

| | | | |
|------|----------------|-------|-------|
| 整理番号 | 2023 - J - 049 | 報告者氏名 | 山口 哲志 |
|------|----------------|-------|-------|

研究課題名

細胞の配置と回収の両方の光制御が可能な細胞付着表面の開発

<代表研究者> 機関名：大阪大学産業科学研究所 職名：教授 氏名：山口 哲志

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

遺伝子発現のシングルセル解析の進歩により、細胞集団内は遺伝子発現状態の異なる不均一な細胞によって構成されていることが明らかとなり、微量に混在するレアな細胞が病気の発症や治療効果に関連する可能性も示唆されている。そこで、1細胞遺伝子解析技術で検出される遺伝子プロファイルと、個々の細胞の表現型とを1細胞レベルで直接紐付けることができれば、表現型に関わる鍵遺伝子や分子ネットワークが同定され、生命現象の理解や新しい創薬標的の探索を飛躍的に向上できると期待される。そこで、大規模に1細胞の表現型を観察した後、その時系列画像に見られる表現型の特徴に応じて細胞を識別し、それらを正確に回収して1細胞遺伝子解析を行うプラットフォーム技術の開発が求められている。本研究では、このような技術を開発するために、細胞の配置と回収を1細胞レベルの精度で光制御できる光応答性の細胞付着表面の開発を目的とした研究を行った。

我々は、これまでに光照射に応じて細胞を付着できる光活性化ポリエチレングリコール (PEG) 脂質を開発した。また、光溶解性のゲルを用い、光に応じて細胞を放出する技術も報告してきた。そこで、この光溶解性ヒドロゲルの上に光活性化PEG脂質を用いて細胞を光配置すれば、光配置と光回収を同時に達成できる表面が開発できると考えた。まず、4分岐PEGの各末端に光分解性リンカーを介して反応基を導入した材料とゼラチンを混ぜ、基板上に延伸することで光溶解性のゼラチンゲル薄膜を調製した。この薄膜の上に光活性化PEG脂質を修飾し、紫外光の二次元パターンを照射した後、細胞を播種したところ、光照射位置のみに選択的に細胞を配置することに成功した。1細胞サイズの円形スポット光のアレイを照射したところ、ゲル薄膜上に1細胞ずつ並べることもできた。このように接着性のがん細胞のアレイを配置して培養すると、ゲル薄膜上にごん細胞が接着し、伸展することが確認された。また、培養後に蛍光顕微鏡観察を行い、特定の表現型（モデルとして緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の発現）に応じて細胞を識別後、光を照射することにより、ゲル薄膜が溶けて、細胞が脱着することも確認された。そこで、脱着した細胞をセルピッカーで回収し、逆転写PCRによって遺伝子発現を解析したところ、EGFP遺伝子の発現を検出することに成功した。このように、開発した光応答性の細胞付着表面を用いて、細胞を1細胞ずつ並べて観察後、着目する表現型に応じて細胞を光回収し、関連遺伝子の発現を確認できることが示された。

これらの研究成果の一部について学会発表を行い、現在、投稿論文として誌上発表準備中である。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

（口頭）

1. 李 雪陽、山口 哲志、岡本 晃充
「光分解性ゲル薄膜上での 1 細胞画像解析と細胞の選択的光選別」
化学工学会第 89 年会、大阪公立大学、堺、2024 年 3 月 20 日
2. 山口 哲志
「細胞を解析・制御するための光応答性細胞付着表面の開発」
日本膜学会第 46 年会、早稲田大学、東京、2024 年 6 月 12 日（招待講演）

（ポスター）

3. 李 雪陽、山口 哲志、岡本 晃充
「光分解性ゲル薄膜上での 1 細胞時系列画像と選別した細胞の解析」
第 73 回高分子討論会、新潟大学、新潟、2024 年 9 月 26 日

