

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
 - ・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)
 - 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)
 - 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）

(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（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）

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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)

これまでに、循環がん細胞(CTC、血流を微量に流れるがん細胞)の特異的マーカーである EpCAM 分子に対して、既存のものに比べ1桁以上大きい結合能力を有する人工ペプチド「Ep114」を取得しているが、本年度は、このペプチドについて各種細胞のスフェロイドを用いて、その結合能の評価を行った。その結果、ヒト結腸癌由来で EpCAM を高発現している HT29 細胞等が蛍光修飾したペプチドで染色されることを確認した。その過程において、本ペプチドと従来用いられる抗 EpCAM 抗体(Vu1D9)が異なる染色結果を与えることから、EpCAM が2つの形態をとる可能性が示唆された。

・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(インスリン様成長因子受容体)は、幹細胞の増殖にも影響を及ぼすことから、未分化の幹細胞に結合しうる人工ペプチドとして「S-011」の取得を行った。

・デバイス及び膜材料への固相化法の開発(藤井G&芝G)

界面にペプチドを固相化するため、共有結合によらない方法として、MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)ポリマーと BMA(butyl methacrylate)との共重合体を疎水性相互作用によって基板の上に接着し、この共重合体に Click Chemistry を用いてペプチドをコンジュゲートする方法を考案した

○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、昨年度に樹立した心筋細胞分化可視化 ES 細胞の可視化能をより一層高めるため、Myh6-EGFP マウスを用いて ES 細胞を樹立した。心筋細胞への分化(拍動性)と EGFP の特異的な発現を確認し、明確な分化可視化を達成した。さらに、デュアルレンジ分化可視化細胞を実現するために、神経細胞マーカーである Tα-1 チューブリン遺伝子プロモーター制御の EGFP 発現ベクターとグリア線維酸性タンパク質(GFAP)遺伝子プロモーター制御の DsRED 発現ベクターを作成し NCH1.5 ES 細胞へ導入後、クローニングに成功、4 細胞株の神経・グリア細胞分化可視化 ES 細胞樹立に

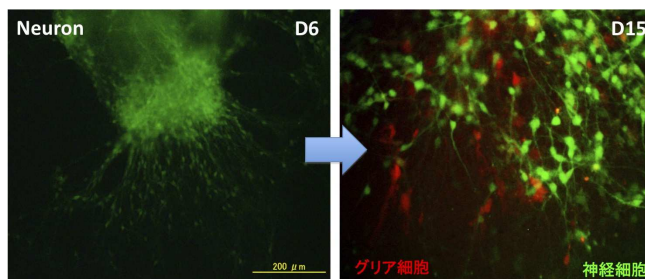


図1 神経細胞・グリア細胞二方向分化の観察
Tα-1 promoter-GFP と、GFAP promoter-DsRED により、神経細胞は緑、グリア細胞は赤の蛍光を発している。この細胞を用いることにより、同一細胞から二方向への分化を観察することが可能となる。

成功した。実際に神経分化を行ったところ、図1に示すように、神経細胞とグリア細胞への分化に伴って、異なる色の蛍光(神経=緑、グリア=赤)が観察された。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。

○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)

デバイス内部に部位特異的にペプチドを固相化することによって接着条件を制御する方法について検討を行った。具体的には層流を用いて異なる種類のペプチドを流路内に固相化し(図2)、その界面上で多能性幹細胞を培養した。その結果、**vitronectin** ペプチドと **bone sialoprotein** ペプチドでは、**bone sialoprotein**の方が未分化維持に効果を有することが示された。これら一連の検討により、ペプチドを部位特異的に固相化して、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が形成できることを確認した。

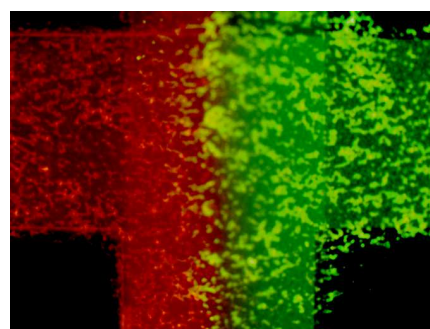


図2. ペプチドの部位特異的固相化
層流を用いて、流路内に異なるペプチドを含む溶液を導入することにより、部位特異的にペプチドを固相化することが可能である。これにより細胞の接着条件を制御することができる。

