

「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を利用した細胞プロファイリング」

若尾雅広

要旨

培養細胞の品質管理は、iPS細胞やES細胞などを用いた組織再生医療において重要な課題であり、細胞状態をモニターできるバイオマーカーが求められている。本研究では、細胞の糖鎖結合性に基づいた糖鎖マーカーの開発を行うため、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(SFNP)を利用した細胞のプロファイリングについて検討した。SFNPは、これまでの方法にしたがって調製し、SFNPの細胞結合性について検討した。細胞には、接着系細胞としてHepG2、HeLa、A431細胞等を用いた。その結果、接着系細胞においては、細胞株の種類によって異なるSFNPの結合性が観察された。SFNPの結合性に基づいて統計解析を行ったところ、糖鎖結合性を指標に、細胞種ごとにプロファイリングできることが明らかとなった。

1. 序論

ワクチンの開発、iPS細胞やES細胞などを活用する再生医療分野において、培養細胞の品質管理は重要な課題となっている。細胞の品質管理には、細胞種特異的な表面タンパク質の検査やmRNAなどの遺伝子解析が用いられるが、細胞接着や組織形成などの細胞間認識においては、タンパク質-糖鎖相互作用や糖鎖-糖鎖相互作用も重要なファクターであるため、細胞表層に特異的に発現する糖鎖の解析ならびに細胞の糖鎖結合性解析も重要であり、mRNAやタンパク質に次ぐ、細胞品質管理に利用できる糖鎖マーカーの探索が求められている。

糖鎖を利用した細胞プロファイリングにおいては、細胞表層糖鎖を解析するレクチンアレイ法が開発されており、iPS細胞やES細胞などの細胞品質管理に向けた検討が行われている¹。しかしながら、この方法では、細胞の糖鎖結合性については評価できない。一方、細胞

に対する糖鎖結合性の評価には、磁気微粒子で標識した糖鎖が開発されているが、この方法においては、磁気イメージング(MRI)装置が必要であるため汎用性が限られており、より簡便な細胞の糖鎖結合性評価法が求められている。

一方、我々のグループでは、これまでに糖鎖の機能を分子レベルでの解析を目指し、糖鎖の合成、機能解析ツールの開発について検討してきた。糖鎖合成では、中性糖をはじめシアル酸、硫酸などを含む複雑な糖鎖の合成を達成し、解析ツールの開発では、糖鎖プローブとなる糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)や糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(SFNP)などを開発し、これらのナノ粒子が、糖鎖-タンパク質相互作用解析や細胞の糖結合性評価、細胞イメージング解析に応用できることを明らかにしている。そこで本研究では、SFNPを利用した新規な細胞プロファイリング法の構築について検討した。

本研究の概略を図1に示す。異なる糖鎖構造を有するSFNPを調製し、まず細胞の糖鎖結合性について評価した。評価はSFNPの蛍光性を利用して、フローサイトメトリーを用いて蛍光強度に基づいて糖鎖結合性のバーニングを行った。また得られたプロファイルの統計解析を行って、細胞種の判別解析を行った。その結果、糖鎖結合性に基づいた細胞の判別が行えることが明らかとなった。

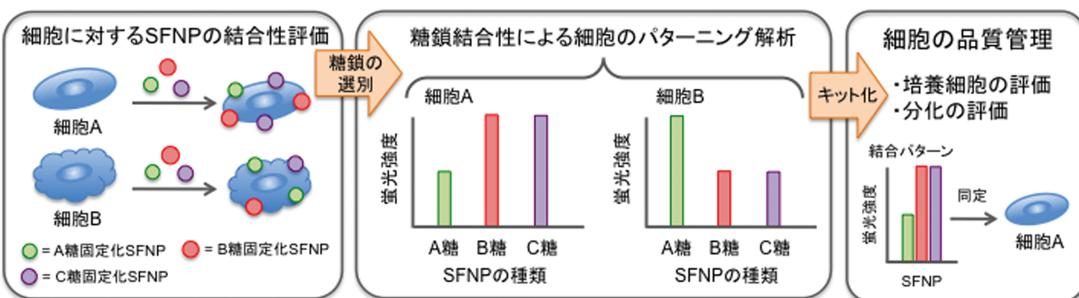


図1. SFNPによる細胞のプロファイリング.

