

藤井輝夫

東京大学生産技術研究所・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. 研究実施体制

(1)「藤井」グループ

① 研究代表者: 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
 - ・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)
- がん転移 Showcase の構築
 - ・血管内皮モデル系の構築
 - ・がん細胞を用いた転移 Showcase
- 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)
 - ・接着条件を統合した分化誘導 Showcase(全G)
- マイクロ流体診断デバイスの開発
 - ・分子や細胞の計測実験
- エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの開発
 - ・並列一細胞モニタリング実験

(2)「芝」グループ

① 主たる共同研究者: 芝 清隆 (公益財団法人がん研究会がん研究所、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を用いたバイオ界面の形成とその評価
 - ・幹細胞結合関連ペプチドを用いたバイオ界面の形成とその評価
 - ・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
 - ・細胞捕捉デバイスの評価・改良(藤井G&芝G)
- 分化誘導 Showcase の構築
 - ・接着条件を統合した分化誘導 Showcase(全G)

(3)「阿久津」グループ

① 主たる共同研究者: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
 - ・分化可視化 ES/iPS 細胞の機能評価
- 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)
 - ・接着条件を統合した分化誘導 Showcase(全G)

§2. 研究実施内容

○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)

悪性腫瘍マーカーとして重要な位置をしめる EpCAM 分子に結合する「Ep114」ペプチドに関しては、昨年度までに既にその創製は完了していたが、今年度は知財化を完了させるために、不足していた細胞の染色実験などのデータを取得し、特許出願を完了した。その後、術中イメージングへの利用など、細胞 Showcase 以外での Ep114 の応用利用の可能性を探る共同研究を開始した。また、軟部腫瘍のマーカーとして注目される Fzd10 に対するペプチドの知財化も完了した。

・幹細胞結合ペプチドの創製(芝G)

幹細胞の維持に必須である IGF-1 の受容体、IGF-1R に対するペプチドの取得は既に昨年度までに創製と知財化は完了している。

・デバイス及び膜材料への固相化法の開発(藤井G&芝G)

細胞 Showcase のデバイス及び膜材料へのペプチドアプタマーの固相化法の開発を Ep114 を用いて進めている。今年度は Ep114 を PEG リンカーを介して MPC ポリマーにコンジュゲートさせた、汎用性の高いポリマー(「エピベタ」と命名)の作成条件を確立した。さらに、「エピベタ」のいろいろな材料表面へのコート条件の確立、コート状態の性質解析、さらに、エピベタでコートされたシリカ材料表面が、EpCAM に対する親和能を獲得していることを、Ep114 に対する抗体や精製 EpCAM を用いて確認した。以上の結果から初期の目的であるデバイス及び膜材料へのペプチドアプタマーの固相化法の開発はほぼ完了した。

○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、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、デュアルレンジ分化可視化細胞として神経と心筋細胞分化可視化できる ES 細胞を樹立した。心筋細胞への分化を可視化するために、Tubulin alpha::Crimson レポーターベクターを aMHC::EGFP ES 細胞へ導入し、明確な分化可視化を達成した。実際に神経分化および心筋分化を行ったところ、図1に示すように、神経細胞(赤)が観察された。心筋細胞は拍動が確認できている。これにより、同一の細胞から異なる細胞への分化を同時に観察することが可能となった。これらの分化可視化細胞を藤井グループに提供し、マイクロ流体デバイスを用いた分化動態解析への応用を進めている。

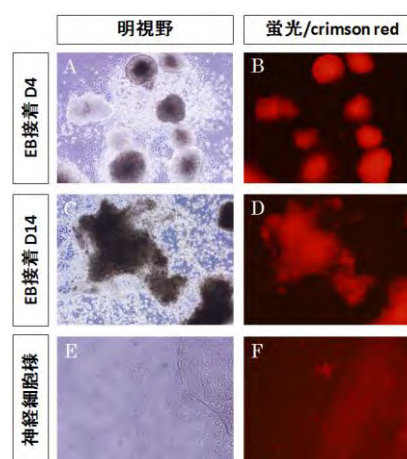


図1 神経-心筋可視化 ES 細胞

○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)

