

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21696

研究課題名(和文) iPS細胞のソーティングに伴う損傷の評価：細胞ローリングカラムを用いた比較検討

研究課題名(英文) Evaluation of the effect of cell enrichment process on iPS cell differentiation

研究代表者

大高 晋之(Otaka, Akihisa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：30739561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗体標識を伴わない“細胞ローリングカラム”を用いた細胞分離がiPS細胞の分化特性に与える影響を調査した。抗Flk1抗体固定化カラムの作製方法を検討した。カラムを用いて、iPS細胞を中胚葉細胞に分化させた細胞からFlk1陽性細胞を回収する条件を検討し、27%から49%までの異なるFlk1陽性率を有する細胞集団の分画に成功した。この細胞を心筋分化させたところ、Flk1陽性率が最も低い分画で分化がすすむ傾向が見られた。フローサイトメータで分離した場合だと、Flk1陽性細胞が心筋分化能を持つことが先行研究より報告されている。今回の結果は細胞分離方法の違いが細胞の分化特性に影響を与える可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Cell rolling behaviors resulting from dynamic cell adhesion to a solid surface with immobilized antibodies have been investigated for label-free cell separation. Here, we investigated the effect of cell rolling behaviors on cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells. After mesoderm induction, proportion of Flk1 positive cells was increased from 27% to 49%, by fractionating cells using cell rolling column, in which anti-Flk1 antibody was successively immobilized on poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate-co-p-nitrophenyl oxycarbonyl poly[ethylene glycol] methacrylate) coated surfaces. After separation, the cardiomyocyte-differentiation potential was decreased with the increase of the proportion of Flk1 positive cells. It has been reported the Flk1 positive cells show high potential of cardiomyocyte differentiation. Collectively, our data demonstrate that the cell enrichment process may affect cell differentiation properties.

研究分野：医用生体工学，生体材料学

キーワード：細胞ローリング ラベルフリー細胞分離 iPS細胞 心筋分化 高分子界面 マイクロ流路

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いて組織再生を目指す際、ヘテロな細胞の中から分化が進んだ目的細胞を選別・回収する技術が用いられる。Fluorescence-activated cell sorter (FACS) は細胞分離法の第一選択肢であるが、抗体標識が細胞活性や遺伝子発現に影響を与える可能性や、装置内で発生する流体環境が細胞に影響を与える可能性が報告されている。また、処理速度にも限界があり、幹細胞を用いた組織再生実現のボトルネックとなっている。

我々は、抗体を細胞に反応させる代わりに、抗体を固定化した流路を用いて細胞を分離する“細胞ローリングカラム”の開発を行ってきた。細胞表面の抗原と流路に固定化された抗体が反応すると、抗原陽性細胞のみが流路壁面上をローリングし、流路からの流出時間が遅延する。この流出時間の違いを利用して、間葉系幹細胞や脂肪幹細胞、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) を抗原発現に応じて分画できることを報告してきた。抗体標識を必要としない新たな細胞分離技術の実現を目指している。

### 2. 研究の目的

細胞の分離方法が異なると、抗体標識などの影響で、処理細胞の分化や増殖に影響を与える可能性が懸念される。しかし、細胞分離の抗体標識の有無が、細胞の分化特性に与える影響を評価した先行研究は存在しない。そこで本研究では、それぞれ細胞ローリングカラムと FACS で処理した iPS 細胞を心筋分培養し、その分化挙動を比較した。

- (1) 抗 Fik1 抗体を固定化したカラムを用いて iPS 細胞から誘導した中胚葉細胞から Fik1 陽性細胞の分離が可能か検証するため、iPS 細胞を中胚葉分化させたのち、抗 Fik1 抗体を固定化したカラムを用いて Fik1 陽性細胞を分画した。顕微鏡によりカラム内の細胞を観察し、FACS による細胞の Fik1 レベルを評価した。
- (2) (1) で Fik1 陽性率の異なる細胞集団を得たのち、この細胞を心筋分化培養した。また FACS を用いて Fik1 陽性/陰性細胞を分離し、同様の分化培養条件で分化誘導した。細胞の増殖性と、中胚葉分化マーカー (Fik1) 及び心筋分化マーカー (Gata4, Nkx2-5, cardiac troponin-T (cTnT)) の mRNA 発現量を PCR で評価し、分離方法が細胞の特性に与える影響を評価した。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. 流路と Fik1 陽性細胞の相互作用