2. 材料と実験方法

2-1. CdTe/CdSコア/シェルQDをコアに持つSFNPの調製

CdTe/CdSコア/シェルQDをコアに持つSFNPの調製は、これまでの方法³に従って行つ

た。CdTe/CdSコア／シェルQD溶液を限外濾過(アミコンウルトラ-10K)した後、濃縮残渣に水を加えてQD溶液を調製した。別途、水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)を水に溶解し、NaBH₄水溶液を調製後、糖鎖リガンド複合体水溶液と混合し、10分間静置した。次に、糖鎖リガンド複合体溶液と、先に調製したQD水溶液を混合し、遮光下で24時間攪拌した。その後、得られた溶液を限外濾過(アミコンウルトラ-10K)して濃縮し、残渣を水に懸濁した。この操作を3回繰り返し、濃縮残渣を回収した後、PBSを加えてSFNP溶液を得た。

2-2. 細胞培養

細胞には、HeLa細胞、HuH-7細胞、HepG2細胞、VMRC-RCW細胞、A431細胞、Hs68細胞、RPTEC細胞を用いた。細胞培養は、それぞれの細胞の至適細胞濃度で、37°C、5% CO₂条件下で行った。HeLa細胞、HuH-7細胞、HepG2細胞、VMRC-RCW細胞、A431細胞、Hs68細胞の培養液には、DMEMまたはMEM(10% FBS、1% PS含有)を用いた。細胞は、70%コンフルエントに達したところで0.05% trypsin-EDTA処理して継代した。すなわち、培養上清を除去し、PBSで洗浄した後、0.05% trypsin-EDTAを加え、適宜インキュベートし、ピペッティングで細胞を剥離した。細胞懸濁液をコニカルチューブに移し、遠心分離後、上清を除去し、細胞を培養液に再懸濁した後、新しいセルカルチャーフラスコに播種した。RPTEC細胞の培養液には、腎上皮細胞培地キットを用い、REBM(無血清)に腎上皮細胞添加因子キットを加えたもの用いた。細胞は、70%コンフルエントに達したところで、サブカルチャー用試薬セットを用いて継代した。すなわち、培養上清を除去しHEPES-BSSで洗浄した後、trypsin-EDTA、TNSを加えてインキュベートし、ピペッティングにより細胞を剥離した。細胞懸濁液をコニカルチューブに移し、遠心分離後、上清を除去し、細胞懸濁液を新しいセルカルチャーフラスコに播種した。培養液の交換は標準プロトコルに従って行った。

2-3. 細胞のフローサイトメトリー解析

培養細胞をトリプシンで処理した後、細胞数を計数し、DMEMまたはMEM(10% FBS、1% PS)で 5×10^5 個/mLになるように懸濁し、1ウェルあたり 5×10^5 個ずつ播種した。その後、37°C、5% CO₂の条件下、細胞がフラスコに強く接着するまでインキュベートした。続いて、培養上清を除去した後、DMEMまたはMEM(FBS、PS不含)で希釈したSFNP溶液を加え、37°C、

5% CO₂の条件で3時間インキュベートした。その後、培養上清を除去し、PBSで3回洗浄した後、PBSを加えてセルスクレーパーで細胞剥離した。細胞懸濁液を回収した後、ピペッティングで細胞塊を分散させ、セルストレイナーで処理した後、フローサイトメトリー解析(Ex.488 nm、Em. 610 nm±15 nm)を行った。

3. 実験の結果と考察

細胞どうしの認識において、タンパク質-糖鎖相互作用や糖鎖-糖鎖相互作用は重要な相互作用であり、細胞の糖鎖結合性を精査することで、細胞の種類や成熟段階など、細胞の性状を評価することが可能である。本研究では、まずSFNPの調製を行い、合成したSFNPを用いてフローサイトメトリーによる細胞結合性評価を行った。また得られたデータを基に統計解析を行い、判別解析を行った。

