

2012年度 生物工学奨励賞 受賞



ナノ磁性粒子を用いた テクノロジーの開発と応用

大河内美奈



Application and development of technologies for cell analysis using magnetic nanoparticles

Mina Okochi (Department of Biotechnology, School of Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603) Seibutsu-kogaku **91**: 301-307, 2013.

はじめに

細胞は、すべての生物が共通してもつ生命の基本単位であり、個々の細胞は隣接する他の細胞や細胞外マトリックスなど細胞周囲の微小環境により細胞機能を発揮する。これより、生体内における細胞応答を測定するには、生体内の環境を模倣した*in vitro*評価系を構築することが重要となる。近年、マイクロ・ナノデバイス技術の進展に伴い、個々の細胞応答を解析する基盤が構築されつつある。少数細胞における解析は、生体内の微小変化を捉えられることから、侵襲性が低い臨床診断や細胞の識別、細胞の生命過程の解析などにおいて有用となる。特にがん化や疾病進行の過程などにおいては、遺伝子異常が多段階で蓄積され異なる状態の細胞が共存することから、個々の細胞形態および細胞挙動を解析し、目的遺伝子の発現量の分布を調べることで早期に変化を捉え、疾患形成メカニズムを解析することが可能となると考えられている。そこで、個々の細胞応答を解析するため、ナノ磁性粒子を用いて磁力を駆動力とした解析システムの構築に関し、筆者らの最近の研究成果を報告する。

液滴搬送による一細胞遺伝子発現解析

磁性粒子は、磁力制御が可能であることから目的に対応したプローブの固定化により、生体サンプルから目的とする細胞や生体分子の分離、精製、濃縮を可能とする特性を有し、磁力を駆動力とした解析システム全体の小型・携帯化を実現する上で優れた特性を有する。これより、小型解析システムなどにおける免疫アッセイ、遺

伝子解析、細胞分離などをはじめ生化学、生物工学など幅広い分野で利用されてきた¹⁻³⁾。

我々は微小液滴を利用することで1細胞レベルでの解析を行うこととした。微小液滴を利用した方法は、従来のマイクロウェルプレートを利用した方法と比較して飛躍的に検体数を上昇できる方法として注目されている。しかし、液滴を利用した解析は、多数の反応ステップを伴う操作を順次、進めることが難しい。そこで、オイル中に磁性微粒子を含む水系の反応液を液滴として挿入し、磁石を利用した液滴搬送システムを考案した(図1)。マイクロチャンバーアレイを用いて、オイル相中液滴

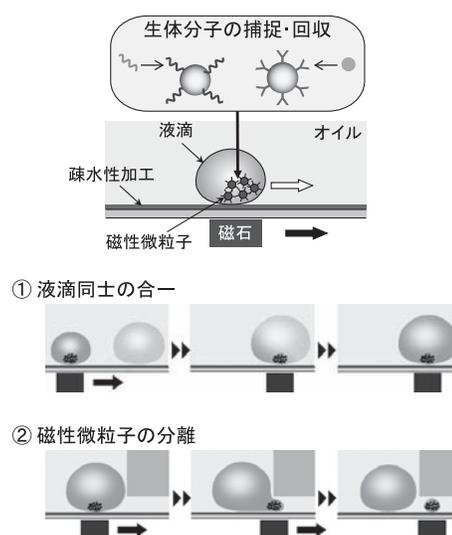


図1. 磁性微粒子を生体分子の担体および液滴の搬送子とする液滴搬送システム

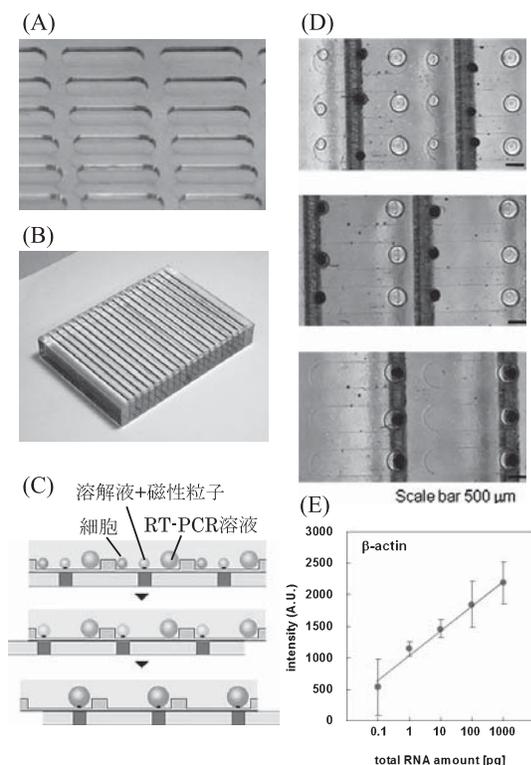


図2. 磁性粒子を用いた磁力液滴搬送によるRT-PCR解析. (A) マイクロチャンバーウェル, (B) 搬送用デバイス, (C) 液滴の構成と搬送図, (D) 磁力によるオイル相中液滴の合一, (E) 遺伝子発現量の測定

