

pH 応答性トランジスタへの浮遊細胞捕捉による 補体活性のラベルフリー測定

Capturing of floating cells on pH sensor for evaluation of complement activity

2161005



研究代表者
(助成金受領者)

東京医科歯科大学
生体材料工学研究所

助 教 合 田 達 郎

[研究の目的]

ナノ材料の生体適合性評価においては個体レベルでの評価が必要である⁽¹⁾。一方、近年における動物愛護の観点から、Organ-on-a-chipなどの動物実験代替モデルの構築が求められている⁽²⁾。生体適合性の評価における重要な項目として、補体活性測定がある。補体系は約20種類の血中タンパク質からなる自然免疫の防御機構であり、活性化した補体分子が連鎖反応を繰り返して、異物や病原菌の細胞膜上に膜障害性複合体を形成することで破壊する(溶膜作用)。補体活性はアレルギー反応などその他の免疫反応を誘導することから、補体活性の測定はナノ材料の生体適合性評価において不可欠である。通常の補体活性測定法として溶血試験が挙げられるが、膜障害性複合体によって形成される微小孔は大きさが一定でなく、ナノ材料による補体活性は低い場合も想定されるため、検出法の高感度化が求められる。これまでの研究で、申請者らは、半導体型 pH センサである Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET) と細胞を融合した細胞微小環境 pH 測定系を確立した。この測定系は、細胞膜のバリア性をリアルタイムかつ高感度に評価できる新しい方法である。本研究では、この系を非接着性の浮遊細胞に拡張することで、新規補体活性評価法の開発を目指した(図1)。まず、補体活性評価に用いる浮遊細胞

を ISFET 表面に捕捉する機能性有機界面を構築した。次に、浮遊細胞を捕捉した ISFET を用いて、外部刺激に対する浮遊細胞膜近傍のイオン微小環境変化を測定した。

[研究の内容, 成果]

1. 浮遊細胞捕捉界面の構築

機能性有機界面の構築のために、ホスホン酸誘導体にオレイル基を導入した分子 (Oleyl-acetamide triethylglycol hexylphosphonic acid: OEP) (図1) を合成した。片末端のホスホン酸は金属酸化物に対して強固に結合することで安定な単分子膜を構築し⁽³⁾、もう片末端のオレイル基は、細胞膜のリン脂質内に埋入することにより、浮遊細胞を非侵襲に捕捉する⁽⁴⁾。また、スペーサー分子として、トリエチレングリコール基を導入した。ISFET 表面は酸化タンタルで構築されているため、OEP による金属酸化物表面の化学修飾が可能である。そこで、まず、*n*-ヘキサン/2-プロパノール混合溶液に溶解した OEP の前駆体 Carboxyl triethylglycol hexylphosphonic acid (CEP) を室温で48時間反応させた。次に、ISFET 表面を2-プロパノールで洗浄したのち、120℃で一晩脱水縮合させることにより、ISFET 表面に CEP 単分子膜を導入した。そして、4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride

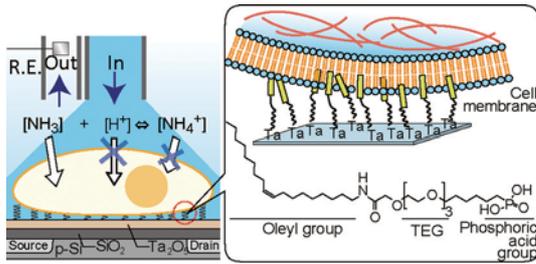


図1 浮遊細胞捕捉用界面を有する ISFET 測定系

(DMT-MM)を触媒として用い、メタノールに溶解したオレイルアミン (Oleylamine: OA) と CEP のカルボキシル末端を 50°C で 4 時間縮合反応させ、ISFET 表面に OEP 単分子膜を作製した (図1)。

