

# 時空間を制限した細胞内シグナルの発生とその計測

中西 淳

物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点

## 1. 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、計測技術の進展は著しいのとは比べ、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・新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」<sup>1</sup>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作製し、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。

## 2. 研究成果

### (1) ケージド培養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構が存在し、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。一般に実験室で細胞移動を引き起こす際、液性因子の濃度勾配を形成する手法やコンフルエントの細胞をピペット先などで掻き取る方法が採られるが、これら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などの影響を受け、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

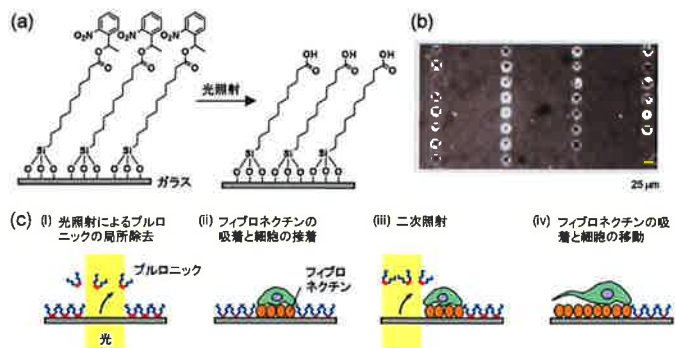


図1. ケージド基板を用いた細胞移動の光誘導法 (a) ケージド基板上の光化学反応. (b) 基板の上に形成した一細胞アレイ. (c) 細胞移動の誘導法の原理.

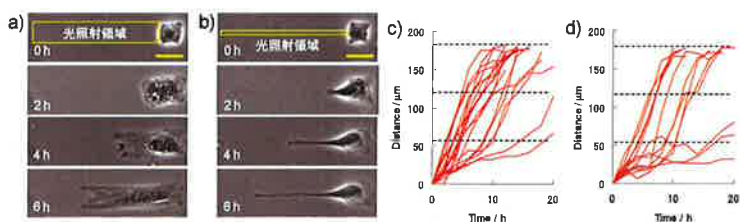


図2. ケージド基板上的での細胞移動の誘導. 幅25 μm(a,c), 5 μm(b,d)の通路上での一細胞の移動挙動の例(a,b), および各一細胞の先端端の時間変化.

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 x 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2 a, 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1 b)、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部の移動挙動をまとめたのが図2 c, dである。同一通路幅上における細胞の挙動に着目すると、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  $\mu\text{m}$ の通路上より25  $\mu\text{m}$ 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。以上のように、ケージド基板を用いることによって、アレイ状に配置した一細胞を対象に細胞移動を自在に誘導する方法の開発に成功した。

## (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、共有結合を介して直接光分解性基に連結した新規基板の開発を行った(図3)。

接触角測定、全反射赤外吸収スペクトル測定、エリプソメトリー、AFMにより、同基板へのPEGの固定化および光解離を確認した。つづいて、作製したケージド基板上の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4 a, 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4 c)。次に、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4 d, e)。以上のように、本基板では、少なくとも2週間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。

つづいて、アレイ中の特定の一細胞の近接領域に対してのみ二次照射を行ったところ、当該細胞が選択的に移動と増殖を繰り返し、コロニーを形成した(図4 f-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り、二次照射による細胞接着領域の拡張を利用して、狙った細胞を選択的に増殖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。