本研究では、マイクロ構造体と流れを利用し、細胞サイズの違いによって細胞を捕捉する手法(トップダウン方式)と希少細胞に対して結合可能なアフィニティを持つ人工バイオ界面によって目的細胞を生きたまま捕捉する手法を(ボトムアップ方式)を統合した、高感度な細胞捕捉分離法を提案している(図2A 参照) (特許出願済:出願番号 2012-234653)。実装としては、図2B に示す。表面に EpCAM 抗体が固相化されたマイクロフィルタ構造(高さ)を持つマイクロウェルを製作し、血液サンプルに懸濁したがん細胞の約 90%を捕捉回収可能(生存率は約 95%)であること確認した(図2C)。現在は、10mL の血液サンプルを処理することを目的に図2D に示すようなウェルを集積したマイクロ流体プレートを開発中である。来年度は、芝 G が取得した人工ペプチドを固相化したアフィニティ表面を用い、捕捉回収率と細胞生存率の両面での

評価を行った後、臨床サンプル中の CTC 捕捉の実施を目指す。

○分化誘導 Showcase の構築

・接着条件を統合した分化誘導 Showcase(全G)

層流を用いて bone sialoprotein (BSP)および vitronectin (VN)由来ペプチドを流路内に部位特異的に固相化することで形成した空間的に特性の異なるパターン化された人工バイオ界面上に iPS 細胞を播種し、未分化維持培地で培養(4日間)した結果を図3に示す。デバイス T 字流路(図3A 参照)の合流地点から 3mm おきに Nanog-GFP(未分化マーカー・緑蛍光)と DAPI(核酸染色剤・青蛍光)の蛍光観察を行ったところ、流路内全体にわたって DAPI 由来の青蛍光観察されたことから、ペプチド表面上で iPS 細胞

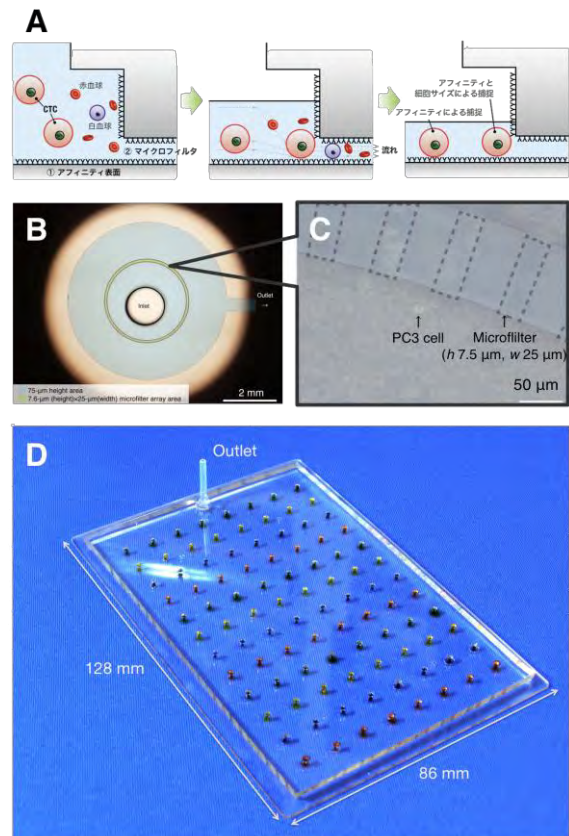


図2. (A) アフィニティと細胞サイズを利用した CTC 捕捉のコンセプト。(B) CTC 捕捉マイクロウェル。ウェルは直径 1.5 mm のインレットを持つ。(C) ウェル内のマイクロフィルタ部分と血液サンプル中から捕捉分離された PC3 細胞。図中の点線部分がマイクロフィルタ構造(高さ 7.5 μ m, 幅 25 μ m)。(D) ウェルを集積したプレート。各ウェルはマイクロ流路で結ばれており、流路はひとつの outlet へと合流する。

