

再生医療を加速する細胞培養ツールの開発 ～ナノ細胞膜の編集・分析から細胞機能の制御～

湊 元 幹 太^{*1} 岡 本 行 広^{*2}
境 慎 司^{*2}

Development of Cell Culture Tools for Realization of Regenerative Medicine ～Modification/Analysis of Nano-cell Membrane to the Control of Cell Function～

Kanta TSUMOTO^{*1}, Yukihiro OKAMOTO^{*2} and Shinji SAKAI^{*2}

Attainment of regenerative medicine requires the cells, the technology for cell culture, and large amount of high-quality cell production processes *etc.* Especially, tailor-made and biomimetic cell engineering for cell culture has been demanded because the present technology for cell culture has been employed for long time with conventional procedures using such simple plastic apparatus, and has used different environment and properties compared to that in our body. Thus, we started the collaboration research for such the cell culture device, by which we would intend to combine well designed artificial and biological surfaces like lipid membranes, supported by Toyota Physical and Chemical Research Institute, and reported our annual results in this paper.

1. 研究背景

再生医療は、細胞や人工的な材料を利用し、機能障害・機能不全に陥った生体組織や臓器の機能の再生をはかるものである。すでに一部実現している再生医療はあるものの、まだ広く普及している段階にはない。この再生医療の普及を実現するために必要な要素として、「細胞」、「細胞を培養する技術」、「質の高い細胞を大量に生産し、供給するプロセス」が挙げられる。細胞に関しては、iPS細胞をはじめとする各種幹細胞が有効なリソースである。一方で、細胞を培養する技術、質の高い細胞の大量生産プロセスに関しては、酵素を用いず、温度制御により培養基材表面から細胞シートを回収する技術などの発展はあるものの、長年、ほぼ同じ手法を踏襲し、大きな発展が得られていないといえる。また、質の高い細胞の大量生産プロセスは、培養技術に則って、大量生産プロセスを考える必要性があるため、さらなる発展が望まれる。

「細胞を培養する技術」に着目すると、現状の最も一般的な細胞培養法は、一様な物性のプラスチック基板上で細胞を接着、増殖させるものであり、これにより基礎研究や細胞供給用の細胞作製は行われている。しかし、細胞が本来存在する環境を考えると、このプラスチック基板の堅さなどの表面特性は、生体内の環境と大きく異なっている。細胞は、弾性をはじめとする周囲の環境特性により、幹細胞の分化方向を含めた機能発現が影響を受けることが知られている。また、その影響を与える特性の程度は、細胞種ごとに異なる。したがって、細胞が接着する基材表面に代表される培養環境を細胞種に合わせて調整することにより、プラスチック基板上での培養とは異なる結果を得られる可能性がある。このようなことから、細胞種ごとに、細胞接着界面をテーラーメイドに構築可能な手法の開発が、再生医療の普及を加速することにつながると我々は考えた。

今回、豊田理化学研究所の支援や共同研究の契機をいただき、このコンセプトの下で、再生医療を加速する細胞培養ツールの開発を目指し、その最初の試みとして、研究者各自が現に取り組んでいる技術である、人工細胞膜（リポソーム膜）を用いた基材への固定法の検討、脂質膜の特性解析、物性の異なるハイドロゲル作製法の開発および細胞への影響について、研究を行ったので、その成果を報告する。

