晶を生成させるのは難しく、大面積化にはハードルが高い。これは結晶成長が基板の温度分布や、気相から供給される亜鉛の堆積の偏りにより大きく影響を受けるためである。また酸化亜鉛基板は硬いため、細胞膜穿孔時に加圧方向が鉛直からずれると、エッジの部分が偏って加圧される。その結果、酸化亜鉛の棒状結晶が部分的に折れることもあった。亜鉛は生体毒性が低いと言われているが、アスベストなどサブミクロン径の硬い棒状構造体が引き起こす毒性が知られていることから、今後の臨床応用を考えると、折れた棒状結晶の混入は避けることが望ましい。

もう一点は、細胞膜穿孔の触媒となる光増感剤の選択である。酸化亜鉛基板では、微量の金を核として剣山状結晶が析出する VLS 結晶成長を利用している。結晶先端に金の含有率が高いため、硫黄原子を含む化合物は金-硫黄結合で先端部に特異的に修飾可能であるが、硫黄を含まない増感剤はそのままでは修飾できない。現在我々が使用している光増感剤はチオフェン三量体のため修飾使用できるが、光力学療法などの医療用に認可された光増感剤には、修飾困難な分子構造を持つものがほとんどである。

これらは、動物細胞への適用に対しては強く改良が望まれる点である。何より動物細胞を対象とする場合、大腸菌などに比較して増殖速度が遅いため、大面積の穿孔体で一度に処理することが望ましく、穿孔体の面積拡大が鍵となる。また、穿孔条件を均一にするためには、穿孔体を均一に加圧することもまた重要と考えられる。

このため、新たに量産性に優れた硬質シリコンゴム（ポリジメチルシロキサン、PDMS）で剣山状の細胞膜穿孔体を作成した。作成法としては、多孔質シリコン基板を転写鋳型とした。これは電解エッチングにより、サブミクロン径の孔を表面全体に自己組織化形成したものである。また、PDMS が硬化する前に光増感剤を分散しておくことにより、その表面において細胞膜穿孔機能を持たせることが可能と考えた（図2）。特長として、電解エッチングによる多孔質シリコンは大面積化が容易であり、転写体も大型化できる。またPDMSは柔軟性があり、均一な加圧に適している。またいかなる光増感剤であっても、PDMS中に分散可能であれば適用可能であり、選択の幅は大きい。

B. 研究方法

以上のPDMS転写体による細胞膜穿孔というコンセプトを実証するため、今回の実験に際しては、動物細胞を対象に実験系を構築した。これは既存の細胞膜穿孔実験はいずれも動物細胞で行われており、細胞膜穿孔体の、細胞に当たる微小棒の径が500nmから1 μ mで適用可能であるという、大まかな範囲が分かっていたためである。

また細胞膜穿孔の評価には、通常は膜を透過しない、マイクロインジェクション用の蛍光色素を利用した。細胞外にこの色素がある際に、細胞膜の一時的な傷害と回復が達成されれば、細胞内に色素が閉じこめらる。このため細胞外から色素を取り除き、細胞の蛍光染色状況から膜穿孔の達成を評価できる。我々は今後、本法を遺伝子等の様々な物質導入法に発展させることで、本法の有用性を更に高めることが出来ると考えている。

なお細胞膜穿孔体の運用には、光照射時間と、穿孔体が細胞に及ぼす圧力の2つのパラメータを最適化する必要がある。穿孔の評価は培養ディッシュ上の細胞に対し、細胞膜不透過性の蛍光色素が、どの程度穿孔処理の前後で浸入したかで判定している。このためには、光源のシャッター開閉、ディッシュを固定した顕微鏡のステージ移動、蛍光波長の選択などを一定の手順で繰り返す必要がある。従来は一連の作業を手動で行ってきたが、本年度に研究実装ロボット技術の応用により、細胞膜穿孔法の条件最適化プロセスを大幅に自動化した。これにより半日を要した実験が一時間以内で終了する等、実験サイクルの大幅

な短縮とデータ信頼性の向上に繋がった。この成果は今後の定量解析に大きく貢献することに加え、装置の商業化プロトタイプとして産業面での訴求力もある。

Ref.1) Takahashi et al. *Cell*, 131, 861-872 (2007)

Ref.2) R.Yano et al., *NeuroReport*, 13, 1263 (2002).