（誌上）

現在、投稿論文執筆中

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

研究の目的

近年、遺伝子発現のシングルセル解析が大きく進歩し、細胞集団内の不均一性が明らかになった。これにより、細胞集団全体で平均化して解析すると見えなかった細胞分化のタイミングや系譜、微量に混在するレアな細胞の存在などが、遺伝子解析によって検出できるようになった (Oxnard *et al.*, *Nat. Med.* **2016**, *22*, 232 など)。これらの1細胞ゲノミクスやトランスクリプトームで検出される遺伝子プロファイルと、個々の細胞の振る舞い(表現型)とを1細胞レベルで直接紐づけることができれば、表現型に関わる細胞内の分子ネットワークを明らかにできる。その結果、生命現象の理解や創薬標的の探索を飛躍的に向上できると考えられる。そこで、細胞集団に含まれる大量の細胞に対して、1細胞ずつ表現型を観察し、特徴的な表現型を示した細胞を選択的に回収して、その遺伝子発現を調べるワークフローが盛んに研究されている (Ota *et al.*, *Science* **2018**, *360*, 1246 など)。

これまでに、1細胞ずつの表現型を観察するために、油中に分散させた微小な水の液滴(ドロップレット)の中や (Madrigal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2022**, *119*, e2110867119 など)、微小なウェルに1細胞を閉じ込めて、その表現型を観察した後、細胞を単離して遺伝子解析に供する方法が報告されてきた (Dura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E3599 など)。しかし、このような既存の技術では、ドロップレットやマイクロウェルなどの微細構造に細胞を封じ込めて観察するため、接着伸展した状態の細胞の表現型を時系列解析することができない。また、マイクロウェルアレイを用いる方法では、低い効率で細胞種に制限はあるものの接着細胞を観察する方法が報告されているが、細胞回収において、細胞を吸引する際に、強く接着伸展している細胞を傷つけることなく回収するのが困難である。従って、回収の過程で、細胞内の核酸のほとんどが漏洩して回収できないという課題がある。そのため、細胞が本来の形状に接着伸展できる平面基板表面に細胞を一つずつ精緻に並べて培養・観察し、観察された表現型に応じて選択的に個々の細胞を温和な条件下で生きたまま取り外せるような細胞付着表面の開発が、生命科学や医工学、創薬など幅広い研究分野で求められている。そこで、本研究では、細胞の配置と回収を1細胞レベルの精度で光制御できる細胞付着表面の開発を目的とした研究を行った。

研究の経過

我々は、脂質の単一鎖が連結した高分子材料(ポリエチレングリコール(PEG)-脂質)を用いて、細胞を基板上に付着させる技術を開発してきた。このPEG脂質を基板に修飾すると、表面に提示された脂質と細胞膜とが相互作用し、細胞が瞬時に付着する。近年、我々は、細胞付着力を向上するために脂質鎖を2本にしたところ、疎水性が高くなり過ぎて脂質同士が凝集し、逆に、細胞膜と相互作用をしなくなることを偶然発見した。そこで、光分解によって脂質が2本から1本に変化するPEG脂質を合成し、光照射によって細胞付着力が活性化する光活性化PEG脂質を開発した(図1, Yamahira *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 13154)。この分子を修飾した表面では、紫外光から青色光の波長の光を照射することによって1細胞レベルの精度で細胞を配置でき(図1)、光配置を繰り返すことで、多種細胞も望むパターンに配置して、その相互作用を解析できる(図2)。

