

整理番号	H26-J-009	報告者氏名	中路 正
------	-----------	-------	------

## 研究課題名

生理活性を付与した高分子ファイバーメッシュによる細胞分離システム“セルセパレーター”の開発

<代表研究者> 機関名：富山大学 大学院理工学研究部 (工学)・先端ライフサイエンス拠点  
職名：准教授 氏名：中路 正

【備考】採択時の所属は、富山大学・先端ライフサイエンス拠点 (テニュアトラック・特命助教) であったが、平成27年4月より、同大学院理工学研究部 (工学) (准教授) に転属した。

<共同研究者> 該当なし

## &lt;研究内容・成果等の要約&gt;

再生医療の発展に伴い、細胞による医療の実現可能性が非常に大きくなってきている。しかしながら、実現に向けて超えるべき障害がまだまだ存在することも明らかになってきている。その一つに、「均質な集団として細胞を獲得しなければならない」という問題がある。

現在、主要な均質な細胞集団の獲得方法として、蛍光または磁気活性化細胞分離法や、密度勾配遠心分離法が挙げられる。これらの方法では、抗体によるラベル化や密度勾配を作製するための有機物質を使用しなければならないのだが、ラベル化剤の除去が不可能な点や、細胞毒性が強く疑われる有機物質の使用等、それぞれに問題があり、臨床で使用する細胞の分離法としては大きな問題を持っている。

そこで本研究課題では、**非ラベル化で安全に**、且つ、**簡便に**細胞分離が行えるデバイスの構築を目指した。具体的には、細胞の“サイズ”と細胞膜表面との“特異的相互作用”の二要素を複合化したものとし、目的とする細胞のみを高回収率、高純度で分離できるようにすることを目標とした材料創製を進めた。本助成を拝受して、これまでに、以下の5点について、①細胞分離の可能性の立証、および、②デバイス構築のアイデアの実現可能性の立証に重点を置いた研究を展開した。

- [1] 生体物質に対して非応答性を有する高分子の合成とその特性評価
- [2] 生体物質非応答性高分子のエレクトロスパンファイバーの構築とその最適条件の決定
- [3] 特定の細胞を捕捉できるオリゴペプチドの合成とその特性評価
- [4] 高分子メッシュへのオリゴペプチドの導入と細胞捕捉特性の評価
- [5] 選択捕捉された細胞の脱着の条件検討および最適化

生体物質非応答性を有し、且つ、特定の細胞と相互作用するオリゴペプチドを導入するための単量体、そして、強固なファイバー化が可能となる単量体をそれぞれ有する高分子の合成に成功し、ファイバー化できることを明らかにした。また、特定の細胞として、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) をターゲットとして、その細胞膜表面に存在する CD34 抗原と相互作用する Gln - Gln - Gly - Trp - Phe - Pro ペプチドを導入した高分子ファイバーによる細胞捕捉能を調査した。その結果、選択的に hMSC のみを捕捉できることが明らかになった。これらの結果は、選択的な細胞分離デバイスの構築に向けての足掛かりとなる重要な知見であると考えられる。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

【ポスター発表】

\*国際学会での発表1件、国内学会での発表1件

Saki Furukawa and Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Peptide-immobilized substrate for the culture of hiPSC maintained the pluripotency, IPC2014 (2014/12/2-5)

○古川彩希、中路 正、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養および細胞選択分離のための細胞制御キメラペプチドコーティング基材, 第14回日本再生医療学会総会 (2015/3/19-21)

## <研究目的>

病因の解明や薬効・薬物耐性評価、そして移植治療など、細胞を用いた医療は、多様化する疾病に対抗するための「次世代最先端医療」として考えられ、その確立に向けて様々な研究が進められている。その中で、いずれの用途においても、細胞を「均質な集団として得なければならない」という共通の課題が存在する。

細胞医療における細胞源としては、胚性幹細胞 (ES 細胞) ・人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 等の全能性幹細胞や、間葉系幹細胞・神経幹細胞等の組織幹細胞など様々な候補が挙げられるが、すべて、目的とする成熟細胞、または成熟細胞になりうる前駆細胞へと分化させ使用することが想定される。しかしながら、現状では、高効率な分化誘導法を用いたとしても、100% 均質な細胞集団を得ることが不可能であり、細胞分離が必要不可欠となっている。

