

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23686119

研究課題名(和文) 幹細胞を用いた機能連携型細胞デバイス作製法の開発

研究課題名(英文) Development of a fabrication method for a functionally collaborating cellular device utilizing stem cells

研究代表者

舟橋 久景 (Funabashi, Hisakage)

広島大学・サステナブル・ディベロップメント実践研究センター・特任講師

研究者番号：60552429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「幹細胞から分化した異種系譜の細胞が共存し、それらが協調して機能を発揮する新規細胞デバイス作製」に適用可能な、「標的幹細胞の遺伝子発現状況を評価し、その状況に応じて標的細胞の転写因子活性を抑制することによって分化を誘導するための基礎技術」と「細胞同士が機能協調していることを評価するための、細胞間シグナル伝達物質であるインスリンをオンラインでモニタリングする基礎技術」の二つの技術開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have developed “a basic technique for inducing cellular differentiation by the down regulation of the activity of a target transcription factor based on the evaluation of gene expression status in a target cell” and “a basic technique for online insulin monitoring which can be applied to the evaluation of cellular functional collaboration”. These two basic techniques are expected to be applied to a fabrication method for “a cellular device in which various types of cells derived from stems cells functionally collaborate”.

研究分野：生物学

キーワード：細胞デバイス 遺伝子発現制御 分化誘導 遺伝子発現解析 イメージング解析 インスリン バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞は、自己増殖能とあらゆる細胞へ分化することができる多分化能を特長として併せ持つ。これらの細胞は、特定種の細胞へ分化誘導したのちに生体へ移植する細胞移植療法、組織を再生したのちに生体内へ移植する組織再生療法、また、分化誘導した細胞を用いたドラッグスクリーニングや、細胞デバイスなどへの応用が期待されている。それらを実現するためには、未分化状態の細胞を特定の細胞種へと分化させることが必要である。研究開始当初、培養液中に低分子化合物などの生理活性物質を添加、または培養中の細胞に細胞種特異的転写因子強制発現ベクターをウイルス感染やリポフェクション法により導入するといった分化誘導法が盛んに開発されていた。それらの分化誘導法は、培養中の全細胞に対して、同一の操作を行うことから、基本的にすべての細胞を同一細胞種へと分化誘導することを期待した方法であった。したがってそれらの手法では、生体や組織などのように異種系譜の細胞が機能連携を行い、協調することによって複雑な機能を発揮している状態を自由に作り出すことは困難であると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、幹細胞から分化した異種系譜の細胞が共存し、それらが協調して機能を発揮する新規細胞デバイス作製のための技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

上記のような目的を達成するために本件研究では大きく以下の二つのテーマを設定し研究を推進した。

(1) 標的単一細胞の分化誘導基礎技術開発  
標的単一生細胞内転写因子活性抑制法の開発

同一培養器内に異種細胞が存在し、機能協調させるためには、一つ一つの細胞を目的の細胞へと分化させる技術が有用であると考えた。そこで、インジェクション技術を用いて標的単一生細胞内の遺伝子発現を制御することにより希望の細胞系譜へと分化誘導する方法を考えた。本研究では、標的単一生 ES 細胞に、転写因子の結合配列と同じ配列を持つ DNA を ̳ DNA として導入する転写因子の抑制制御法の開発を行った。̳ DNA をフェムトインジェクション法により標的細胞内へ直接導入し、レポーター蛍光タンパク質の蛍光を観察することにより、転写因子活性の抑制効果进行评估した。

標的細胞の状態評価法開発

目的の単一標的細胞を分化誘導するためには、細胞の状態を的確に評価し、その状態に応じて分化を誘導する必要がある。そこで本研究では、標的細胞の遺伝子発現状態を、

細胞を殺さずに評価する方法を開発した。DNA を基本骨格とし標的 mRNA に結合すると蛍光シグナルを発する mRNA 測定用 DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサを開発し、細胞内標的 mRNA の検出可能性について検討した。