実験

実験設備

自動化細胞膜穿孔・撮影システム (図3)

本体： IX71 蛍光顕微鏡(オリンパス、東京、日本)

QICAM-C モノクロ高感度冷却 CCD カメラ (QImaging, BC, Canada)

または SP350 デジタルカメラ(オリンパス、東京、日本)

拡張部品：

3軸マイクロマニピュレータ NI (Eppendorf, Hamburg, Germany)

同 マイクロインジェクションポンプ InjectMan

2軸ステージ SGSP20-35 (XY) (シグマ光機、東京、日本)

同 ステージコントローラ SHOT-102

同 照明部電動シャッタ蛍光、透過光) BSH-RIX、BSH-TIX

同 シャッタコントローラ SSH-C4B

KRS4013HV シリアルサーボ2ヶ (近藤科学、東京、日本)

(顕微鏡蛍光キューブ選択、顕微鏡ピント補正を電動化)

以上、LabVIEW7.1(National Instruments, TX, U.S.A.)で統合運用
制御PC Latitude D620 (DELL, TX, U.S.A.)

マイクロ冷却遠心器(3500型、久保田商事、東京都、日本)

クリーンブース (Z-901、ホーザン、大阪、日本)

顕微鏡等、細胞膜穿孔システムは遮光カーテンで覆い実験を行った。

開発ソフトウェア

いずれも National Instruments 製 LabVIEW7.1 上で動作する。

近藤科学 サーボモータ ICS2.0 ドライバ

顕微鏡自動化用の、近藤科学製 KRS-4013HV サーボモータを制御するドライバソフトである。このモータの出力軸は 270° の可動範囲を持つが、この回転座標を 3500～11500 の範囲で 8000 分割し、任意の座標へ移動するよう指示、また移動後の座標を読み取ることが可能である。また移動先座標に 0 を指定することで、出力軸を自由回転に設定することも可能である。

焦点記録プログラム

- ①ステージを PC 制御下で標準の 20 座標 (XY) を自動巡回して焦点 (Z) を記録する
 - ②ステージを手動で操作し、任意の座標 (XY) とその位置の焦点 (Z) を順次記録する
- 以上の 2 種がある。一連の座標は順番を付けられた上でテキストファイル形式で保存され、自動加圧プログラムや自動撮影プログラムで利用できる。

自動加圧プログラム

プログラム中の配列に、蛍光顕微鏡の蛍光フィルタターレットの番号、照射時間と、加圧条件 (hPa) を設定することで、35mm 径ディッシュに加圧 4 条件、それぞれの加圧下で光照射時間 5 条件、計 20 条件での条件出しを実施可能である。

またステージにおける XY 座標、対物レンズの Z 座標も、テキストファイル形式で記述することにより任意に変更可能である。

自動撮影プログラム

まず、撮影箇所のステージ XY 座標、対物レンズの Z 座標を、テキストファイル形式で記述する。次にプログラム中の配列に、蛍光顕微鏡の蛍光フィルタターレットの番号、撮影時間を設定する。これらの設定に従い、自動的に各座標で指定した蛍光ないし透過照明の撮影を行う。撮影された画像ファイル名には撮影座標、フィルタ番号、撮影時刻が含まれるため、穿孔作業の前後など、相互の比較が容易である。

転写穿孔体の作成

素材

シリコーンゴム： ポリジメチルシロキサン (以下 PDMS) (SYLGARD184 silicone elastomer kit, DOW CORNING, MI, U.S.A)

光増感剤： 2,2':5',2''-Terthiophene (以下 α T) (Aldrich, WI, U.S.A)

α T 19.85mg をメタノール 5ml に溶解、16mM stock solution とする。

これを更にメタノールで8倍に希釈した 2mM stock solution も作成した。

酸化鉄粒子： Iron(III) oxide nanopowder
(544884-25G, Aldrich, WI, U.S.A)

転写鋳型

電解エッチング多孔質シリコン基板 (17mm角基板)
(カンタム14、東京、日本)

Type A (平均孔径 0.8 μ m 程度, 平均孔ピッチ 2 μ m 程度, 孔深さ 2 μ m 以上)

Type B (平均孔径 2 μ m 程度, 平均孔ピッチ 5 μ m 程度, 孔深さ 3 μ m 以上)