の合一や磁性粒子の分離などの操作を磁力制御で進行させることにより反応を進行させた^{4,5)}. 1細胞から回収できるmRNA量は高々1 pgのオーダーであり, 細胞内に発現されるmRNAの定量解析には, 逆転写反応 (reverse transcription) と polymerase chain reaction (PCR) を組み合わせたRT-PCRにより行った. アルミニウム板のエンドミル加工により鑄型を作製し, ポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いたマイクロチャンバーアレイを作製した. 表面を疎水化するため, 化学気相成長法によりパリレンC処理を行った. 液滴操作デバイスは, アクリル板にレーザービームで溝を彫り, SK材の粉末を充填した後, シーリングを行うことで作製した. 液滴操作デバイスを用いて多数の液滴を同時に搬送する様子を図2に示す. 液滴中に懸濁する磁性粒子は, 常磁性マグネタイトを用い, アミノ基修飾粒子に負電荷ポリマーをコートすることによりPCR阻害を回避した. 細胞封入液, 細胞溶解液, RT-PCR溶液の3液滴を, オイルを満たしたマイクロチャンバーアレイに挿入し, 液滴搬送デバイスを用いて磁気誘導を行い, 各反応を進行させた. HeLa total RNAを鑄型として, β-actin遺伝子を解析したところ, 磁性粒子の存在下においてもPCR阻害がな

く, RT-PCRで定量できた.

そこで, ヒト慢性骨髄性白血病細胞株であるK562を使用し, がんマーカーとして知られているWT1を検出した. WT1遺伝子は当初, 小児の腎がん, ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として見つかり, 現在では白血病のモニタリングマーカーとして利用されており, 治療や病態把握に不可欠な指標として用いられている. 液滴中に確率的に1細胞となるように液滴を作製し, 液滴操作により細胞溶解, 逆転写反応, PCRを進行させた後, 核酸量を蛍光強度により測定したところ, 細胞数と蛍光強度の相関が得られた他, PCR増幅40サイクルにおいて1細胞解析による正常細胞との識別も可能であった⁶⁾.

次に, TaqMan probeを用いて, 腫瘍マーカーであるCEAおよびHER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2: ヒト上皮成長因子受容体2) を標的遺伝子として用いて遺伝子発現解析によるがん細胞の検出について検討した. HER2は, がん関連遺伝子であり, その発現量が分子標的薬であるトラスツズマブ (抗HER2ヒト化モノクローナル抗体) の治療効果指標となることから, 乳がんだけでなく胃がんにおいても検査が実施されるようになってきている. 腹腔洗浄液中での胃がん細胞の検出による再発癌の診断を想定し, 胃がん細胞N87株を正常細胞の懸濁液中に混合し, 画像認識機能を有する自動液滴スポッティング装置を用いてオイルを充填したマイクロチャンバーアレイ内の目的の位置に, 細胞懸濁液, 磁性粒子を懸濁した細胞溶解液, RT-PCR溶液の3種の液滴を順次, 分注・配置した. 溶液内の全細胞を解析できるよう, プランジャー方式によるスポッティングを採用した. On-chipで細胞溶解およびRT-PCRを行った結果, 正常細胞では細胞を含有しない液滴と比較してコントロール遺伝子であるβ-actinの蛍光強度が上昇したのに対し, HER2およびCEAでは上昇がみられなかった. これに対し, 胃がん細胞ではHER2とCEAにおいても蛍光強度の上昇がみられた.

そこで, 胃がん細胞と正常細胞の混合比を変え, 液滴中に平均2.5 cells/dropletとなるように細胞懸濁液を調製し, 同様に解析した. 図3は, HER2およびβ-actinを指標とした検出結果を示す. 細胞が含まれる液滴ではβ-actin発現による赤い蛍光がみられ, 特にかん細胞を1つでも含む液滴においては, HER2発現による緑色の蛍光が検出され, 細胞懸濁液内に含まれるがん細胞数を検出することができた. 以上のことから, 磁力応答型の液滴搬送法を利用したMagnetic force-based Lab-on-a-Chip (MAG-LOC) を用いて, CEA, HER2, β-actin発現量のマルチプレックス解析を行うことで, がん細胞を検出し, 治療指標を提供できる可能性が示唆された.