○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)

前年度にまでに確立した二層流路による液性条件制御法について、より詳細な検討を行い、細胞に対して実際に作用する物質分布の詳細を明らかにした。また、細胞に作用させる物質分布のパターンを時間的に変化させた際に、異なる分化動態が得られることを確認した。さらに、胚様体に対する液性条件制御法として、1)層流を用いる方法、2)膜状に形成した貫通穴を用いる方法の2通りの方法を考案した。層流を用いた液性条件制御については、異なる組成の培養液を導入することにより、神経細胞・心筋細胞の二方向に空間特異的に分化誘導しうることを確認した。また、貫通穴を用いる方法では、胚様体がさらに成長し、接続型胚様体(Articulated Embryoid: Art-EB, 図3)が形成できることを明らかにした。この接続型胚様体では部位特異的に分化の方向性を決めることができる。

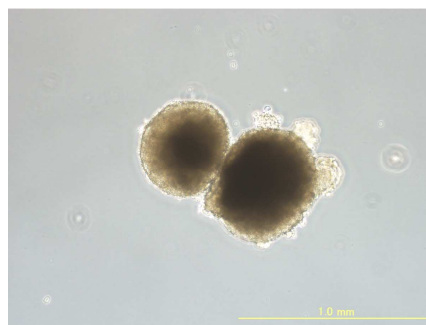


図3. 接続型胚様体の形成

膜上に設けた貫通穴に胚様体を捕捉することによって、異なる組成の培養液を作用させながら胚様体を成長させ、2つの球状の胚様体が接続したものを形成することができる。

○マイクロ流体診断デバイスの開発

宮原チームと共同で、バイオトランジスタとマイクロ流体デバイスを融合した診断デバイスの設計・

製作ならびに計測システムの構築を行った。

○エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの開発

野地チームと共同で、エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイを用いて、多能性幹細胞の分化誘導過程において、未分化マーカーの細胞毎の発現分布がどのように変化するかについて、並列解析することを試みた。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Nakao, Y., Kimura, H., Sakai, Y., and Fujii, T.,” Bile Canaliculi Formation by Aligning Rat Primary Hepatocyte in a Microfluidic Device”, *Biomicrofluidics*, Vol. 5, Issue 2, 022212, 2011 (DOI:10.1063/1.3580753)
2. Kim, S. H., Yamamoto, T., Fourmy, D., and Fujii, T.,” Electroactivemicrowell arrays for highly efficient single-cell trapping and analysis”, *Small*, Vol.7, No.22, pp. 3239–3247, 2011 (DOI: 10.1002/sml.201101028)
3. Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., and Fujii, T.,”A Rapid Method for Optimizing Running Temperature of Electrophoresis through Repetitive On-Chip CE Operations”, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.12, pp.4271-4281, 2011 (DOI:10.3390/ijms12074271)
4. Niino, T., Hamajima, D., Montagne, K., Oizumi, S., Naruke, H., Huang, H., Sakai, Y., Kinoshita, H., and Fujii, T.” Laser Sintering Fabrication of Three-dimensional Tissue Engineering Scaffolds with a Flow Channel Network”, *Biofabrication*, Vol. 3, 034104, 2011 (DOI:10.1088/1758-5082/3/3/034104)
5. Evenou, F., Hamon, M., Fujii, T., Takeuchi, S., and Sakai, Y., “Gas-permeable Membrane and Co-culture with Fibroblasts Enable High-density Hepatocyte Culture as Multilayered Liver Tissues”, *Biotechnology Progress*, Vol.27, No.4, pp.1146-1153, 2011 (DOI 10.1002/btpr.626)