2024年3月1日 受理

^{*1}三重大学大学院工学研究科応用化学専攻

^{*2}大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域

2. 人工細胞膜（リポソーム膜）を用いた基材への固定法

細胞膜は、両親媒性のリン脂質が水溶液中で自己集合し形成された脂質二分子膜である平面膜が、疎水性の端を隠すように閉じた小胞である。次節で述べるように、脂質膜には多彩な物性が知られており、それらの生物学的な意義も研究されている。一方で、脂質膜に関する非常に単純な疑問もある。細胞が通常生育するような生理的塩溶液中では、細胞のような数マイクロサイズのリン脂質小胞（リポソーム）を形成させることが一般に難しいことである。そのため、広い面積を持った単層二分子膜小胞を作製する技術の開発がこれまで盛んに行われてきた（例えば、文献（1）および（2）を参照）。私たちはこれまで、温和かつ大量に比較的サイズが揃った巨大リポソーム（giant unilamellar vesicles, GUVs）を調製する方法を複数考案してきており、本研究では、これらの手法で得た GUV を用いて、膜への機能性の付与や、球形基材への固定を検討した。前者の例として、接着性の組換え膜タンパク質の導入によりリポソーム膜間の相互作用を実現した。組換え膜タンパク質の人工膜への挿入は、組換えバキュロウイルス出芽粒子の膜融合により実現しており、現在、報告準備中である。後者では、連続した脂質膜の大量調製が可能とする GUV の逆相遠心法（reverse-phase evaporation method）（2）を用いた GUV 調製を行っている。Fig. 1 に示すように、この方法では、脂質組成を工夫することにより、相分離マイクロドメインを形成した GUV を大量に形成させることが可能であり、膜構成脂質に種々の脂質組成を、

水相に生理的塩溶液を、それぞれ選択できるため、実際の生細胞が持つような広範な脂質組成から平面膜の組成を選択することが可能となる。GUV は一般に平板の固体基板に吸着後に開裂展開すると支持脂質二分子膜となるが（次節）、この要領で得た GUV を球状の固体粒子（シリカビーズ）を支持体として展開すると、脂質膜で被覆されたビーズが調製される。支持膜の展開は、GUV を使うことで一度に球面を広く覆うことが示されている（Fig. 1）。

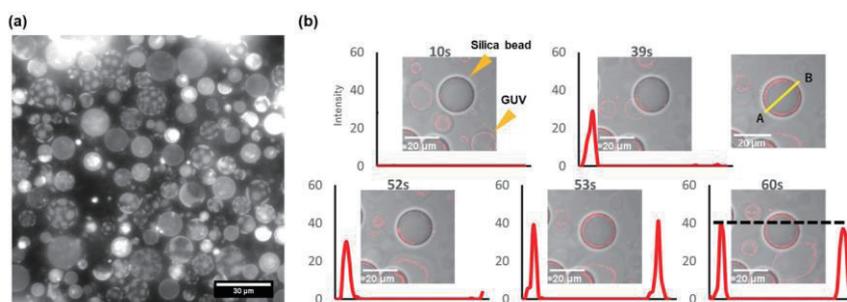


Fig. 1 GUVs and the lipid membrane spreading on a silica bead.

(a) GUVs possessing microdomains (REF 3), (b) the time-lapse CLSM observation of spreading of GUV membrane on a silica bead (unpublished data, Iwata, et al.).

3. 脂質膜の特性解析に関する研究

細胞膜は、人工的な膜（有機、無機）と比較し、異なる特性をいくつも有している。中でも脂質膜を構成する分子（脂質、膜タンパク質など）や組成比が異なれば、膜流動性、表面電荷、相分離、相状態（ゲル相、液晶相）などの特性が大きく異なる。そこで、今年度は、細胞培養を指向し、細胞とのインターフェースとなり得る脂質膜の特性解析法の開発ならびに特性解析を実施したので報告する。

平面脂質膜の流動性に関する解析として（極性（GP 値）、lipid packing, 異方性 r ）を解析可能な手法に関して、研究を実施した。vesicle fusion 法にてガラス基板上に平面脂質二分子膜を作製した。その後、lipid packing に関しては solvatochromism を示す LipiORDER（蛍光）試薬を用いて、平面脂質膜の lipid packing を評価した。Lipid packing を評価する方法としては、落射蛍光顕微鏡に同時二波長測定機能を組み込み、ratio 測定可能とした。