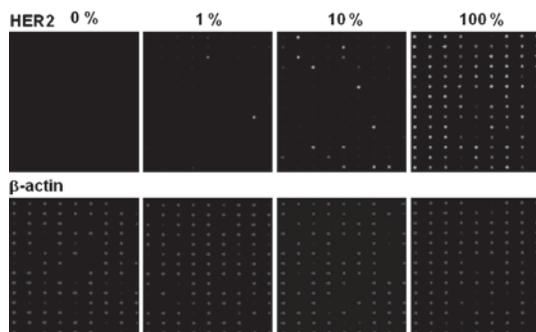


図3. 液滴搬送システムを用いた遺伝子発現解析による胃がん細胞の検出（胃がん細胞の混合比を表示）

接着性の細胞では、足場を維持したまま細胞溶解して遺伝子発現解析を行うため、組織培養で実績のある足場担体を利用し、1担体あたり1細胞を接着させて解析した。担体は、平均粒径10 nmの分散マグネタイト溶液中で膨潤させて磁性化した。磁性化担体への細胞播種濃度を検討し、0 cells/carrierが38%、1 cells/carrierが40%、2 cells/carrierが22%となる条件を見いだした。磁性化担体上に細胞を接着後、先の磁力応答型の液滴搬送システムを用いて解析した。この系では、粒子径6 μmの磁性粒子を搬送子として用い、液滴の搬送や磁性化担体の回収に利用した。また、RT-PCR後の蛍光観察を行う際には、マイクロウェルチャンバーにゲートを設置し、磁性化担体を搬送子用磁性微粒子とともに除去した。

モデルがん細胞として、がん関連遺伝子である*v-src*を導入したマウス胎仔由来線維芽細胞BALB/3T3/*v-src*を解析した。Srcの下流に存在し、細胞接着や細胞運動・形態制御に関連のあるRac-1の発現量を、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHを基準に比較した。BALB/3T3/*v-src*では、正常細胞と比較して約100倍の発現がみられ、細胞挙動が亢進される細胞アレイでの観察と一致する結果が得られた。また、1マイクロキャリア上に10細胞を接着した系においても解析した結果、10細胞中に1細胞でもがん化細胞が存在すると蛍光強度の差が確認でき、変異細胞の検出といった点から、有用な検出系となることが示唆された。

以上より、磁力応答型の液滴搬送法を利用し、1細胞レベルでの検出を可能とする遺伝子発現解析システムを構築することができた。今後は、各細胞レベルでも発現量の差異を解析するため、解析精度の検証が必要となる。液滴内に磁性粒子を封入する液滴搬送システムは、イムノアッセイや酵素活性測定などの簡易小型解析システムにも適用でき^{7,8)}、分析診断に利用するための基盤を構築できた。

