

パターン化自己組織化単分子膜を利用した細胞チップ

加藤 功一・高 寅甲・有馬 祐介・山内 文生
戸田 満秋・吉迫 智・岩田 博夫*

次世代分析ツールとしての細胞チップ

DNAチップに代表されるバイオチップの出現は、細胞生物学の研究に革命的な進歩をもたらした。マイクロアレイの特徴を巧みに利用することで、膨大な数のプローブとのハイブリダイゼーションを一挙に行うことが可能になり、遺伝子の網羅的な発現プロファイルを瞬時に取得することができるようになった。¹⁾ DNAチップの発展は、Schenaら²⁾ および Fodorら³⁾ のチップ作製法に関する基盤技術の開発によるところが大きい。

本稿で取り上げる細胞チップは、DNAチップやプロテインチップとは異なり、生きた細胞を解析対象とする新しい概念である。多種類のタンパク質、核酸、薬物などの生細胞に対する影響をパラレルに分析したり、細胞の発現する抗原を網羅的に探索したり、細胞間の相互作用を多くの組み合わせについて調べるなど、今まで考えられなかったさまざまな分析が細胞チップの使用によって可能になるものと期待される。細胞チップを用いる分析によって、機能体としての細胞システムを分子論的に捉え、また、人為的に制御するための方策を与えてくれるであろう。後述するように、細胞チップによる分析は、再生医療のための細胞プロセッシング、ポストゲノム時代の課題である遺伝子機能解析など、生命科学のさまざまな局面で画期的な進歩をもたらすものと予測される。

細胞チップは、アレイ上でパラレル分析を行う点において従来のバイオチップと類似している。しかし、解析の対象が生細胞となると、さまざまな問題が浮上してくる。それらの解決には、バイオマテリアルやナノテクノロジーに関する知識や技術が重要な役割を果たすことになる。細胞チップの態様は、その用途に応じていくつものバリエーションが考えられるであろう。本稿では、アルカンチオール分子が形成する自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer; SAM) を利用して作製された細胞チップについて、われわれの研究成果を中心に紹介する。

SAMを利用した細胞チップの作製

われわれが作製した細胞チップは、ガラスのような基板を土台とする。まず、その表面の1 cm 四方程度の微

少な範囲内に、タンパク質や核酸などの多数の機能分子をスポット状に配列固定する。次に、ここへ細胞を作用させることでタンパク質と細胞との相互作用を分析したり、核酸を細胞内に取り込ませてその影響を評価する。機能分子の配列固定には、アルカンチオールを用いて作製されるパターン化 SAM がきわめて有用である。

アルカンチオールは図 1a に示すような分子構造をもつ。末端のチオールは金、銀、アルミニウムなどの金属の結晶面に化学吸着を起こし、アンカーリングされる。一方、分子中央部のアルキル鎖は疎水性が高く、分子間にファンデルワールス力が働くため、図 1b に示すような安定な SAM が形成される。アルカンチオールの SAM については成書⁴⁾ ならびに総説⁵⁾ に詳しく述べられている。

Au-S 間の結合エネルギーは ~ 40 kcal/mol であることが報告されており、⁴⁾ 他の安定な化学結合に比較して小さい。この性質を利用し、形成された SAM の一部分を局所的に酸化分解することで除去したり、除去された部分に異なる分子構造をもつアルカンチオールの SAM を形成させることができる。さらに、チオール基とは反対側の末端は、SAM 形成後に最表面に露出することになるが、その構造として、カルボキシル基、アミノ基、水酸基などの官能基、ペプチドやポリエチレングリコールのような分子が考えられる。細胞チップの作製を目的として、SAM 表面にタンパク質や核酸などの機能分子を固定する場合に便利である。

パターン化 SAM の一例を図 1c に示す。⁶⁾ 金の薄膜を蒸着したガラス基板上に n -ヘキサデシルメルカプタン [$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{SH}$] の SAM を作製した後、局所的に紫外線を照射することで多数のスポットを形成させ、さらに種々の官能基をもつアルカンチオール (アルキル鎖の炭素数は10あるいは11) からなる SAM をスポット内に形成させたものである。アルキル鎖長のわずかな差異を明確に区別するため、イメージング表面プラズモン共鳴装置を用いて観察している。この例では、25個のスポット (直径1 mm) が基盤目状に並んでいる。この例が示すように、アルカンチオール SAM を利用することで、パターン化表面を再現性よく作製することが可能で

