

## 論文の内容の要旨

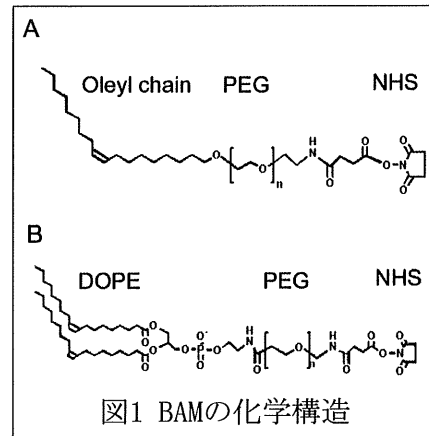
### 論文題目 脂質-PEG を用いた細胞膜へのタンパク質アンカーリング法 及び細胞固定化法の開発

氏名 加藤耕一

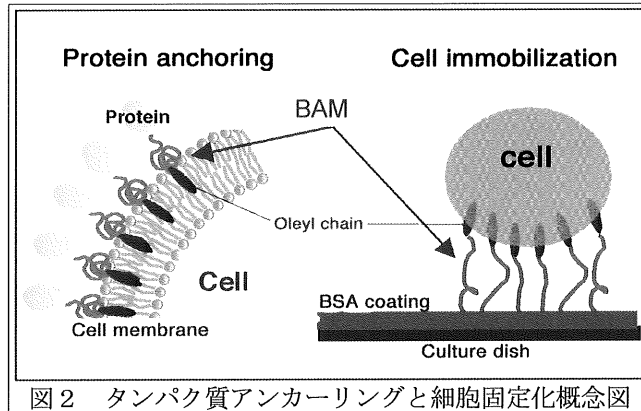
#### 1. 脂質-PEG を用いた細胞表層へのタンパク質アンカーリング 技術開発

【緒言】細胞膜上は細胞外の情報を細胞内へ取り入れるためのタンパク質が備わるインターフェイスとしての機能をもつ重要な部分であり、その細胞表面に任意の物質を導入する技術は細胞に新たな機能を付加できる可能性を秘めている。タンパク質を細胞表層に提示するために遺伝子導入法や化学修飾法などが報告されているが、それぞれ発現細胞を得るのに時間がかかること、膜タンパク質の本来の機能を損なう可能性があることなど問題を含み利用は限定されている。

これらの問題点を解決する方法として、本研究ではリピッドアンカー法を採用した。リピッドアンカーは細胞膜に結合



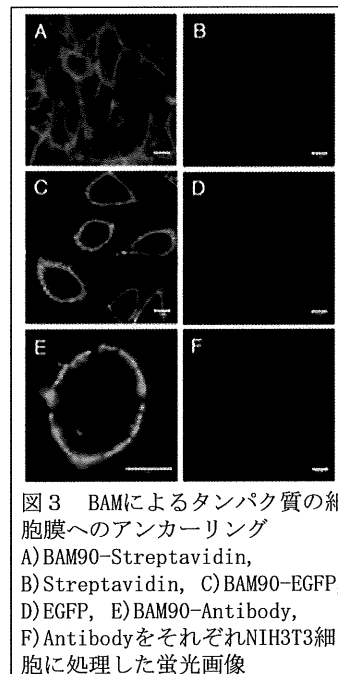
する性質があり、これに結合させた物質を細胞表面に係留させることができる。リピッドアンカーは水溶性でないため細胞への投与が困難であったが、本研究では親水性のポリエチレングリコール (PEG) を結合させることにより水溶性化して用いた。この脂質 (リピッドアンカー) -PEG 誘導体は日本油脂株式会社と我々との共同研究で新規細胞膜修飾剤として開発され、Biocompatible Anchor for Membrane (BAM) と名付けられた。BAM の構造式は図 1 A に示した。またタンパク質のアンカーリングの概念は図 2 右に示した。



#### 【方法と結果と考察】

(1) タンパク質のアンカーリング ストレプトアビジン (64KDa)、EGFP(27KDa)または抗体(150KDa)のそれぞれに BAM を結合させることによりこれらの蛋白を細胞膜にアンカーリングすることができた (図 3A, C, E)。(アンカーリングされたストレプトアビジンと抗体はそれぞれ Fluorescein-biotin と antigen-EGFP 融合タンパクにより検出した。)