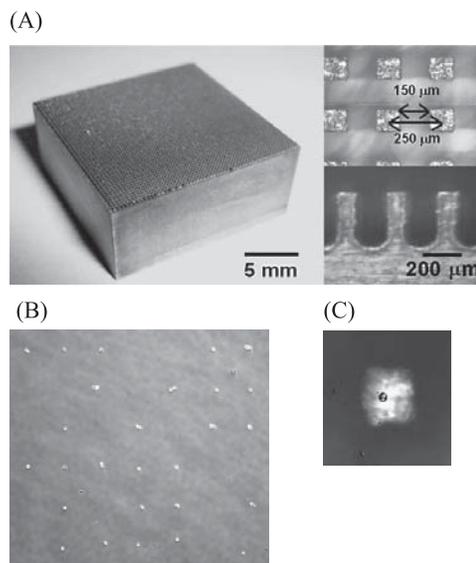


図4. 磁力による細胞アレイの構築。(A) 剣山状鉄製デバイス、(B) 磁性標識細胞のアレイ化、(C) 1細胞がボールに誘導された様子。

ナノ磁性粒子を用いた細胞アレイの作製

細胞を目的の位置にパターンニングする技術は、細胞の形態情報に加え、細胞間の相互作用や薬剤刺激に対する細胞応答の解析に有効である。磁性微粒子を細胞内に多数取り込ませることで、外部設置の永久磁石の磁力を利用し、細胞をアレイ状に誘導して配置させる手法を開発した⁹⁾。細胞の磁性標識は、平均粒径10 nmのFe₃O₄粒子を分散させて直接取り込ませる他、正電荷リポソームで包埋して細胞膜との親和性を高めたマグネタイト正電荷リポソーム (Magnetite Cationic Liposome (MCL)) を用いた¹⁰⁾。MCLは、N-(α-trimethylammonio-acetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride (TMAG), Dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC), Dioleoyl phosphatidylethanolamin (DOPE) をモル比1:2:2 (TMAG:DLPC:DOPE) の組成で脂質膜を作製し、分散させたマグネタイト表面を包埋した。細胞への親和性が高く、鉄濃度の換算では10 pg/cell程度の標識がみられている。細胞アレイの作製には、250 μmピッチの剣山状鉄製デバイスを磁石の上に設置して、剣山デバイス上に培養皿をのせた後、細胞を播種した。播種する細胞密度に応じて各ボールの上に細胞が配置される様子が観察された(図4)。アレイ状に配置された細胞は、磁石を外して培養すると伸展・増殖し、薬剤応答解析や細胞機能計測に利用することができた(図5)。TNF感受性L929細胞を用いて1細胞アレイを作製し、TNF-αによるアポトーシス誘導を各細胞でトラッキングするなどの挙動解析も可能であった¹¹⁾。その他、アレイ化した血管内皮細胞のマ

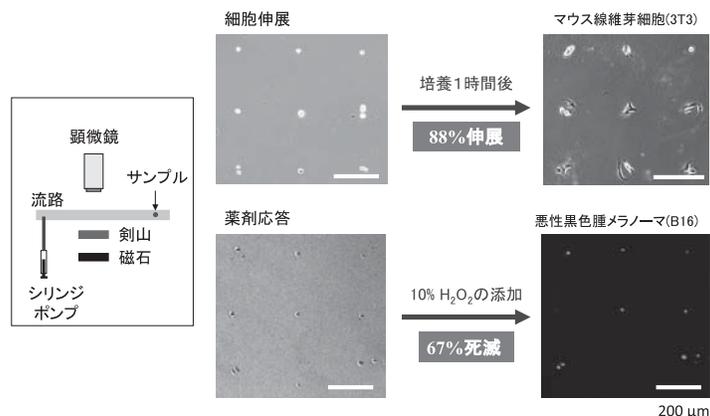


図5. マイクロ流路内における細胞のアレイ化と応答

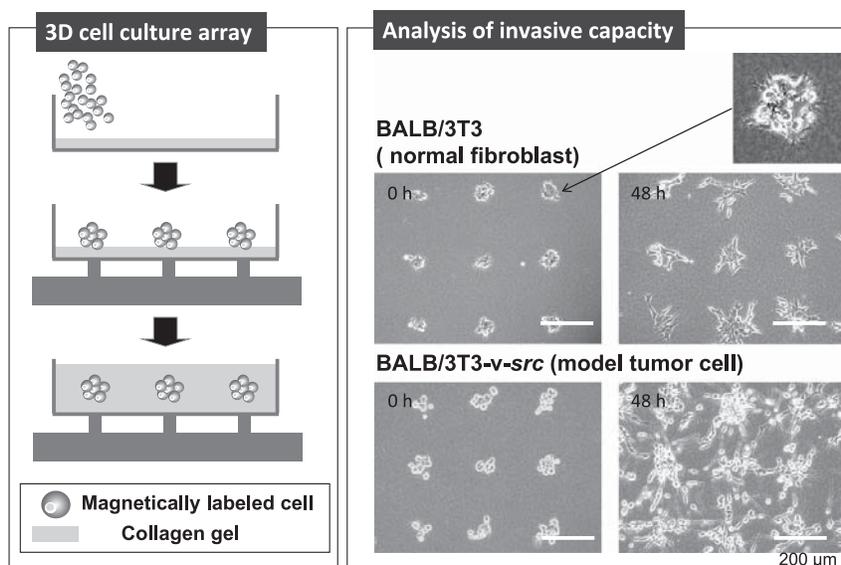


図6. 3次元細胞アレイによるモデルがん細胞の浸潤評価

トリゲル上でのチューブ形成能の評価も可能であった¹²⁾。磁力を利用した細胞アレイ化法は、細胞形態の観察に利用できる他、細胞を孤立することなく解析でき、細胞間の相互作用解析やその微小環境による挙動変化を解析する上で有用であると考えられる。

