

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K13721
研究課題名(和文)細胞機能・分化に影響を与える物理刺激パターンを解明する新規評価用デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of DEP device for analysis of mechanobiology that affects cell function and differentiation

研究代表者
吉本 敬太郎 (YOSHIMOTO, Keitaro)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：60392172
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分化能を含めた MSC の機能と足場環境との関係は徐々に明らかとなりつつあるが、未だ外部刺激と分化機構に関する知見は不足している状況にある。このような背景のもと、本研究では、細胞に対して様々な物理刺激を与えることができる新規デバイスの作製を試みることを目的とした。細胞に物理刺激を加えるための新しい誘電泳動用(DEP)電極デバイスを作製することに成功した。同デバイスで周波数を変化させながら誘電泳動を生じさせることで、様々な力学的刺激を細胞に与えることができる。本デバイスによる物理刺激で間葉系細胞株(UE7T-13)の分化関連遺伝子発現量が大きく変化するという大変興味深い現象を見出した。

研究成果の概要(英文)：Although mechanical stimulation to the cells is recognized as an important factor to control cellular functions, conventional methods for cell stimulation are difficult to control the intensity and timing of mechanical stimulation with simple procedures and equipment. In this study, we investigated the effect of positive dielectrophoresis (DEP) on gene expression in mesenchymal stem cells. When applying the alternating current voltage, human bone marrow derived mesenchymal stem cells (UE7T-13) exhibited positive DEP and were compressed onto the electrode surface. Constructed device can easily control the DEP force to the cells by changing frequency. Interestingly, gene expressions of cell differentiation marker in UE7T-13 cells and mechanical stimulation-susceptible one were changed by applying positive DEP. These results suggested that gene expression in mesenchymal stem cells can be regulated by applying mechanical stimulation derived from DEP.

研究分野：バイオ分析

キーワード：細胞分析 誘電泳動 幹細胞 メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cell) は、今から約 40 年前に骨髄液から発見され、同じく幹細胞である受精卵由来の ES 細胞や、人工多能性幹細胞の iPS 細胞よりも歴史が古く、臨床応用が進んでいるもう一つの幹細胞である。ヒトの体の中に存在するいわゆる天然の幹細胞であるため、安全性の高い再生医療用細胞資源であることから、MSC の分化能を ES 細胞や iPS 細胞のレベルまで改善することができれば、同幹細胞らを超えた重要な幹細胞ソースになりうる。

2. 研究の目的

分化能を含めた MSC の機能と足場環境との関係は徐々に明らかとなりつつあるが、未だ外部刺激と分化機構に関する知見は不足している状況にある。このような背景のもと、本研究では、細胞に対して様々な物理刺激を与えることができる新規デバイスの作製を試みることを目的とした。細胞に対して物理刺激を発生させる原理として、細胞の誘電泳動現象を利用することを着想し、細胞に任意の強さの物理刺激を加えることのできる電極デバイスを考案した。誘電泳動による細胞操作は、細胞に様々な強さ、時間およびタイミングの力学的刺激を与えることのできる自由度の高い手法である。このようなデバイスを用いて力学的刺激と細胞機能の関係性が明らかとなれば、生命科学分野における MSC の基礎研究のみならず、再生医療分野における応用研究など幅広い分野に対して大きな波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、細胞に任意の物理刺激を精度良く与えるための誘電泳動用電極デバイスのプロトタイプ作製と、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 などを用いて同デバイスの機能評価を行った。

4. 研究成果

まず、既に他のグループによって誘電泳動が報告されていたヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 を、構築したデバイス流路内に流し込み、誘電泳動前後における泳動挙動を確認した。図 1 に HL-60 の正の誘電泳動および負の誘電泳動の結果を示す。新規に設計した電極デバイスを用いた場合でも、周波数を変化させることで同一溶媒中において正負逆の誘電泳動を発現させることが可能であった。同様に UE7T-13 の誘電泳動を行ったところ、同様の現象が象が観測された。細胞の泳動挙動は周波数以外に、細胞懸濁液の導電率、細胞種、電極の設計の違いによって変化し、溶媒の導電率が高い溶液では誘電泳動力が弱くなった。正の誘電泳動では電極上に細胞が押しつけられ、負の誘電泳動では電極間に細胞が集積して細胞塊 (スフェロイド) を形成した。