主に用いられる細胞分離方法として、蛍光または磁気活性化細胞分離 (Fluorescence activated cell sorting, FACS または Magnetic activated cell sorting, MACS) 、また、フィコール等の有機溶剤を使用した密度勾配遠心分離法等が挙げられる。それらを用いることで均質細胞群を得ることが可能ではあるが、細胞を選別するために用いる蛍光ラベル化・磁気ラベル化抗体を除去することが困難であることや、細胞毒性が強く懸念される有機溶剤を使用すること等の問題を抱えており、臨床で使用する細胞の分離法としては利用できないと考えられている。

そこで本研究では、非ラベル化であり、安全な細胞を得る手法であること、さらに、簡便に分離が行えるデバイスの構築を目指す。具体的には、細胞の "サイズ" と 細胞膜表面との "特異的相互作用" の二要素を複合化したものとし、目的とする細胞のみを高回収率、高純度で分離できるようにする。

構築するデバイスは、細胞のサイズ分画を行うメッシュ構造と目的とする細胞のみを捕捉するための特異的相互作用を有する。

まず、二つの要素を的確に発現させるために、メッシュ基材に不必要な相互作用 (タンパク質吸着やそれに伴う細胞接着) が起こらない高分子を構成要素とする。そこで、細胞接着などを抑制することが知られている、双性イオン型高分子の一つ、カルボキシメチルベタイン (CBM) を使い、ファイバー化させてメッシュ構造体を構築する。その際、CMB のみの高分子では水に溶解することから、CMB とブチルメタクリレート (BMA) 等との共重合体として非水溶性高分子を合成する。

また、特異的な相互作用により細胞を捕捉するために、細胞膜上の表面抗原と特異的に相互作用するペプチドをファイバー上にアンカーリングさせる。 ペプチドの導入には、反応効率が非常に高いクリック反応を利用し、高分子ファイバー側にはアルキン側鎖を (プロパルギルメタクリレート, PGMA を使用)、一方、ペプチド側にはアジド側鎖のアミノ酸をそれぞれ導入する。

構築するファイバーは、生体物質に対して非応答性を有し、且つ、特定の細胞にだけ相互作用するものとする。これをメッシュ化させて、特異的相互作用能を有し、且つ、サイズ分画能を持たせた構造体とする。

## <研究経過>

### 【高分子合成とその特性評価】

非水溶性高分子とするため、まずはシンプルな系として、CMB と PGMA の共重合体を合成し、ファイバー化を試みた。その結果、CMB が 30 mol%、PGMA が 70 mol% の組成で、非水溶性のファイバーを構築することができた (図 1)。PGMA は、オリゴペプチドを導入するためのアルキン側鎖を持った単量体であり、その含有率を変えた素材を得る必要がある。そこで、CMB と PGMA、および、不溶性単量体として、BMA を用いて重合を行い、ファイバー化を検討した。その結果、図

2に示すように、ファイバー化が可能であることが分かった。

このファイバーの強度および耐久性を現在調査しており、最終報告 (H28年4月末) までに結果をまとめる予定であるが、強度・耐久性は、非水溶性単量体の種類を $T_g$ や結晶化度を考慮して選択する必要があると考えて検討を進めている。

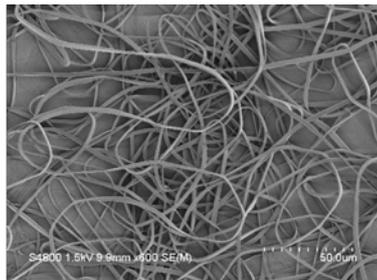


図1. CMB-PGMA共重合体 (CMB : PGMA = 3 : 7) で作製したエレクトロスパンファイバーの走査型電子顕微鏡像。

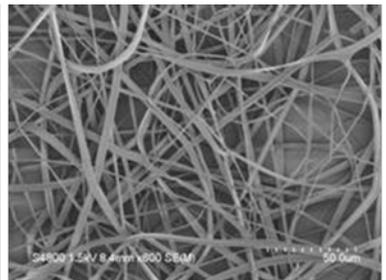


図2. CMB-BMA-PGMA共重合体 (CMB : BMA : PGMA = 3 : 6 : 1) で作製したエレクトロスパンファイバーの走査型電子顕微鏡像。