3次元細胞アレイの作製とがん細胞の挙動評価

細胞培養といえば、一般的に底面を細胞が接着しやすいように処理したプラスチック面で培養する2次元培養を指す。これは、細胞外環境を一定に制御できることから細胞の接着・増殖を一定に保持することができ、簡便に細胞の顕微鏡観察や機能解析に適している。しかし、2次元細胞培養では接着・伸展活性が増強されるが多くの細胞機能が低下することから、生体環境における細胞間および細胞外基質との相互作用を考慮した新しい3次

元(3D)細胞培養システムの開発が進められている。多細胞スフェロイド、細胞多層培養、マトリクス包埋培養など、多様な手法で3次元的に培養する方法が提案され、ハイスループットスクリーニングへ展開されている。また、がん細胞の細胞運動・浸潤測定にはトランスウェル・チャンバーを用いたインベージョンアッセイ法が用いられている他、リソグラフィにより作製した3Dマイクロパターンや3Dマイクロ流体をプラットフォームとして遊走能や薬剤感受性を評価する方法が開発されている。

先の細胞パターンニング法により、コラーゲンゲルシート上で磁性標識細胞の微小細胞塊を形成し、さらにコラーゲンゲルで包埋する3D培養法を構築し、がん細胞の挙動評価に利用した(図6)。モデルがん細胞として、*v-src*を導入したBALB/3T3/*v-src*を用いた。剣山状鉄製デバイ

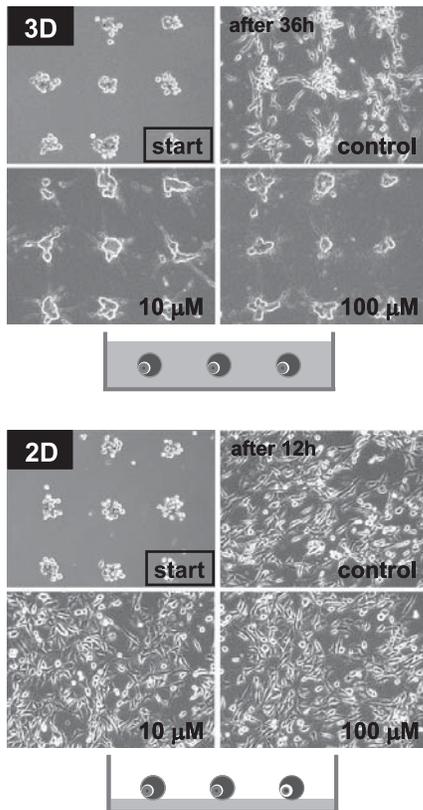


図7. 3次元細胞培養アレイでのMMP阻害剤GM6001に対する感受性評価. (上) コラーゲンゲル内での3次元配置, (下) コラーゲンゲル上での2次元配置 (細胞: BALB/3T3/v-src)

スを用いてアレイ状に細胞塊を配置させて観察したところ, 正常細胞と比較し, 浸潤能の亢進が見られた.

次に, この3次元がん細胞挙動評価モデルで抗がん剤感受性を評価した. 抗がん剤として, 大豆イソフラボンの一種である Genistein を添加し培養したところ, 100 μM 以上の添加で浸潤阻害効果が確認された. Genistein は, チロシンキナーゼ阻害により, がん細胞の浸潤活性を阻害することが報告されているが, MCL 標識した細胞を用いた本手法でパターンニングした細胞においても薬剤感受性が変化しないことが確認できた. さらに, マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害剤である GM6001 を使用し, コラーゲンゲル上での2D培養とコラーゲン包埋3D培養により細胞挙動を比較した. 3D培養では濃度依存的な浸潤阻害がみられ, 100 μM では細胞の浸潤, 増殖は観察されなかった. 一方, 2D培養では, 細胞がコラーゲンに包埋されていないことからMMP阻害剤の影響はみられなかった(図7). 従来の3D培養では, 顕微鏡観察や評価が困難であったが, 本手法では同一平面状に多数の細胞塊を形成させるため, すべての細胞塊を容易に観察でき, その数値化も可能であると示唆された¹³⁾.