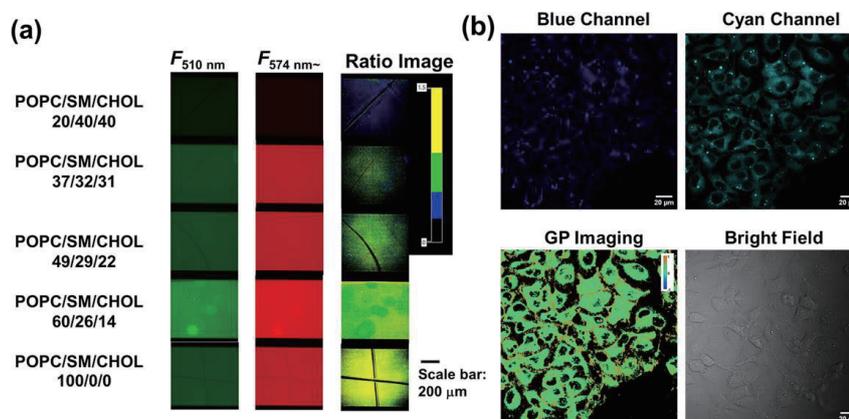


Fig. 2 Fluorescence images of membrane properties.

(a) lipid packing, (b) GP values.

その結果, Fig. 2に示す様に, 相状態の違いを反映し, 蛍光強度比が変化する結果を得た. また, 相分離系に対しても, 相図から得られるLo/Ld相の面積比を反映した蛍光強度比を得ることに成功した. つまり, 本手法により, lipid packingという観点で, 平面膜の相状態, 相分離状態, 流動性を評価可能な手法を確立した. これを実際に生細胞に応用した際, 細胞膜との外来分子との相互作用の結果, lipid packingの変化を追及可能であった. つまり, 人工的な脂質膜よりも複雑な生細胞膜であっても, 本手法を適用可能であることを実証した.

続いて, 極性値 (GP 値) の評価を行った. 一般的に使用される Laurdan という蛍光分子は, 蛍光退色が激しく, 落射蛍光顕微鏡では評価不可能であった. そこで, 高感度かつ退色を起こしにくい二光子顕微鏡を用いて平面膜の GP 値を評価することを目指した. その結果, lipid packing の成果と同様に, 細胞膜と相互作用する物質を投与後, GP 値の変化を追及可能であることを実証した. また, 流動性の指標として, 蛍光異方性 r に関して, 平面膜の蛍光異方性を測定する手法を検討し, vesicle とほぼ同等の異方性を得られた. この事より, 脂質膜の特性 (流動性) を維持し, 基板上に固定化可能であることを実証した.

4. 物性の異なるハイドロゲル作製法の開発および細胞への影響に関する研究

本研究において脂質膜が培養する細胞とのインターフェースであるが, 細胞の機能発現に影響を与える要素の一つである周囲環境の弾性を制御する観点から, 脂質膜を固定する基材の物性制御に取り組んだ. 具体的には, 生体組織を構成するヒアルロン酸とコラーゲンから得られるゼラチンの誘導体から得られるハイドロゲルに関して, 過酸化水素を含む空気への曝露や紫外線への曝露により高分子鎖の分解を制御することを試みた. そして, それにより得られたハイドロゲルが筋芽細胞の筋細胞への分化と血管内皮細胞の血管様ネットワーク形成に与える影響を評価した. いずれの高分子の分解法も, 容易に曝露の ON/OFF を切り替えられるため, 物性のコントロールが容易であるという長所を有している.

ヒアルロン酸とゼラチン誘導体のハイドロゲルを, 過酸化水素を 16 ppm 含む空気に 15, 60, 120 分間の異なる時間曝露して得られた表面でマウス筋芽細胞 (C2C12) を培養し, 筋細胞への分化を誘導したところ, Fig. 3に示すように, 細胞の形態はそれぞれの表面で大きく異なり, 60 分間曝露して得られた表面において最も良好な筋細胞への分化を示した (4). また, 同様のハイドロゲルを 30, 40, 60 分間紫外線に曝露した表面でヒト血管内皮細胞を培養したところ, 45 分間曝露して得られた表面においてのみ, 血管様のネットワークを形成した.