* 著者紹介 (代表) 京都大学再生医科学研究所 (教授) 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53
TEL/FAX. 075-751-4119 E-mail: iwata@frontier.kyoto-u.ac.jp

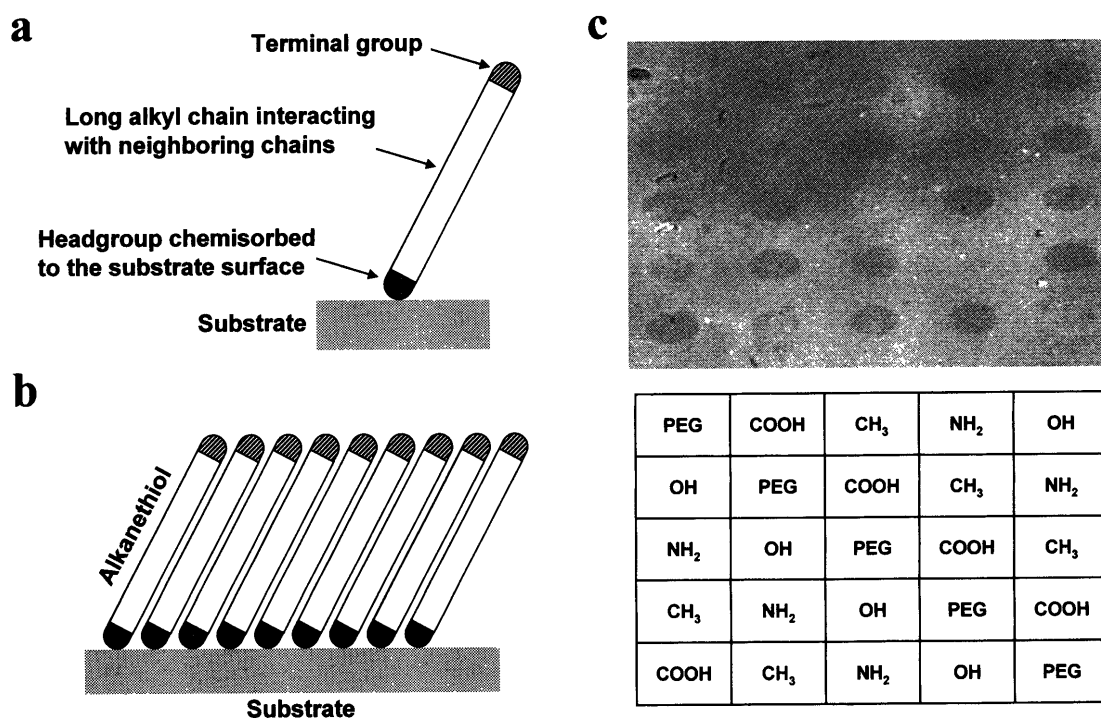


図1. (a) アルカンチオール分子の構造, (b) アルカンチオール分子で構成された SAM, (c) パターン化 SAM のイメージング表面プラズモン共鳴像. 各スポット内に形成された SAM の末端構造を下図に示す.