マウス iPS 細胞をコラーゲン IV 上で 4.5 日培養し、中胚葉細胞に誘導した。この細胞を剥離し、ハンス緩衝塩で懸濁して  $2 \times 10^7$  cells/mL の細胞懸濁液とした。ホウケイ酸ガラス製のマイクロ流路 (流路幅  $340 \times$  流路高

$170 \mu\text{m}$ ) の壁面を両親媒性ポリマーで被覆した。さらにこの被覆面に抗 Fik1 抗体を約  $2 \times 10^8 / \text{mm}^2$  の密度で固定化した。流路内をハンス緩衝塩溶液 (HBSS) で満たした後、約  $2 \mu\text{L}$  の細胞懸濁液を注入した。1 分間静置した後、HBSS をシリンジポンプで  $0.5 \text{ mL/h}$  の流速で送液し、流路内の細胞を押し流した。顕微鏡によりカラム内の細胞を観察した。送液開始 30 秒後、流路出口から流出する液をマイクロチューブに 6 分画回収した (流出時間; F1: 30-60 秒; F2: 60-90 秒; F3: 90-120 秒; F4: 120-150 秒; F5: 150-180 秒; F6: 180-210 秒)。流出時間と Fik1 発現との関係の評価するため、上記の操作を 30 回反復し、回収した細胞を蛍光標識抗 Fik1 抗体で染色した後 FACS で評価した。

#### 3.2. 分画細胞の心筋分化特性評価

次に細胞ローリングカラムを用いて分画した細胞を山下らの報告した心筋分化法で培養し分化特性を評価した。96 well プレートに  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種した OP9 フィーダ層を構築した。細胞ローリングカラムで分画した細胞を F1-2, 3, 4, 5-6 の 4 群に分け  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種した (Figure 1. left)。 $\alpha$  modification of Eagle's media に 10% FBS,  $3 \mu\text{g/mL}$  cyclosporine-A を添加した培地で 8 日間培養した。

FACS を用いて分離した細胞でも同様の培養を行った (Figure 1. right)。蛍光抗体標識した細胞 (Crude) から Fik1 陽性細胞 (Positive) 及び Fik1 陰性細胞 (Negative) を回収し、3 群をカラム群と同様の方法で 8 日間培養した。

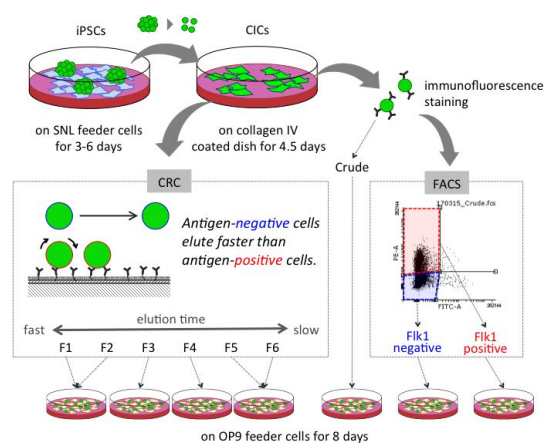


Figure 1. Experimental procedure of cardiomyocyte differentiation using two types of cell-separating processes.

