

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21360400

研究課題名（和文）

磁気細胞パターンニングによる1細胞機能解析法の確立

研究課題名（英文）

Research on single cell function analysis by magnetic force-based cell patterning

研究代表者

本多 裕之 (HONDA HIROYUKI)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：70209328

研究成果の概要（和文）：細胞組織や異種細胞との相互作用に基づく1細胞解析を目標に、磁気細胞パターンニング法を用いた細胞の形態・運動などの表現型変化の検出、イメージングと顕微鏡観測等による1細胞分析方法の基盤技術の確立のため、1)簡便な磁気ラベル化法を開発し、2)ペプチドアレイ上での少細胞機能解析の確立、3)画像解析を用いた細胞機能解析法の開発、4)細胞機能解析法の実例としてがん細胞の機能解析などの研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Single cell analysis including cell-cell interaction was studied. Based on magnetic force based cell patterning, gene expression analysis, and image analysis of single cell, the following basic analytical methods were established; 1) simple magnetic labeling method, 2) few cell functional analysis on peptide array, 3) cell function assessment by image analysis, and 4) single cell function analysis of tumor cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：磁性微粒子、細胞アレイ、1細胞解析、パターンニング、微細加工

1. 研究開始当初の背景

細胞の機能評価による正確な疾患診断望まれている。がんは組織の不均質性（Heterogeneity）による多様性の評価が困難であり、転移能や抗がん剤の正確な評価には、他の細胞との相互作用が評価でき、多数の抗がん剤との相互作用が評価できるmassiveな1細胞解析が不可欠である。

1細胞解析技術はたくさんの研究者が研究している。しかし、その多くは、マイクロポンプを用いた流れ系であり、また特殊な表面加工を施したマイクロセルを使ったコンパートメント方式であり、単層細胞層とがん

細胞、がん細胞層と樹状細胞といった生体内の細胞間相互作用を解析できる手段ではない。

がん細胞の転移浸潤能は、多孔性のトランスウェルを通過する細胞の個数で評価されているが、1細胞での評価ではない。抗がん剤の評価も多細胞では行われるが、生体内を模倣した接着面や細胞層への接着を許した状況での1細胞解析は皆無である。

我々は、下記のような基盤技術を確立している。①分散性の高いナノ磁性微粒子（MCL; Magnetite Cationic Liposome）の開発と細胞の飲作用を使った細胞を磁気ラベル法、②

磁気ピンホルダー（剣山）デバイスの作製と、③磁気ラベルした細胞を孤立分離して細胞機能を観察できる方法、また、④細胞接着ペプチドのスクリーニング技術などである。そこで、これらの成果を有機的につなげることで、他の研究者ではなしえない“細胞間の相互作用の観測評価に基づく1細胞機能解析法の確立”を目指し、本研究を実施した。

2. 研究の目的

細胞組織や異種細胞との相互作用に基づく1細胞解析を目標に、磁気細胞パターンング法を用いた細胞の形態・運動などの表現型変化の検出、イメージングと顕微鏡観測等による1細胞分析方法の基盤技術の確立のための基盤技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

具体的には下記の実験方法で実施した。

- (1) 簡便な磁気ラベル化法の開発：1細胞の効率的な機能解析を実行するために、磁性微粒子を混和して短時間で磁気ラベルできる簡単な導入方法を検討した。
- (2) マイクロ磁場制御技術の開発：すでに開発している磁化ピンホルダー（磁気剣山）デバイスを改良してプラットフォームの大きさや形状を変え、悪性黒色腫（メラノーマ）細胞を対象に1細胞磁場制御技術の開発を目指した。
- (3) ペプチド修飾表面での細胞の種類識別：これまでに探索した細胞接着ペプチドを元にして配列置換を実施し細胞接着を評価し、画像処理も組み合わせて細胞の識別を検討した。
- (4) 磁気細胞パターンングによる1細胞機能計測：(2)で検討した細胞パターンング法を使い、抗がん剤の応答性の違いを1枚の培養器材で定量評価できる方法の開発を目指した。遺伝子発現解析方法の開発を行った。
- (5) ペプチドアレイ上での1細胞解析：ペプチド固定ガラス表面の作製を検討し、培養と形態変化の検出について検討した。
- (6) 画像解析を用いた細胞機能解析：細胞画像情報から形態特徴量を抽出し細胞機能が評価できる方法の開発を目指した。
- (7) 細胞機能解析法の実例：実際の具体例として抗がん剤を用いたがん細胞の機能解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 簡便な磁気ラベル化法の開発：1細胞の効率的な機能解析を実行するために、磁性微粒子を混和して短時間で磁気ラベルできる簡単な導入方法を検討した。様々な細胞種で検討したところ、細胞数に関わらず、培地中でもトリプシン処理中でも、 $10 \mu\text{g/ml}$ (100pg/cell)の濃度になるようにMCLを