以上の結果より, 本研究で採用した方法により, ハイドロゲルの物性を制御でき, それにより細胞挙動をコントロールできることに関する知見を得ることができた.

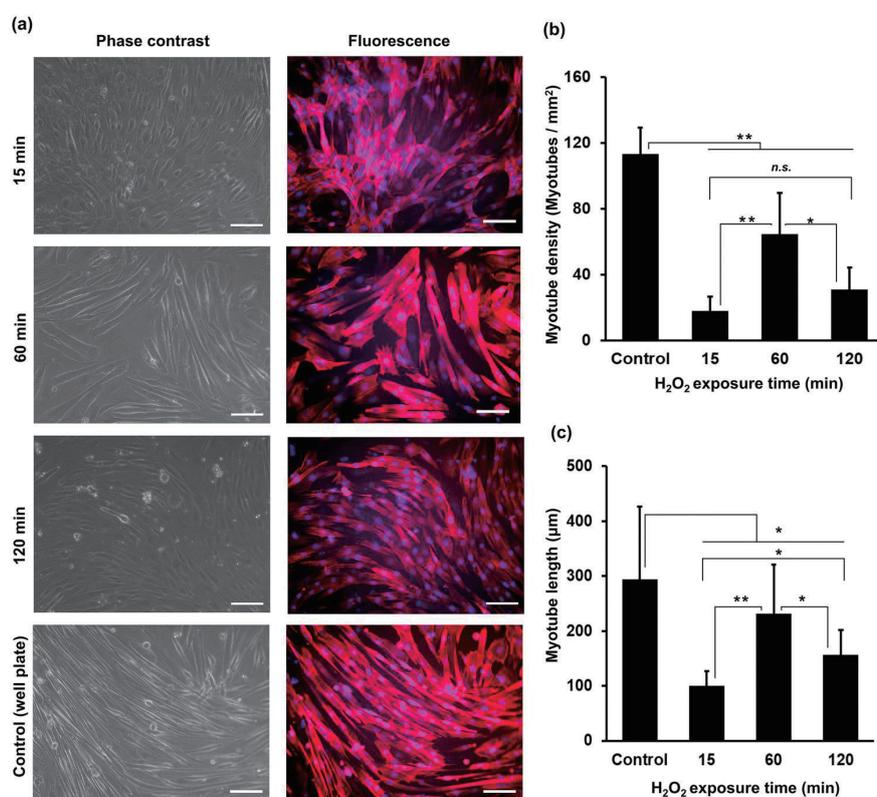


Fig.3 (a) Fluorescent images of C2C12 cells induced to differentiate into myotube on hydrogels obtained by varying the duration of exposure to air containing H₂O₂. (b) Myotube density and (c) length on each hydrogel (REF 4).

5. 結語

以上のように、細胞培養のためのハイドロゲル基材の作製と、そこに展開する人工細胞脂質膜の調製法、固定法や特性解析法の検討を行ってきた。今後、種々の細胞培養条件に応じて、調節可能の提供ができるような技術の実現を目指して、これらの成果を複合していきたいと考える。

6. 謝辞

本研究にあたっては、学生諸氏ならびに共同研究者の方々の協力があつて遂行できた。特に、湊元は、岩田京樹氏（三重大）に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita and T. Yoshimura, *Colloids Sur B: Biointerfaces*, **68** (2009) 98.
- 2) K. Tsumoto, Y. Hayashi, J. Tabata and M. Tomita, *Colloids Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **546** (2018) 74.
- 3) P. Stano and K. Tsumoto, *Life*, **13** (2023) 1594.
- 4) K. C. M. L. Elvitigala, W. Mubarak and S. Sakai, *Soft Matter*, **19** (2023) 5880.