3-1. CdTe/CdSコア／シェルQDをコアに持つSFNPの調製

定法に従ってCdTe/CdSコア／シェルQDに糖鎖の固定化を行った³。糖鎖成分には、8種類の糖鎖リガンド複合体を用いた(図2)。これらは、非還元末端の糖鎖構造に生体内の糖鎖構造に多く含まれる α -グルコース(α Glc、1)、N-アセチル- α -グルコサミン(α GlcNAc、2)、 α -マンノース(α Man、3)、 β -ガラクトース(β Gal、4)、N-アセチル- β -ガラクトサミン(β GalNAc、5)、 α -フコース(α Fuc、6)、 α 2-3シアリルガラクトース(SA α 2-3Gal、7)、 α 2-6シアリルガラクトース(SA α 2-6Gal、8)を有する。また陰性コントロールには、非糖鎖であり、両親媒性を有するテトラエチレングリコール鎖を持つTEG-mono 9を用いた。

まず、NaBH₄を超純水に溶解した後、10分間静置しNaBH₄水溶液を調製した。そして、調製したNaBH₄水溶液に糖鎖リガンド複合体水溶液を加え混合し、10分間静置することで還元処理した。続いて、別途合成したCdTe/CdSコア／シェルQDを添加し、室温で遮光下24時間攪拌した。その後、限外濾過により過剰の糖鎖リガンド複合体を除去し、PBSに分散させ、SFNP溶液を調製した。調製したSFNPは、非還元末端の糖鎖構造を用いて、 α Glc-SFNP(1を固定化)、 α GlcNAc-SFNP(2を固定化)、 α Man-SFNP(3を固定化)、 β

Gal-SFNP(4を固定化)、 β GalNAc-SFNP(5を固定化)、 α Fuc-SFNP(6を固定化)、SA α 2-3Gal-SFNP(7を固定化)、SA α 2-6Gal-SFNP(8を固定化)と表記する。

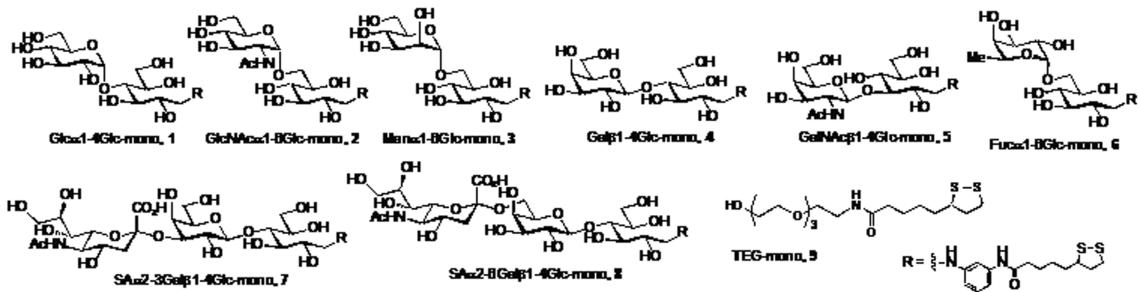


図2. SFNPの調製に使用したリガンド複合体

3-2. 細胞の糖鎖結合性の解析

細胞の糖鎖結合性を詳細に解析するために、調製した9種類のSFNPを用いて5種類の癌細胞の糖鎖結合性をフローサイトメトリーにて解析した。本実験では、癌細胞として、HeLa細胞(子宮頸癌細胞)、HuH-7細胞(肝臓癌細胞)、HepG2細胞(肝臓癌細胞)、VMRC-RCW細胞(腎臓癌細胞)、A431細胞(類上皮癌細胞)を用いた。まず、細胞をトリプシン処理し、フラスコから剥離後、遠心分離により細胞を回収した。続いて、細胞を培養液に再懸濁し、セルカルチャープレートに播種した。その後、37°C、5% CO₂の条件で適宜培養し、細胞を接着させた。この時、細胞がフラスコに強く接着するまでの時間が細胞ごとに異なるため、培養時間は適宜調整した。続いて、培地を除去後、SFNP溶液を添加し、37°C、5% CO₂の条件で3時間培養した。そして、PBSで洗浄し、セルスクレーパーで細胞を剥離後、細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて細胞の糖鎖結合性を解析した。また、本実験では継代数の異なる細胞のフローサイトメトリー解析を3回行った。結合性評価は、蛍光強度の中央値で比較し、SFNPを加えていない細胞の蛍光強度の1として数値化した。糖鎖結合性に基づく細胞プロファイルを図3に示す。フローサイトメトリー解析の結果、細胞へのSFNPの結合性は固定化した糖鎖構造に応じて異なる結合挙動を示すことが分かった。また、TEG-FNPにはほとんど結合性がなかったことから、SFNPは細胞の糖鎖受容体に結合することが分かった。また細胞種ごとに糖鎖結合性を比較したところ、HeLa細胞とVMRC-RCW細胞は類似した

