

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

- 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
  - ・がん細胞を用いた転移 Showcase (藤井 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)
- 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
- 細胞播種用流路構造の開発
  - ・流路構造の設計・製作と接合方法の検討
- 神経筋接合形成の試み
  - ・デバイスの設計・製作と神経筋接合形成実験

### (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

- 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）
- がん転移 Showcase の構築
  - ・がん細胞を用いた転移 Showcase（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）
- エクソソーム分離技術の予備的検討
  - ・人工バイオ界面の応用可能性に関する予備的検討（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
  - ・接着条件を統合した分化誘導 Showcase（全G）

## § 2. 研究実施の概要

本研究では、人工バイオ界面をマイクロ流体アプローチと組み合わせることにより、

- 1) 血中循環腫瘍細胞などの希少細胞を捕捉し解析できるデバイス
- 2) がん転移のプロセスを模擬する血管内皮モデルデバイス
- 3) 多能性幹細胞の分化誘導を制御するデバイス

などのデバイスを実現し、がん転移や多能性幹細胞の分化誘導過程を仔細に調べるための **Showcasing** の方法論を確立することを通して、広くがん医療や再生医療に貢献することを目的としたものである。以下では、今年度の実施内容について、その概要を以下に述べる。

### ○ 希少細胞捕捉デバイスの開発

今年度は、これまでに開発した 96 ウェルデバイスについて、実際に健常者の全血にセルラインのがん細胞を懸濁したモデル系を用いて、そのデザインの最適化を行なうとともに、捕捉したがん細胞に対して、異なる種類の免疫染色法による解析や、**viability** アッセイが並列的に実施可能である事を確認した。その一方で、人工ペプチドからなるバイオ界面をデバイス内部に導入する方法について検討を進めており、今後、これを用いた手法の検討を進める予定である。

### ○ がん転移 Showcase の構築

がん転移のプロセスを調べるための血管内皮モデルについては、肝由来細胞および周皮細胞と肝類洞内皮細胞からなる階層的な構造を有するモデル組織を構築し、肝特異的ながん細胞の転移を観測可能な系であることを確認した。このモデル組織をマイクロ流体デバイス内部に構築し、がん細胞の付着実験を実施することによって転移過程のモデル系となりうることを示唆するデータを得た。今後は、このデバイスを発展させることにより、がん細胞と血管内皮との相互作用を Showcase する系を構築する予定である。

### ○ 分化誘導制御デバイスの開発

膜上の貫通穴を用いるデバイス上での液性条件の制御により、胚様体を部位特異的に分化誘導する手法について検討を行なった。胚様体の部位特異的に眼杯組織を分化誘導する検討を行なった結果、網膜のマーカー遺伝子である **Rx** を部位特異的に発現させることが可能である事を確認した。

一方、分化の動態を仔細に可視化する目的で、外胚葉・内胚葉・中胚葉それぞれへの分化を異なる蛍光色素発色により可視化するトリプルマーカー対応の **ES** 細胞樹立に成功した。これまでに、三胚葉それぞれに対して異なる分化マーカーを有する細胞樹立の報告はなく、この細胞株はマイクロ流体デバイスによる分化誘導過程の **Showcasing** にきわめて有用な細胞ツールである。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国際)

