

# 1細胞のヒドロゲル薄膜内包括と細胞識別・分離・制御

境 慎司

## はじめに

近年、1細胞からクローニングされた細胞株であっても、そこに含まれる個々の細胞は、遺伝子発現の程度や挙動に差があるヘテロな集団であることが広く認識されるようになってきている。このようなこともあり、1細胞単位で細胞を取り扱える技術は、創薬分野などでの重要性が増大している。この1細胞単位で細胞を取り扱う方法としてもっとも広く用いられているのは、フローサイトメトリーであろう。たとえば、ある細胞に特異的に発現するタンパク質などに対し、その抗体に蛍光物質を標識したものを適用することで、個々の細胞のもつ情報を読み取り、その有無・強弱を目印として、目的の細胞を分取するということが生命科学や医学の分野などで広く行われている。その他には、抗体を表面に固定した磁性ナノ粒子で抗原を発現している細胞を識別する方法もよく使用されている。これらの技術は、細胞を識別、分離することを可能とするものであるが、より簡便、安価であったり、識別・分離以外の細胞操作も可能とするような新たな技術は、産業応用も含めた1細胞レベルでの細胞解析、利用の用途拡大につながると期待される。

本稿では筆者らの行っている1細胞ごとに厚さ数 $\mu\text{m}$ 程度のヒドロゲル薄膜で覆う細胞加工技術およびその応用に関して概説する。

## ヒドロゲルビーズへの細胞包括

ヒドロゲルビーズへの動物細胞の包括は、40年以上前から、さまざまな用途での利用が検討されてきた。包括された細胞の生存は、ヒドロゲルが酸素や栄養分、二酸化炭素や代謝老廃物を透過できることで維持される。さらに、用途に応じてヒドロゲル材料の選択、物性の制御を行うことで、物質透過性や力学的強度をはじめとする細胞周囲環境を操作可能である。これらが、これまでに細胞包括ヒドロゲルビーズのさまざまな用途での利用が検討されてきた理由の一つであろう。たとえば、外部からの力学的な負荷に対してそれほど強い耐性を有さない動物細胞をバイオリクター内の溶液の流動により生じる剪断力から保護しながら有用物質を生産させるためにヒドロゲルビーズ包括が行われてきた。また、ヒドロ

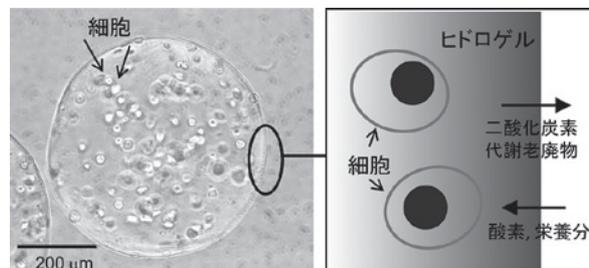


図1. 一般的なサイズの細胞包括ゲルビーズ（左写真）と細胞包括ヒドロゲルの模式図。

ゲルに免疫反応に関わる細胞や物質を透過させない物性を付与することで、非自己の細胞の移植を免疫抑制剤の非投与下で行うための細胞移植用ツールとしての検討もなされてきた<sup>1)</sup>。さらに最近では、幹細胞の分化を細胞と接触するヒドロゲルビーズ材料によって制御するといったことも試みられている<sup>2)</sup>。図1の写真は、筆者らが以下に記す汎用的な方法で作製した、一般的な大きさの細胞包括ヒドロゲルビーズである。この方法では、通常、細胞がそれよりもはるかに大きなビーズに多数同時に包括されることとなる。

なお、細胞をヒドロゲルビーズに包括する際に利用される方法に着目すると、材料や手法は異なるものの、常識的ともいえるほど汎用的に用いられてきたのは、細胞が存在しなくても高分子溶液からヒドロゲルが形成する過程に細胞を混入するというものである。たとえば、アルギン酸ナトリウム水溶液は、カルシウムのような多価の金属イオンを含む水溶液に滴下するとゲルビーズが得られる。このアルギン酸ナトリウム水溶液にあらかじめ細胞を混ぜておけば、細胞包括アルギン酸ゲルビーズを得ることができる。

