

非接触濡れ性評価システムを活用した 物理化学的バイオマーカーの創成

Physico-chemical biomarkers based on a non-contact wettability assessment system

○正 田中 信行 (理研) 高原 順子 (理研)
栗津 茜 (理研) 那須 博光 (北川鉄工所)
春園 嘉英 (北川鉄工所) 田中 陽 (理研)

Nobuyuki TANAKA, RIKEN, nobuyuki.tanaka@riken.jp
Junko TAKAHARA, RIKEN
Akane AWAZU, RIKEN
Hiromitsu NASU, Kitagawa Iron Works
Yoshihide HARUZONO, Kitagawa Iron Works
Yo TANAKA, RIKEN

This study proposed a concept for evaluating biological functions by its physico-chemical properties such as surface wettability. To realize the concept, we have to prepare two elements; (1) systems for assessing the physico-chemical properties of biological objects and (2) a database connecting physico-chemical properties to biological functions. In this study, non-contact wettability assessment system was used as an apparatus for assessing surface wettability, one of the most common physico-chemical properties. Because this system can eliminate a physical contact between a probe and an object, there is an advantage on contamination reduction. Furthermore, in-liquid evaluation is feasible by the system. Therefore, this study aimed to the evaluation of cellular functions via the surface wettability on the cultivated cellular tissues.

Key Words: Surface wettability, Biological behavior, Biomarkers, Physico-chemical properties, Biological functions

1. 緒言

近年、培養細胞などを使って、機能不全に陥った組織や臓器の機能回復を図る再生医療が注目を集めている。培養細胞が対象の組織や臓器と同等の機能を持っているかを評価するには、機能を担う遺伝子やタンパク質などのターゲットとなる物質を細胞から検出し、対象の基準と照らし合わせる必要がある。このような培養細胞の機能評価は多くの場合、細胞内部の物質を得るために細胞を壊したり、特殊な試薬を反応させたりする必要があることから、細胞に対して破壊的であった。これに対して近年、非破壊的に細胞の機能の評価する手法が提案されている。本研究では、機能性の異なる細胞がその表面に異なる物質を有していることに着目し、物理化学的指標のバイオマーカー利用を提案する。

細胞の表面は、脂質二重層でできた細胞膜に対して膜タンパク質や糖鎖が結合した構造を有している。これらの膜タンパク質や糖鎖は、細胞の種類ごとに変化に富み、固有の細胞を識別する物質的バイオマーカーとしても用いられている。これらの物質は、ほかの物質との結合のしやすさといった物理化学的性質がそれぞれ異なり、物性の違いとして表出される。特に生体を構成する分子の中で最も大きな割合を示す水との親和性は親水性と呼ばれ、例えば、糖鎖を構成する糖は親水性官能基が多数存在するため親水性が高く、逆に脂質は親水性官能基がほとんどないため親水性が低い。本研究では、物理化学的指標として物質の液体に対するなじみややすさを示す濡れ性を、著者らが考案した非接触濡れ性評価システム [1,2] を利用して定量化し、Fig. 1 に示すように、培養細胞の機能性との関連について調査する。

2. 実験

多細胞生物は、一般的に機能の異なる複数種類の細胞集団で

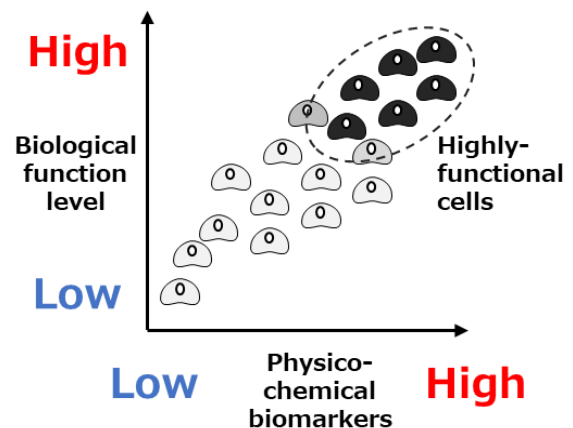


Fig. 1. A hypothesis on the relationship between biological function level and physico-chemical biomarkers. The concept of this study is to evaluate the biological function level via the physico-chemical biomarkers based on this relationship.

構成される。本研究では、複数種類の細胞を個別に培養し、それぞれの培養細胞の濡れ性を非接触濡れ性評価システムで定量化することによって、濡れ性の違いの有無を確認した。本研究で使用した細胞の一覧を Table 1 に示す。非接触濡れ性評価システムについては、既報のものを利用している。各細胞を培養皿でコンフルエント状態まで培養したのち、液体培地で覆われた表面に対して、空気噴流を印加し、液体培地の挙動を観察した。既報において、空気噴流印加時の液体除去直径および空気噴流遮断後から液体が再び表面を覆うまでの時間である液体回復時間と、一般的に用いられている濡れ性評価指標である接触角との相関性がそれぞれ示されている。これによれば、濡れ性が高い表面においては、液体除去

直径は小さく、また液体回復時間は短くなる。このため、各細胞に対して非接触濡れ性評価システムから得られたデータから液体除去直径と液体回復時間をそれぞれ測定した。

Table 1 Cell types

Name	Cell types	Item #
FRSK	Fetal rat skin keratinocyte cell line.	JCRB0005
HeLa	Human cervical carcinoma cell line	JCRB9004
HH	Bovine carotid artery normal endothelial cell	JCRB0099
ST2	Mouse bone marrow stroma cell line	RCB0224
ATDC5	Mouse teratocarcinoma cell line	EC99072806
C2C12	Mouse skeletal myoblast cell line	RCB0987

Sources: JCRB; Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, RCB; RIKEN Cell Bank, and EC; DS Pharma Biomedical Co., Ltd.