2. 細胞微小環境 pH 測定系

我々のグループで開発した ISFET/細胞測定系 (図1) を用いて、浮遊細胞膜近傍の pH 計測を行った。ドレイン-ソース間の電流を 0.5 mA、電圧を 0.5-1.0 V に調節し、参照電極として Ag/AgCl ペレット電極を用いた。ISFET/細胞測定系の時間分解能は 0.2 秒、電位分解能は 0.01 mV であり、 ΔpH では 2.7×10^{-4} の変化が測定できる。ISFET のゲート部分 ($10 \mu\text{m} \times 340 \mu\text{m}$) の周辺に、内径 5 mm の円筒ガラスを熱硬化性エポキシ樹脂で固定することで、ゲート電極に浮遊細胞を培養した。

ISFET 表面に OEP を導入することで、浮遊細胞周辺の pH 変化の測定を可能とした。浮遊細胞には、血球系培養細胞である Jurkat T 細胞を用いた。細胞懸濁液を ISFET 表面に曝し、室温で 30 分間培養することで、ISFET 表面への浮遊細胞の捕捉を行った (図2)。この ISFET/細胞測定系は 37°C、Jurkat T 細胞存在下において、pH 6.0-8.5 の範囲で -37.2 ± 2.7 mV/pH の電位応答を示した。ISFET は細胞非存在下においては、理想的なネルンスト応答を示すことから、電位応答の傾きの低下は、細胞膜近傍のイオン微小環境測定に起因すると考えられる。細胞の洗浄および電位の安定化には、BTP buffer (1 mM Bis-tris propane (BTP),

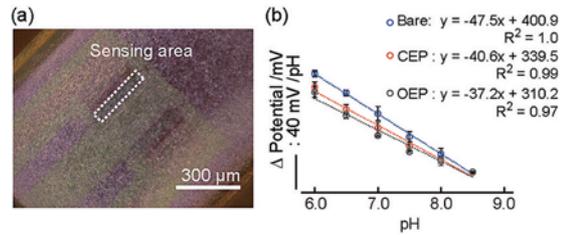
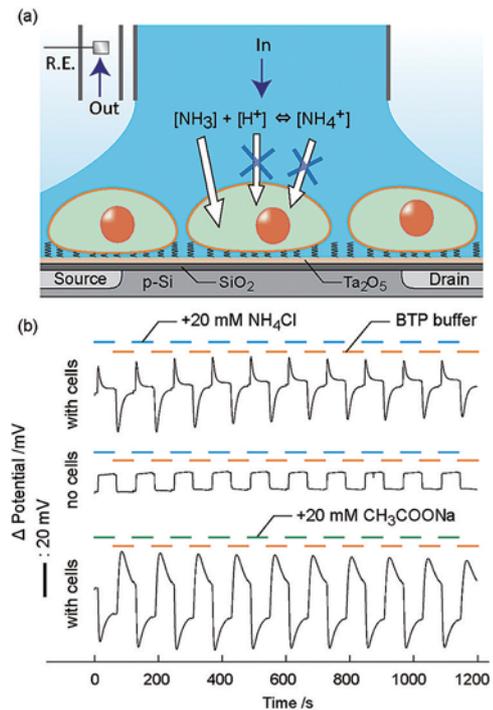


図2 (a) Jurkat T 細胞捕捉時の顕微鏡像。(b) 電位計測法による溶液 pH 変化時の細胞膜近傍 pH 微小環境変化。

図3 (a) NH_4Cl buffer 添加時の NH_3 選択的細胞膜透過による pH 変動。(b) 溶液交換による細胞膜近傍 pH 変化。

140 mM 塩化ナトリウム、4 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、20 mM スクロース；pH 7.4) を用いた。BTP buffer は緩衝領域が pH 6.0-9.5 と広く、生理学の研究において広く用いられている。本研究では ISFET/細胞測定系を用いて、細胞膜のイオンバリア性に起因する細胞周辺微小環境 pH の変化を観察した。BTP buffer と NH_4Cl buffer の二つの溶液を細胞周辺において溶液交換を行うことで、細胞周辺での一時的な pH の変動を誘導できる (図3)。細胞周辺の溶液を NH_4Cl buffer に交換すると、電位は瞬時に +19 mV 変化し、その後 1 分以内に緩衝液 (pH 7.2) の電位に収束した。