## 1細胞ごとのヒドロゲル薄膜内包括

上述した従来の方法でも、ゲルビーズ一つに細胞が一つ入るために必要な細胞濃度を計算し、それに基づいて調製した細胞分散高分子水溶液からゲルビーズを作ること、理論的には1細胞ずつ別々のヒドロゲルビーズに包括することが可能である。しかし、実際には、細胞が一つしか入っていないヒドロゲルビーズができるかどうか

かは、あくまでも確率論的に決まるものであり、細胞が含まれていないものや、複数含まれるゲルビーズもできてしまう。1細胞レベルで細胞を取り扱いたい用途においては、それらを分離することが必要であるが、それはとても難しい。さらに、汎用的な方法では、細胞がその内部のどの部分に固定されるかを制御できない状態で直径数百マイクロメートルのゲルビーズが形成する。このため、各種顕微鏡を用いた観察を多数の細胞に対して行う場合には、各ビーズ内の細胞ごとに焦点の調整が必要となるなどの問題が生じる。細胞周囲のヒドロゲル層の厚さは、観察の容易さだけでなく、細胞と周囲環境との物質交換にも影響を及ぼす。同じ物性であればヒドロゲル層は薄い方が良好な交換を可能とすることは容易に理解できるだろう。

細胞が存在しなくてもゲル化が生じる過程に細胞を混入させるというアプローチを取りつつも、細胞周囲のヒドロゲル層を薄くする方法として、マイクロ流路を用いてゲルビーズを作製する方法が報告されている<sup>3)</sup>。しかし、この方法でも細胞の生存に影響を与えずに細胞とほぼ同じ大きさのヒドロゲルビーズを作ることは非常に難しい。また、前に述べた空のゲルビーズ、複数個細胞が入ったゲルビーズが生成するという確率論的問題は残存したままである。

そこで筆者らが取り組んでいるのが、細胞が存在しなければ高分子水溶液からヒドロゲルが進行しない方法、すなわち細胞がヒドロゲル形成の起点となる細胞包括法

である。具体的には、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を細胞表面に固定し、ヒドロゲル形成を導く酵素反応を細胞表面で進行させることで、細胞をヒドロゲル薄膜で覆う方法である (図2a)<sup>4)</sup>。HRPは、過酸化水素の存在下でフェノール性水酸基間の架橋形成反応を触媒する (図2b)。このため、フェノール性水酸基を含んだ高分子水溶液にHRPを溶解させた場合には、そこに過酸化水素を添加すると、水溶液全体をゲル化することができる (図2c)。HRPを表面に固定化した細胞を、フェノール性水酸基を導入した高分子を溶解した水溶液に分散し、そこに微量の過酸化水素を添加すれば、細胞表面に厚さ約1 μmのヒドロゲル薄膜を形成させることができる (図2d, 蛍光標識した高分子を使用)。なお、この方法の各過程に要する時間は10分程度であり、HRPの細胞表面への固定化は、細胞膜修飾剤 (BAM, 日油 (株)) を用いて行うことができる。強度や透過性に影響を与える形成するヒドロゲル薄膜の厚みやそこに含まれる高分子密度の制御は、細胞表面に固定化するHRP量や、水溶液中の高分子濃度、過酸化水素濃度および反応時間の制御により行うことが可能である<sup>4)</sup>。これまでに、ピペッティング操作や1週間程度の培養の間に崩壊することがないヒドロゲル薄膜を形成させることもできている。このような強度を有するヒドロゲル薄膜は、マイクロピンセットのような機械的ツールを用いて1細胞ごとに細胞を移動・配置するような用途で役に立つと期待される。さらに、そのようなヒドロゲル薄膜中では、細胞の分裂・