糖鎖結合性パターンを持つが、その他の細胞は細胞種ごとに糖鎖の結合性パターンが異なることが分かった。

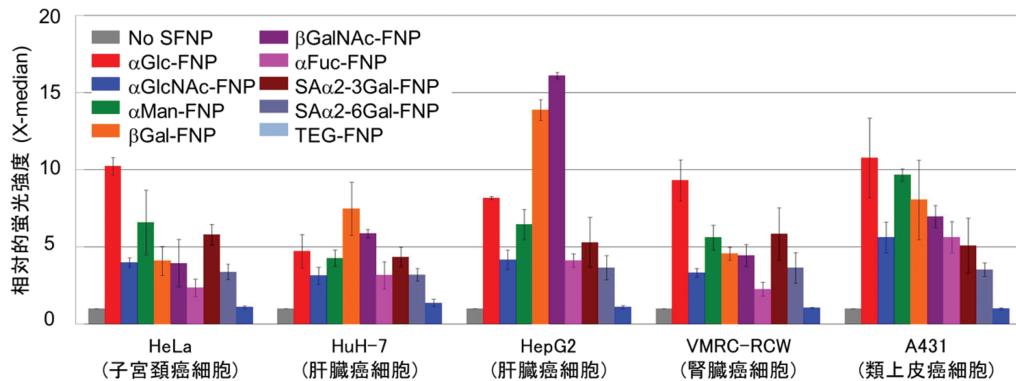


図3. 癌細胞の糖鎖結合性解析

続いて、細胞の癌化によって細胞の糖鎖結合性が変化するかを評価するために、同一組織の正常細胞と癌細胞の糖鎖結合性を解析した。細胞には、VMRC-RCW細胞(ヒト腎細胞癌細胞)、RPTEC細胞(ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞細胞)、A431細胞(ヒト皮膚類上皮癌細胞)、Hs68細胞(ヒト皮膚正常纖維芽細胞)を用いた。前述と同様の手法で細胞の糖鎖結合性をフローサイトメトリーにて解析した結果、同一組織の細胞でも、癌細胞と正常細胞では糖鎖の結合性パターンが異なることが分かった(図4)。

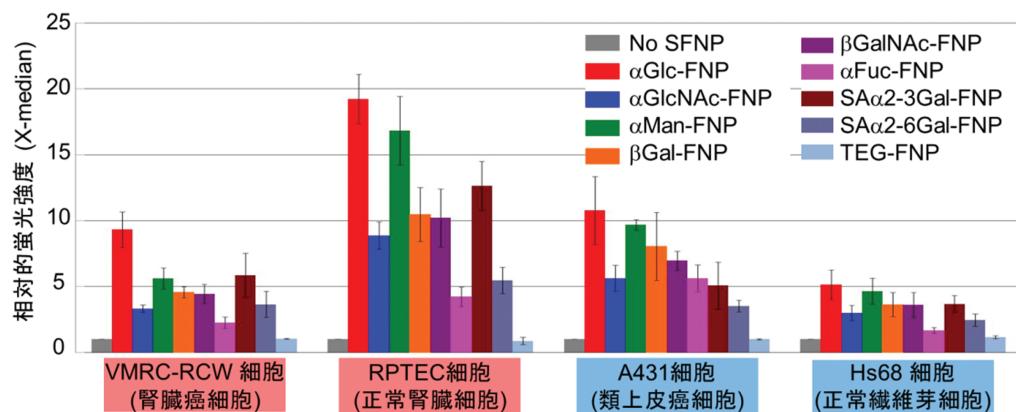


図4. 癌細胞と正常細胞の糖鎖結合性解析

3-3. クラスター解析による糖鎖結合性パターンの解析

細胞の糖鎖結合性パターンを解析することで細胞種を識別できるか評価するために、クラスター解析による詳細なパターニング解析を行った。クラスター解析には、IBM SPSS Statistics 21を使用し、Ward's法を用いて解析した。クラスター解析の結果、HeLa細胞とVMRC-RCW細胞は判別できなかったが、その他の細胞は糖鎖結合性パターンに応じて、細胞種を識別できることができた(図5)。また、クラスター解析の結果からも癌細胞と正常細胞は明確に識別できることができた。今回識別できなかったHeLa細胞とVMRC-RCW細胞は、糖鎖の結合性パターンが非常に類似しており、今回用いたSFCNPでは結合性パターンの差が見られなかった。したがって、QD上に固定化する糖鎖の種類をさらに多様化することで異なる結合性パターンが得られれば、これらの細胞の識別も可能になると考えられる。