(2) BAM アンカーリングのメカニズムの考察 脂溶性リピッドアンカーは PEG 鎖を持つことで水溶性化合物に変換できたが、ミセルの形成が予想された。動的光散乱 (DLS) 測定法で BAM 溶液を観察した結果、長い PEG を持つ BAM はミセル形成しないことがわかった。またミセル形成しない BAM はアンカーリング能が高いこともわかった。つまり BAM 分子はモノマー状態に分散して溶解していて、細胞膜と接近したとき細胞膜にリピッドアンカーが取り込まれると考えられた。



(3) アンカーリング処理時間 BAM90-EGFP が細胞にアンカーリングされるためにかかる時間について調べたところ 30 秒間の処理で十分に BAM90-EGFP は細胞に結合することがわかった (図 4)。

(4) アンカーリングの保持時間 アンカーリングされた BAM の細胞膜上での保持時間を調べた。BAM40 及び BAM90 は無血清培地中において 4-5 時間で細胞膜から消失した (図 5)。また 10% 血清添加された培地中ではその保持時間は 1-2 時間に短縮された。そこで脂質鎖を 2 本持つジアシル型 BAM (化学構造式: 図 1B) を調製しその保持時間を調べたところ、24 時間以上 (図 5 では 8 時間以上) に延長された (図 5)。

(5) 細胞毒性 BAM の細胞毒性を細胞内乳酸脱水素酵素 (LDH) の細胞外への逸脱により評価した結果、BAM15, BAM40, BAM90, DOPE 型 BAM すべてにおいて全く細胞毒性は見られなかった (図 6; ANOVA  $p > 0.05$ )。増殖に与える影響も調べたところ、 $10 \mu\text{M}$  BAM (BAM90 と DOPE-PEG) 処理 NIH3T3 細胞の増殖 (48 時間後) は無処理の細胞のものと同様であった (ANOVA;  $p > 0.05$ )。

【結言】遺伝子導入を伴わない細胞表面への速やかなタンパク質アンカーリングを実現した。アンカーリング保持時間を短くしたい場合にはモノオレイル型 BAM が有効であり、また、血清存在下長時間アンカーリング効果を持続させたい場合にはジオレイル型 BAM が有効であった。また、これらアンカー

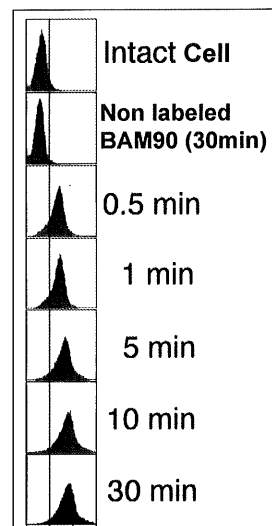


図4 BAM90-EGFPの32D細胞へのアンカーリング速度をFCMで評価

リング処理による細胞に対する毒性は全く見られなかった。この技術は、腫瘍免疫におけるターゲティングやワクチン療法等への応用が期待される。

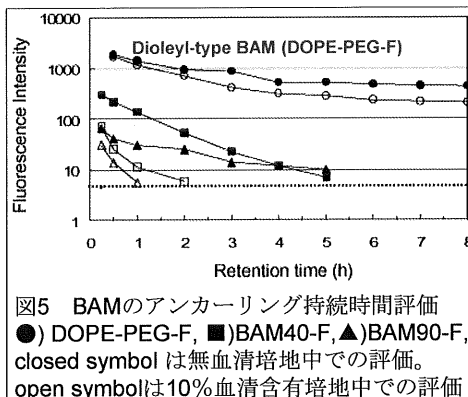


図5 BAMのアンカーリング持続時間評価  
●) DOPE-PEG-F, ■) BAM40-F, ▲) BAM90-F, closed symbol は無血清培地中での評価。open symbolは10%血清含有培地中での評価

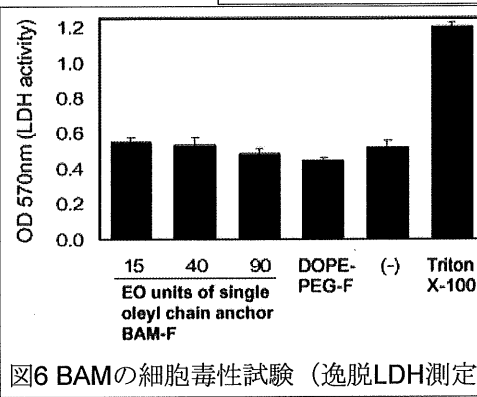


図6 BAMの細胞毒性試験 (逸脱LDH測定)