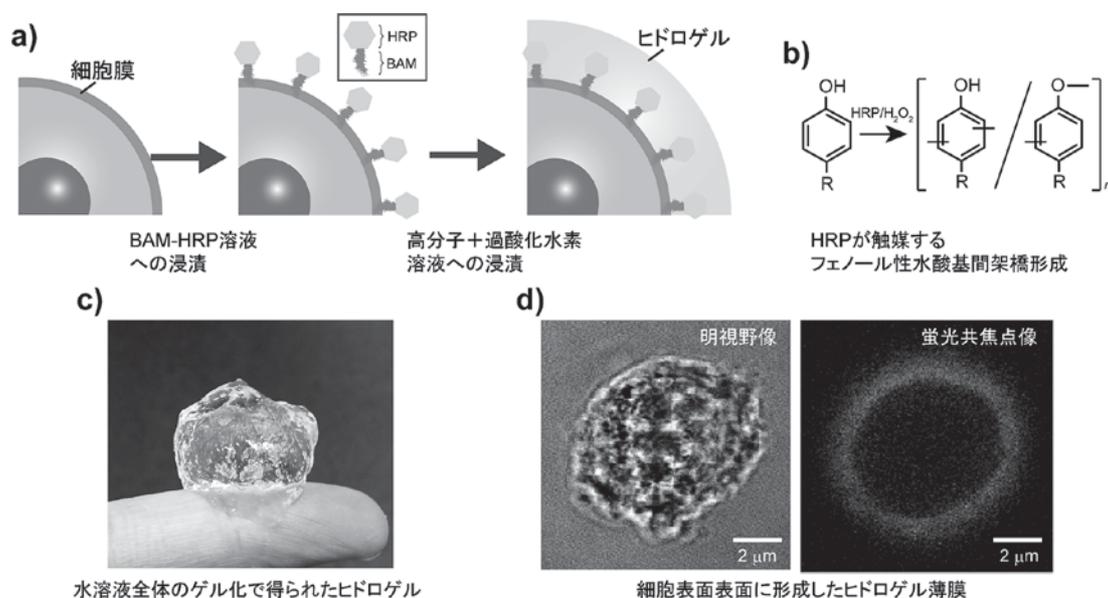


図2. a) 細胞表面固定HRPを用いた細胞表面へのヒドロゲル薄膜形成法模式図, b) HRPによるフェノール性水酸基間架橋形成反応, c) それにより得られるヒドロゲル写真, およびd) 細胞表面固定HRPの触媒反応により細胞表面に形成したヒドロゲル薄膜<sup>4)</sup>。

増殖が抑制されることもわかっており、そのような状態にすることが、細胞にどのような影響を与えるのかは興味深いところである。

細胞機能に影響を与える刺激を1細胞ごとにヒドロゲル材料から与えるという視点からは、架橋されるフェノール性水酸基さえ導入できれば、さまざまな材料で細胞を包括できることは魅力的な点である。これまでに、アルギン酸、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリビニルアルコール、キトサンなど再生医療・組織工学分野で多くの利用が行われている各種高分子の誘導体からヒドロゲル薄膜を形成させることができることを確認している。また、それぞれの高分子の分解酵素（たとえばアルギン酸誘導体ヒドロゲル薄膜の場合にはアルギン酸リアーゼ）で処理することで、任意のタイミングで細胞の生存を損なうことなく薄膜を除去することも可能である。さらに、薄膜を除去された細胞は、その後、増殖することも確認されている。

なお、過酸化水素の使用は、細胞への毒性が危惧される場所であるが、その濃度を上手くコントロールすることで、細胞の生存に影響を与えることなくヒドロゲルを形成させることが可能である。

#### 細胞表面の抗原を目印とする薄膜内包括

上述した1細胞ごとのヒドロゲル薄膜内包括では、細胞膜修飾剤を用いてHRPを細胞表面に固定化している。このため、系の中に存在するすべての細胞がヒドロゲル薄膜に包括される。これに対して、細胞表面抗原をターゲットとしてHRPの固定化を行えば、細胞選択的にヒドロゲルに包括することが可能である<sup>5)</sup>。さまざまな細胞を含む細胞集団からある特定の細胞群だけを選択的にヒドロゲルで包括することは、従来のヒドロゲルへの細胞包括技術では不可能であったことである。HRPが標識された抗体は、固相酵素免疫検定法（ELISA法）用の試薬として、さまざまなものが市販されている。すなわち、フェノール性水酸基を導入した高分子と過酸化水素を用意するだけで比較的簡単に実施可能である。