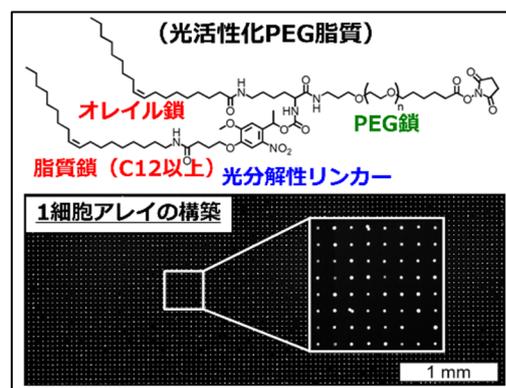


図1 光活性化PEG脂質の構造式と調製した1細胞アレイの蛍光顕微鏡画像

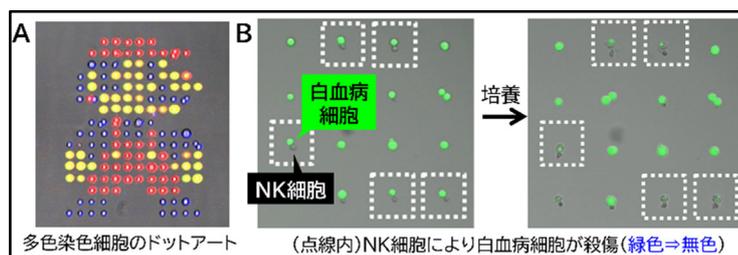


図2 細胞の光配置とNK細胞のがん細胞傷害性解析への応用

一方、我々は、光溶解性のヒドロゲルを用い、ゲルの溶解に伴って細胞を放出する技術も開発してきた (Yamaguchi *et al.*, *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 6416; Yamaguchi *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 5887)。そこで、この光溶解性ゲル上に光活性化 PEG 脂質を用いて細胞を光配置すれば、光配置と回収を同時に達成できると考えた (図 3)。しかし、これまで開発してきた両方の材料とも、紫外光から青色光領域の波長 (360~405 nm) に対して応答するため、単純に両方の材料を積層するだけでは、ゲルを溶解せずに細胞を光配置するのが難しいと考えた。そこで、より長波長の光 (450 nm 以上) で活性化できる PEG 脂質を開発し、二波長に反応して光配置と光回収が可能な表面を構築することにした。このような長波長応答性の光活性化 PEG 脂質として、これまでのパラニトロフェニル誘導体から成る光分解性リンカーを、BODIPY 誘導体に変えた材料の開発を計画した (図 3)。

当初の計画通り、BODIPY 誘導体を光分解性リンカーとした光活性化 PEG 脂質の合成を実施したところ、可視光領域の光で分解するため、精製分離の際に光分解が生じて、高い収率が得られないという課題に直面した。現在、その課題

を解決しながら、合成を行っている。一方で、当初、光配置と光回収を同時に達成することが困難であると考えていた、現状の光溶解性ヒドロゲル上にパラニトロフェニル誘導体型の光活性化 PEG 脂質を修飾した表面について、実際に調製して、本当に困難であるのかを調べてみることにした。光活性化 PEG 脂質の方が、光溶解性ヒドロゲルよりも少ない光の量に反応することがこれまでの検討で分かっていたため、光配置の際の光量を極力下げることで、光配置と光回収を同時に達成できるのではないかと期待して実験を行った。その結果、当初の予想に反して、望ましい結果が得られたため、以下、この後者の試みの成果について、結果と考察を報告する。

結果と考察

【積層表面の構築】 接着細胞の光配置と光回収の両方を実現するために、光溶解性のヒドロゲル薄膜の上に光活性化 PEG 脂質 **1** を修飾した表面の開発を試みた (図 4)。コラーゲンコートしたガラス基板の上に、ゼラチンと光分解性架橋剤 **2** との混合水溶液を落とし、薄膜状に延伸した。ここで、4 分岐 PEG の末端に光分解性リンカーを介して *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) エステルを導入し、架橋剤 **2** を合成した。飽和水蒸気下でゲル化後、PEG 脂質 **1** の DMSO 水溶液 (50%) を作用させ、ゲル薄膜上に PEG 脂質を修飾した。この表面にフォトマスクを通してスポット光 (365 nm) を照射し、細胞懸濁液を 5 分間作用させて細胞を光配置した。本研究では、モデル細胞としてヒト子宮頸がん HeLa 細胞を用いた。

まず、この方法でゼラチンゲル薄膜上に 1 細胞アレイを構築できるか調べた。光分解性リンカーを挿入していないゲルを用いて実験を行ったところ、精緻な 1 細胞アレイが構築できた (図 5)。このアレイを 12 時間培養後、細胞接着に関わるアクチンとビンキュリンを染色したところ、PEG 脂質を修飾していないゲル薄膜上と同様の染色像が得られた (図 5)。これより、PEG 脂質 **1** を用いて接着細胞をゲル薄膜上に光配置でき、その接着伸展した状態を観察できることが分かった。