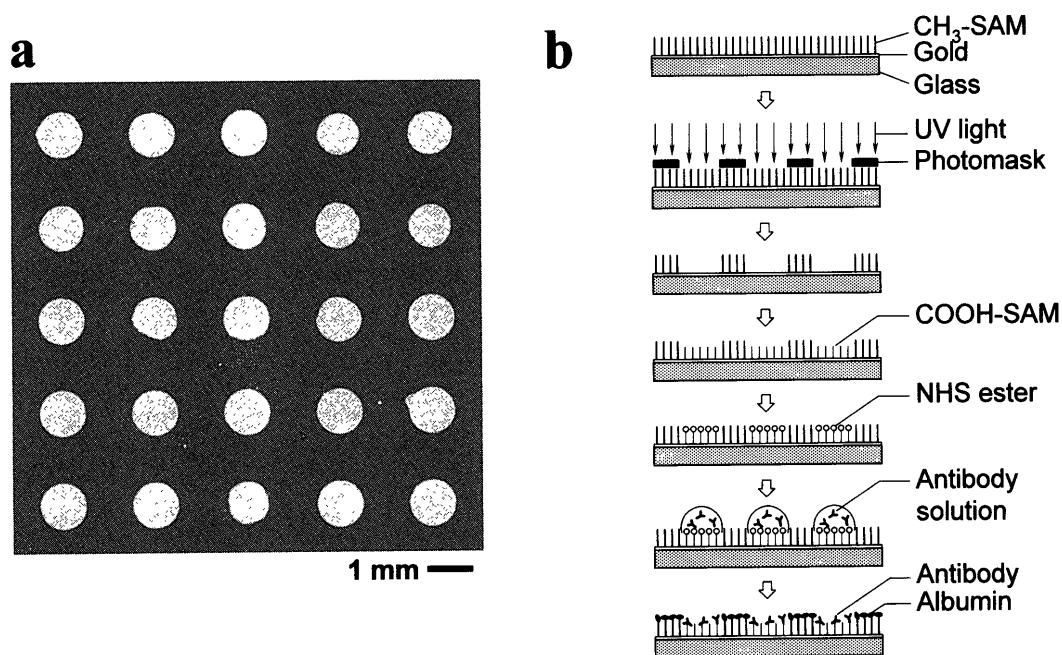


図2. (a) 抗CD5抗体スポットに結合したリンパ球の実体顕微鏡像, (b) パターン化 SAM の作製および抗体のパターン固定方法の概略図. NHS, N-ヒドロキシスクシンイミド.

ある. これと同様なパターン化 SAM は, マイクロコンタクトプリンティング法によっても簡便に作製することができる.⁷⁾

図2a には, 各スポットに抗体を固定した細胞チップと

細胞との相互作用の様子を示す. 図2b に示す方法で, スポット表面に露出したカルボキシル基を利用して, 抗CD5モノクローナル抗体を共有結合で固定化した. 細胞表面にCD5を発現するリンパ球が表面抗原-固定化抗

体間の相互作用を起こし、その結果、スポット上にもみ結合した。いずれのスポットにも数千個のリンパ球が結合している。

抗体アレイ型細胞チップ

上記の例が示すように、抗体をパターン固定したチップ上で細胞の結合試験を行うことによって表面抗原の有無を簡便に調べることができる。細胞表面に発現する膜抗原はタンパク質や糖タンパク質からなり、細胞の種類や分化の程度に応じてその発現プロファイルが変化する。表面抗原に関する情報は細胞の同定にとって重要であり、細胞生物学、細胞工学、臨床検査などの幅広い分野において分析の対象とされる。従来、表面抗原の分析にはフローサイトメトリーが多用されてきた。しかし、その方法によって同時に分析できる表面抗原の数には限りがあるため、多種類の表面抗原について迅速に解析することは困難であった。一方、表面抗原に対する多種類の

の抗体をパネル化したマイクロアレイを用いると、迅速かつ簡便にプロファイリングすることが可能である。

最初の例として、造血器腫瘍細胞における表面抗原の分析について述べる。⁸⁾ 抗体アレイの作製には 22 種類の白血球表面抗原に対するモノクローナル抗体を用い、それらを異なるスポット上に固定化した。細胞結合試験には、表面抗原プロファイルの大きく異なることが知られている 3 種類の造血器腫瘍細胞株を用いた。まず、2 種類の異なる細胞を既知の割合で混合した分散液を用いて、一方の細胞のみに反応性をもつ抗体スポットへ結合した細胞の数を求めた。その結果、スポットに結合した細胞は当該抗原を発現する細胞のみであり、しかも、結合細胞数は分散液中の抗原陽性細胞の割合に比例することがわかった。図 3 に示すように、異なる細胞株を用いて試験した結果、細胞の種類に応じて、細胞結合のみられるスポットのパターン、すなわち表面抗原の発現プロファイルが異なっていた。各スポット上の細胞数はフ