(2) 異種細胞間機能協調を評価するための基礎技術開発

同一培養器内の細胞同士が機能協調していることを評価するためには、細胞間シグナルをオンラインで評価するシステムが必要である。本研究ではインスリンシグナルをモデルとして選定した。インスリン受容体のインスリン結合ドメイン構造と蛍光タンパク質、または蛍光タンパク質を遺伝子工学的に融合し、インスリンを検出すると蛍光シグナルを発する新しいタンパク質プローブを開発した。これを用いて洗浄操作不要のインスリン検出を実現し、インスリン分泌のオンラインモニタリングを行った。

4. 研究成果

(1) 標的単一細胞の分化誘導基礎技術開発  
標的単一生細胞内転写因子活性抑制法の開発

̳ DNA の直接導入による転写因子活性抑制法開発にあたり、Tet-Off System が組み込まれた EBRTcH 細胞をモデルケースとして選択した。この細胞は、tTA 転写因子によって Venus 蛍光タンパク質を発現する ES 細胞である。まず tTA 転写因子の結合配列を含まない DNA をフェムトインジェクション法によって核に導入した場合、蛍光タンパク質の発現抑制効果は見られなかった。一方、tTA 転写因子の結合配列を含む DNA 断片を ̳ DNA としてとして標的生細胞へフェムトインジェクション法により核へ導入した場合、その後の蛍光タンパク質の発現が観察された細胞数が低下した。

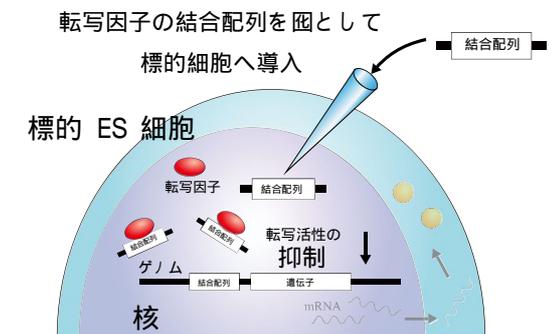


図1 ̳ DNA の直接導入による標的単一生細胞の転写因子活性抑制法

このことは、tTA が ̳ DNA を認識し結合することにより、ゲノム上の転写因子結合配列への結合頻度が減少し、本来の転写活性が抑制された結果であると推察された。以上のことから、フェムトインジェクション法により標的転写因子の結合配列を直接導入する、新

しい標的単一生細胞内転写因子活性抑制法の開発に成功したと結論した(図1)。

### 標的細胞の状態評価法開発

で開発した転写因子抑制法を用いて標的幹細胞の分化誘導を試みたところ、同一条件にもかかわらず、人為的に分化誘導される細胞とされない細胞が混在した。これは同一培養器内で培養した細胞でさえも、細胞の状態が個々に異なっていることを示しており、標的の細胞を目的の細胞へと分化誘導するためには、細胞を生かしたまま、遺伝子組換えなしに細胞内の状況を的確に評価する技術が必要であると考えた。

そこで本研究では、標的 mRNA を測定する新しい蛍光バイオセンサの開発を行った。図2に示したように、DNA ナノピンセット構造体を基本構造とする新しい蛍光バイオセンサをデザインし、3本の合成オリゴヌクレオチドを自己集積することにより作製した。