## 2. BAM を用いた浮遊細胞固定化培養への応用

【緒言】近年、遺伝子ライブラリーを効率良く機能評価するために遺伝子導入細胞を固相に高密度アレイした cell microarray が開発された。この方法は遺伝子機能を効率よく且つ網羅的解析が可能のため非常に注目された方法であるが、基板へ結合できる細胞は接着細胞に限定され、免疫細胞や幹細胞などに代表される浮遊細胞は利用できない。本研究では図 2 の概念図右に示したように、BAM を固相した表面に浮遊細胞を固定化できるのではないかと検討を試みた。

### 【実験方法と結果と考察】

(1) BAM 表面への固定化 BSA コートしたスライドガラスに BAM90 を結合させた表面上に 32D または K562 細胞 (無血清培地に懸濁) は速やかに固定化された。図 7A の 0 day の写真に示すように、BAM 修飾領域にのみ細胞が固定化された。またオレイル鎖を持たない PEG 表面では全く細胞が結合しないことも確認された。

(2) BAM 表面での培養とその比増殖速度 上記の実験で固定化された 32D 及び K562 を培養すると増殖が観察され、その増殖した細胞は BAM 表面上に集密的に固定化された (図 7A)。またこれらの細胞の生存率を確認したところ 7 日間固定化培養した K562 細胞クラスターのすべての細胞が生存していることが観察された (図 7A

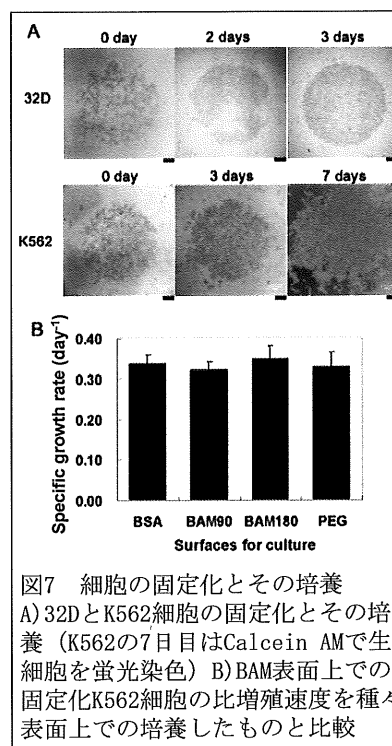


図7 細胞の固定化とその培養  
A) 32DとK562細胞の固定化とその培養 (K562の7日目はCalcein AMで生細胞を蛍光染色) B) BAM表面上での固定化K562細胞の比増殖速度を種々表面上での培養したものと比較

右下パネル)。更に 7 日間固定化培養された K562 には分化誘導などによる形態変化は観察されなかった。BAM 表面での固定化培養が比増殖速度に及ぼす影響についても検討を行った結果、BAM90 または BAM180 表面上で固定化された細胞は通常培養のものと比較して比増殖速度に全く差がなかった (ANOVA;  $p>0.05$ ) (図 7B)。つまり BAM 上での固定化は細胞増殖に全く影響を与えなかった。

**(3) 細胞高密度アレイ** インクジェットプリンターを用いて BSA コートスライドガラス上に BAM 溶液を 20nl ずつアレイした。この BAM がアレイ化されたスライドガラス上に 32D 細胞は固定化され、図 8 に示すように高密度マイクロアレイ状のフォーマットで細胞固定化ができた。

**(4) リポソームの固定化** BAM が細胞膜の脂質層と相互作用していることを示すため、リポソームの BAM 上への固定化を検討した。Fluorescein を封入した 3 種類の異なる表面荷電を持つ Cationic, Nonionic, Anionic liposome をそれぞれ調製し (サイズ 100-300 nm) BAM 表面上に添加した。いずれのタイプのリポソームも BAM 表面に結合した (図 9)。

**(5) 細胞固定化メカニズムの考察** リポソームの固定化結果より、BAM による細胞固定化には表面荷電や細胞膜上の蛋白質が関与する可能性は低いと考察され、図 2 の右図に示したように細胞膜の脂質膜にオレイル基が相互作用し BAM 表面に細胞が捕捉されているものと考えられた。