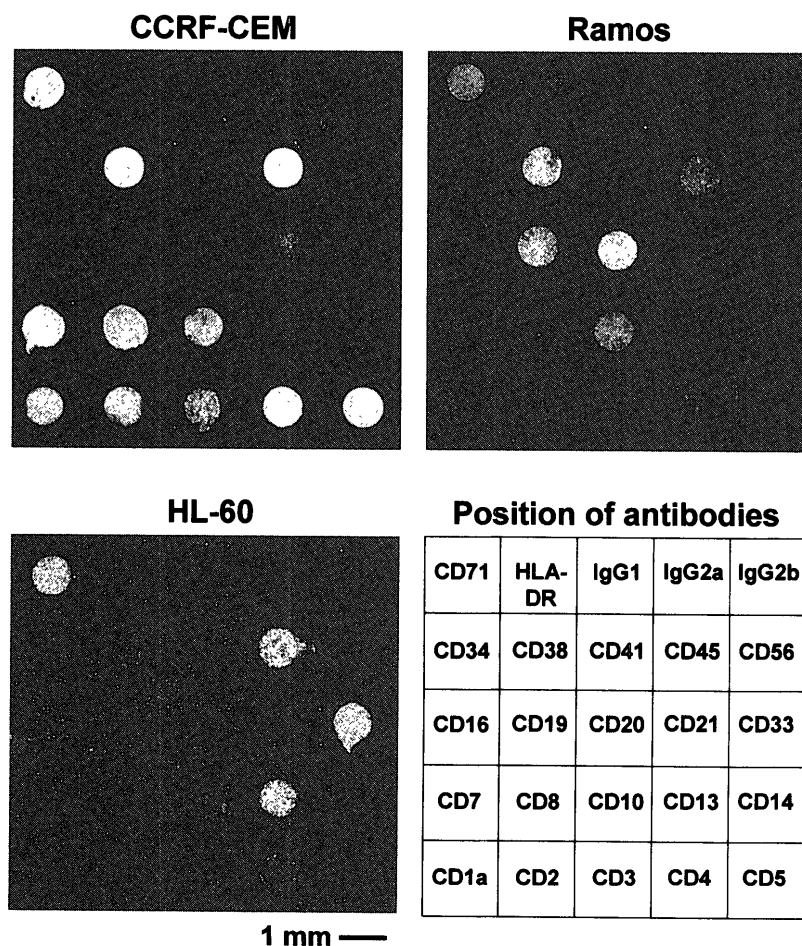


図3. 抗体アレイに結合した白血病細胞のデジタルマイクロスコープ像。固定化抗体の種類ならびに抗体アレイ上における位置を右下図に示す。CCRF-CEM, T細胞系急性リンパ腫細胞; Ramos, B細胞系バークットリンパ腫細胞; HL-60, 骨髄芽球系急性白血病細胞。

ローサイトメトリーで求めた陽性細胞率とよい一致を示した。以上の結果より、抗体アレイ上での細胞の結合試験を特徴とする本手法は、表面抗原の発現プロファイルを簡便かつ迅速に調べるための有効な方法であると云える。

本手法は再生医療の進歩にも大きなインパクトを与えるものと考えられる。以下に述べる適用例では、抗体アレイ型細胞チップを利用して幹細胞に発現する表面マーカーの探索が行われた。

最近の幹細胞生物学の著しい進歩によって、再生医療への期待が大きく膨らんでいる。ところが、多くの幹細胞では、細胞内に発現する特異的なマーカーがよく知られている一方で、分化の指標となる表面マーカーに関する情報に乏しい。そのため、ヘテロな細胞集団から治療に必要な幹細胞を生きた状態で単離したり、その分化状態を正確に把握するには困難が伴う。このような場合、抗体アレイ型細胞チップと免疫染色法を組み合わせることで、既知の細胞内マーカーと表面マーカーとの間に対応付けを行うことが可能である。これによって、目的とする幹細胞を手に入れることができるようになるものと期待される。

Ko らは,⁹⁾ ラット胎児線条体から神経幹細胞を多く含む細胞集団を採取した。これを単細胞に分散させた後、各種の抗体を固定化した抗体アレイ型細胞チップ上での

結合試験に供した。さらに、神経幹細胞内に発現するマーカーとして知られているネスチンに対する抗体を用いて、スポットに接着した細胞の免疫染色を行った。各々のスポットに接着した細胞の総数、ならびに、そこに占めるネスチン陽性細胞数を細胞接着の認められたスポットについて図4に示す。図からわかるように、12種類のスポットについて細胞接着がみられ、それらの抗体に対応する表面抗原の発現が示された。また、抗CD57抗体を固定したスポット上ではネスチン陽性細胞率が比較的高く、神経幹細胞の濃縮が起きていることが示唆された。一方、抗CD56抗体を固定したスポットでは、細胞接着数が比較的多いにもかかわらず、ネスチン陽性率は低値を示した。以上の結果から、試験に用いた細胞集団に含まれるCD57陽性分画には、他の表面抗原をマーカーとする分画に比べて、ネスチンを発現する細胞の割合の高いことがわかる。これとは逆に、CD56は神経幹細胞の表面抗原としての特異性が低いものと考えられる。