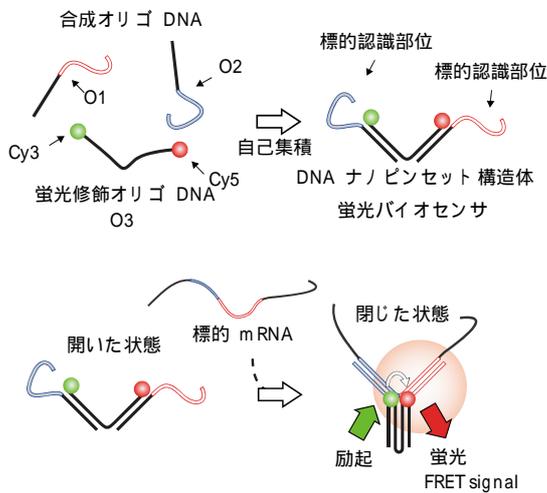


図2 標的 mRNA 測定用 DNA ナノピンセット構造体蛍光バイオセンサ

この蛍光バイオセンサは、標的 mRNA を認識すると開いた状態から閉じた状態へ構造が変化し、あらかじめ修飾しておいた蛍光色素 Cy3、Cy5 間の距離が変化する。この距離変化を反映する蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) によって生じる蛍光をシグナルとして評価したところ、生体外で作製した転写因子の mRNA 濃度を反映したことから、標的 mRNA 測定用 DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサの開発に成功したと結論した。そこで細胞を固定後、DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサを用いて蛍光染色を行ったところ、標的 mRNA のイメージングに成功したことが示唆された。さらに毒素を用いて生細胞内へ DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサ導入し、細胞を固定化後に観察を行ったところ、標的 mRNA のイメージングに成功していることが示唆された。これらの結果は今後のライブイメージングによる遺伝子発現状況評価の実現可能性を強く示唆する結果である。

## (2) 異種細胞間機能協調を評価するための基礎技術開発

インスリンシグナルのオンライン評価システムを開発するにあたり、本研究ではインスリン受容体のインスリン認識メカニズムに着目した。インスリン受容体は  $\alpha$ CT セグメントと L1 ドメインと呼ばれる部位でインスリンを挟み込むようにして認識する。そこで、それぞれの部位を蛍光タンパク質、または蛍光タンパク質と融合した2つのタンパク質をインスリン検出プローブとして作製した。これらのプローブは、インスリン存在下で3分子複合体を形成した場合のみ、蛍光タンパク質と蛍光タンパク質が近接し、生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer; BRET) が生じると期待される(図3)。

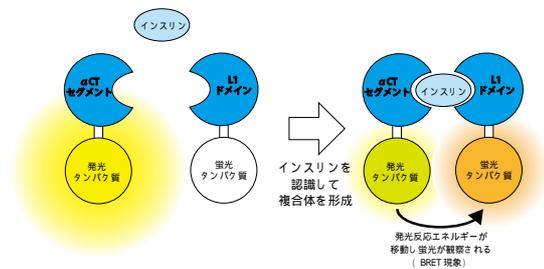


図3 インスリン受容体の標的認識部位を利用した洗浄操作不要のインスリン検出法原理図

プローブとインスリンを混合し、そのまま発光基質を添加する洗浄操作不要のホモジニアスアッセイ方式で BRET 効率を評価したところ、その効率はインスリン濃度依存であった。そこで、インスリン分泌細胞である MIN6 細胞培養中の培養液にこのインスリン検出プローブを添加し、グルコースやインスリン分泌誘導剤で細胞を刺激し、その応答のオンラインモニタリングを行った。その結果、MIN6 細胞のグルコース応答や薬剤効果を反映した BRET シグナル応答が経時的に測定されたことから、インスリンシグナル分泌応答のオンラインモニタリングに成功したと結論した。

以上の様に本研究では、幹細胞から分化した異種系譜の細胞が共存し、それらが協調して機能を発揮する新規細胞デバイス作製に適用可能な、

- ・ 標的幹細胞の遺伝子発現状況を評価し、その状況に応じて標的細胞の転写因子活性を抑制することによって分化を誘導するための基礎技術
- ・ 細胞同士が機能協調していることを評価するための、細胞間シグナル伝達物質であるインスリンをオンラインでモニタリングする基礎技術

の二つの技術開発に成功した。今後は、これらの技術を利用した、新しい生細胞デバイスの開発が期待される。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6件)