Type C (平均孔径 100nm 程度, 平均孔ピッチ 300nm 程度, 孔深さ 1 μ m 以上)

その他小物

スチロール樹脂ケース (スチロール角形ケース1型、アズワン、大阪、日本)

シリンジ、ただしラテックスを含まないタイプ
(NORM-JECT 50ml, HENKE SASS WOLF, Tuttlingen, Germany)

作成法

1. PDMS の主剤と硬化剤を混合、光増感剤と鉄粉を加えて十分に攪拌する。

転写デバイス1ヶ当たりの組成は以下の通り

酸化鉄粒子 0.1g

PDMS 主剤 2ml (1.977g)

PDMS 重合剤 200 μ l (0.1977g)

光増感剤 16mM stock solution 200 μ l

2. スチロール樹脂ケースに多孔質面を表にシリコン基板を置いておく。

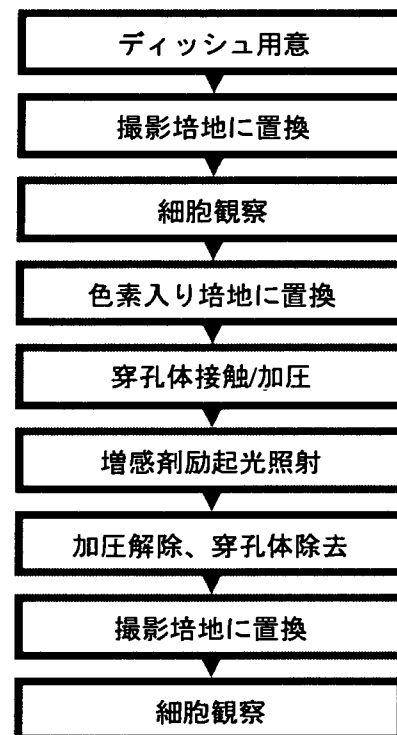
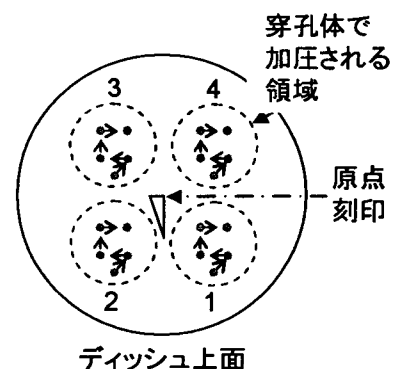


図 付着細胞 膜穿孔手順



付着細胞実験手順

ディッシュ上を1~4の領域に分け、領域順、かつ矢印順に●印位置の細胞を撮影。

各領域に対し、加圧条件は変えず、矢印順に●印位置の細胞に異なる時間で励起光照射し、穿孔。

領域順、かつ矢印順に●印位置の細胞を再度撮影、穿孔前後の像を比較する。

3. シリンジの内筒を抜き、シリンジ内に PDMS 混合物を流し込む。内筒を再度はめ、規定量の PDMS 混合物をシリコン基板上に注いでゆく。
4. そのまま室温で一晩放置後、シリコン基板から固化した PDMS を剥離する。
5. シリコンゴム用ボーラーで、直径 12mm の円盤状に穿孔体を切り出す (図 4)。

細胞実験関連試薬

付着細胞撮影用培地 : NeuroBasal-A Medium, without phenol red (Invitrogen, CA, U. S. A)

添加物は標準的な調整法に従い、B-27 supplement と グルタミン、グルタミン酸を加えた。実験に際しては 37°C、炭酸ガス濃度 5% に設定した CO₂ インキュベーター中で 2 時間以上、調整済培地を静置し、温度と pH を調整した上で使用した。

細胞膜不透過性蛍光色素 AlexaFluor594 (Alexa Fluor® 594 hydrazide, sodium salt for microinjection, invitrogen, CA, U. S. A)

付着細胞への適用の際には、この 10mM 原液 2 μ l、調整済 NeuroBasal-A 998 μ l の比率で混合し、色素濃度 20 μ M の stock solution とした。

浮遊細胞への適用の際には、この 10mM 原液 4 μ l と PBS 996 μ l の比率で混合し、色素濃度 40 μ M の stock solution とした。

付着細胞への適用 (図 5)