ただ添加するのみで、すぐに1,000個程度の少量の細胞に対して十分な磁気誘導効果が得られることを見出した。この結果を学術誌に発表した（図1）。

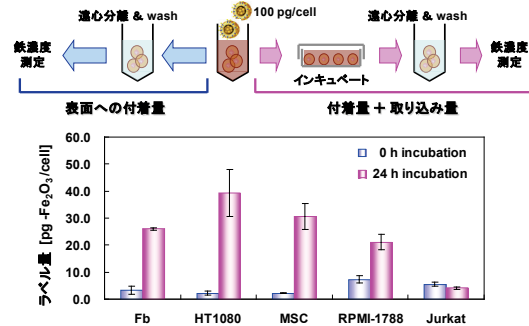


図1 MCLによる簡便な磁気ラベル法

- (2) マイクロ磁場制御技術の開発：すでに開発している磁化ピンホルダー（磁気剣山）デバイスを改良してプラットフォームの大きさや形状を変え、悪性黒色腫（メラノーマ）のアレイ状配置に成功した。また細胞をマトリゲル状に播種しコラーゲンゲルで埋包する（図2）ことで、3次元細胞浸潤評価アレイを構築し、4種類のメラノーマの浸潤能力の違いを明らかにした（図3）。

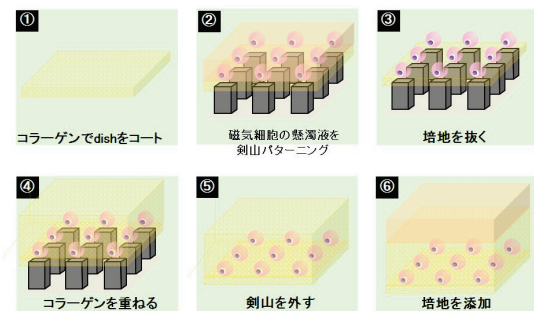


図2 コラーゲン埋包による3次元浸潤評価

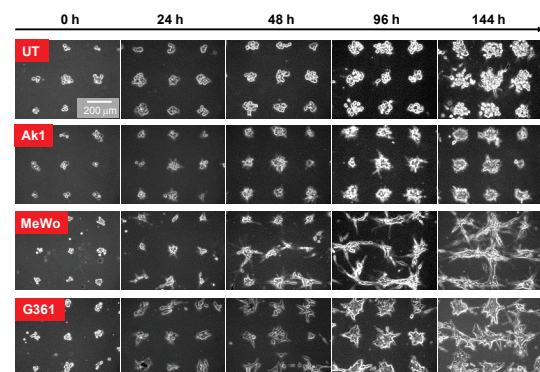


図3 4種類のヒトメラノーマ細胞の浸潤

- (3) ペプチド修飾表面での細胞の種類識別：これまでに探索した細胞接着ペプチドを元にして配列置換を実施し細胞接着を評価した。その結果、PRYD および GKKG ペプ

チドのインテグリンの種類が違うことが明らかになった。細胞特異的ペプチドの候補になると示唆される。また、この2種類のペプチドを混合させ血管内皮細胞の形態を観察したところ、血管新生阻害能を發揮することがわかった (図4)。

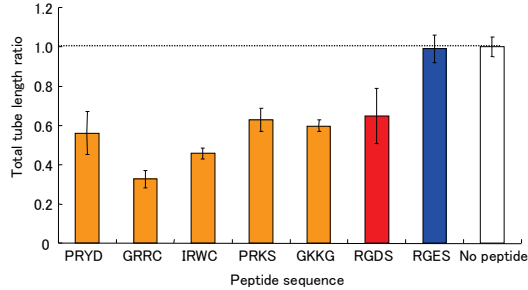


図4 残基置換ペプチドによる血管新生阻害

(4) 磁気細胞パターンニングによる1細胞機能計測：細胞パターンニング法を使い、細胞の浸潤を蛍光顕微鏡と画像解析で検出した。共焦点レーザー顕微鏡で深さ方向への浸潤能力が評価できることを明らかにし、画像解析により経時的かつ定量的に浸潤評価できることを示した (図5)。

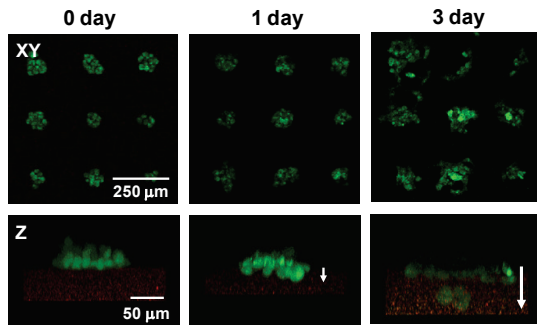


図5 メラノーマ(Sk-mel-118)の浸潤評価

(5) ペプチドアレイ上での1細胞解析：ペプチド固定ガラス表面での培養と形態変化について検討した。肥満細胞 (RBL-2H3) の抗DNP-IgE 刺激による脱顆粒反応に注目した。わずか500細胞/wellの条件でカルシウムインジケータ (Fluo-4,AM) によるカルシウム流入が検出でき、またDNP-BSA 40ng/mlで抗原刺激を抑制できた (図6)。この結果は、少数のパターンニング細胞でも細胞機能が検出できることを示唆している。