1. Hajime Shigeto, Takeshi Ikeda, Akio Kuroda, and Hisakage Funabashi, “A BRET-Based Homogeneous Insulin Assay Using Interacting Domains in the Primary Binding Site of the Insulin Receptor.”, *Anal. Chem.*, 87(5), 2764–2770 (2015), DOI: 10.1021/ac504063x, 査読有り
2. Hisakage Funabashi, Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, and Akio Kuroda, “A FRET-based DNA nano-tweezers technique for the imaging analysis of specific mRNA”, *Analyst*, 140(4), 999-1003 (2015), DOI: 10.1039/C4AN02064B, 査読有り
3. Hisakage Funabashi, Seitaro Oura, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Targeted delivery of a decoy oligodeoxynucleotide to a single ES cell by femtoinjection”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9, 855-863 (2013), DOI: 10.1016/j.nano.2013.03.003, 査読有り
4. 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 単一 ES 細胞の分子制御, 未来材料, NTS 出版, 13(2), 17-23 (2013), 査読なし
5. Hisakage Funabashi, Yuki Sugimoto, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, “A femto-injection technique for dynamic analysis of protein function in living ES cells”, *Biotechnol. Lett.*, 34(7), 1257-1262 (2012), DOI: 10.1007/s10529-012-0922-7, 査読有り
6. Hisakage Funabashi, Shiho Ogino, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, “Utilization of Fluorescent Glucose Analog 2-NBDG as a Metabolic Indicator for FACS analysis during ES Cell Differentiation”, *Electrochemistry*, 80(5), 299-301 (2012), DOI: 10.5796/electrochemistry.80.299, 査読有り

### 〔学会発表〕(計 25件)

#### 招待講演 (国際学会)

1. Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Femtoinjection Technique for The Analysis and Regulation of Target-single-living ES cells”, 5th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, Nov. 9-12 (2011), International Convention Center (ICC), Jeju, Korea

#### 招待講演 (国内学会)

2. 生体機能を利用したバイオセンシング分子の開発, 舟橋久景, 第 61 回中国四国産学連携化学フォーラム, 2015 年 4 月 10 日, 広島大学東広島キャンパス
3. DNA ナノピンセット構造体を利用したバイオセンシング, 舟橋久景, 2014 年電

気化学秋季大会, 2014 年 9 月 27 日, 28 日,  
北海道大学高等教育推進機構, 札幌

#### 国際学会

4. Hisakage Funabashi, “Detection of Inter/intra Cellular Response by Biofunctional Material-based Sensors”, 2nd Hiroshima International Symposium on Sustainable Sciences, Nov. 6 (2014), Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan
5. Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, Akio Kuroda, Hisakage Funabashi, “Development of FRET-based DNA Nano-tweezers for Glucose Transporter Gene Expression Analysis”, 2nd Hiroshima International Symposium on Sustainable Sciences, Nov. 6 (2014), Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan
6. Hideki Koike, Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Feasibility Study of Dual-FRET Molecular Beacon for the Dynamic Analysis of Oct3/4 mRNA in ES Cells”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science (PRiME 2012) Joint international meeting: 222nd Meeting of ECS - The Electrochemical Society and 2012 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, Oct. 7-12 (2012), Honolulu, Hawaii, USA
7. Seitaro Oura, Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Suppression of an Oct3/4 Transcription Activity in ES Cells by Decoy DNA Femtoinjection”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science (PRiME 2012) Joint international meeting: 222nd Meeting of ECS - The Electrochemical Society and 2012 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, Oct. 7-12 (2012), Honolulu, Hawaii, USA
8. Toshiaki Tanaka, Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Production of a Differentiation Regulating Protein to Be Femtoinjected into ES Single-Cells”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science (PRiME 2012) Joint international meeting: 222nd Meeting of ECS - The Electrochemical Society and 2012 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, Oct. 7-12 (2012), Honolulu, Hawaii, USA
9. Shota Hisatomi, Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Dynamic Properties of Fluorescent Reporter Proteins Femtoinjected into ES Single-Cells”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science (PRiME 2012) Joint

international meeting: 222nd Meeting of ECS - The Electrochemical Society and 2012 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan, Oct. 7-12 (2012), Honolulu, Hawaii, USA

10. Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, "Femtoinjection Technique for Single-living ES Cell Research, Hiroshima International Symposium on Sustainability Sciences, Mar. 8 (2012), Hiroshima University, Higashihiroshima.