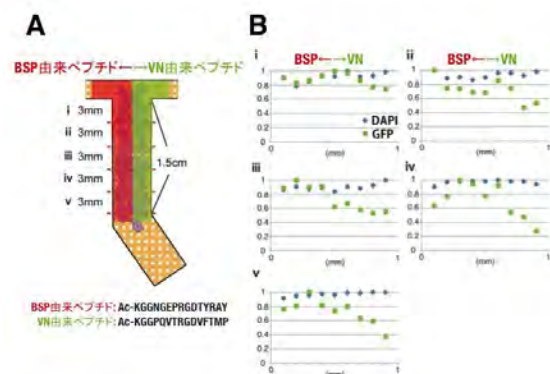


図3. 層流を用いて部位特異的に 2 種類のペプチドを固相化し形成した人工バイオ界面での iPS 細胞の培養結果 (A) BSP および VN 由来ペプチドの部位特異的固相化の模式図。(B) 各地点 i~v での未分化維持マーカー(GFP)由来の蛍光と核酸(DAPI)由来の蛍光強度との関係。

の培養が可能であることが確認された。

また、各地点で DAPI 由来の蛍光強度(青)はほぼ一定であることから、細胞数は 2 種類のペプチド表面によらず一定である事がわかる。一方で、Nanog-GPF 由来の蛍光強度(緑)は各地点においても VN 由来ペプチド表面の蛍光強度が低い。これは、VN 由来ペプチド表面では分化が促進されている一方、BSP 由来ペプチドで表面では未分化状態が維持されている事を示唆している。以上の結果から、ペプチドを部位特異的に固相化し、空間的に特性の異なるパターン化された人工バイオ界面によって多能性幹細胞の分化誘導と未分化維持が制御しうる事が確認出来た。

○エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの開発

数百から数千個の iPS 細胞をマイクロチャンバアレイに一細胞ごとに捕捉し、エレクトロポレーションによって iPS 細胞の内容物を取り出すことで、未分化マーカーである Nanog の発現量の定量的な測定に成功した。それぞれ一細胞レベルでの計測を行うことによって、細胞集団の分化状態の分布変化を捉えることが可能になった。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Chowdhury, M. M., Fujii T., and Sakai, Y., “Importance of a diffusion-dominant small volume to activate cell-secreted soluble factor signaling in embryonic stem cell culture in microbioreactors: A mathematical model based study”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2013) published online. (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.008)
2. Desbois, L, Padirac, A., Kaneda, S., Genot, A., Rondelez, Y., Hober, D., Collard, D., and Fujii, T.,” A Microfluidic Device for On-chip Agarose Microbead Generation with Ultralow Reagent Consumption”, *Biomicrofluidics*, Vol.6 (2012) 044101 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4758460>)
3. Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T.,”Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation”, *Lab on a Chip*, Vol.12 (2012) pp. 4508–4515 (DOI: 10.1039/c2lc40268h)
4. Matsui, H., Takeuchi, S., Osada, T., Fujii, T., and Sakai, Y.,” Enhanced bile canaliculi formation enabling direct recovery of biliary metabolites of hepatocytes in 3D collagen gel microcavities”, *Lab on a Chip*, Vol.12 (2012) pp. 1857–1864 (DOI: 10.1039/c2lc40046d)
5. Chowdhury, M.M., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y., “Induction of alternative fate other than default neuronal fate of embryonic stem cells in a membrane-based

- two-chambered microbio reactor by cell-secreted BMP4”, *Biomicrofluidics*, Vol.6 (2012) 014117 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3693590>)
6. Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin Is a Glycoprotein Ligand of the Human Pluripotent Stem Cell-Specific Probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.*, In press (DOI: doi: 10.5966/sctm.2012-0154)
 7. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW and Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, in press (DOI: 10.1038/onc.2012.614)
 8. Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J Orthop Res.* 30(12), 1915-1922, 2012. (DOI: 10.1002/jor.22157)
 9. Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep.* 2:930, 2012. (DOI: 10.1038/srep00930)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 5 件)