

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650049

研究課題名(和文) 分化と運動の相関：ノコギリ型により細胞のミクロなゆらぎをマクロな運動へと変換

研究課題名(英文) Correlation between cell migration and differentiation

## 研究代表者

大沼 清 (Ohnuma, Kiyoshi)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50396834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの誘導多能性幹細胞(iPS細胞)は各種の細胞に変化できるが、各種の細胞が勝手に動き回ると制御が難しくなる。ところが、各種の細胞の動きがどのように異なるかは未だに明らかでない。本研究は、細胞を型の中に閉じ込め、かつ様々な条件を一度に観察することにより、各種の細胞の運動の特徴を効率的に調べる事を目標とした。その結果、髪の毛の太さ程度の小さな型の中にヒトiPS細胞を閉じ込める新技術の開発に成功した。またヒトiPS細胞が別の細胞に変化し始めると動きが遅くなるを明らかにした。各種の細胞の動きを知り、それを制御する技術が開発できれば、再生医療に大きく貢献できるだろう。

研究成果の概要(英文)：Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have the ability to differentiate into all types of cells. Letting many types of cells wander around culture dish could lead to out of control behavior, and there are still unknown differences in the movement of various cell types derived from hiPSCs.

In this study, we attempted to restrict the movement of hiPSCs to a specific pattern and to observe cell movement under multiple conditions simultaneously. We succeeded in creating a hair-thin (200 μm in diameter) circular pattern of hiPSCs. We also discovered that the early differentiating hiPSCs move slower than the undifferentiated hiPSCs.

The knowledge about cell movement and the development of the cell-movement regulation technique contribute to future regenerative medical applications.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：細胞 ゆらぎ 幹細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

発生・再生で細胞は、分化するだけでなく、正しい場所へ動いて初めて機能する。つまり、分化と移動が適切にリンクすることが重要。しかし、この2つを結び付ける研究はあまりない。問題は、動きの観測に時間がかかり、多様な条件を一度に試せないことだ。申請者は、既知成分を用いた ES・iPS 細胞の培養で多くの業績が有る。また、連携の豊田と共に、微細加工を用い、細胞が付く足場がノコギリ型だと細胞が一方向に動くことを発見した(下記 1~4)。そこで、この2つを併せれば、分化に伴い細胞の動きの量的・質的(速さ、揺らぎ、記憶)の変化を定量できるとの着想にいたった。

2. 研究の目的

ノコギリ型の3つの条件(隙間・幅・波長)を変えた接着領域を作り、未分化・分化のヒト iPS 細胞、栄養供給細胞が「どちらに動く(たまる)か」を観察し、これらが明確に違う条件を明らかにすることである。

3. 研究の方法

目標を達成するため、初めに基礎研究として以下の2つを行う。  
 (1) 細胞の運動領域を制限するため、細胞を型(微小な2次元パターン)の中に閉じ込めて培養するための再現性良い作製条件。  
 (2) 細胞運動実験のコントロール実験ともなる、自由空間(型を使わずに自由に動ける状態)での細胞の運動特性の解析。  
 以上の2つを元に、本実験の中心課題である、細胞運動が変化するノコギリ型の探索を行う計画であった。

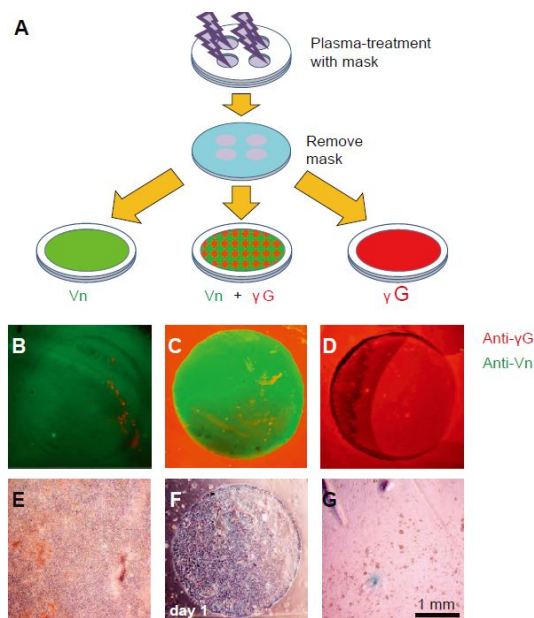


図1：プラズマ処理した後、 グロブリンとビトロネクチン混ぜてコートすると(A中央)、ビトロネクチンのパターンができ(C緑) ヒト iPS 細胞のパターンができた(F)。(雑誌論文2より転載)