1. 穿孔対象として、ラット株化細胞 PC12 を使用した。この細胞は取り扱いが容易で、現在までの細胞膜穿孔実験も含め、様々な分野で標準的に用いられている。
2. 細胞をディッシュに 140 細胞/ μ l、3ml で継代培養。数日経過したものを使用する。
3. 標準の細胞培地を除去し、撮影用培地 1ml をディッシュの内壁を伝わらせながら慎重に入れて、ディッシュ上の細胞を洗う。もう一度培地の除去と洗浄を繰り返し、最終的に撮影用培地 1ml とする。以降、ディッシュ上の細胞

の洗浄処理に際してはこのプロセスを繰り返す。

4. ディッシュの中央に上面からデザインナイフで傷を付け、簡易的に座標原点とする。その上でディッシュを顕微鏡ステージに固定する。
5. ステージをステージコントローラのリモコンにより手動で調整し、ナイフで付けた傷の位置をステージ原点に設定する。その後、ステージコントローラをPC制御に切り替える。
6. 蛍光顕微鏡の2番蛍光キューブをWU（広域紫外）フィルタに設定、対物レンズは10倍、蛍光絞りを調整し、光スポット径が2mmになるようにする。
※フィルタは本来はNU（狭域紫外）が望ましいが、この実験の時点ではWUしか使えなかった。
7. 自動焦点記録プログラムを実行、ディッシュ上の標準20座標について、順に焦点を設定してゆく。
8. 自動撮影プログラムを実行、標準20座標における透過照明像とAF蛍光像を撮影。
9. ディッシュより撮影培地を除去、AF色素入り培地1mlを慎重に入れる。
10. 穿孔体を加圧シリンジにセット、自動加圧プログラムを実行
11. ディッシュ上の細胞を洗浄、撮影用培地に入れ替える。
12. 自動撮影プログラムを実行、標準20座標における透過照明像とAF蛍光像を再度撮影し、先の像と比較する。

浮遊細胞への適用（図6）

1. 浮遊細胞として、マウス白血球（C57マウス由来、単核球）への適用を試みた。国立循環器病センターより提供を受けた、単核球分散液（細胞数 3×10^6 、0.5ml）を50 μ l分取、同体積の蛍光色素溶液を加えて混合する。最終色素濃度は20 μ Mとなる。

2. 「蛍光顕微鏡の2番蛍光キューブをNU（狭域紫外）フィルタに設定、対物レンズは10倍、蛍光絞りを調整し、光スポット径が2mmになるようにする。
3. 細胞一色素混合液を、顕微鏡ステージに固定した35mmディッシュの中央に滴下し、乾燥しないうちに液滴上部から穿孔体で加圧する。この場合には中央部加圧用の専用プログラムを使用する。これは圧力1条件、光照射時間5条件で実施され、この光照射時間内に穿孔が達成されれば、染色された細胞が認められるはずである。なお液滴の半分以上は穿孔体の下から外に押し出されてしまうので、細胞改変の効率を重視する場合には滴下量はもっと減らしても良い。
4. プログラムに従って加圧と光照射を行った後、穿孔体は自動的に引き上げられて動作は終了する。穿孔体で処理された細胞が乾燥しないよう、すぐにPBSをディッシュ上に滴下し、細胞を分散、0.5mlマイクロチューブに回収する。（穿孔処理した細胞の回収をより確実にを行うには、穿孔体の下面にもPBSを吹きかけて細胞を洗い落とすことが望ましい。）
5. 回収した細胞を、遠心分離（25℃、1300rpm、5分）により沈め、上澄みをPBSで置換する。遠心分離をもう一度繰り返し、上澄みを除去。（PC12細胞と同一の条件で遠心分離を行ったが、マウス単核球は沈みにくいようだ。細胞が傷まない程度に、より強いGをかけて沈める必要があると思われる）
6. この細胞分散液を、通常細胞数の計測と同様に、Burker-Turk血球計算板に20 μ l滴下し（上下の計測部に約半分ずつ）、デッキグラスをかける。蛍光顕微鏡で撮影し、体積当たりの細胞数全体と、その中の蛍光染色された細胞数から膜穿孔効率を確認する。この撮影の際には、対物レンズ4倍を使用する。（対物レンズ10倍のままでは血球計算板の標準1エリア、約0.1 μ l相当は撮影できない）

