

藤井輝夫

東京大学生産技術研究所マイクロメカトロニクス国際研究センター 教授

マイクロ・ナノ統合アプローチによる細胞・組織 Showcase の構築

§1. 研究実施の概要

平成 22 年度は、細胞・組織 Showcasing を実現するための基盤となるマイクロ流体デバイスの設計と操作法の検討、ペプチド・アプタマーの創製、および分化可視化 ES 細胞の樹立を本格的に開始した。それぞれのサブグループにおいて、順調に作業が進んでおり、本研究課題としての成果が出始めている。マイクロ流体デバイスに関しては、流路内部において接着状態の ES 細胞ならびに iPS 細胞の分化誘導を局所的に行う方法を確立し、分化動態に関する新しい現象を見出した。ペプチド・アプタマーの創製については、循環がん細胞(CTC)の特異的細胞外マーカーである EpCAM 分子を標的とした高親和性の結合分子を創製することに成功した。また、ES 細胞の樹立に関しては、心筋細胞への分化を可視化する細胞株の樹立を行い、デバイス内での実験に使用するまでに至っている。今後はペプチド・アプタマーの創製ならびに ES 細胞の樹立を進めるのに並行して、これらをマイクロ流体デバイスの実験系に導入する研究により一層注力し、細胞・組織 Showcase の構築を進める予定である。

§2. 研究実施体制

(1)「藤井」グループ

① 研究分担グループ長:藤井 輝夫 (東京大学生産技術研究所、教授)

② 研究項目

- 人工バイオ界面のデバイスへの導入
 - ・デバイス及び膜材料への固相化法の開発(藤井G&芝G)
- デバイス内微小環境制御法の確立
 - ・液性条件制御法の確立(藤井G)
 - ・接着条件制御法の確立(藤井 G&芝 G)
- 希少細胞捕捉デバイスの開発

- ・捕捉デバイスの設計・製作(藤井G)
- ・捕捉デバイスの評価・改良(藤井G&芝 G)
- がん転移 **Showcase** の構築
 - ・血管内皮モデル系の構築(藤井G)
- 分化誘導 **Showcase** の構築
 - ・液性条件制御による分化誘導 **Showcase**(藤井G&阿久津G)
- マイクロ流体診断デバイスの開発
 - ・システムの構築とデバイス設計・製作(藤井G&宮原G)

(2)「芝」グループ

- ① 研究分担グループ長:芝 清隆 (財団法人癌研究会癌研究所、部長)
- ② 研究項目
 - 人工バイオ界面のデバイスへの導入
 - ・腫瘍細胞結合ペプチドの創製(芝G)
 - ・幹細胞結合ペプチドの創製(芝G)
 - ・デバイス及び膜材料への固相化法の開発(藤井G&芝G)
 - デバイス内微小環境制御法の確立
 - ・接着条件制御法の確立(藤井G&芝G)
 - 希少細胞捕捉デバイスの開発
 - ・捕捉デバイスの評価・改良(藤井G&芝G)

(3)「阿久津」グループ

- ① 研究分担グループ長:阿久津英憲 (国立成育医療研究センター研究所、室長)
- ② 研究項目
 - 分化可視化 **ES/iPS** 細胞の樹立
 - ・分化可視化 **ES/iPS** 細胞の樹立(阿久津G)
 - ・分化可視化 **ES/iPS** 細胞の機能評価(阿久津G)
 - 分化誘導 **Showcase** の構築
 - ・液性条件制御による分化誘導 **Showcase**(藤井G&阿久津G)

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

○人工バイオ界面のデバイスへの導入

・腫瘍細胞結合ペプチドの創製(芝G)

循環がん細胞(CTC、血流を微量に流れるがん細胞)の特異的マーカーとしてEpCAM分子に結合能力を有する人工ペプチドの創製を進めている。本プロジェクトが開始される段階で、既に創製されていた「Ep301」に比べ、いずれもEpCAMに対して1桁以上の結合能力を有する第2世代の「Ep133」ならびに第3世代の「Ep114」を取得することに成功した。また、個別がん種の診断も視野に入れ、IGF-1RやFzd10などのEpCAM以外のマーカーに対する結合ペプチドの取得も開始している。

・幹細胞結合ペプチドの創製(芝G)

腫瘍細胞のマーカーでもあるIGF-1Rに対する結合ペプチドが、幹細胞の増殖にも影響を及ぼす可能性があるため、これを観察するための実験系のデザインを進めている。

・デバイス及び膜材料への固相化法の開発(藤井G&芝G)

界面に固定化したペプチドの評価では、これまで末端官能基をもつSAM膜の上に結合ペプチドを共有結合的に固相化する方法が採られているが、SAM膜が存在しなくとも金表面への物理的吸着のみで、ある程度のバイオ界面の活性を発揮しうることを示唆する予想外の結果が得られた。この点をより深く掘り下げるために、観察される現象のペプチド依存性、また、洗浄に対するロバストネスを調べている。同時に、当初の予定通り、官能基を出したPCやPET上にペプチドを固相化させるために、微量水晶天秤のセンサー上に、PCやPETの薄膜を形成する実験の準備を進めている。一方、デバイスの材料として用いることが想定されるPDMS(polydimethylsiloxane)もしくはガラス上にペプチドを固相化する方法として、シランカップリング剤を用いた化学結合による方法を検討し、PDMS上に固相化可能であることを確認した。