3次元細胞アレイを用いたがん-間質細胞の挙動評価

がん組織には, がん細胞に加えて炎症細胞, 免疫細胞の他, 血管・リンパ管構成細胞, 線維芽細胞や線維組織などが存在し, これらはがん微小環境を形成している. これらの細胞は, がん細胞との相互作用により増殖因子

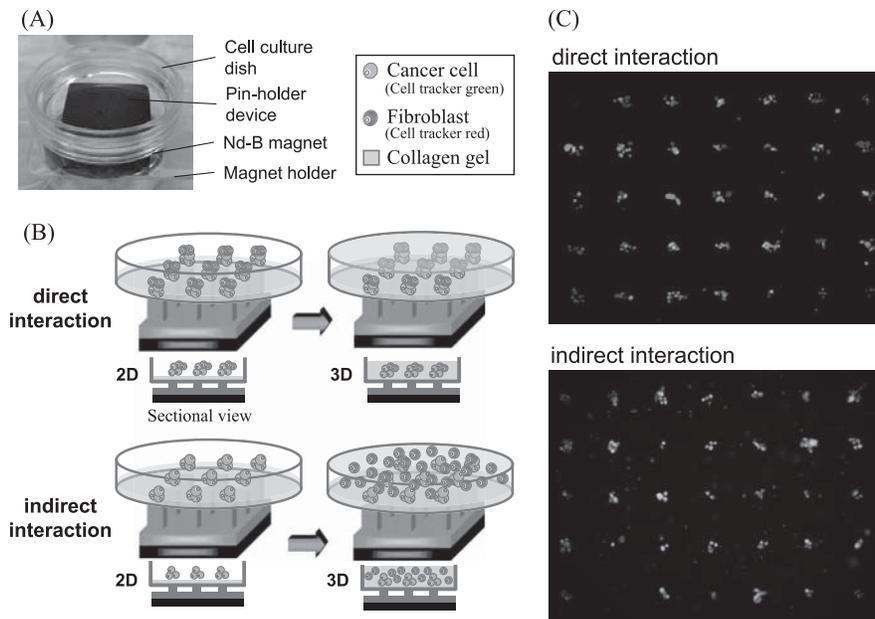


図8. がん-間質細胞の3次元相互作用モデル (直接, 間接作用). (A) 剣山状鉄製デバイスを利用した3次元細胞アレイの作成, (B) がん細胞と間質細胞の磁性標識後に細胞塊を構築 (直接接触), がん細胞の細胞塊アレイ作製と間質細胞を懸濁したコラーゲンゲル (間接作用), (C) アレイ化細胞の蛍光顕微鏡写真.

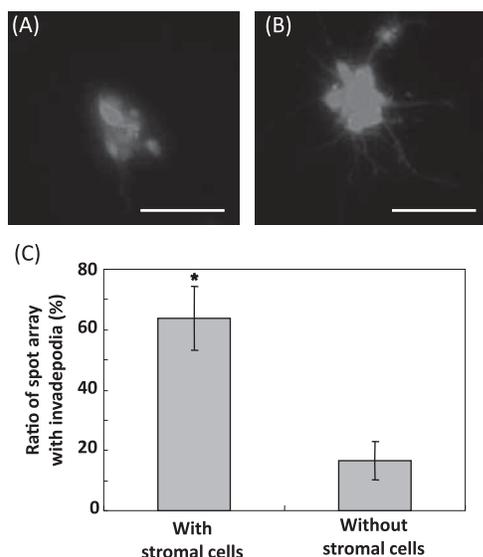


図9. 間質細胞を懸濁したコラーゲングルで包埋したがん細胞アレイにおけるMMP阻害剤の効果. (A, B) 細胞染色画像 (A: 間質細胞なし, B: 間質細胞存在下で2日間培養), (C) 浸潤突起のあるスポット割合を比較.

やサイトカイン, MMPなどの産生, がん細胞の生存や増殖, ひいては浸潤・転移を制御することが明らかとなっている. 特に, 間質線維芽細胞はがん間質を構成する主要な細胞であり, がん組織の構造や機能を調整している.

そこで, 3次元磁性パターンニング法を用いて, 線維芽細胞共存下でのがん細胞の挙動について解析した. がん細胞と線維芽細胞を磁性標識し, 同時に剣山状鉄製デバイスを用いてスフェロイド形成を行うことにより, 線維芽細胞とがん細胞との混合スフェロイドが形成された. また, がん細胞のみをアレイ化し, 線維芽細胞を懸濁したコラーゲングルで包埋する共培養系も構築できた. さらに, 線維芽細胞シート上にがん細胞スフェロイドをパターンニングするなど, 線維芽細胞の直接および間接的な相互作用を解析するモデルを作製した (図8).

ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231を用いて, 線維芽細胞との共存下でMMP阻害剤であるGM6001の薬剤感受性を調べた. 先の実験において浸潤阻害活性が確認された100 μ Mの濃度においてGM6001を作用させたところ, がん細胞の浸潤活性が大きく減少し, 培養2日後においても播種した時の凝集塊を保持していた. しかし, 顕微鏡で細胞塊の拡大画像を取得すると, 線維芽細胞との共存下で培養した際には, 多くの浸潤突起が確認された. 浸潤突起がみられた割合は線維芽細胞の非存在下では15%であったのに対し, 存在下では65%と大きく上昇した (図9). このような違いは, MMP阻害剤を添加しない場合にはみられなかった現象であり, 間質細胞ががん細胞の浸潤活性を増強し, 抗がん剤に対する抵抗性を

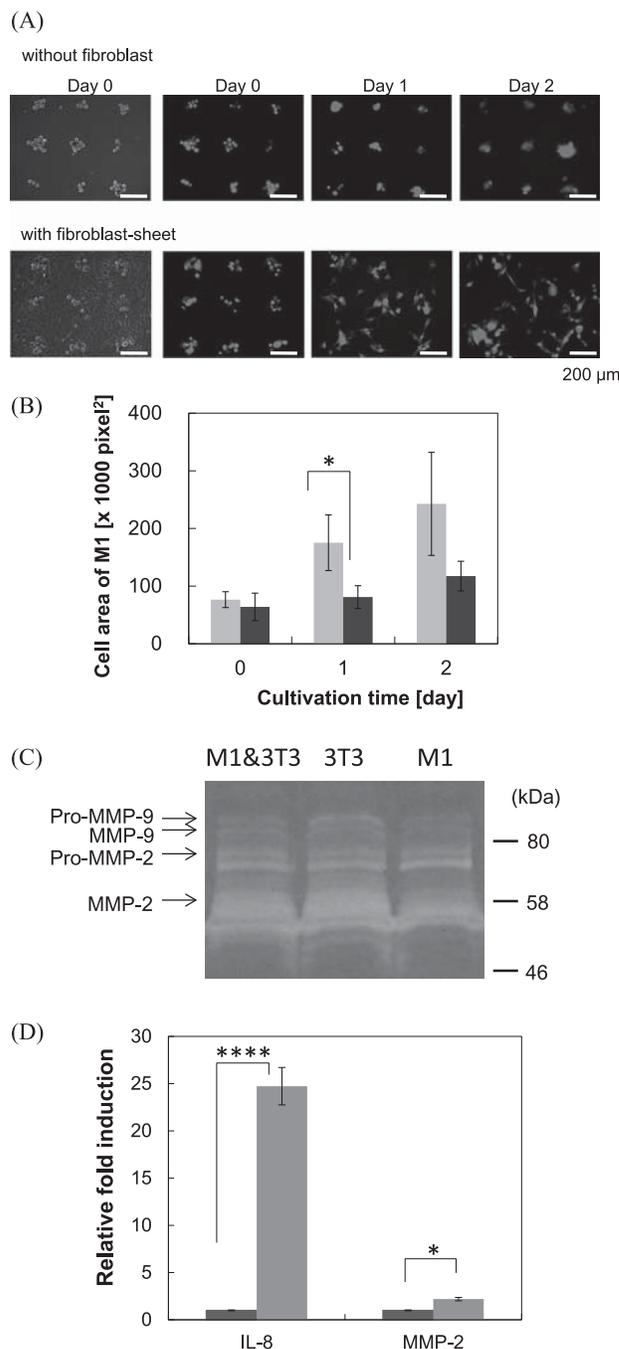


図10. 線維芽細胞シート上でのメラノーマ細胞塊の形成と浸潤評価. (A) 3次元培養によるメラノーマ細胞塊の浸潤挙動, (B) 細胞表面積, (C) 培養上清のゼラチン・ザイモグラフィー (2日後), (D) ヒト特異的プライマーによる遺伝子発現解析 (リアルタイムRT-PCR, 黒: メラノーマ単独, 灰色: 線維芽細胞シート上での共培養).

上昇することが示唆された¹⁴⁾.

皮膚がんの一種であるメラノーマ (悪性黒色腫) を用い, 線維芽細胞シート上でスフェロイドをアレイ上にパターンニングした. マウス線維芽細胞3T3を一晩培養した後, マイトマイシンC処理により細胞増殖を停止させた.

