

スポンジモノリス充填デバイスによる 細胞の機械的強度に基づいた細胞分離分析法の開発

加地 範 匡^{*1} 久保 拓 也^{*2}

Development of a Cell Separation and Analysis Technique Based on the Mechanical Strength of Cells Using Spongy Monolith-filled Devices

Noritada KAJI^{*1} and Takuya KUBO^{*2}

Technology to separate iPS cells and cancer cells based on their differentiation status and malignancy is essential for the further development of cellular diagnostics and cellular medicine. Previous cell separation technologies have had some problems, such as the need for fluorescent labeling and the difficulty of mass processing. On the other hand, it is known that mechanical properties such as cell stiffness vary depending on the malignancy and differentiation state of cells, and it is expected to become a new biomarker for diagnosing diseases and the differentiation state of stem cells in addition to conventional biochemical information. If cells can be separated based on their mechanical properties, it will be possible to efficiently separate cells in an unlabeled manner, and is expected to make a significant contribution to the clinical field of cell medicine, which requires large amounts of cells. Therefore, this study focused on sponge monolith columns with through-holes of the same size as the cells, and aimed to develop a cell separation method that can efficiently separate a large number of cells based on the mechanical properties of the cells. In this study, a method for introducing cell-like particles into the sponge monolith column and the most suitable column type for cell separation were investigated. Next, model cells with different elastic moduli were prepared by treating the cells with drugs that affect their mechanical properties, and cell separation was attempted. Finally, the cells were recovered after isolation and tested for viability to verify their applicability in a clinical setting. As a result, cells were successfully separated based on their elastic moduli, although there was some cell loss associated with passage through the column. The viability of the cells after separation was also confirmed. These results suggest that this cell separation technology will be a new technology that separates cells based on mechanical rather than biochemical information of the cells, and k results suggest the possibility of application not only in cell diagnosis but also in cell medicine.

1. はじめに

がん細胞と正常細胞、転移性がん細胞と限局性がん細胞など、細胞の同定と分離は、医療において診断のみならず治療においても重要である¹⁾。現在の細胞診断法は、フローサイトメトリーに代表される生化学的マーカーに基づいた方法である。フローサイトメトリーでは、細胞懸濁液を細胞が一行に並ぶように流れを制御した状態で、レーザー光を順次照射することでその散乱や蛍光強度を測定し、個々の細胞の大きさや形状、内部構造、細胞表面の膜タンパク質などを高速かつ定量的に測定する手法である。この細胞懸濁液を、細胞ごとに液滴内に封入して液滴全体に電荷を付与することで、細胞診断後に目的細胞のみを分取することもできる。しかしながら、細胞医療の臨床現場で必要とされるような大量の細胞を分取することは難しく、事前に細胞を蛍光標識する必要があるため、診断後に分取・再回収した細胞をそのまま臨床現場で適用することはできない。さらに分取・再回収の過程で細胞の生存率が低下するなどの問題もあり、細胞移植の臨床現場への応用は現実的ではない。また、人工多能性幹細胞 (iPSCs) から目的細胞へ分化させた細胞を移植する際には未分化の細胞が混入する可能性があるが²⁾、このような未分化の細胞は体内でがん化する可能性があることから、蛍光色素などの標識法を用いずに非標識で細胞を診断して事前に分離・除去する技術が必要である。

このような背景の元、細胞の新たなバイオマーカーとして注目されているのが、細胞の機械的特性です。その一例として、Nematbakhshらはヒト乳腺由来の悪性がん細胞は正常細胞に比べて弾性率が低いことを明らかにしており³⁾、肺がん細胞や口腔がん細胞でも同様の傾向が報告されている^{4,5)}。また、Deliormanらは、転移性前立腺がん由来の血中循環がん

2023年3月7日 受理

^{*1}九州大学大学院工学研究院応用化学部門 (機能)

^{*2}京都大学大学院工学研究科材料化学専攻

細胞 (CTCs) の弾性率 (6.2 ± 1.8 kPa) が、限局性前立腺がん由来の CTCs の弾性率 (23.9 ± 2.2 kPa) に比べて低いと報告している⁹⁾。このような細胞の機械的的特性の差異と、スポンジモノリスカラムが有する大きな貫通孔径と高い柔軟性、成形性の高さ、カラム充填時の操作性の高さに着目し、スポンジモノリスカラムでの細胞分離技術の開発へ着手することとした。

2. モデル粒子を用いた分離の基礎検討

スポンジモノリスカラムには、貫通孔が空いており、圧力印加によって細胞を導入すると、細胞は変形しながら孔を通過することが予想される。このとき弾性率の高い細胞は変形しづらいので、通過時間が遅くなり、弾性率の小さい細胞は変形しやすいので、通過時間が早くなると考えられる (図 1)。この細胞の通過時間の差によって弾性率の異なる細胞を分離することができると考えた。

孔径が 30、60、200 μm のスポンジモノリスカラムに、それぞれ直径が 1、4.5、6、10 μm の PS ビーズを導入して通過時間と通過率を測定した。その結果、いずれのスポンジモノリスカラムにおいても、一番始めに分取した溶出液での回収率が最も高く、続いて分取するにつれて回収率が低くなる傾向となった。また、回収率はスポンジモノリスの孔径が 30、60、200 μm になるにつれて高くなった。