○分化可視化ES/iPS細胞の樹立及び機能評価(阿久津G)

分化誘導過程を可視化するためには、各種臓器細胞に対応する分化マーカーの発現を蛍光検出できるような分化可視化幹細胞の樹立を進めている。今年度は、心筋細胞分化マーカーである α 型ミオシン重鎖(α -MHC)遺伝子プロモーター制御のEGFP発現ベクターを作成し、C57BL/6Jx129/svのF1胚より樹立したES細胞(NCH1.5)へ導入後、サブクローン化することで、心筋

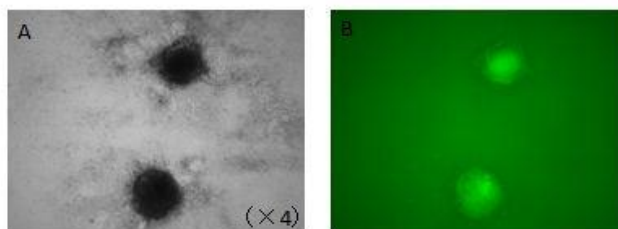


図1 心筋細胞分化可視化マーカー制御の観察
 α -MHC EGFP-ES細胞から胚様体形成による心筋分化誘導により効率よく分化可能で、EGFPも拍動細胞特異的に発現している。

細胞分化可視化 ES 細胞を樹立し、心筋細胞分化を解析するとともにその分化可視化の制御性を解析した。樹立した α -MHC EGFP-ES 細胞から懸滴培養法にて分化体である胚様体を作成し、心筋細胞への分化動態を解析した結果、心筋様拍動した細胞は EGFP の発現が認められた(図1)。 α -MHC EGFP-ES 細胞は安定的に未分化維持可能でもあり、in vitro での心筋細胞分化誘導により心筋細胞へ分化可能で EGFP の発現が認められ実際に心筋細胞分化が可視化可能であった。藤井グループへ α -MHC EGFP-ES 細胞を提供し、マイクロ流体デバイスを用いた分化動態解析へ応用している。

○がん転移 Showcase の構築

・血管内皮モデル系の構築(藤井G)

がん転移は専ら組織内毛細血管に起こることから、灌流可能な毛細血管モデルの作成をまず目標とした。最近のマイクロ流体デバイスを用いた血管新生に関する2つの研究成果、①培養液の灌流刺激が血管内皮細胞のゲル内への angiogenesis を誘導すること、②溝状のマイクロ空間にゲルと HUVEC を播種すると管腔構造を形成すること(vasculogenesis)、に基づき、マクロ流路と溝状の長いマイクロ空間を持つ灌流型のマイクロリアクターを作成し、血管内皮細胞を培養した。その結果、5-7 日の静置培養で、溝の全長2ミリにわたる連続管腔構造が形成された。また、内皮細胞のみからなる構造は不安定であったが、周皮細胞を共存させることにより、その培養系での安定性を著しく長期にすることができた。

この成果を基に、現在マクロからミクロスケールの連続的な血管網モデル形成が可能か否か検討している。さらに、平板流路型のマイクロ流体デバイスへの利用を念頭に置き、敢えて血管内皮細胞の管腔構造の形成を抑制し、安定な単層形成・維持のための条件を検討したところ、やはり周皮細胞を下層に配置することが極めて重要であることが明らかとなった。次年度はこの培養条件を基に、マイクロ流体デバイスを設計・製作する。

○分化誘導 Showcase の構築

・液性条件制御による分化誘導 Showcase(藤井G&阿久津G)

前年度に考案した二層流路による液性条件制御法について、複数のパターンで繰り返し実験を行い、その再現性を確かめた(図2)。また、細胞による DAPI の取り込みを測定することにより、デバイス内部に細胞が播種された状態で、液性因子が細胞に対してどのように作用するのかを明らかにした。さらに分化誘導刺激を一定時間のみ局所的に与える実験を行い、分化の動的な挙動を捉えることができた。一方、胚様体に対して液性条件制御を行うための新しいデバイスを設計・製作し、その分化動態を時空間的に制御する方法

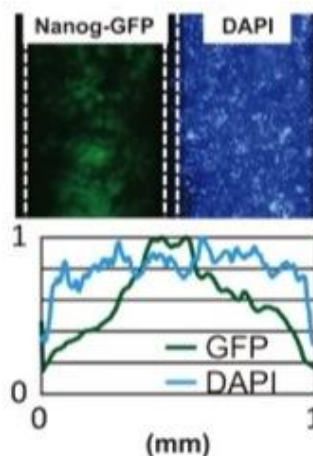


図2. マウス iPS 細胞分化制御
Nanog-GFP の蛍光測定により、細胞の分化・未分化状態を観察した結果、分化促進因子の濃度が高い流路壁近傍で、細胞の分化が認められ、分化抑制因子の濃度が高い流路中央部で未分化状態が維持されていることを確認した。