検討の一例を紹介する。まず、マウス線維芽細胞株の10T1/2細胞とヒト肝臓がん由来細胞株のHepG2細胞を混合した細胞群を、HRP標識した抗CD326抗体を含む緩衝液に30分間浸した。CD326はHepG2細胞表面に存在しているタンパク質である。洗浄後、微量の過酸化水素を含む蛍光標識したフェノール性水酸基導入アルギン酸水溶液に30分間浸した。その結果、HepG2細胞表面のみにヒドロゲル薄膜が形成した<sup>5)</sup>。細胞膜主食剤を用いてHRPを系に存在するすべての細胞表面に固定し、

すべてヒドロゲル薄膜で包括した場合と同様に、ヒドロゲル薄膜への包括による生存率の低下はほとんど生じなかった。以上は、細胞培養皿から剥離した細胞に対して行った結果であるが、培養皿に接着している細胞に対しても同様の操作で、選択的にHepG2細胞の表面にヒドロゲル薄膜を形成することが可能である。

なお、細胞表面の抗原に対する抗体にHRPを標識したものをを用いた方法（直接法）だけでなく、1次抗体で細胞の識別を行い、1次抗体に対する2次抗体にHRPを標識したものをを用いて細胞表面にHRPを固定する方法（間接法）でも、同様の細胞選択的なヒドロゲル薄膜への包括が可能である。所要時間、検出感度、汎用性などの点で、直接法と間接法には一長一短があるが、いずれの方法でも細胞選択的なヒドロゲル薄膜内への包括が可能であることは、この方法の有用性を高めるものであろう。

#### 活性酸素放出細胞の薄膜内包括と分離

図2aに示した方法では、細胞表面にヒドロゲル薄膜を得るために、微量の過酸化水素を系外から添加した。ここで、過酸化水素は、動物細胞を含む多くの好気性生物が酸素を消費する過程で生じる活性酸素の一つである。したがって、系外から過酸化水素を添加しなくても、細胞が放出する過酸化水素を利用してヒドロゲル薄膜を形成させることができ、それによりある一定量以上の過酸化水素を放出している細胞を1細胞レベルで検出できる（図3a）。具体的な方法はきわめて簡単であり、フェノール性水酸基を導入した高分子水溶液にHRPを溶解させ、その中に細胞を分散させて一定時間待つだけである。フェノール性水酸基を導入したアルギン酸誘導体水溶液にHRPを溶解させた後、過酸化水素を細胞内で生成していることをあらかじめ確認しておいた細胞を希薄に10分間分散させたところ、一部の細胞の表面のみにヒドロゲル薄膜が形成していることが蛍光顕微鏡で確認された（図3b）<sup>6)</sup>。この操作と同時に細胞内部の過酸化水素の検出を行ったところ、細胞内の過酸化水素が豊富であることが示唆された細胞とヒドロゲル薄膜が形成した細胞が必ずしも一致するということはなかった。この結果は、細胞内の活性酸素除去機能の発現の程度も細胞ごとに異なることを示唆している。

前頁で述べたように、HRPを細胞表面に固定して行うヒドロゲル薄膜形成では、過酸化水素濃度の操作により、ヒドロゲル形成量を制御することができる。細胞が放出する過酸化水素を利用する本方法では、過酸化水素放出速度により細胞表面に形成するヒドロゲル量に違い