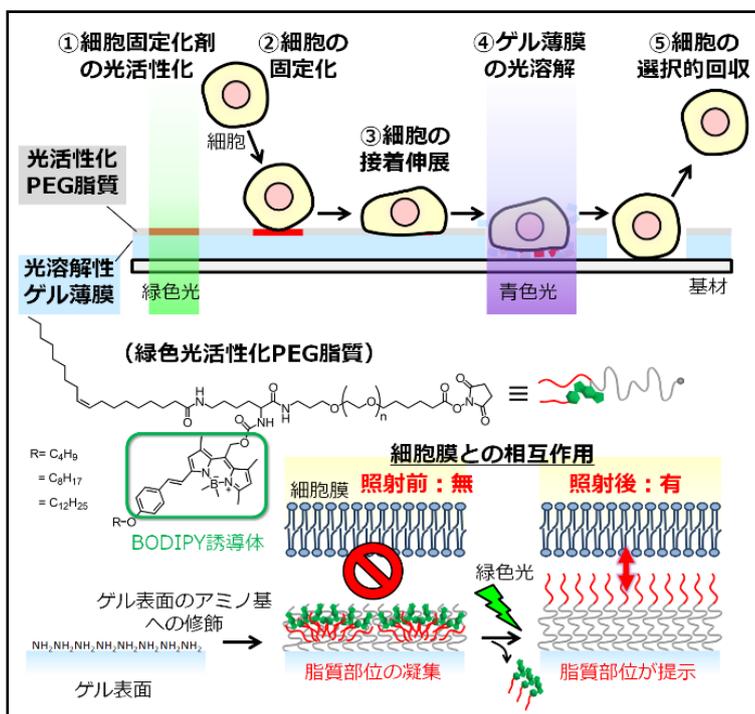


図3 二波長応答型細胞固定化表面と緑色光活性化PEG脂質の概念図

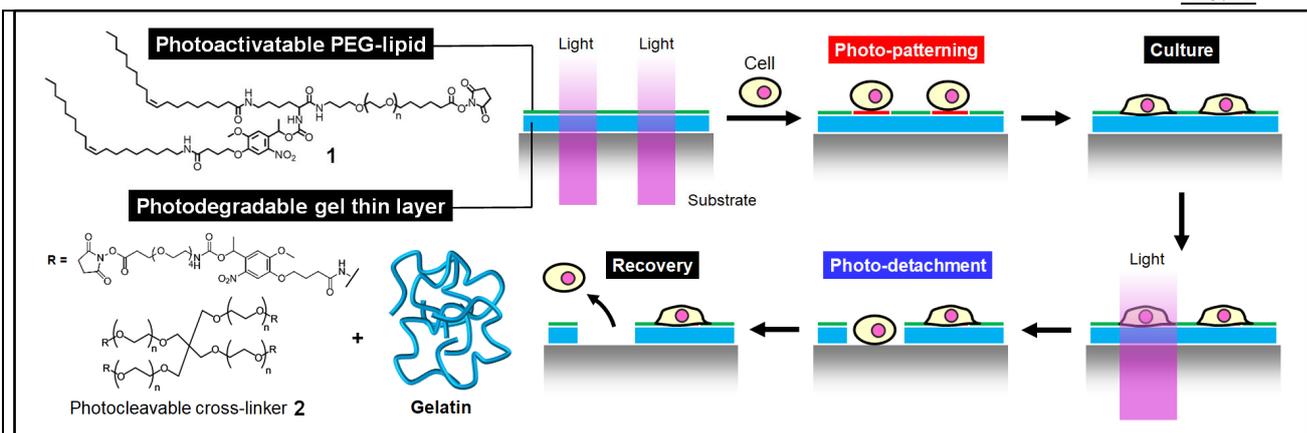


図4 一波長応答型の光活性化PEG脂質と光溶解性ゼラチンゲルを積層した光応答性表面上で細胞の光配置と光回収の概念図

次に、光溶解性のゼラチンゲル薄膜上からの細胞の光回収について調べた。PEG脂質を用いてゲル表面全体に高密度に細胞を付着し、光を照射してゲルの溶解に伴う細胞の脱着を計測した。その結果、 3 J/cm^2 以上の光量で完全に細胞が脱着した。脱着させた細胞を回収し、細胞生存率を調べたところ、回収前後で有意な差は見られなかった。これより、細胞にほとんど影響のない微弱な光で細胞を回収できることがわかった。