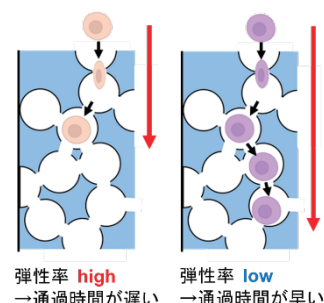


図 1 スポンジモノリスカラムによる細胞分離の概念図。

3. スポンジモノリスカラムによる細胞分離

モデル細胞として、HeLa 細胞と THP-1 細胞を用いた。孔径が 30、60、200 μm のスポンジモノリスカラムを用いたときの HeLa 細胞と THP-1 細胞の通過率は、それぞれ 0、16.5、37.6%と 0、46.6、76.8%であった。いずれの細胞も、スポンジモノリスカラムの貫通孔の大きさが大きくなるにつれて通過率が上昇した。また、60、200 μm のスポンジモノリスでは HeLa 細胞に比べ THP-1 細胞の方が通過率が高かった。これは、HeLa 細胞より THP-1 細胞の大きさが小さいことが主要因であると考えられる。

同じ大きさの細胞において細胞の機械的的特性が通過率にどのように影響するかを検討するために、通過率が最も高かった 200 μm のスポンジモノリスを用いて、事前に細胞をグルタルアルデヒドとラトランクリン A で処理して分離実験を行った。その結果、HeLa 細胞では未処理細胞、グルタルアルデヒド処理細胞の通過率はそれぞれ、37.6、0.833%であり、グルタルアルデヒドで処理することで通過率が大きく減少した。これは、グルタルアルデヒドで処理することで、細胞の弾性率が上昇し、細胞が貫通孔を通る際に変形できずとどまる細胞が増えたためだと考えられる。また、THP-1 細胞では未処理細胞、グルタルアルデヒド処理細胞の通過率はそれぞれ 76.8、20.0%となり、HeLa 細胞と同様にグルタルアルデヒドで処理することで通過率が大きく減少した。次に細胞の弾性率を低下させた細胞の通過率を測定するために、HeLa 細胞と THP-1 細胞をラトランクリン A で処理した。細胞には、アクチンフィラメントという細胞骨格繊維が存在する。アクチンフィラメントは細胞膜下で、2本のアクチン重合体が絡まった構造をとり、細胞膜に強度と形を与えている。細胞をラトランクリン A で処理すると、アクチン単量体と 1 対 1 で反応することで、アクチン重合を阻害し、弾性率を低下させることが知られていることから、1.0 μM のラトランクリン A を含む培地にて細胞を 37°C で 30 分インキュベートし、スポンジモノリスカラムに細胞を導入した。HeLa 細胞では未処理細胞、ラトランクリン A 処理細胞の通過率はそれぞれ、24.5、16.3%であり、THP-1 細胞では、未処理細胞、ラトランクリン A 処理細胞の通過率はそれぞれ、75.0、47.7%であり、ラトランクリン A 処理により細胞の通過率の上昇は観察されなかったため、さらなる検討が必要である。

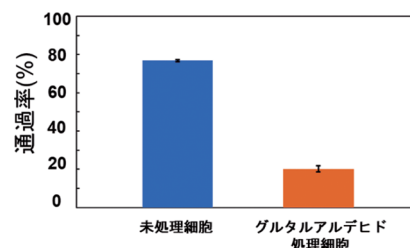


図 2 THP-1 細胞の分離結果。

4. 結論

本研究では、スポンジモノリスカラムを用いた非標識で大量処理が可能な細胞分離法を開発を目指して、カラムに粒子を導入する方法とカラムの条件について検討した。また、薬物処理による弾性率の異なる細胞の分離、分離後の細胞の生存率アッセイを行った。弾性率の異なる細胞の分離では細胞の損失はあったものの、弾性率の異なる細胞の分離に成功した。また、分離後の細胞の生存も確認された。これらの結果から、本手法が機械的的特性の異なる細胞の分離技術の基盤となり、ひいては細胞の診断・分離といった医療現場への応用が期待される。

REFERENCES

- 1) Y. Chang, Y. Liang and W. Gu, *ACS Omega*, **4** (2019) 8318.
- 2) K. Sekine, S. Tsuzuki, R. Yasui, T. Kobayashi, K. Ikeda, Y. Hamada, E. Kanai, J. Gray Camp, B. Treutlein, Y. Ueno, S. Okamoto and H. Taniguchi, *Scientific Reports*, **10** (2020) 10293.
- 3) Y. Nematbakhsh, K. T. Pang and C. T. Lim, *Convergent Science Physical Oncology*, **3** (2017) 034003.
- 4) T. W. Remmerbach, F. Wottaswah, J. Dietrich, B. Lincoln, C. Wittekind and J. Guck, *Cancer Research*, **69** (2009) 1728.
- 5) S. E. Cross, Y. Jin, J. Rao and J. K. Gimzewski, *Nature Nanotechnology*, **2** (2007) 780.
- 6) M. Deliorman, F. Janahi, P. Sukumar1 and A. Glia, *Microsystems and Nanoengineering*, **6** (2020) 1.