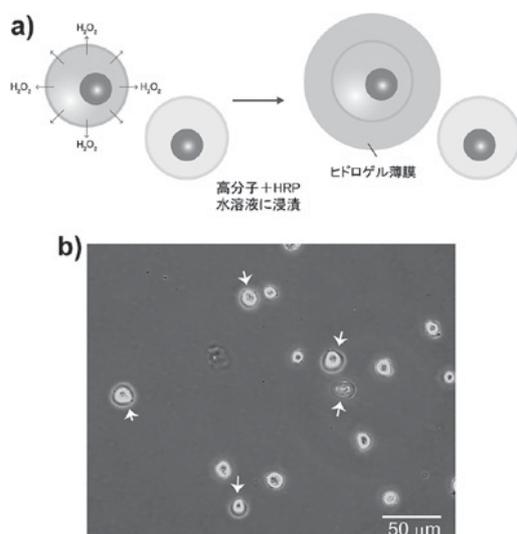


図3. a) 過酸化水素放出細胞のヒドロゲル薄膜形成による識別法模式図, b) 細胞表面に形成したヒドロゲル薄膜 (矢印)<sup>6)</sup>.

が生じる。このため、蛍光標識した高分子からヒドロゲル薄膜を形成させれば、蛍光顕微鏡観察やフローサイトメーターなどを用いて、1細胞ごとの過酸化水素放出速度を定量すること可能である。

ヒドロゲル薄膜の形成により一定量以上の過酸化水素を放出していることが確認された細胞に関して、遺伝子発現のような解析を行うためには、それらを分離する必要がある。蛍光標識した高分子から薄膜を得た場合には、それを目印としてセルソーターを使い分離することも可能である。しかし、セルソーターは高価であることに加え、処理速度という点では大量の細胞処理には不向きである。本法を壁付着性細胞に対して適用した場合には、ヒドロゲル薄膜の存在を利用して、培養液に分散させた後に培養皿上に数時間静置するという簡単な操作により、薄膜が形成していない細胞のみを培養皿に接着させて、分離することができる。なお、この方法は前述した細胞表面の抗原を目印としてヒドロゲル薄膜内に包括された細胞の分離にも適用可能である。

活性酸素は、動脈硬化、脳卒中、がんなどさまざまな疾患に関与するため、それに着目した疾患の病態解明と予防対策・治療戦略の確立が急がれている。特に細胞を

対象とする各種の検討においては、活性酸素を可視化するためのツールが必須である。現在、細胞内部で産生された活性酸素を可視化するための試薬と細胞が放出した活性酸素を定量するための試薬が市販されており、多くの試験で用いられている。前者は活性酸素の産生に関わる細胞の特定を可能とし、蛍光を標的としてセルソーターにより分取したり、蛍光を発する細胞の周囲の細胞挙動を観察・解析したりすることに利用される。しかし、細胞内にはカタラーゼに代表される活性酸素を除去する仕組みが存在する。このため、識別された細胞が実際に活性酸素を放出しているか、また活性酸素をどの程度の速度で放出しているかどうかを知ることは不可能である。後者の方法では、細胞を含む培養液中の活性酸素の定量しかできず、活性酸素放出細胞の特定は不可能である。本方法は、これら既存の方法ではできなかった、活性酸素を放出している細胞を識別、分離し、その放出速度も定量することを可能とするものであり、活性酸素に関する分野での活用が期待される。なお、先に述べたように、ヒドロゲル薄膜としてさまざまな材料を利用できる点と組み合わせれば、過酸化水素放出細胞の検出と同時に、ヒドロゲルから細胞機能を制御するようなことも可能であり、過酸化水素を放出している細胞に特異的に刺激を与えるといった使い方も興味深いところである。

### おわりに

本稿では1細胞ごとにヒドロゲル薄膜内に包括する技術に関して紹介した。今後、これらの技術が1細胞レベルで細胞を扱うことを必要とする産業分野に貢献できるようになることを期待している。

### 文 献

- 1) Hernandez, R. M. *et al.*: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 711 (2010).
- 2) Wang, X. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **22**, 791 (2006).
- 3) Köster, S. *et al.*: *Lab Chip*, **8**, 1110 (2008).
- 4) Sakai, S. and Taya, M.: *ACS Macro Lett.*, **3**, 972 (2014).
- 5) Sakai, S. *et al.*: *Biomaterials*, **53**, 494 (2015).
- 6) Liu, Y. *et al.*: *Anal. Chem.*, **86**, 11592 (2014).