（倫理面への配慮）

ラット株化細胞を対象とした実験については、特に倫理面に配慮する必要はない。また、マウス単核球は国立循環器病センター研究所脳循環研究室より提供を受けたが、細胞採取に際して実験動物に苦痛を与えないなど、センター動物実験指針を遵守し研究を行っている。

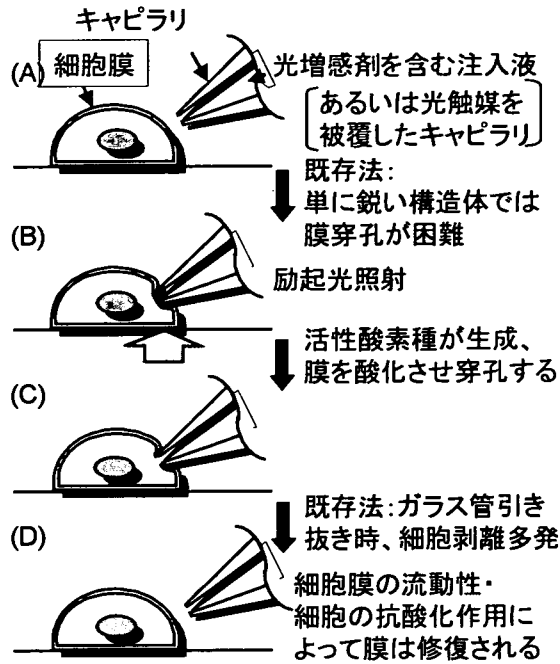


図1 高効率細胞膜穿孔法 基本原理
例: マイクロインジェクション

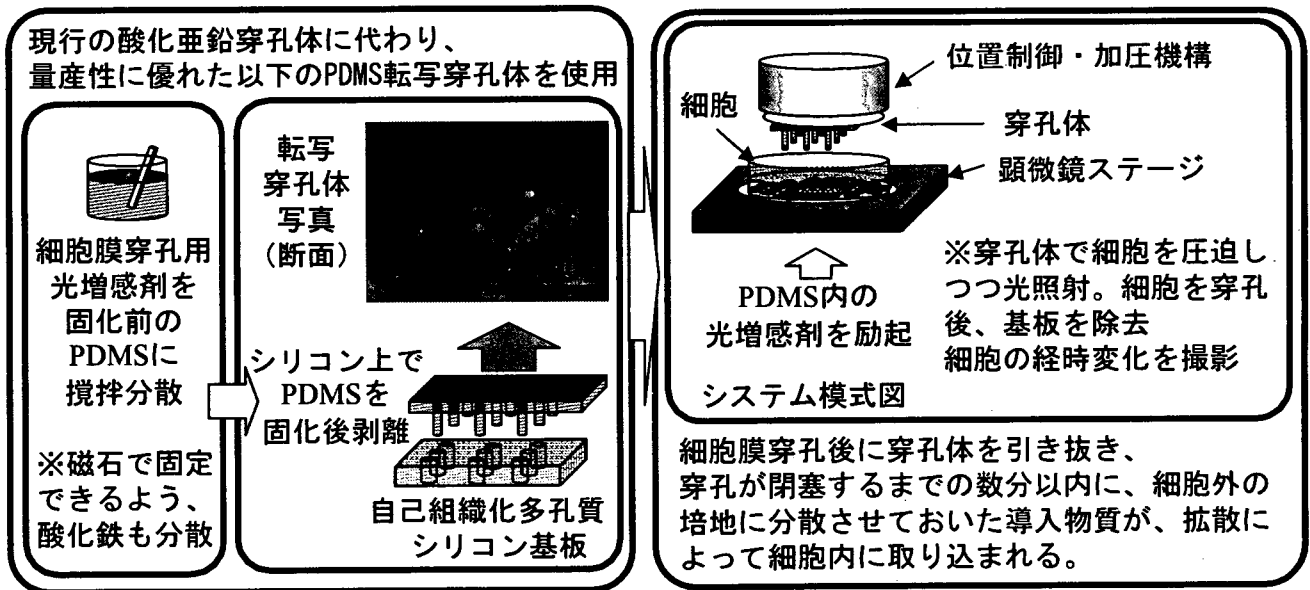


図2 転写穿孔体の作成と運用法

なお浮遊細胞では、細胞分散液を穿孔体とディッシュの間で圧迫固定し、その状態のまま5段階の光照射を行っている。このため撮影した細胞は、光照射量が段階的に異なる、すなわち膜穿孔の程度が段階的に異なる細胞の混合物であり、穿孔処理された細胞の蛍光強度に差が現れたものと考えられる。今後、これらの細胞の蛍光量の経時変化を定量評価することで、蛍光量の分布をある程度量子化し、細胞の傷害を出来るだけ抑制しつつ、物質導入を行える最適な条件を明らかにしうると考える。なお光照射のみでも染色された細胞は、先の付着性細胞のケースと同様のケースと考えられ、いずれもPDMS穿孔体による細胞膜穿孔自体を否定するものではないと思われる。