3. 結果と考察

各細胞に対して測定した液体除去直径と液体回復時間を Fig. 2 に示す。Fig. 2(a) に示すように、液体除去直径は 6~7 mm の狭い範囲に分布している。一方、Fig. 2(b) に示すように液体回復時間は、0 秒以下から 10 数秒の広い範囲に分布している。また、Fig. 2(c) に示すように液体除去直径と比べて、液体回復時間は、各細胞におけるデータの標準偏差が小さく、細胞の種類によっては、液体回復時間を用いて種別ごとに完全に分離できる可能性が示唆されている。最も液体回復時間が長い FRSK 細胞は表皮由来の細胞であり、表皮は外界から生体を保護する機能を有し、よく水を弾くことから関連が示唆される。一方、比較的濡れ性が高い C2C12 細胞は、隣接する細胞と融合し筋管細胞に分化する能力を有し、このような細胞間接着のための糖タンパク質などが高い濡れ性につながった可能性が考えられる。

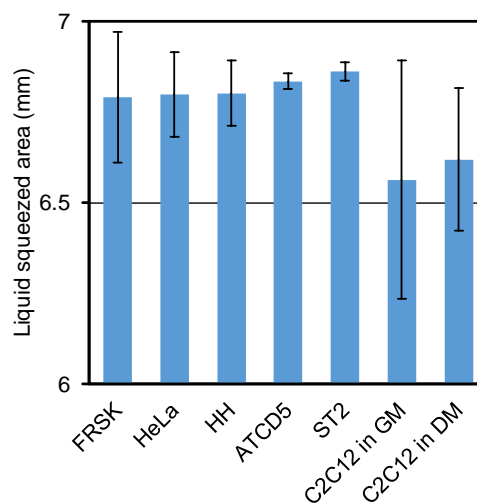
4. 結言

本研究では、細胞機能評価を目的として表面濡れ性などの物理化学的指標のバイオマーカーとしての利用を提案した。非接触濡れ性評価システムを用いて得られた表面濡れ性指標を基準として、機能性の異なる細胞を分離できる可能性を示した。

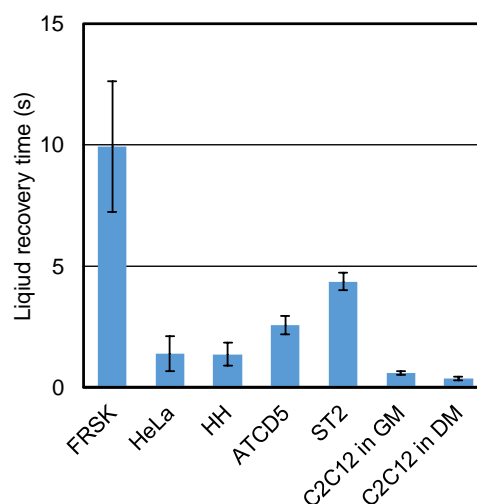
なお、本研究は科学技術振興機構 (JST) 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) (課題名: 「バイオ界面の非接触濡れ性評価システム」) および地域産学バリュープログラム (課題名: 超親水・超撥水性材料の定量的濡れ性評価) の支援を受け、株式会社北川鉄工所と共同で行われたものである。株式会社北川鉄工所からは非接触濡れ性評価システムの試作機の貸与を受けた。

参考文献

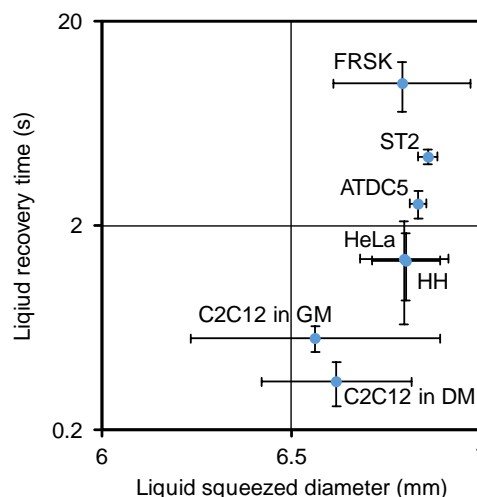
- [1] Tanaka N., Kondo M., Uchida R., Kaneko M., Sugiyama H., Yamato M., Okano T., "Splitting culture medium by air-jet and rewetting for the assessment of the wettability of cultured epithelial cell surfaces," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 9082-9088, 2013.
- [2] Tanaka N., Haruzono Y., Nasu H., Nakanishi Y., Takahara J., Awazu A., Tanaka Y., "Contamination-free non-contact wettability assessment system," *ROBOMECH Journal*, vol. 4, DOI: 10.1186/s40648-017-0089-z, 2017.



(a) Liquid squeezed area (n=2)



(b) Liquid recovery time (n=3)



(c) Scatter diagram of liquid recovery time and liquid squeezed diameter

Fig. 2. Results of non-contact wettability assessment for various types of cells. GM: growth medium. DM: differentiation medium. Bars or data points: mean values. Error bars: standard deviations.