- 1 He, X., Kimura, H., and Fujii, T., " A High-throughput Device for Patterned Differentiation of Embryoid Bodies", *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol.25, No.4 (2013) pp.623-630
- 2 Yamaoka, S., Ito, N., Ohka, S., Kaneda, S., Nakamura, H., Agari, T., Masatani, T., Nakagawa, K., Okada, K., Okadera, K., Mitake, H., Fujii, T., and Sugiyama, M., " Involvement of Rabies Virus Phosphoprotein Gene in Neuroinvasiveness", *Journal of Virology*, Vol.87, No.22 (2013) pp.12327-12338
- 3 Shinohara, M., Kimura H., Montagne, K., Komori, K., Fujii, T., and Sakai, Y., "Combination of microwell structures and direct oxygenation enables efficient and size-regulated aggregate formation of an insulin-secreting pancreatic  $\beta$ -cell line", *Biotechnology Progress* (2013) pp.178-187
- 4 Kim, S.-H., He, X., Kaneda, S., Kawada, J., Fourmy, D., Noji, H., and Fujii, T., "Quantifying Genetically Inserted Fluorescent Protein in Single iPS Cells to Monitor Nanog Expression Using Electroactive Microchamber Arrays", *Lab on a Chip*, Vol.14 (2014) pp. 730-736
- 5 Hauser, P.V., Nishikawa, M., Kimura, H., Fujii, T., and Yanagawa, N., " Controlled Tubulogenesis from Dispersed Ureteric Bud-derived Cells Using a Micropatterned Gel", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2014) published online, (DOI: 10.1002/term.1871)
- 6 Tabata, Y., Horiguchi, I., Lutolf, M. P., and Sakai, Y., "Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors", *Biomater. Sci.*, 2, 176-183 (2014)
- 7 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., and Hirabayashi, J., "Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN", *Stem Cells Translational Medicine*, Vol.2, No.4, pp.265-273, 2013 (10.5966/sctm.2012-0154)
- 8 Hiura, H., Toyoda, M., Okae, H., Sakurai, M., Miyauchi, N., Sato, A., Kiyokawa, N., Okita, H., Miyagawa, Y., Akutsu, H., Nishino, K., Umezawa, A., and Arima, T., "Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells", *BMC Genetics*, Vol.14, pp.32, 2013 (10.1186/1471-2156-14-32)
- 9 Kobayashi, H., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Sugawara, N., Kumakura, S., Ogawa,

- H., Akutsu, H., Hata, K., Nakabayashi, K., and Kono, T., “Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc”, *Epigenetics*, Vol.8, No.6, pp. 635-645, 2013 (10.4161/epi.24887)
- 10 Okumura, N., Akutsu, H., Sugawara, T., Miura, T., Takezawa, Y., Hosoda, A., Yoshida, K., Ichida, J.K., Yamada, M., Hamatani, T., Kuji, N., Miyado, K., Yoshimura, Y., Umezawa, A., “ $\beta$ -Catenin Functions Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in Mouse Embryo-Derived Stem Cells”, *PLoS One*, Vol.8, No.5, e63265, 2013 (10.1371/journal.pone.0063265)
- 11 Terai, M., Izumiyama-Shimomura, N., Aida, J., Ishikawa, N., Kuroiwa, M., Poon, S.S., Arai, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Nakamura, K.I., and Takubo, K., “Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization”, *Tissue and Cell*, Vol.45, No.6, pp.407-413, 2013 (10.1016/j.tice.2013.07.003)
- 12 Yamada-Fukunaga, T., Yamada, M., Hamatani, T., Chikazawa, N., Ogawa, S., Akutsu, H., Miura, T., Miyado, K., Tarín, J.J., Kuji, N., Umezawa, A., and Yoshimura, Y., “Age-associated telomere shortening in mouse oocytes”, *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol.11, No.1, pp.11, 2013 (10.1186/1477-7827-11-108)
- 13 Yamazoe, T., Shiraki, N., Toyoda, M., Kiyokawa, N., Okita, H., Miyagawa, Y., Akutsu, H., Umezawa, A., Sasaki, Y., Kume, K., and Kume, S., “A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells”, *Journal of Cell Science*, Vol.126, No.pt23, pp.5391-5399, 2013 (10.1242/jcs.129767)
- 14 Nakayama, H., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y., “Image-based evaluations of distribution and cytotoxicity of Irinotecan (CPT-11) in a multi-compartment micro-cell coculture device”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2013) in press, (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.019)
- 15 I. Horiguchi, M. M. Chowdhury, Y. Tabata, Y. Sakai, “Proliferation, morphology and pluripotency of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) in three different types of alginate beads for mass production”, *Biotechnol. Prog.*, in press.
- 16 Iwao, T., Toyota, M., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Akutsu, H., Umezawa, A., Nagata, K., and Matsunaga, T., “Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method” *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, Vol.29, No.1, pp.44-51, 2014 (in press)
- 17 Kondo, Y., Iwao, T., Nakamura, K., Sasaki, T., Takahashi, S., Kamada, N., Matsubara, T., Gonzalez, F.J., Akutsu, H., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Toyoda, M., Umezawa, A., Nagata, K., Matsunaga, T., and Ohmori, S., “An Efficient Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into

Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity”, Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2013 (in press)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 7件)