E. 結論

本年度の研究開発により、量産性あるPDMS転写細胞膜穿孔体を開発し、浮遊、付着いずれの細胞にも適用可能であるという端緒を付けた。また、穿孔体の運用条件の最適化を大幅に省力化するシステムを構築できた。昨年度末に私の所属研究室が移転したこともあり、本年度は機材や人材の制約が大きかったが、そのような中で新システムによる膜穿孔の確認まで達成することが出来たのは、朗報である。今後は画像解析のノウハウを蓄積し、細胞集団に対する細胞膜穿孔の定量的解析をすすめ、最適な穿孔条件を一定の手順でルーチンワークとして導出できるようにする。また既存のリン酸カルシウム共沈法など、非生物学的な遺伝子導入法のノウハウを習得し、本法との比較を行う。

なお穿孔自動化システムは、適用する細胞に対し、細胞死を誘発せずに細胞膜を穿孔しうる、光量（強さ、時間）や穿孔体の加圧条件範囲を速やかに求めることが主目的である。条件が判明すれば、あとは自動化システムを使用しなくとも、穿孔体に適当におもりを載せ、タイマー等で一定時間の光照射を行えば、同様の穿孔作業を行いうる。次年度においては、このような簡易型システムを医療系研究室に導入、現場で改変した細胞を利用した動物実験に移行したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

神経インターフェース

齋藤 敬

応用物理 76(12), 2007, pp.1384-1387.

2. 学会発表

東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム

『酸化ナノロッドを用いたハイスループット細胞膜穿孔技術の開発』

関 宗俊、野口真路、齋藤 敬、田畑 仁

東京大学、2007.9.15

第24回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム

『化学的細胞膜穿孔のための試薬灌流型チャンネル/試薬固定プローブを有するマイクロデバイス』

山本貴宏、磯 圭介、小西 聡、齋藤 敬、六車仁志、田畑 仁

東京、2007.10.16-17

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国際公開番号 : W001-19953

発明の名称 : 膜の穿孔方法および装置

出願人 : 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター

発明者 : 齋藤 敬

本年度、米国に於いて認可(“Method of perforating membrane and apparatus therefor” 2007.9.4)、手続中

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

細胞膜穿孔機能を有する高機能 Scaffold の量産商業化について、以下の共同研究を開始。

共同研究 株式会社アテクト

課題名 : 細胞への新規高効率遺伝導入技術の応用開発

予算規模 : 320 万円

実施期間 : 平成 19 年度 (継続予定)

代表者 : 齋藤 敬

C. 研究結果

今回選定した3種の多孔質シリコン基板を鋳型に、転写作成したPDMS穿孔体を図7に示す。

- ・ Type A ではPDMSの剥離も容易で、かつ剣山状の形状が転写された。
 - ・ Type B ではシリコン基板からPDMSの剥離が難しく、基板を割ってしまうことが多かった。剣山状の形状は転写されていた。
 - ・ Type C では剥離は問題なかったが、形状は転写されなかった。
- このため、細胞実験に際してはType Aの転写体を使用した。

付着性のラットPC12細胞に、PDMS穿孔体を適用した結果を図8に示す。加圧+光照射によって膜傷害が生じ、細胞質の漏出が起こっていることが透過照明写真から分かる。蛍光像では細胞の輪郭の蛍光ではなく、細胞質の蛍光染色状況を評価する。

この場合、細胞外に吸着したAF色素、また幾つかの細胞中のAF色素が照射時間と関係なく認められたが、大多数の細胞内のAF色素は、加圧下で、光照射時間に比例する傾向が認められた。また透過照明で撮影された細胞と、同一の領域でAF色素を含む細胞の写真と比較した結果、導入効率は100%近い結果となった。また、PDMS穿孔体を細胞に接触および細胞膜穿孔を行ったことによる細胞の剥離もこの時点では認められなかった。