#### 国内学会

11. インスリン受容体の標的認識部位を利用した洗浄操作不要のインスリン検出法開発, 重藤元, 池田丈, 黒田章夫, 舟橋久景, 日本化学会第94春季年会, 2015年3月26日~29日, 日本大学 船橋キャンパス
12. DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサを用いた標的 mRNA の in situ イメージング, 舟橋久景, 中司圭亮, 重藤元, 黒田章夫, 電気化学会 第81回大会, 2014年3月29日~31日, 関西大学千里山キャンパス
13. DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサを用いたインスリン刺激に対する遺伝子発現応答のイメージング, 重藤元, 中司圭亮, 黒田章夫, 舟橋久景, 日本化学会第94春季年会(2014), 2014年3月27日~30日, 名古屋大学東山キャンパス
14. DNA ナノピンセット構造を利用した特異 mRNA の蛍光検出法開発, 舟橋久景, 中司圭亮, 重藤元, 黒田章夫, 2013年日本化学会中国四国支部大会, 2013年11月16日, 17日, 広島大学東広島キャンパス
15. 生細胞内応答を観る技術開発 - 生細胞機能の利用を目指して -, 舟橋久景, 広島大学サステナブル科学シンポジウム「資源の持続的活用に貢献するサステナブル科学」, 2013年11月8日, 広島大学東広島キャンパス
16. Hes-1 mRNA 検出用DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサの開発, 舟橋久景, 中司圭亮, 重藤元, 黒田章夫, 斉藤美佳子, 松岡英明, 2013年電気化学秋季大会, 2013年9月27日, 28日, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京
17. グルコーストランスポーター遺伝子発現挙動解析のための DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサ開発, 重藤元, 中司圭亮, 黒田章夫, 舟橋久景, 日本生物工学会2013年大会, 2013年9月18日~20日, 広島国際会議場, 広島
18. 標的 mRNA 測定のための DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサの開発, 舟橋久景, 重藤元, 黒田章夫, 斉藤美佳子, 松岡英明, 電気化学会 第80回大会, 2013年3月29日~31日, 東北大学川内キャンパス
19. 細胞機能を利用するスーパーバイオデバイス作製に向けた技術開発, 舟橋久景, 広島大学サステナブル科学シンポジウム

サステナブル科学による次世代エネルギーシステムへの貢献 - 生命科学・物質科学からのアプローチ -, 2012年11月16日, 広島大学東広島キャンパス

20. decoy DNA インジェクション法による ES 細胞内の Oct3/4 遺伝子の転写活性抑制, 大浦誠太郎, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 電気化学会 第79回大会, 2012年3月29日~31日, アクトシティ浜松
21. Oct3/4 発現系の ES 細胞内環境を考慮した動的挙動解析, 小池秀樹, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 電気化学会 第79回大会, 2012年3月29日~31日, アクトシティ浜松
22. 蛍光レポータータンパク質の単一 ES 細胞内における動的特性評価, 久富祥太, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 日本化学会 第92春季年会, 2012年3月25日~28日, 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス
23. 単一 ES 細胞内への分化制御関連タンパク質の導入, 田中利明, 杉元侑樹, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 日本化学会 第92春季年会, 2012年3月25日~28日, 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス
24. Decoy DNA 法による単一生 ES 細胞の特異的転写調節, 大浦誠太郎, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 2011年電気化学秋季大会, 2011年9月9日~11日, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター, 新潟
25. FRET 型 Molecular beacon の単一生 ES 細胞内の標的 mRNA 挙動解析への応用, 小池秀樹, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明, 2011年電気化学秋季大会, 2011年9月9日~11日, 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター, 新潟

#### 〔図書〕(計 1件)

1. Hideaki Matsuoka, Mikako Saito, Hisakage Funabashi, "Functional Control of Target Single Cells in ES Cell Clusters and Their Differentiated Cells by Femtoinjection", Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering, Ed. Michael S. Kallos, INTECH Open Access Publisher, ISBN 978-953-307-278-4, 149-170 (2011).

#### 〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: インスリンの検出方法、および、インスリンの検出キット

発明者: 舟橋久景, 重藤元, 黒田章夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-239348

出願年月日: 2014年11月26日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/hisafuna/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

舟橋 久景 (FUNABASHI Hisakage)

広島大学・サステナブル・ディベロップメン

ト実践研究センター・特任講師

研究者番号：60552429