以上の結果から、SFCNPを用いて、フローサイトメトリー解析により細胞の糖鎖結合性を解析し、詳細なパターニングを行うことで、細胞種の識別や癌細胞と正常細胞の識別をすることが可能だと考えられる。

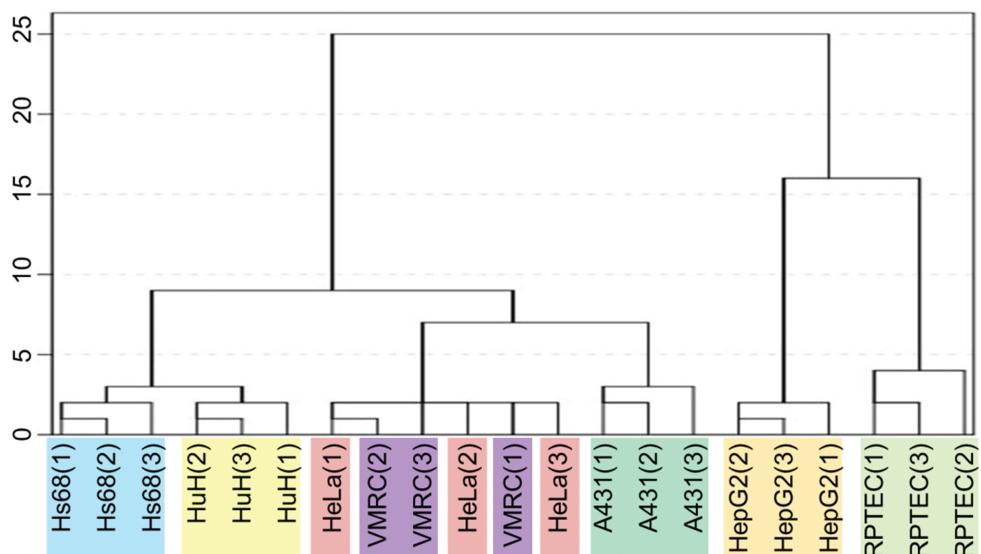


図5. 糖鎖結合性に基づく細胞のクラスター解析

3-4. 培養条件による糖鎖結合性の変化の解析

再生医療や医薬品生産における培養細胞の品質管理に応用するために、細胞をストレ

ス条件下で培養した場合、糖鎖結合性がどのように変化するかを解析した。細胞へのストレス刺激として細胞の増殖阻害がかかる過密度条件での培養を行った。細胞にはHeLa細胞を用い、70%コンフルエントで継代を行った場合と100%コンフルエントで継代を行った場合と比較した。フローサイトメトリー解析の結果、70%コンフルエントに達してから継代した細胞は、再現性のある糖鎖の結合性パターンを示したが、100%コンフルエントで継代した細胞では、糖鎖の結合性パターンに大きなバラつきが観測された(図6a)。一方、それぞれの細胞の形態を光学顕微鏡で観察したところ、形状に大きな違いは見られなかつた。またフローサイトメトリー解析においては、細胞の形状に関する情報が得られる前方散乱や側方散乱のプロットにもほとんど差がなかつた(図6b、c)。以上の結果から、培養条件で細胞の形状には大きな変化がないにもかかわらず、糖鎖の結合パターンは大きく変化することが分かつた。したがつて、細胞の糖鎖結合性を解析することによって、細胞の形状だけでは判断できない細胞状態の変化を追跡できることが分かつた。