P(CMB-BMA-PGMA) へのタンパク質吸着を調査するために、ファイバー化せず、ガラス基板にキャスト膜を作製し、その表面へのアルブミン (ウシ血清アルブミン, BSA) の吸着を調査した。その結果、 $27 \pm 4.9 \text{ ng/cm}^2$  (ガラス基板へのタンパク質吸着量:  $248 \pm 13.4 \text{ ng/cm}^2$ ) であり、高いタンパク質吸着抑制能を示した。通常、細胞がタンパク質を介して接着するさいには、少なくとも  $40 \text{ ng/cm}^2$  以上の吸着が必要であると言われており、本高分子への細胞接着は、ほぼ完全に阻害できるものと考えられる。

### 【オリゴペプチドの合成】

ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) の膜表面に特異的に存在する CD34 抗原と特異的に相互作用する Gln-Gln-Gly-Trp-Phe-Pro (QQGWFP) 配列を有するオリゴペプチドを、固相合成法により作製した。このペプチドの C 末端には、アジド基を側鎖に有するアジドホモアラニン (AHA) を導入した。また、QQGWFP と AHA の間にリンカー配列として Gly (G) を数残基導入した。

まず、QQGWFP-GGG-AHA ペプチドを合成し、円二色性測定により評価した。その結果、207 および 220 nm に負のコットン効果を有することが分かり、 $\alpha$ ヘリックスの構造を有すると考えられる。次に、ペプチドの P(CMB-BMA-PGMA) への導入を調査した。P(CMB-BMA-PGMA) のアルキン残基モル濃度に対して、1.5 モル等量のオリゴペプチドを混合 (溶媒: メタノール/DMF/水混合液) し、クリック反応を行った。そのポリマーを限外濾過により精製後、MicroBCA 法によりポリマーに存在するペプチドを定量した。その結果、導入率が  $98.1 \pm 1.1\%$  であることが分かり、狙い通りペプチドをポリマーに導入できることがわかった。

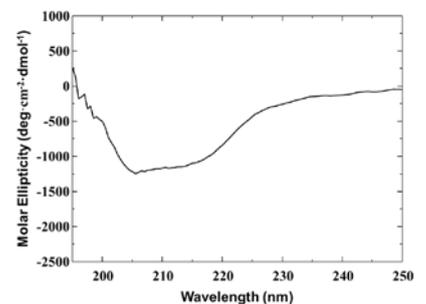


図3. QQGWFPGGG-AHAペプチドの円二色性測定。溶媒: 水、ペプチド濃度:  $300 \mu\text{g/mL}$ 。

ファイバー化させた場合は、アルキン側鎖がファイバーの表面に存在しなければ導入できないと考えられるため、そのあたりの考慮が必要であると考えられるが、ファイバー化したポリマーへのオリゴペプチドの導入は可能であると推察された。

### 【高分子フィルムへのペプチドの導入および hMSC 捕捉評価】

ペプチド導入高分子による細胞捕捉能を評価するため、P(CMB-BMA-PGMA) フィルム表面へ QQGWFP-GGG-AHA をクリックケミストリーにより導入し、その表面への hMSC の選択的接着について評価した。細胞接着評価では、比較対照として、ヒト腎由来細胞 (HEK293 cell) およびヒト神経前駆細胞 (hNPC) を用いた。

コポリマーフィルムへのペプチド導入量を MicroBCA 法により評価した結果、 $90.3 \pm 13.2 \text{ ng/cm}^2$  ( $85.1 \mu\text{mol/cm}^2$ ) であった。反応率は、表面にどのくらいアルキン残基が露出しているのかを定量できないため評価できないが、想像していた以上に多くのペプチドを導入できたと考えられる。

この表面に各種細胞を接触 (3 h) させ、細胞接着の選択性、hMSC のみの捕捉について評価した。その結果、オリゴペプチドを導入していないコポリマーフィルム上へはどの細胞も接着しなかったのに対し、オリゴペプチド導入フィルム上では、hMSC のみ接着し、その他の細胞種では全く接着し