について検討を開始した。

○マイクロ流体診断デバイスの開発

(藤井G&宮原G)

同一領域内の宮原チームとの共同研究として、藤井チームが有するマイクロ流体デバイス技術と宮原グループが進めている「バイオトランジスタ」による生体分子検出技術とを組み合わせ、新しい診断プラットフォームの開発を開始した。本年度は、図3に示すようなマイクロ流体デバイス部分と計測用セットアップを構築し、サンプル溶液を流すことによって得られるバイオトランジスタの応答について基礎的な検討を行った。

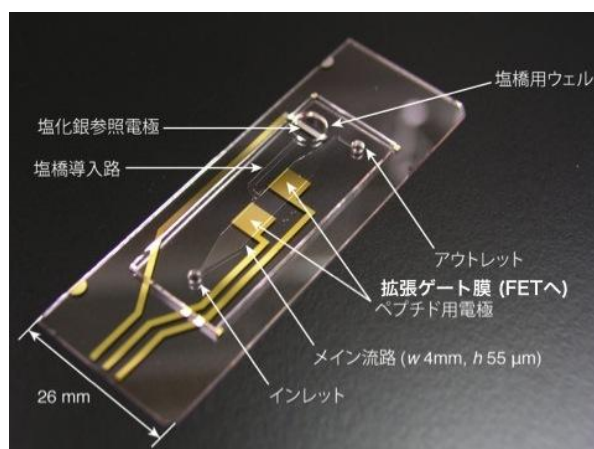


図3. マイクロ流体診断デバイス。

バイオトランジスタの拡張ゲート電極上にマイクロ流路を配置し、電極上に各種分子を固相化することによって、ターゲットを捕捉・検出する。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Chowdhury, M.M., Katsuda, T., Montagne, K., Kimura, H., Kojima, N., Akutsu, H., Ochiya, T., Fujii, T., and Sakai, Y., “Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor”, *Biomed. Microdev.*, Vol. 12, No.6, pp.1097-1105, 2010 (DOI: 10.1007/s10544-010-9464-8).
2. Sasaki, N., Hirano, T., Kobayashi, K., Toyoda, M., Miyakawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Akutsu, H., Umezawa, A., and Nishihara, S., “Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.401, No.3, pp. 480-486, 2010 (DOI:10.1016/j.bbrc.2010.09.085).
3. Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Makino, H., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Takahashi, Y., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Akutsu, H., and Umezawa, A., “Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts”, *PLoS One*, Vol.5, No.9, pp.e13017, 2010 (DOI:10.1371/journal.pone.0013017).
4. Adachi, T., Wang, X., Murata, T., Obara, M., Akutsu, H., Machida, M., Umezawa, A., and Tomita, M., “Production of a non-triple helical collagen alpha chain in

transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture”, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.106, No. 6, pp.860-870,2010 (DOI: 10.1002/bit.22752).

5. Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K., “Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells”, *Nature*, Vol.465, No.7295, pp. 175-181, 2010 (DOI: 10.1038/nature09017).
6. Yamada, M., Hamatani, T., Akutsu, H., Chikazawa, N., Kuji, N., Yoshimura, Y., and Umezawa, A., “Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development”, *Hum. Mol. Genet.*, Vol.19, No.3, pp.480-493,2010 (DOI: 10.1093/hmg/ddp512)
7. Ken-Ichi Sano, Tamiko Minamisawa and Kiyotaka Shiba, “Autonomous Silica Encapsulation and Sustained Release of Anticancer Protein”, *Langmuir* vol. 26, No.4, pp. 2231-2234, 2010 (DOI: 10.1021/la9045226)
8. Toru Tsuji, Yuya Oaki, Masao Yoshinari, Takashi Kato and Kiyotaka Shiba, “Motif-programmed Artificial Proteins Mediated Nucleation of Octacalcium Phosphate on the Titanium Substrates”, *Chemical Communications*, vol. 46, No.36, pp. 6675-6677, 2010 (DOI: 10.1039/C0CC01512A, Communication)
9. Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., and Fujii, T., “Pneumatic handling of droplets on-demand on a microfluidic device for seamless processing of reaction and electrophoretic separation”, *Electrophoresis*, Vol.31, pp.3719-3726, 2010 (DOI 10.1002/elps.201000295)
10. Ono, K., Kaneda, S., Shiraishi, T., and Fujii, T., “Optofluidic Tweezer on a Chip”, *Biomicrofluidics*, Vol.4, 043012, 2010 (DOI:10.1063/1.3509436)
11. Toru Tsuji, Kazuo Onuma, Akira Yamamoto, Mayumi Iijima and Kiyotaka Shiba, “Physicochemical Properties of Artificial Proteins that Accelerate Nucleation of Crystalline Calcium Phosphate”, *Journal of Crystal Growth*, in press, 2010
12. Nakao, Y., Kimura, H., Sakai, Y., and Fujii, T., “Bile Canaliculi Formation by Aligning Rat Primary Hepatocyte in a Microfluidic Device”, *Biomicrofluidics* (2011) in press

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)