次に、NH₄Cl buffer から BTP buffer に溶液を交換すると、電位は -23 mV 変化し、その後 BTP buffer (pH 7.4) の電位に収束した。溶液交換時の特徴的なピークは 10 回の溶液交換を行っても形や大きさに変化はなく、相対標準偏差は NH₄Cl buffer 添加時のピークで 6.9% (1.3 mV/19 mV)、BTP buffer 添加時のピークで 8.2% (1.9 mV/23 mV) であり、再現性の高いことが分かった (n=10)。これらの結果から NH₄Cl の曝露、及び BTP buffer と NH₄Cl buffer の溶液交換によっては細胞膜のイオンバリア性を損なわないことが明らかとなった。さらに、この特徴的な電位変動は ISFET 表面に浮遊細胞が存在する場合にのみ観察された。また、NH₄Cl の代わりに CH₃COONa を細胞に作用させた場合は、溶液交換に際する電位応答の方向が反転することがわかった。

この特徴的な pH 変化は、NH₃ の細胞膜透過によるものである⁽⁵⁾。NH₄Cl buffer 中において、NH₃+H⁺↔NH₄⁺ という平衡状態が成り立っている ($K_a = [\text{NH}_3][\text{H}^+]/[\text{NH}_4^+] = 13.05 \times 10^{-7} \text{ mM} (37^\circ\text{C})$)。まず NH₄Cl を加えた瞬間、NH₃ のみ溶液中から細胞膜を透過し細胞質へ受動拡散する。その結果、細胞外では NH₃ の平衡状態が崩れるため、H⁺ 濃度が上昇する。細胞内へ NH₃ が充てんされると、細胞内外で NH₃ が平衡状態になるため、細胞外では溶液の pH に収束する。次に、BTP buffer に溶液交換をすると、細胞内に充てんされた NH₃ が細胞外へ拡散し、再度 NH₃ の平衡状態が崩れるため、H⁺ 濃度が一時的に減少する。細胞外への NH₃ の拡散が終了すると、再び溶液の pH に安定する。以上、BTP buffer と NH₄Cl buffer の溶液交換によって、過渡的な pH 変化を誘導できる。CH₃COONa buffer と溶液交換した場合、細胞膜を透過できる分子は CH₃COOH であるため、NH₄Cl とは逆に溶液交換に伴い H⁺ は消費される (CH₃COOH↔CH₃COO⁻+H⁺)。したがって、溶液交換に伴う電位応答の変化は平衡反応と細胞膜の半透膜性から説明でき、膜電位変化は関

与しない。つまり、pH 変動は細胞膜のイオンバリア性の評価がおこなえる。

3. ISFET/細胞測定系による細胞膜障害性評価

細胞膜障害性を引き起こすモデル実験には Triton X-100 (TX-100) を用いた。TX-100 は細胞膜溶解を引き起こす非イオン性の界面活性剤であり、膜タンパク質の抽出や免疫染色などに広く用いられている。BTP buffer と NH₄Cl buffer の溶液交換を行ったのち、BTP buffer に TX-100 を加えた Sample buffer (pH 7.4) に交換することで、TX-100 を細胞に作用させた。その結果、TX-100 を細胞に曝露すると、溶液交換時の電位変化量が減少し、TX-100 の曝露回数を増やすにつれて電位変化量がさらに減少した (図 4)。これは TX-100 の作用によって細胞膜イオンバリア性が損なわれたことに起因する。つまり、膜障害によって NH₃ と NH₄⁺ の双方が細胞膜を透過するため、細胞外において、アンモニア平衡の乱れが小さくなり、細胞膜近傍の pH 変化が小さくなったと解釈できる。

そこで、電位変化のピーク強度の変化率 $[(\Delta V_0 - \Delta V_1) / \Delta V_0]$ を指標とし、膜障害性を測定した。値が大きくなるほど膜障害性が強いことを示している。比較として、従来法の細胞膜障害性試験である赤血球溶血試験を TX-100 に対しておこなった。赤血球溶血試験と ISFET/細胞測定系の結果とを比較したところ、相関係数 $r=0.69$ と相関性が示された。注目すべきことに、赤血球溶血試験ではほとんど違いの識別できない領域においても ISFET/細胞測定系で