4. 研究成果

(1) 細胞接着領域の再現性良い作成条件の探索では、当初に予定していたマイクロコンタクトプリント法のスタンプの作製が困難であったため、代案である物理マスクとプラズマを用いる方法を検討した。プラズマにより親水化のパターン処理した後、細胞接着タンパク質のビトロネクチンをコートすれば、細胞接着のパターンができると予想して実験を進めたが、予想に反して細胞のパターンができなかった。そこで、細胞接着せず疎水性フラグメントをもつ グロブリンを混ぜれば疎水面への接着を阻害できると考え、グロブリンとビトロネクチン混ぜてコートした結果、ヒト iPS 細胞の接着パターンができることが明らかになった(図1、雑誌論文2~4)。

更により細かいパターンを作製する手法の開発を試みた。上記は直径2mmという大きなパターンしか成功していなかったため、直径0.2mmの円形のパターンを作る事に挑戦した。シリコンゴムに穴を空けてプラズマ用のマスクを作製していたのに対し、PMMAにドリルで穴を空けた。また、グロブリンの代わりに入手し易く安価なBSAを用いてみた。その結果、直径200μmの円形領域に数十個のヒト iPS 細胞を閉じ込めることに成功した。一度に100カ所以上の型が作製できるため、効率、再現性ともに非常に良く、細胞の運動観察が容易になった(図2、雑誌論文1)。

(2) 自由空間(型の中ではなく、細胞が自由に動くことができる状態)での細胞運動を調べる実験も平行に進めた。型の中での細胞運動を観察するためのポジティブコントロール実験となる。生細胞の核染色色素のHoechstを用いて細胞の核を染め、タイムラプス(微速度撮影)蛍光顕微鏡観察した。ヒト iPS 細胞を培養するときの栄養供給細胞として使用するマウス繊維芽細胞(MEF)と比べた場合、ヒト iPS 細胞は数分の1以下の速さで運動していることが明らかになった。また、非常に興味深いことに、同じヒト iPS 細胞でも単一細胞が孤立している場合と、集

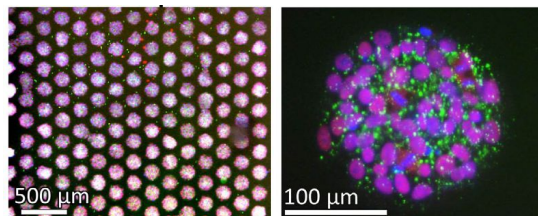


図2：してプラズマ処理と、BSAとビトロネクチン混ぜたコートにより、直径200μmのヒト iPS 細胞のパターンを、未分化マーカーで免疫染色した結果(青は核)。右図で赤紫楕円が細胞の核であり、約60個の全ての細胞が未分化マーカーを発現している。(雑誌論文1より転載)

団を形成して平面コロニーを形成している場合とでは、大きく運動性が違う事が明らかになった。

更に、初期分化させた細胞も同時に比較しながら追跡が可能な系を立ち上げた。2つの培養条件を同時に観察するための専用の培養・観察チャンバーを作製した。これを用い、ヒト iPS 細胞を BMP4 を用いて初期分化した場合と、未分化な場合とを比較した。その結果、未分化な細胞の平均速度が、分化細胞のそれに比べて有意に高い事を発見した(図3、論文準備中)。

本研究課題では、当初予定した細胞接着領域の制御技術が使え無いたことが判明し、代替案を採用したため想定以上に時間がかかり、基本技術である(1)細胞パターンの作製、(2)自遊空間での運動解析、の2つを進めたのみで、当初の予定であるノコギリ型の細胞運動領域を用いての細胞の選別をする研究までは至らなかった。しかし、型内において複数の培養条件で細胞運動を観察する系が確立でき、かつヒト iPS 細胞が分化することにより運動性能が変化する事も発見できたため、遅れはあるものの目標に向けて順調に研究は進んだと言える。

#### 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 4件)

1) Yamada R, Hattori K, Tagaya M, Sasaki T, Miyamoto D, Nakazawa K, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K\*. Plasma-patterned polydimethylsiloxane surface with single-step coating of a mixture of vitronectin and albumin enables the formation of small discs and spheroids of human iPS. *Plasma Medicine*. 2014;4(1-4):165-76.