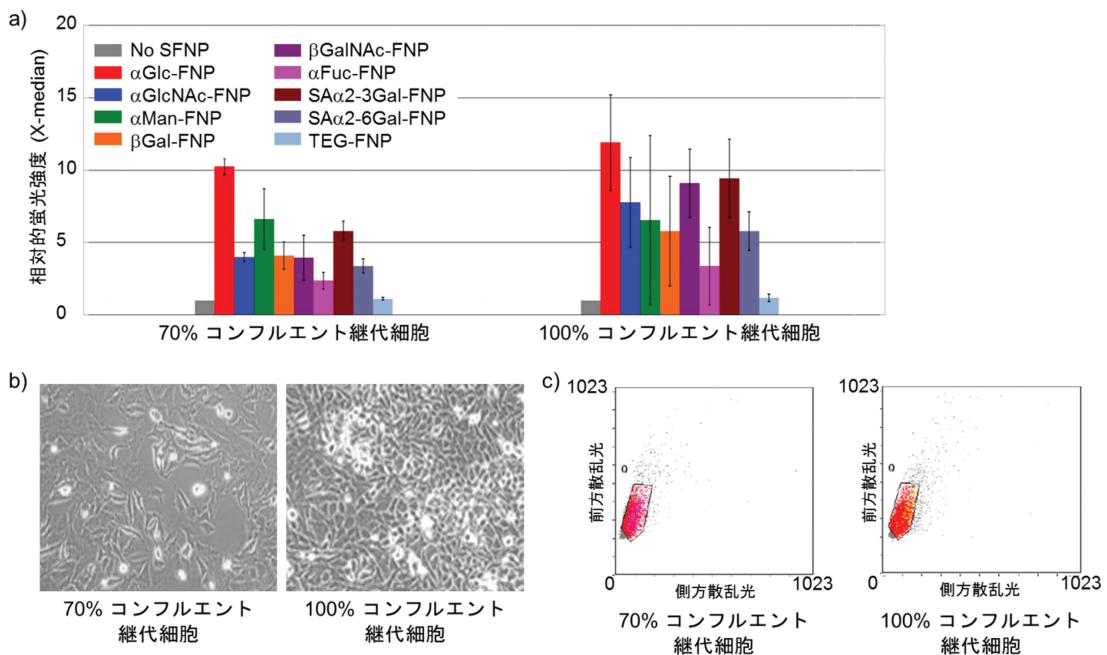


図6. 培養条件の違いによる糖鎖結合性の変化。細胞の糖鎖結合性解析(a)、細胞の形態変化(b)、細胞の前方散乱光および側方散乱光のプロット(c)。

4. 結論

本研究では、SFNPを用いて細胞の糖鎖結合性を詳細に解析し、糖鎖結合性に基づく細胞プロファイリングについて検討した。その結果、細胞は固定化した糖鎖構造ごとに異なる結合挙動を示し、糖鎖の結合パターンは細胞種ごとに異なることが分かった。また、同組織でも、癌細胞と正常細胞では糖鎖の結合パターンが異なることが分かった。得られた結果を用いて、糖鎖結合パターンに基づくクラスター解析を行ったところ、糖鎖の結合パターンによって細胞種を判別できることが分かった。さらに、ストレス条件下で細胞培養した場合に糖鎖結合性が変化するかを解析した結果、70%コンフルエンス培養細胞では、再現性のある糖鎖結合性を示したのに対し、増殖阻害がかかる過密度条件で培養を行った細胞では、糖鎖結合パターンに大きなバラつきが観測された。このことから、SFNPを用いて細胞の糖鎖結合性を解析することによって、細胞の状態を評価できることが示唆された。今後、iPS細胞やES細胞の品質管理や医薬品生産における培養細胞の品質管理などへ応用が期待される。

参考文献

- 1) Toyoda, M.; Yamazaki-Inoue, M.; Itakura, Y.; Kuno, A.; Ogawa, T.; Yamada, M.; Akutsu, H.; Takahashi, Y.; Kanzaki, S.; Narimatsu, H.; Hirabayashi, J.; Umezawa, A. *Genes to Cells* **2011**, *16*, 1–11.
- 2) El-Boubou, K.; Zhu, D.-C.; Vasileiou, C.; Borhan, B.; Prosperi, D.; Li, W.; Huang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4490–4499.
- 3) Shinchi, H.; Wakao, M.; Nakagawa, S.; Mochizuki, E.; Kuwabata, S.; Suda, Y. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2678–2682.