核酸アレイ型細胞チップ

アルカンチオールからなるパターン化SAMを用いることで、プラスミドDNAやsiRNAのように細胞内で機能する核酸をアレイ化することもできる。核酸アレイ型細胞チップの使用目的は、核酸の情報が細胞内でどのような機能をもつかについて細胞レベルで迅速に調べるこ

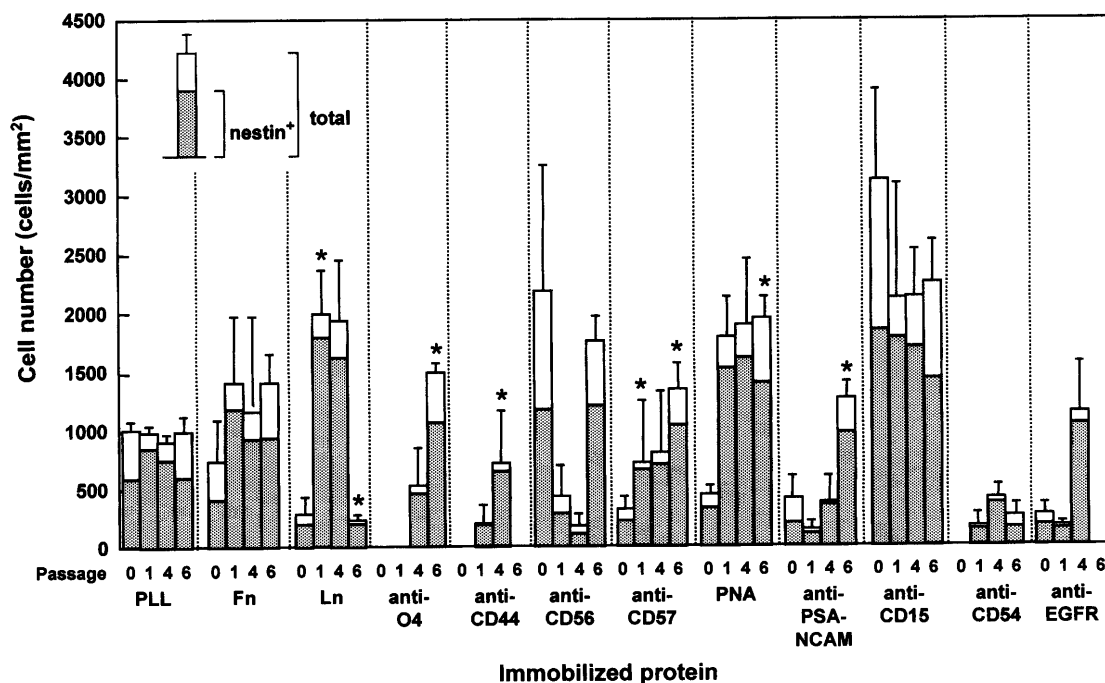


図4. 抗体アレイ型細胞チップの各スポットに結合した神経系細胞の全細胞数およびネスチン陽性細胞数。継代数0, 1, 4, および6の細胞を用いて試験した。

とである。たとえば、ヒトゲノムの解読に伴って多くの機能未知遺伝子の存在が予測されたが、これらの新規遺伝子の機能解析を効率よく行うためには、網羅的かつ高速に遺伝子を過剰発現させたり、ノックアウトする手法が必要になる。¹⁰⁾