また、浮遊性のマウス単核球について、PDMS穿孔体を適用した結果を図9に示す。加圧と光照射を実施した場合には、AF色素で染色された細胞が多く見いだされた。また、染色された細胞群の蛍光強度は細胞毎に差があった。一方、光照射のみを行った対象例では、わずかな細胞が染色されたに留まった。

D. 考察

細胞膜穿孔処理後、穿孔体と細胞が容易に分離できるのは、光化学的な細胞膜穿孔に特徴的な現象であり、酸化亜鉛穿孔体でも、最適な圧力条件では同様な結果が得られている。微小ガラス管を利用する既存の細胞膜穿孔法では、細胞に接触した微小ガラス管と細胞が密着して、ガラス管を細胞から外すことが出来ず、ディッシュから細胞を剥離してしまうことが多い。この点、細胞を剥離させずに大規模に膜穿孔を行えることは、細胞集団に繰り返し様々な物質を導入可能という利点がある。なお照射時間と無関係に膜不透過性色素で染色される細胞は、以前使用していた同傾向の色素Lucifer Yellow CHの場合でも認められていた。これは細胞膜が傷む、あるいは細胞の飲食作用が昂進する等、膜の透過性が不安定ないし上昇していたためと考えられる。

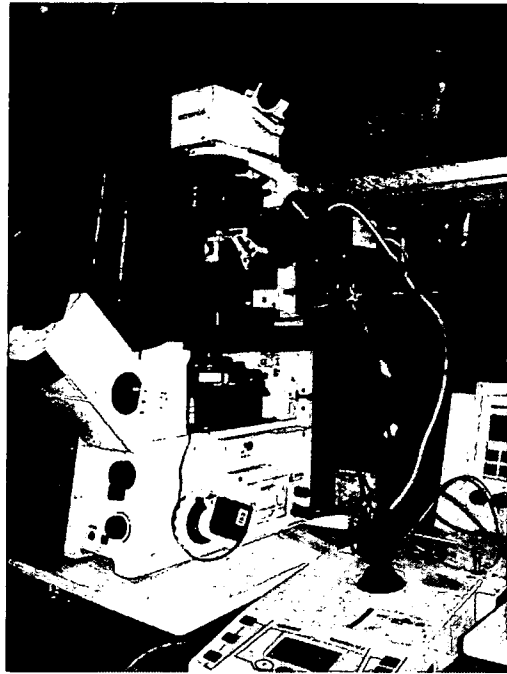
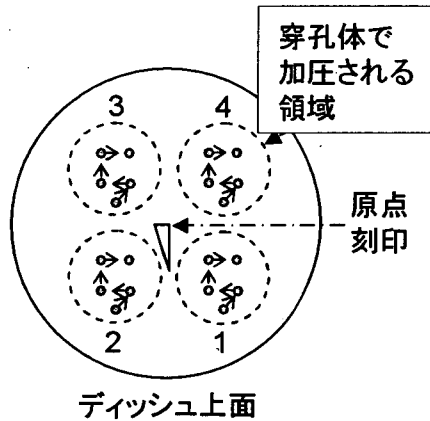