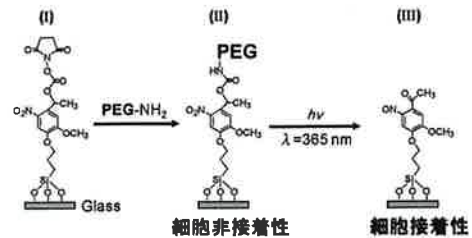


図3. 光解離性PEGに基づくケージド基板

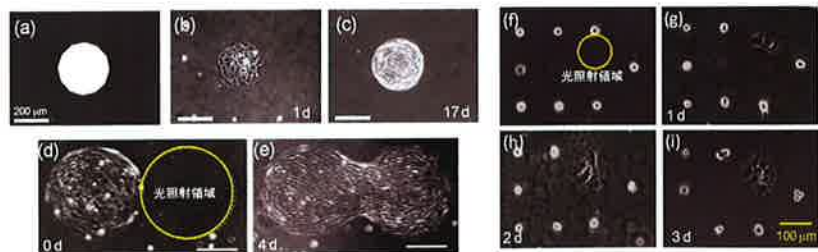


図4. 光分解性PEGに基づくケージド基板上的細胞接着制御。(a)光照射領域。(b)1日後および(c)17日後の細胞の位相差像。(d, e)光照射による細胞移動・増殖の誘導。(f-i)特定一細胞の選択的増殖。

### (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、直径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、その赤外吸収スペクトルを指標にナノ粒子へのアミンの固定化と光放出を確認した。また、紫外-可視吸収スペクトルから、一つのナノ粒子辺りの光分解性分子の導入数、アミンの固定化量、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、 $\sigma$ -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 $\text{Ca}^{2+}$ 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、一過性に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 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 $\text{Ca}^{2+}$ 応答は見られなかった。以上の結果は、ナノ粒子に固定化されている時点では、ヒスタミンは活性を失っており、光照射によ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 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの伝播に関する詳細な追求が可能であろう。

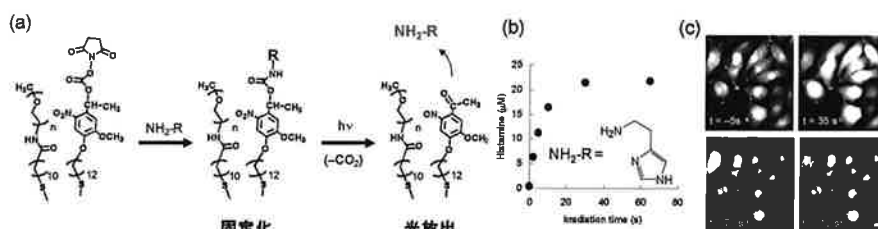


図5. 金ナノ粒子に基づくケージング担体(a)原理. (b)ヒスタミンの光応答的放出. (c)Fluo3-導入HeLa細胞での光照射(t=0, 100 ms)に対する $\text{Ca}^{2+}$ 応答.

本手法においては、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、簡単にケージド化合物を合成することができる。したがって、ここで示した例以外に、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、金-チオール反応により他の修飾基の導入も容易である点も主張に値する。例えば、ドラッグデリバリーシステムで使用されるような標的化ペプチドを用いることで、特定細胞への選択的な取り込みなども実現できると期待している。

以上のように、ケージド基板とケージング担体を作製し、時空間を制限して細胞に刺激を与える方法を開発した。使用した光化学反応は、標準的な蛍光顕微鏡の水銀光源による光照射で進行するため、(3)で例示したように蛍光イメージング技術との両立も容易である。現在、細胞機能解析の自由度を高めるために、本材料・技術の適用可能性の検証を進めているところである。

(参考文献) <sup>1</sup>J. Nakanishi et al. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16314-5 (2004)

### 3. 主な論文

- Y. Kikuchi, **J. Nakanishi**, H. Nakayama, S. Inoue, K. Yamaguchi, H. Iwai, Y. Yoshida, Y. Horiike, T. Takarada, "Arraying Heterotypic Single Cells on Photoactivatable Cell-Culturing Substrates", M. Maeda, *Langmuir*, 24, 13084-95 (2008),
- Y. Kikuchi, **J. Nakanishi**, H. Nakayama, T. Shimizu, 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),
- **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),
- **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)
- 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*, 52,1613-8 (2007).

### 4. その他

#### 特許

- 中西 淳, 山口和夫, "光応答性薬物輸送体及び薬物付き光応答性薬物輸送体", 特願 2008-184326
- 中西 淳, 山口和夫, "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", 特願 2007-240292.

#### 受賞

- 中西 淳, 日本分析化学会第 55 年会, イノベーション賞受賞 (2006 年 9 月)