**【結言】** BAM 修飾表面を用いた接着細胞の接着能に依存しない速やかな細胞固定化法を開発できた。この方法により、接着能を持たない浮遊細胞も固定化しながら培養できた。また固定化は細胞増殖には影響を与えなかった。この技術はマイクロ流路内細胞分析等の分析技術分野への応用やパターン化細胞培養技術などティッシュエンジニアリング分野にも大きく貢献できると考える。

### 3. 遺伝子機能解析のための細胞マイクロアレイ技術開発

**【緒言】** 第 2 章で得られた成果の浮遊細胞マイクロアレイへの応用性について検討した。固定化された細胞にそれぞれ遺伝子を如何に導入するかが大きな検討課題である。

#### 【方法と結果と考察】

**(1) BAM による固定化細胞への遺伝子導入方法** 固定化細胞へ遺伝子を導入する方法を種々検討した結果、図 10 に示した方法が最も有効であった。発現ベクターとリポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン) 培地及び添加物を混合した溶液を BAM 表面にスポットし乾燥させた。この乾燥した遺伝子アレイは乾燥密封低温保存で 130 日以上安定に保存できた。この遺伝子アレイ

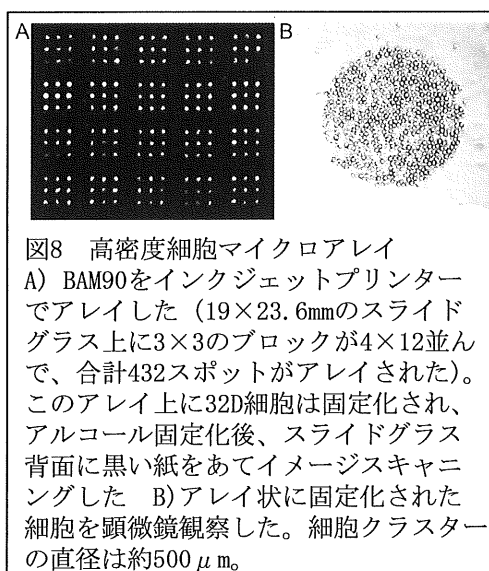


図8 高密度細胞マイクロアレイ  
A) BAM90をインクジェットプリンターでアレイした (19×23.6mmのスライドガラス上に3×3のブロックが4×12並んで、合計432スポットがアレイされた)。このアレイ上に32D細胞は固定化され、アルコール固定化後、スライドガラス背面に黒い紙をあてイメージスキャンした B)アレイ状に固定化された細胞を顕微鏡観察した。細胞クラスタの直径は約500  $\mu\text{m}$ 。