図3 自動化細胞膜穿孔・撮影システム



図4 PDMS転写穿孔体 全景
取り扱い簡便化のため、
磁石に付くよう酸化鉄粒子も含む。



手順
 ディッシュ上を1~4の領域に分け、
 領域順、かつ矢印順に●印位置の細胞を撮影。

各領域に対し、加圧条件は変えず、
 矢印順に●印位置の細胞に異なる時間
 で励起光照射し、穿孔。

領域順、かつ矢印順に●印位置の細胞を再度撮影、穿孔前後の像を比較する。

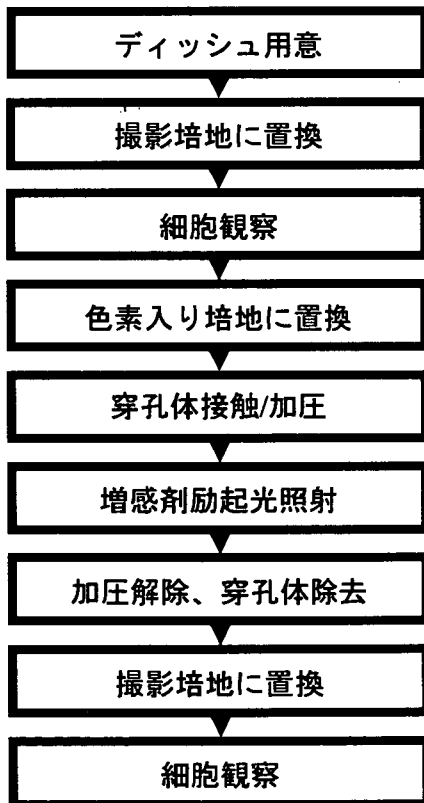
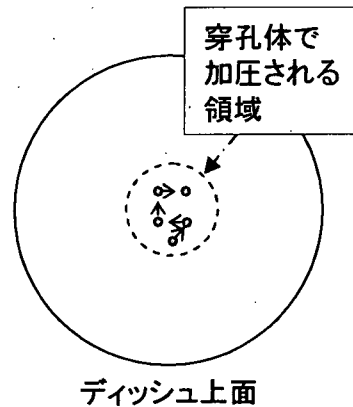


図5 付着細胞 膜穿孔手順



手順
 ディッシュ中央に細胞一色素混合液
 を滴下。

ディッシュ上の矢印順に●印位置の細胞に異なる時間で励起光照射し、穿孔。

PBSを追加し、細胞を回収する。

細胞外の色素を除くよう、遠心分離と上清の置換を行い、最終的な細胞分散液を血球計算板上で透過/蛍光撮影。

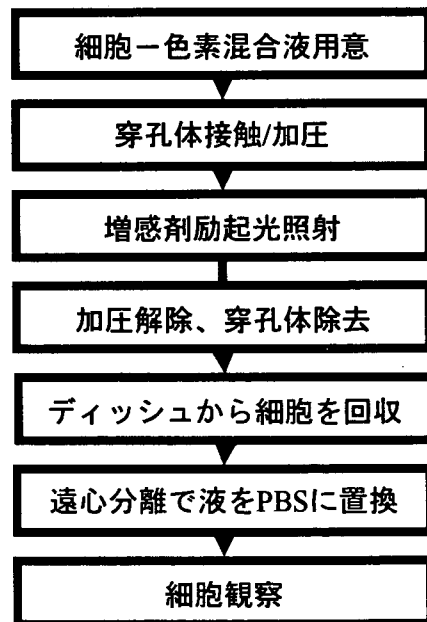


図6 浮遊細胞膜穿孔手順

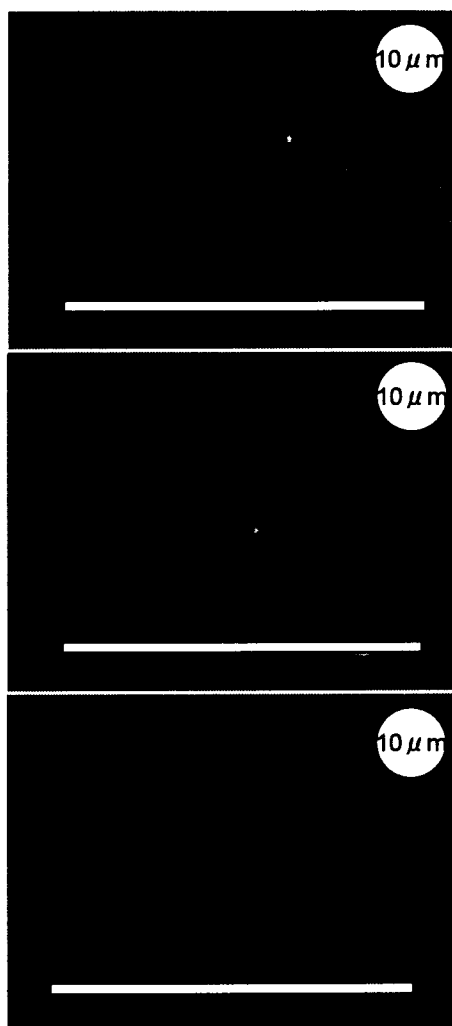


図7 鑄型別、転写穿孔体の断面写真

比較のため、動物細胞のサイズである
10 μm 径の円を記載。