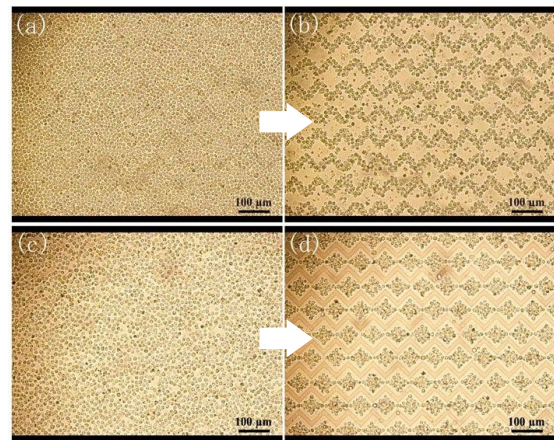


図 1 HL40 の誘電泳動挙動

上段: (a) 正の誘電泳動前、(b) 正の誘電泳動後

下段: (c) 負の誘電泳動前、(d) 負の誘電泳動後

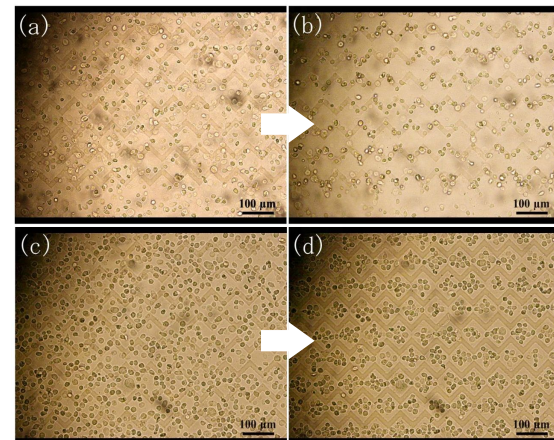


図 2 UE7T-13 の誘電泳動挙動

上段: (a) 正の誘電泳動前、(b) 正の誘電泳動後

下段: (c) 負の誘電泳動前、(d) 負の誘電泳動後

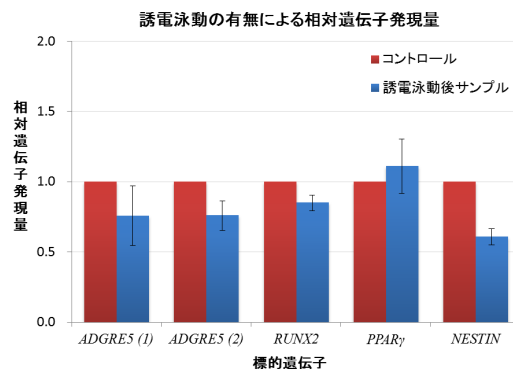


図 3 DEP 後の UE7T-13 の遺伝子発現量変化

構築したデバイス内に、同じ時間 (1 時間) 誘電泳動無しで静置サンプルをコントロールとして規格化

誘電泳動による物理刺激が、UE7T-13 の遺伝子発現に与える影響を調査するため、Real Time RT PCR を用いて正の誘電泳動後における遺伝子発現量の変化を測定した。図3に示すとおり、細胞が物理刺激を受けた際に発現量が低下するとされている ADGRE5、骨芽細胞分化マーカー RUNX2、脂肪細胞分化マーカー PPAR の各種伝子の発現量が優位に低下するという結果が得られた。以上の結果から、本デバイスを用いて MSC に物理刺激を与えることができること、さらに分化に関連する遺伝子が変化することが明らかとなった。

本研究では、DEP による物理刺激を与える際の細胞形態に着目し、マイクロパタン培養皿を用いる均一な細胞凝集体の作製を試みた。幹細胞の分化能は増殖因子に加え、細胞密度や足場への接着状態など、細胞を取り巻く様々な微小環境によって制御されている。マイクロパタン培養皿は二次元培養における間葉系幹細胞 (MSC) の接着状態を精密に制御可能なデバイスとして、また MSC のスフェロイドを形成させるための機能性三次元培養皿として利用されてきた。本研究では、MSC の培養形態を二次元系から蓄積レベルが異なる複数の三次元系まで連続的に変化させるデバイスとしてマイクロパタン培養皿を利用することを着想し、三次元細胞蓄積レベルの変化が脂肪幹細胞 (ADSC) の分化能に及ぼす影響を評価した (図4)。

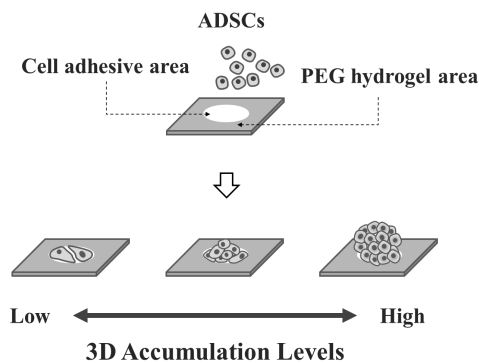


図4 マイクロパタン培養皿を用いる細胞凝集体の作製

核及び細胞質の染色により、播種細胞数の増加に伴ってマイクロドメイン上で細胞が積層している様子が確認された。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元像構築により、マイクロパタン培養皿において、最小 10 μm から最大 72 μm まで幅広い蓄積レベルの細胞凝集体が形成していることが明らかとなった (図5)。

大変興味深いことに、分化誘導因子を添加してないにも関わらず、三次元細胞蓄積量の増加に比例して骨芽分化マーカー遺伝子である RUNX2 及び ALP の発現量が有意に上昇した。一方で脂肪分化マーカー遺伝子である