### 4. 研究成果

中胚葉細胞分化した時点での Fik1 陽性率は 40% 以上であった。抗 Fik1 抗体を固定化したカラムに中胚葉前駆細胞を流した条件のみで細胞移動速度の選択的な低下が観察された。また、蛍光標識抗 Fik1 抗体を固定化したカラムに中胚葉前駆細胞を流し、回収した細胞の膜表面を共焦点顕微鏡で観察し

た。回収した細胞表面には蛍光標識された抗体の存在は確認されず、本カラムで処理した細胞がカラム流出後もラベルフリーの状態を維持していることがわかった。以上から、本実験条件により抗 FIK1 抗体を固定化した細胞ローリングカラムの作製条件を決定した。

作製したカラムで中胚葉細胞を分画した。各分画の FIK1 陽性細胞率は F1 が 27%、F2 が 38%、F3 が 41%、F4 が 44%、F5 が 49%、F6 が 46% であり、流出時間が遅くなるに従って FIK1 陽性率は増加した。FIK1 陽性細胞の高純度での分離・濃縮には至らなかったものの、FIK1 の発現レベルに従って流出時間が遅延することがわかった。

カラムで分画した細胞を心筋分化培養した。培養 8 日目の時点で、いずれの群においても拍動細胞は見られなかった。細胞を回収し増殖率と PCR で評価した。増殖率は F4 が最も高かった。cTnT の遺伝子発現量は 4 群間に有意な差は見られなかったものの、Gata4、Nkx2-5 の遺伝子発現量は F1-2 が他の群と比較して有意に高かった。以上より、細胞ローリングカラムで分画した細胞を分化培養することで、異なる分化特性の細胞を得た。

次に、FACS で分画した FIK1 陽性細胞 (Positive) と FIK1 陰性細胞 (Negative) 及び蛍光抗体標識のみをした細胞 (Crude) を心筋分化させた。FACS で処理した細胞の増殖性はカラムで処理した細胞のものと比較して低くなる傾向にあった (Figure 2)。Positive 群は他の全ての群と比較して 2 倍の cTnT 遺伝子発現量を示した。FACS で分画した細胞では、FIK1 陽性細胞で心筋分化が進む傾向にあり、これは先行研究の結果と符合する。一方、興味深いことに、細胞ローリングカラムで処理した細胞は初期に F1-2 の細胞 (つまり FIK1 陽性率 27%、同陰性率 67% と FIK1 陰性細胞が多い細胞分画) で心筋分化が進む傾向似合った。これらの結果は、細胞分離方法の違いが細胞の分化特性に影響を与える可能性を示唆する。

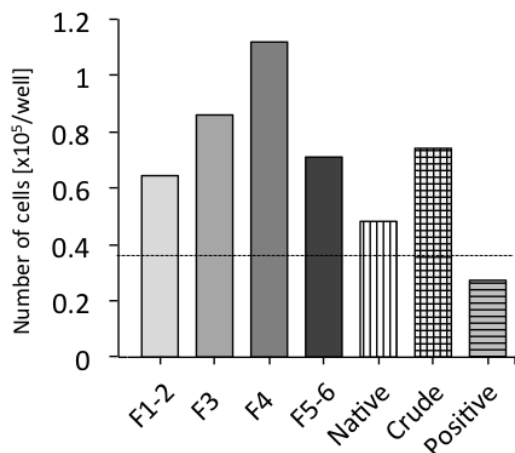


Figure 2. Number of cells after 8-day culture. Dotted line: initial cell number.

## 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 2 件)

A. Otaka, K. Kitagawa, T. Nakaoki, M. Hirata, K. Fukazawa, K. Ishihara, A. Mahara, T. Yamaoka, Label-Free Separation of Induced Pluripotent Stem Cells with Anti-SSEA-1 Antibody Immobilized Microfluidic Channel, 査読有, *Langmuir*, 33, 2017, 1576-1582. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b04070.

大高晋之, 抗 SSEA1 抗体固定化流路界面の細胞挙動を用いた未分化細胞分離, 査読無, *バイオマテリアル学会<生体材料>*, 35(1), 2017, 28-29.