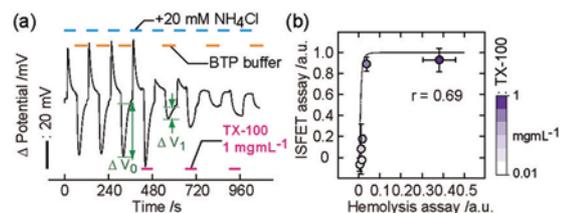


図 4 (a) TX-100 曝露による pH 変動の減少。(b) TX-100 曝露に対する Jurkat T 細胞 / ISFET アッセイと赤血球溶血アッセイとの相関プロット。

は識別可能であることが分かった。これは、それぞれの測定法の指標であるヘモグロビンの流体力学半径 (≥ 3.1 nm) と、アンモニウムイオンの水和半径 (≤ 0.33 nm) に起因する感度の違いであると考えられる^{(6), (7)}。また、溶血試験は2時間かかるのに対し、ISFET/細胞測定系は20分間でおこなえることから、アッセイの大幅な時間短縮が可能である。

[今後の研究の方向, 課題]

浮遊細胞固定を可能にする機能性分子の開発によって、アンモニア溶液交換にともなう浮遊細胞近傍のpH微小環境を計測することに成功した。ISFETによる浮遊細胞膜イオン漏出測定法は、従来法である赤血球溶血試験に比べて高感度であることから、今後、ナノマテリアルの補体活性評価に応用できると考えられる。

[参考文献]

- (1) Clinton F. Jones, David W. Grainger, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61, 438-456, (2009)
- (2) Neuzil P, Giselbrecht S, Lange K, Huang T, Manz A, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 11, 620-632, (2012)
- (3) Textor M, Ruiz L, Hofer R, Rossi A, Feldman K, Hahner G, Spencer N, *Langmuir.*, 16, 3257-3271, (2000)
- (4) Kato K, Umezawa K, Funeriu D, Miyake M, Miyake J, Nagamune T, *Biotechniques.*, 35, 1014-1021, (2003)
- (5) Schaffhauser D, Fine M, Tabata M, Goda T, Miyahara Y, *Biosensors.*, 6, 11, (2016)
- (6) Winzor DJ, Wills PR, *Biophys Chem.*, 104, 345-

359, (2003)

- (7) Nightingale ER, *J. Phys. Chem.*, 63, 1381-1387, (1959)

[成果の発表, 論文等]

〈学会発表〉

- [1] Imaizumi Y, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Non-destructive analysis of cell membrane injury using proton-sensitive field-effect transistor, Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology 2016 (APCOT 2016), Kanazawa, Japan, June 26-29, 2016
- [2] Imaizumi Y, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Non-destructive analysis of ion barrier property of cell membrane using pH-sensitive transistor, International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Japan, November 10-11, 2016
- [3] 合田達郎, 今泉祐輝, 松元亮, 宮原裕二, pH応答トランジスタを用いた細胞膜透過性高分子による膜障害性測定, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016, 福岡国際会議場, 2016年11月21-22日
- [4] Goda T, Imaizumi Y, Hatano H, Matsumoto A, Miyahara Y, Sensing cell barrier functions by proton dynamics, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo, Tokyo, Japan, November 28-30, 2016

〈論文〉

- [1] Yuki Imaizumi, Tatsuro Goda, Yutaro Toya, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara: Oleyl Group-functionalized Insulating Gate Transistors for Measuring Extracellular pH of Floating Cells, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 17, 337-345, (2016)
- [2] Yuki Imaizumi, Tatsuro Goda, Daniel F. Schaffhauser, Jun-ichi Okada, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara: Proton-Sensing Transistor Systems for Detecting Ion Leakage from Plasma Membranes under Chemical Stimuli, *Acta Biomater.*, 50, 502-509, (2017)