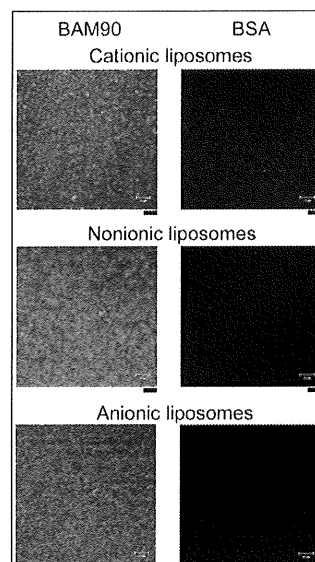


図9 リポソームの固定化  
表面電荷の異なるフルオレセイン封入リポソームをBAM表面に3種類すべて固定化できた

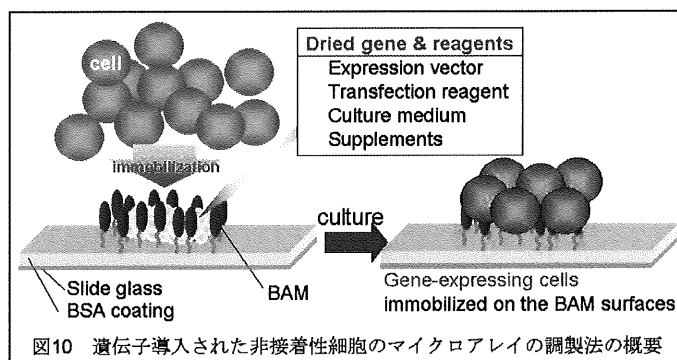


図10 遺伝子導入された非接着性細胞のマイクロアレイの調製法の概要

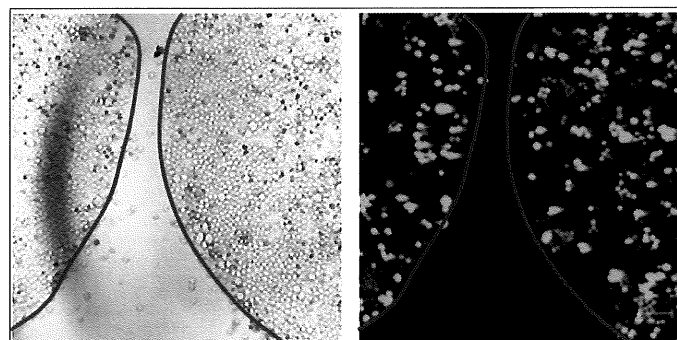


図11 固定化されたK562への遺伝子導入

イ上に細胞を固定化し培養すると、遺伝子を固着した領域内でのみその遺伝子を発現した細胞が観察された (図 11)。

(2) クロスコンタミネーションの確認 BAM 固相 (BSA プレコート) カバーガラス上に、EGFP 及び DsRedII の遺伝子をそれぞれ約  $500\ \mu\text{m}$  離して直径約  $1\text{mm}$  の円形に固着した。数分乾燥させてその上に K562 細胞を固定化し 48 時間培養した結果、それぞれの遺伝子を発現した細胞は定義された範囲内でのみ観察され、クロスコンタミネーションも全く見られなかった (図 12)。

(3) 固定化細胞への siRNA の導入 BAM 表面上に EGFP に対する siRNA (Qiagen) とリポフェクトアミン 2000 を含む混合物をスポットし、EGFP 定常発現 K562 細胞 (モノクローン株) をその上に固定化し 42 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。siRNA をスポットした領域は EGFP の発現が抑制されていた (図 13)。siRNA がスポットされていない領域では EGFP の発現の減少は観察されなかった。このことより、siRNA も BAM 固定化細胞に導入できることが証明され、この技術の汎用性をさらに拡大できた。

**【結言】**

基板上的に定義された位置で特定の遺伝子を発現させながら浮遊細胞を固定化培養する方法を確立した。この技術は浮遊細胞を使った遺伝子導入細胞マイクロアレイを実現し、Cell-based microarray 技術の応用性を拡大できた。

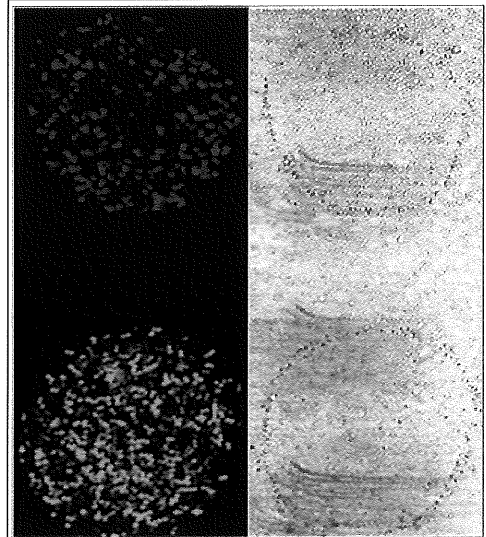


図12 遺伝子 (導入試薬も含む) をスポット (直径約  $1\text{mm}$ ) された場所にある BAM 固定化 K562 細胞だけにその遺伝子発現が観察された。またこれらの遺伝子が約  $500\ \mu\text{m}$  隔てたスポット間でクロスコンタミネーションすることなく特定領域上でのみ発現された。

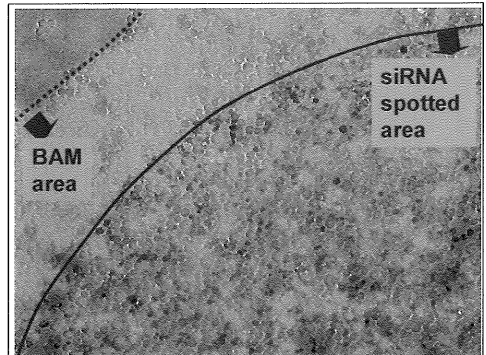


図13 EGFP 定常発現する K562 細胞を BAM で固定化し、さらに BAM 上の特定領域に siRNA (及びその導入試薬) をスポットした箇所では同時にその細胞内で siRNA も作用した。