ないことが分かった (図4)。これらの結果から、ペプチド導入高分子基材によって、選択的にhMSCを捕捉できることが示唆された。

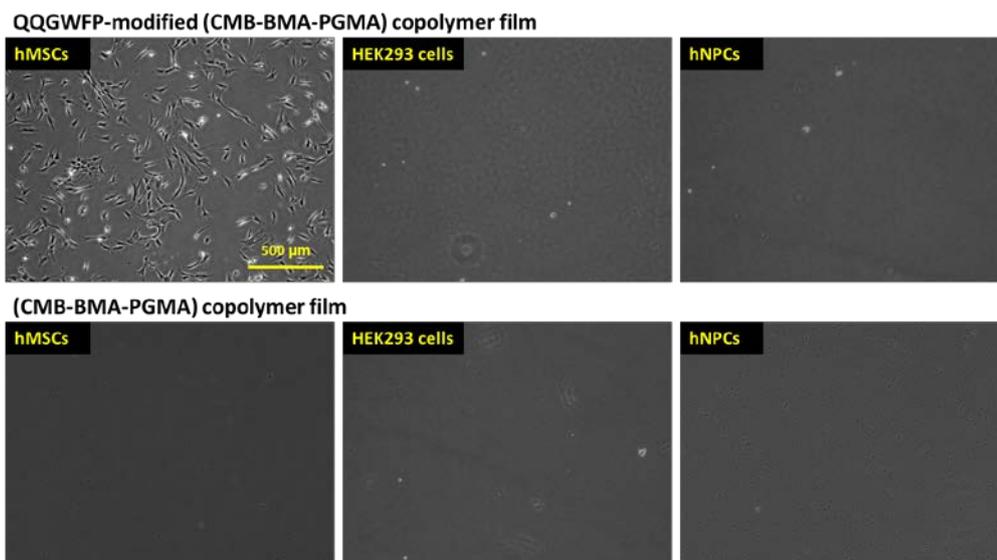


図4. オリゴペプチド導入 (上段) および非導入 (下段) コポリマーフィルム上への各種細胞の接着評価。細胞播種後、3時間インキュベーションし、培養液で十分に洗浄後、位相差顕微鏡により観察した。

#### 【選択捕捉された細胞の脱着の条件検討および最適化】

前述のように、高分子に導入したQQGWFPペプチドにより、hMSCのみを選択的に捕捉することができたことから、次に、選択捕捉された細胞の脱着についてを検討した。脱着は、QQGWFPペプチドを溶解した細胞培養液を用いることとした。まずは、ペプチドにより脱着できるかの可能性を探るべく、あらかじめペプチドによって処理された細胞が、QQGWFPペプチド担持高分子フィルムに捕捉されるかを調査した。その結果、ペプチドで処理された細胞は、フィルムへ捕捉されないことが明らかとなり、この結果を受けて、溶液中にQQGWFPペプチドが存在すれば、競争的に遊離のペプチドと高分子上に担持されたペプチドが相互作用し、細胞を脱着することができると予想した。

続いて、高分子フィルム上に捕捉された細胞の、QQGWFPペプチド溶液の暴露による脱着を評価した。その結果、QQGWFPペプチドの濃度が10 μg/mL以下では、捕捉された細胞が全く脱離してこなかったのに対し、それ以上の濃度では、5 min程度のインキュベーションにより脱離させることができることを見出した。この結果から、選択的に捕捉した細胞を遊離ペプチドを用いることで回収可能であることを見出された。

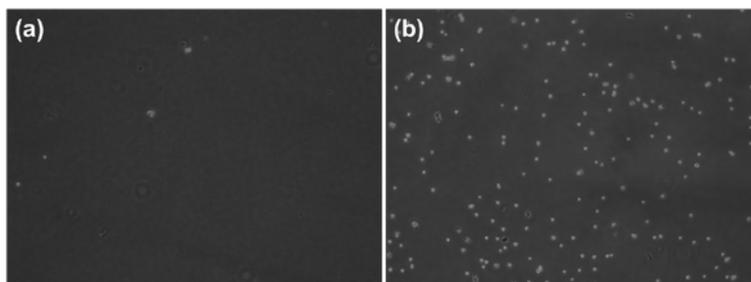


図5. QQGWFPペプチド担持高分子フィルム上にhMSCを暴露し10 min間インキュベーション後、リン酸緩衝液で洗浄した後の位相差顕微鏡像。(a)高分子フィルムに暴露する前に、あらかじめQQGWFPペプチドを含む培養液に浸漬(10 min)させたhMSC。(b)何も処理されていないhMSC。

#### <今後の展開>

本助成を受け、前述した重要な成果を挙げる事ができた。これらの結果は、特定の細胞のみを捕捉できる簡易デバイスの構築が可能であることを裏付けるものである。今後は、得られた成果を踏まえ、細胞分離に最適な高分子メッシュの探索を進めていく。それに合わせて、ペプチドのリンカー長や導入量と細胞捕捉能との関係の調査等、進めなければならないことが多数存在するため、本研究は、引き続き進めて行こうと考えている。