核酸アレイの表面からその上に培養された細胞へ効率よく核酸を導入するためには、まず、十分な量の核酸をスポット表面に担持しなければならない。しかも、細胞と接触した後は、担持された核酸が解離し、細胞内に取り込まれる必要がある。われわれは、陽性荷電をもつ脂質と陰性荷電をもつ核酸との間に働くイオン間相互作用を利用して、パターン化 SAM 上に核酸を担持した。¹¹⁾このような方法によって約 0.5 g/cm² のプラスミド DNA を担持することが可能であり、また、その DNA はリン酸緩衝液との接触によって基板表面から遊離することを確認した。蛍光タンパク質である EGFP および DsRed をコードする 2 種類のプラスミド DNA を用いて核酸アレイ型細胞チップを作製し、HEK293 細胞への遺伝子導入を行った。細胞播種から 72 時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察した結果 (図 5)、各スポット上の細胞では担持されていたプラスミド DNA の取り込みにもとづく蛍光タンパク質の発現が観察され、2 種類のプラスミドを混合し

たスポットでは両タンパク質の共発現が認められた。発現の効率は高く、最適条件下で 85% であり、蛍光タンパク質の発現は 10 日間以上持続した。以上の例は、パターン化 SAM を利用することで、プラスミド DNA のスポット間でのクロスコンタミネーションを回避することができ、場所を厳密に限定した遺伝子導入を高効率に行うことができることを示している。さらに、核酸アレイ型細胞チップは、RNA 干渉による遺伝子機能のノックダウンに用いることも可能である。¹²⁾

本稿では、生細胞を分析対象とする「細胞チップ」について紹介した。パターン化 SAM がタンパク質や核酸の 2 次元的配置にとって重要な役割を果たすことがわかりいただけたと思う。アルカンチオール分子の選択によって幅広い化学的性質をもつ表面を厳密に設計することが可能であり、また、パターンの形状や集積度を大幅に変更することも容易である。生物学研究の現場では、今後ますます、高速で網羅的な細胞レベルでの分析手法、細胞集団における位置情報を理解するための分析手法が求められるであろう。パターン化 SAM の長所をうまく利用することで、それらの要求に応えることができればと願っている。

[カラー頁参照]

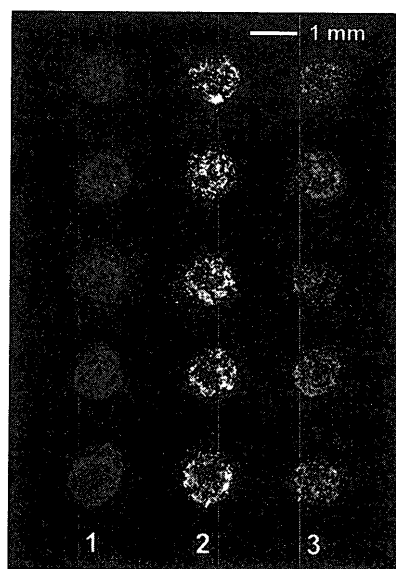


図5. プラスミド DNA を用いて作製された核酸アレイ型細胞チップ上での HEK293 細胞への遺伝子導入。Lane 1, 2: EGFP 発現プラスミドをスポット, Lane 2, 3: DsRed 発現プラスミドをスポット。Lane 2 では EGFP と DsRed が共発現している。

文 献

- 1) Shena, M. and Davis, R. W.: *DNA Microarrays, An Practical Approach*, p.1, Oxford University Press, UK (1999).
- 2) Schena, M. et al.: *Science*, **270**, 467 (1995).
- 3) Fodor, S. P. et al.: *Science*, **251**, 767 (1991).
- 4) Ulman, A.: *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, p. 237, Academic Press, San Diego, CA (1991).
- 5) Schreiber, F.: *Prog. Surface Sci.*, **65**, 151 (2000).
- 6) 平田伊佐雄ら: 高分子学会予稿集, **51**, 3546 (2002).
- 7) Mrksich, M. and Whitesides, G. M.: *Trends in Biotechnol.*, **13**, 228 (1995).
- 8) Kato, K. et al.: *Gels, Genes, Graft & Giants, Transitioning Biomaterials into the 21st Century*, p.116 (2002).
- 9) 高 寅甲ら: 高分子学会予稿集, **52**, 3906 (2003).
- 10) Ziauddin, J. and Sabatini, D. M.: *Nature*, **411**, 107 (2001).
- 11) Yamauchi, F. et al.: Micropatterned, self-assembled monolayers for fabrication of transfected cell microarrays, submitted.
- 12) 吉迫 智ら: 第49回高分子研究発表会講演要旨集, p. 35 (2003).