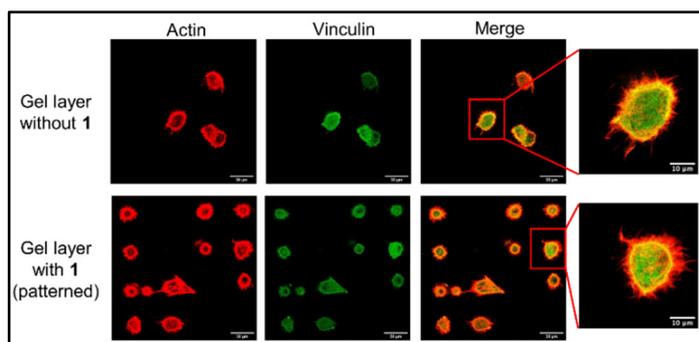


図5 光活性化PEG脂質1を修飾したゼラチンゲル上に光配置したHeLa細胞の蛍光顕微鏡画像

光溶解性のゲル薄膜上で、光活性化PEG脂質を用いて細胞を光配置できるかを調べた。今回、ゲルとPEG脂質の両方で同じ光分解性リンカーを使用しているため、ゲルが溶解しない光量で細胞を光配置する条件を探す必要があった。光量を変えて検討したところ、最小で 1.0 J/cm^2 で光配置できた。そこで、光配置した細胞が光回収できるかを調べるために、培養後に 5 J/cm^2 の光を照射した。その結果、ゲルの溶解は確認できたが細胞の光脱着は見られなかった。この結果より、培養中に細胞がゲル薄膜を越えて基板に接着してしまったと考えた。そこで、ゲル薄膜の厚みを $10\sim 30 \mu\text{m}$ の範囲で変えて実験を行ったところ、厚みに応じて細胞の脱着率が向上し、 $30 \mu\text{m}$ では脱着率が87%であった。以上の結果より、光溶解性のヒドロゲル薄膜上に光活性化PEG脂質を修飾した表面を開発し、接着細胞の光配置と培養後の高効率な光脱離を実現することができた。

【細胞アレイからの光回収と遺伝子解析】 望みの性能の表面が開発できたので、HeLa細胞の緑色蛍光タンパク質(EGFP)発現株と未発現株の1対1の混合サンプルを1細胞アレイ状に並び、EGFPの発現の有無に応じてスポット光を照射し、セルピッカーで選択的に回収した。回収した細胞からRNAを抽出し、逆転写PCRによってEGFP遺伝子の転写を調べたところ、緑色蛍光が観察された細胞からのみEGFP遺伝子の転写が確認された(図6)。そこで、細胞伸展の形態学的特徴(13個)のスコアに従って画像解析を行い、UMAP上で離れた位置にある細胞群から選択的に細胞を回収し、細胞の伸展や遊走に関連する6種類の遺伝子について、1細胞定量PCR解析を行ったところ、MMP9の発現量に有意な差がみられることが分かった。このように、表現型の観察によって識別した細胞から、表現型に関連する遺伝子の発現を検出できることが示された。

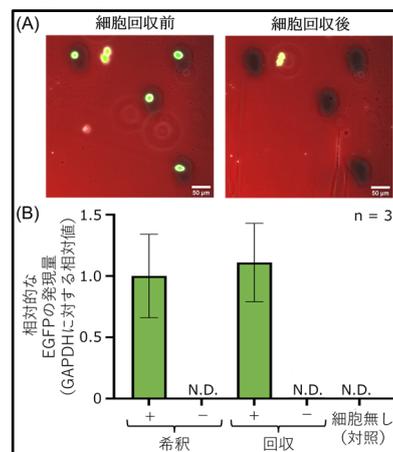


図6 (A) 細胞回収前後の画像。ゲルは赤色蛍光染色。(B) EGFP発現量の比較