蛍光染色したヒトメラノーマ細胞M-1をアレイ状にパターンニングした後、コラーゲンゲルで包埋した。その結果、線維芽細胞シート上で培養すると、メラノーマは伸展し、細胞移動・浸潤能が増大している様子が観察された。線維芽細胞を用いずコラーゲンゲルで包埋した場合は、メラノーマは細胞塊を形成し、各スポットに止まった。ゼラチン・ザイモグラフィーによるMMP活性染色においてもMMP-2、MMP-9活性の増加が示唆された。また、遺伝子発現解析により炎症性サイトカインIL-8とMMP-2を調べたところ、M-1単独で培養した時と比較しIL-8では約14倍、MMP-2では約2倍の発現上昇がみられた。これらの発現は、がん細胞の遊走、浸潤活性に関与することから、線維芽細胞はメラノーマの細胞移動・浸潤活性を増加させることが示された¹⁵⁾。

おわりに

磁性粒子を利用した細胞解析に関する方法として、磁力応答型の液滴搬送システムを有するMAG-LOCおよび細胞アレイ構築法について概説した。MAG-LOC法は、オイル、液滴、磁性粒子など簡易な要素で構成されており、反応液量の変化に柔軟に対応できる他、反応場に液滴を用いることで非特異吸着によるサンプルロスを回避できるなど少量サンプルの解析において優れた特性を有する。また、磁性3次元細胞アレイ法は、細胞挙動観察が容易であり、薬剤応答解析などの創薬支援分野における展開が可能であると示された。今後、多様な細胞培養・解析システムの構築により細胞の機能発現と維持が可能となり、生体システムの高次な理解による診断・治療法の開発や治療薬創出が期待される。

本研究は、名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻において行われたものであり、本多裕之教授に心より御礼申し上げます。また、研究を遂行する上で、液滴搬送システムの構築について御教示を賜りました式田光宏先生（名古屋大学工学研究科 准教授）ならびに、がん細胞浸潤モデルの構築について御教示を賜りました千賀 威先生（名古屋大学医学系研究科 准教授）に感謝申し上げます。本研究は、研究室の卒・修了生諸氏の研究成果であり、皆様に謝意を表します。また、

研究室の助教として支えていただきました井藤 彰先生（九州大学工学研究院 准教授）、加藤竜司先生（名古屋大学創薬科学研究科 准教授）に感謝申し上げます。最後に、これまで御指導を賜りました松永 是先生（東京農工大学 学長）、中村徳幸先生（産業技術総合研究所）、竹山春子先生（早稲田大学理工学術院 教授）、養田正文先生（東京農工大学工学研究院 教授）に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matsunaga, T., Okochi, M. and Nakayama, H.: *Electrochim. Acta*, **44**, 3779–3784 (1999).
- 2) Matsunaga, T., Nakayama, H., Okochi, M., Takeyama H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **73**, 400–405 (2001).
- 3) Akutsu, J., Tojo, Y., Segawa, O., Obata K., Okochi, M., Tajima, H. and Yohda, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 667–671 (2004).
- 4) Ito, H., Takayanagi, K., Okochi, M., Shikida, M., Sato, K. and Honda, H.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **39**, 1296–1299 (2006).
- 5) Tsuchiya, H., Okochi, M., Nagao, N., Shikida, M. and Honda, H.: *Sens. Actuator B-Chem.*, **130**, 583–588 (2008).
- 6) Okochi, M., Tsuchiya, H., Kumazawa, F., Shikida, M. and Honda, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 193–197 (2010).
- 7) Shikida, M., Koyama, M., Nagao, N., Imai, R., Honda, H., Okochi, M., Tsuchiya, H. and Sato K.: *Sens. Actuat-B: Chem.*, **137**, 774–780 (2009).
- 8) Shikida, M., Inagaku, N., Okochi, M., Honda, H. and Sato K.: *J. Micromech. Microeng.*, **21**, 067006 (7 pp) (2011).
- 9) Ino, K., Okochi, M., Konishi, N., Nakatochi, M., Imai, R., Shikida, M., Ito, A. and Honda, H.: *Lab Chip*, **8**, 134–142 (2008).
- 10) Shinkai, M., Yanase, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J. and Kobayashi, T.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1179–1183 (1996).
- 11) Kiode, H., Isaji, Y., Okochi, M. and Honda, H.: *Chem. Eng. Jpn.*, **42**, 290–297 (2009).
- 12) Ino, K., Okochi, M. and Honda, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, 882–890 (2009).
- 13) Okochi, M., Takano, S., Isaji, Y., Senga, T., Hamaguchi, M. and Honda, H.: *Lab. Chip*, **9**, 3378–3384 (2009).
- 14) Okochi, M., Matsumura, T., Yamamoto, S., Nakayama, E., Jimbow, K. and Honda, H.: *Biotechnol. Prog.*, **29**, 135–142 (2013).
- 15) Okochi, M., Matsumura, T. and Honda, H.: *Biosens. Bioelectron.*, **42**, 300–307 (2013).