[学会発表](計 15 件)

大高晋之, 馬原淳, 山岡哲二, 抗体固定化マイクロ流路を用いた未分化 iPS 細胞の分離, 第 54 回日本生体医工学会大会, 2015/5/7-9, [愛知, ポスター]

大高晋之, 北川和宜, 平田みつひ, 深澤今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原淳, 山岡哲二, PMBN ポリマーによる固定化抗体濃度が iPS 細胞のローリング挙動に与える影響, 第 61 回高分子研究発表会, 2015/7/17, [兵庫, 口頭]

大高晋之, 北川和宜, 平田みつひ, 深澤今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原淳, 山岡哲二, 未分化 iPS 細胞の分離のための抗体固定化ポリマー被覆マイクロ流路の開発, 第 44 回医用高分子シンポジウム, 2015/7/27-28, [東京, 口頭]

A. Otaka, A. Mahara, T. Yamaoka, The effect of the density of anti-SSEA-1 antibody immobilized to microfluidic channel on iPS cell rolling behavior, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2015/9/16-19, [札幌, ポスター]

大高晋之, 北川和宜, 平田みつひ, 深澤今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原淳, 山岡哲二, 抗 SSEA-1 抗体を固定化した PMBN コート流路による未分化 iPS 細胞の分離, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015/11/9, [京都, ポスター]

A. Otaka, K. Kitagawa, A. Mahara, K. Ishihara, T. Nakaoki, T. Yamaoka, The effect of immobilized antibody density

on iPS cell rolling behavior in cell rolling column, 4th TERMIS World Congress, 2015/9/8-11, [ボストン・アメリカ, ポスター]

大高晋之, 北川和宜, 平田みつひ, 深澤今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原淳, 山岡哲二, 抗 SSEA-1 抗体を固定化したマイクロ流路による未分化 iPS 細胞の分離, 日本機械学会 第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016/1/9~10, [東京, 口頭]

大高晋之, 北川和宜, 平田みつひ, 深澤今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原淳, 山岡哲二, 細胞ローリングカラムを用いた未分化 iPS 細胞の分離, 第 15 回 日本再生医療学会総会, 2016/3/17-19, [大阪, 口頭]

A. Otaka, K. Kitagawa, M. Hirata, K. Fukazawa, T. Nakaoki, K. Ishihara, A. Mahara, T. Yamaoka, Label free undifferentiated iPS cell separation using anti SSEA-1 antibody coated microfluidic channels, CiRA / ISSCR International Symposium 2016 (京都), 2016/3/22-24, [京都, ポスター]

北川和宜, 大高晋之, 平田みつひ, 深澤今日子, 中沖隆彦, 石原一彦, 馬原淳, 山岡哲二, 抗 Fik1 抗体固定化細胞ローリングカラム内の iPS 細胞由来心筋前駆細胞の移動速度評価, 第 65 回高分子学会年次大会(神戸), 2016/5/25-27, [兵庫, ポスター]

北川和宜, 大高晋之, 平田みつひ, 中沖隆彦, 馬原淳, 山岡哲二, 抗体固定化細胞ローリングカラムによる iPS 細胞由来心筋前駆細胞のラベルフリー単離の試み, 第 62 回高分子研究発表会, 2016/7/15, [兵庫, 口頭]

大高晋之, 平田みつひ, 馬原淳, 山岡哲二, 抗体固定化マイクロ流路を用いた SSEA-1 発現量による未分化 iPS 細胞のラベルフリー分離, 第 45 回医用高分子シンポジウム(東京), 2016/7/25-26, [東京, 口頭]

A. Otaka, A. Mahara, T. Yamaoka, Isolation of undifferentiated iPS cell based on cell rolling phenotype in antibody immobilized microfluidic channel, the 6th Stanford Bio-X & ADATE Symposium, 2016/9/12-14, [カリフォルニア・アメリカ, 口頭+ポスター]

A. Otaka, A. Mahara, T. Yamaoka, Evaluation of iPS cell rolling phenotype on anti-SSEA-1 antibody immobilized microfluidic channel as a pluripotency marker, 20th Anniversary International Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016, 2016/9/29-30, [ソウル・韓国, 口頭+ポスター]

A. Otaka, A. Mahara, T. Yamaoka, Evaluation of iPS cell rolling phenotype on anti-SSEA-1 antibody immobilized microfluidic channel as a pluripotency marker, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (福岡), 2016/11/21-22, [福岡, ポスター]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大高 晋之 (AKIHISA OTAKA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号: 30739561