PPAR の発現量は変化せず、C/EBP の発現量は顕著に減少していた (図6)。

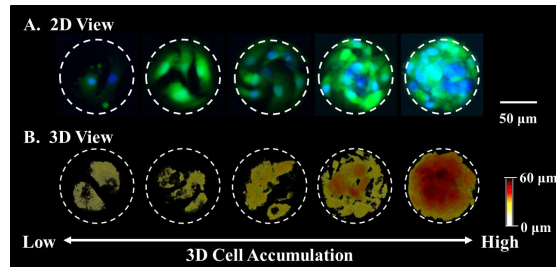


図5 間葉系幹細胞のマイクロパタン上における二次元培養状態から三次元培養状態への変化

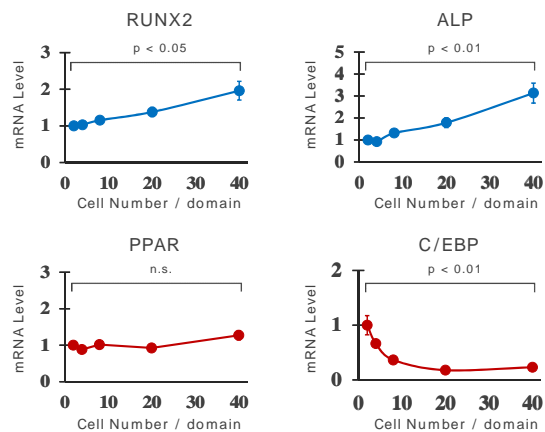


図6 間葉系幹細胞のマイクロパタン培養皿上における骨芽関連遺伝子 (RUNX2, ALP)、脂肪関連遺伝子 (PPAR, C/EBP) の発現量と培養形態の依存性

細胞凝集体に DEP 刺激を与えた際の実験は現在も継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

(1) Furuhata, Y., Yoshitomi, T. Kikuchi, Y., Sakao, M., Yoshimoto, K., "Osteogenic Lineage Commitment of Adipose-Derived Stem Cells is Predetermined by Three-Dimensional Cell Accumulation on Micropatterned Surface", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (11), 9339-9347 (2017). 査読あり

(2) Furuhata, Y., Kikuchi, Y., Tomita, S., Yoshimoto, K., "Small Spheroids of Adipose-Derived Stem Cells with Time-Dependent Enhancement of IL-8 and VEGF-A Secretion", *Genes to Cells*, 21 (12),

1380-1386 (2016). 査読あり

(3) Yoshioka, J., Yoshitomi, T., Yasukawa, T., Yoshimoto, K., "Alternation of Gene Expression Levels in Mesenchymal Stem Cells by Applying Positive Dielectrophoresis", *Analytical Science*, 32(11), 1213-1216 (2016). 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 古旗 祐一, 吉富 徹, 吉本 敬太郎 “マイクロパタン培養皿上における三次元細胞蓄積量が間葉系幹細胞の分化系列を運命づける Lineage Commitment of Mesenchymal Stem Cells is Regulated by 3D Cell Accumulation Level on Micropatterned Surface” **日本化学会第97回春季年会**, 2017/3/16-19, 慶應義塾大学 (神奈川県横浜市) 英語口頭発表

2) 古旗 祐一, 吉富 徹, 菊池 有夏, 坂尾 美帆, 吉本 敬太郎 “脂肪幹細胞の分化誘導における新機軸の提案: マイクロパタン培養皿を利用する細胞蓄積量の精密制御” **第26回インテリジェント材料・システムシンポジウム**, 2017/1/11, TWINS (東京都新宿区), 東京女子医科大学・先端医科学研究所・TWIns 口頭発表

3) Junya Yoshioka, Toru Yoshitomi, Tomoyuki Yasukawa, Keitaro Yoshimoto “Dielectrophoresis device with saw-shaped electrode as a tool for applying mechanical stress to cell” **2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology**, 2016/7/27-28, 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (茨城県つくば市) 英語ポスター発表

4) 吉岡 純矢, 安川 智之, 吉本 敬太郎 “鋸型電極の誘電泳動を利用する細胞の分離・凝集・力覚分析用デバイスの開発” **第76回分析化学討論会**, 2016/5/28-29, 岐阜薬科大学 (岐阜県岐阜市) ポスター発表・優秀ポスター賞受賞

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://yoshimotolab.c.u-tokyo.ac.jp/>

アウトリーチ活動:

日本科学未来館 (台場・東京都) にて、「幹細胞の機能をパワーアップする方法を一緒に考えよう!」という“サイエンティスト・クエスト”という来館者との対話型形式のイベントを行いました。

<http://www.miraikan.jst.go.jp/event/1701271421085.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 敬太郎 (YOSHIMOTO, Keitaro)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 60392172

(2) 研究分担者

安川 智之 (YASUKAWA, Tomoyuki)
兵庫県立大学・物質理学研究科・准教授
研究者番号: 40361167