6. Evenou, F., Couderc, S., Kim, B.-J., Fujii, T., and Sakai, Y., "Microfibrillated Cellulose Sheets Coating Oxygen-Permeable PDMS Membranes Induce Rat Hepatocytes 3D Aggregation into Stably-Attached 3D Hemispheroids", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol.22, No.11, pp. 1509-1522(14), 2011 (DOI:10.1163/092050610X513242)
7. Ostrovidov, S., Sakai, Y. and Fujii, T., "Integration of a Pump and an Electrical Sensor into a Membrane-based PDMS Microbioreactor for Cell Culture and Drug Testing", *Biomedical Microdevices*, Vol.13, pp.847-864, 2011 (DOI 10.1007/s10544-011-9555-1)
8. Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., and Fujii, T., "Changing the Surface Property in PDMS-Glass Hybrid Microfluidic Devices", *Analytical Sciences*, Vol.28, pp.39-44, 2012
9. 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 microbioreactor by cell-secreted BMP4", *Biomicrofluidics*, Vol.6,014117, 2012 (DOI: 10.1063/1.3693590)
10. Komori, K., Fujii, S., Montagne, K., Nakamura, H., Kimura, H., Otake, K., Fujii, T., and Sakai, Y., "Development of the Well of the Well System-Based Embryo Culture Plate with an Oxygen Sensing Photoluminescent Probe", *Sens. Actuators B*, 162, pp.278-283 2012 (DOI :10.1016/j.snb.2011.12.078).
11. Tsuji, T., Onuma, K., Yamamoto, A., Iijima, M., and Shiba, K., "Physicochemical properties of artificial proteins that accelerate nucleation of crystalline calcium phosphate", *J Cryst Growth* vol. 314, pp190–195, 2011 (DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2010.10.167)
12. Murakami, T., Kashiwagi, K., and Shiba, K., "Creation of novel signalling modulators from existing cytokine using scanning motif-programming", *ChemComm* vol. 47, No.33, pp. 9357-9359, 2011 (DOI: 10.1039/C1CC12214B)
13. Kasai, T., Matsumura, S., Iizuka, T., Shiba, K., Kanamori, T., Yudasaka, M., Iijima, S., and Yokoyama, A., "Carbon nanohorns accelerate bone regeneration in rat calvarial bone defect", *Nanotechnol* 22: 065102 (8pp), 2011

(DOI:doi:10.1088/0957-4484/22/6/065102)

14. Matsumura, S., Aoki, I., Saga, T., and Shiba, K.,” A tumor-environment-responsive nanocarrier that evolves its surface properties upon sensing matrix metalloproteinase-2 and initiates agglomeration to enhance T2 relaxivity for magnetic resonance imaging”,*Mol Pharm* 8(5): 1970-1974, 2011 (DOI: 10.1021/mp2001999)
15. Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Sakaguchi, H., Akutsu, H., and Umezawa, A.,” DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time”,*PLoS Genet.* 7(5), e1002085, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002085)
16. Nishi, M., Akutsu, H., Masui, S., Kondo, A., Nagashima, Y., Kimura, H., Perrem, K., Shigeri, Y., Toyoda, M., Okayama, A., Hirano, H., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S.W., Ryo, A.,” A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency”, *J Biol Chem.* 286(13), pp.11593-11603, 2011 (DOI: 10.1074/jbc.M110.187989)
17. Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Itakura, Y., Kuno, A., Ogawa, T., Yamada, M., Akutsu, H., Takahashi, Y., Kanzaki, S., Narimatsu, H., Hirabayashi, J., and Umezawa, A.,”Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells”, *Genes Cells.* 16(1), pp.1-11, 2011 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01459.x)
18. Gokoh, M., Nishio, M., Nakamura, N., Matsuyama, S., Nakahara, M., Suzuki, S., Mitsumoto, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Yasuda, K., You, A., Saeki, K.,” Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells.”, *Cell Reprogram.* 13(4), pp.361-370, 2011 (DOI: 10.1089/cell.2011.0004)
19. Takezawa, Y., Yoshida, K., Miyado, K., Sato, M., Nakamura, A., Kawano, N., Sakakibara, K., Kondo, T., Harada, Y., Ohnami, N., Kanai, S., Miyado, M., Saito, H., Takahashi, Y., Akutsu, H., and Umezawa, A.” Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion”,*Sci Rep* 1, 68, 2011 (DOI: 10.1038/srep00068)
20. Egli, D., and Akutsu, H., Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova*

Res. 28: pp.118-125, 2011 (10.1274/jmor.28.118)

21. Sugawara, T., Nishino, K., Umezawa, A., and Akutsu, H.,” Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells”, Stem Cell Res Ther. 3, 8, 2012 (10.1186/scrt99)

(3-2) 知財出願

① 平成 23 年度特許出願件数(国内 2 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)