2) Yamada, R., K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, S. Sugiura, T. Kanamori and K. Ohnuma\* (2014). "Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned

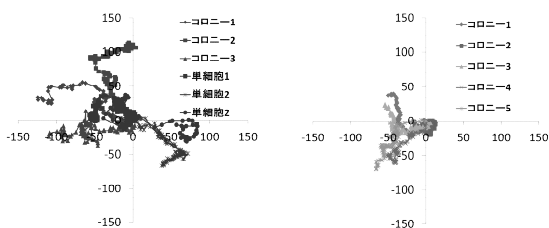


図3：未分化(左)・分化(右)細胞の運動の違い。撮影開始時を原点にとったときの1日の軌跡。

polydimethylsiloxane coated with vitronectin and  $\gamma$ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 118, 315-322 (Sept 2014). (IF 2013 1.737)

3) Ohnuma, K\*, A. Fujiki, K. Yanagihara, S. Tachikawa, Y. Hayashi, Y. Ito, Y. Onuma, T. Chan, T. Michiue, M. K. Furue and M. Asashima (Apr. 2014). "Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations." *Sci. Rep.* 4: 4646. (IF 2014: 5.078)

4) Hattori, K., R. Yoshimitsu, S. Sugiura, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamori (Oct 2013). "Masked plasma oxidation: simple micropatterning of extracellular matrix in a closed microchamber array." *RSC Advances* 3(39): 17749-17754.

[学会発表](計 件)

1) 山本 悠太、加納歩、中村昇吾、大沼清、「タイムラプス撮影による分化・未分化細胞の移動の定量」、再生医療学会、2015年3月20日(パシフィコ横浜)

2) Y. Yamamoto, R. Yamada, K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, D. Miyamoto, K. Nakazawa, S. Sugiura, T. Kanamori, and K. Ohnuma, Discs of human induced pluripotent stem cells on a plasma-patterned polydimethylsiloxane surface following single-step coating with vitronectin and  $\gamma$ -globulin, 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS2014, San Antonio, Texas, USA), pp901-903, October 26-30, 2014

3) 山本悠太・中村昇吾・加納歩・大沼清、「分化・未分化細胞のタイムラプス撮影」、細胞アッセイ研究会、2015年1月13日(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)

4) Ryotaro Yamada, Koji Hattori, Saoko Tachikawa, Motohiro Tagaya, Toru Sasaki, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, and Kiyoshi Ohnuma, Plasma-patterned PDMS Coated with Vitronectin and  $\gamma$ -globulin Enables Patterning of Human iPS Cells, 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5)(May 20, 2014, Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan)

5) 山田遼太郎、服部浩二、太刀川彩保子、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治、金森敏幸、大沼清、プラズマ照射と複合コートによるヒト iPS 細胞の2次元パターンの作製、第21回 HAB 研究機構学術年会(2014年5月16日

～17日、昭和大学・上條講堂、東京)

6) 山田遼太郎、服部浩二、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治・金森敏幸、大沼清、 “ プラズマ処理による、 $\alpha$ -globulin と Vitronectin を使った無血清/無フィーダ培養でのヒト iPS 細胞パターン作製 ” 細胞アッセイ研究会・細胞アッセイ技術の現状と将来 ( Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay )(Tokyo, 25 Nov 2013)

7) K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura\*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamori, MASKED PLASMA OXIDATION METHOD AS A SIMPLE MICROPATTERNING OF EXTRACELLULAR MATRIX IN A CLOSED MICROCHAMBER ARRAY, W.031b, micro TAS 2013 (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)

8) Ryotaro Yamada, Koji Hattori<sup>2</sup>, Motohiro Tagaya<sup>3</sup>, Toru Sasaki<sup>4</sup>, Shinji Sugiura<sup>2</sup>, Toshiyuki Kanamori<sup>2</sup>, Kiyoshi Ohnuma\*, Patterning of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Patterned Plasma Treatment on a PDMS Surface Followed by Composite Protein Adsorption, IEEE, 24th 2013 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2013) 12 Nov 2013 Nagoya University 口頭

9) Ohnuma K\*, Motility Control of Neuronal and Human iPS Cells under Serum- and Feeder-Free Culture Condition, 688, Mini Symposium at The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '13), July 3-7, 2013, Osaka Japan 口頭

10) Ohnuma, K., Fujiki, A, Koike, S, Hayashi, Y, Ito, Y, Onuma, Y, Chan, T, Michiue, T, Furue, M K., Asashima, M, ENZYME FREE PASSAGE OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS, International Society for Stem Cell Research (ISSCR 2013)(Boston, MA, USA, 14 June 2013)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 清 (Kiyoshi Ohnuma)

長岡技術化学大学・技学研究院・技術化学  
イノベーション専攻  
研究者番号：50396834

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

豊田 太郎 (Taro Toyota)

東京大学・大学院・総合文化研究科

研究者番号：80422377