また、同時に2種類のIgE 刺激による脱顆粒反応に注目した。Fmoc-Lys(ivDde)-OH (正式名称：N- α -Fmoc-N- ϵ -1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl-L-lysine)を固相に固定化し、Fmoc基側とivDde基側に別々の抗原ペプチドを合成することに成功した。また固相に結合する抗原濃度を0.025mMから250mMまで変えることで、1分子のFmoc-Lys(ivDde)-OHに起因す

る脱顆粒反応を検出することに成功した (図7)。ピンホルダーデバイスとの位置合わせは実施できなかったが、nLオーダーのスポットティング装置は導入したので基盤技術は確立できた。

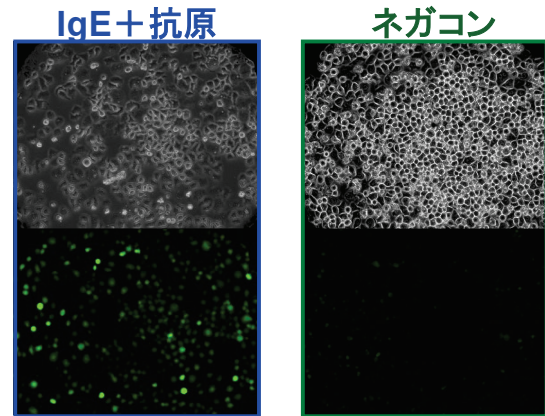


図6 RBL-2H3細胞500細胞/wellでの抗原刺激応答検出 (抗原：DNP-BSA、40ng/ml)

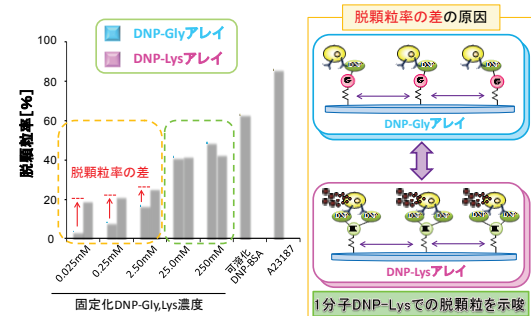


図7 Fmoc-Lys(ivDde)-OHを用いた2種類抗原刺激による脱顆粒反応検出

(6) 画像解析を用いた細胞機能解析：ヒト線維肉腫細胞HT-1080に対してRhoA siRNA、Rac1 siRNAを遺伝子導入し、その細胞機能変化が画像解析で検出可能であることを確認した (図8)。

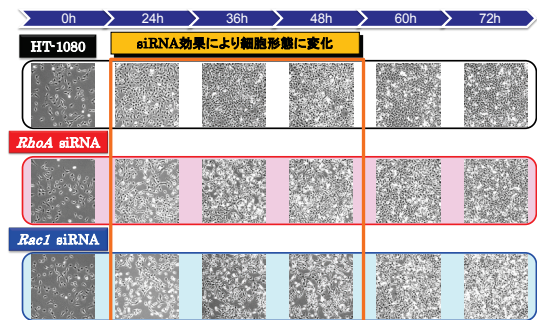


図8 siRNAによる発現抑制と細胞形態変化

また、実際に、位相差画像を重回帰分析した結果、Ell.form factor(楕円形度)の0hから48hの変化量で最も違いが現れることが分かった (図9)。さらに、複数種類の間葉系幹細胞

胞の分化形質に関わる画像解析を実施した。k-means クラスタリングで 10 グループに分けることで、脂肪細胞や軟骨細胞への分化を、培養時に識別できることが判明した(図 10)。

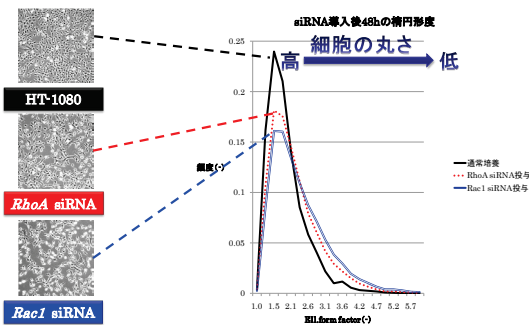


図 9 楕円形度による細胞形態評価

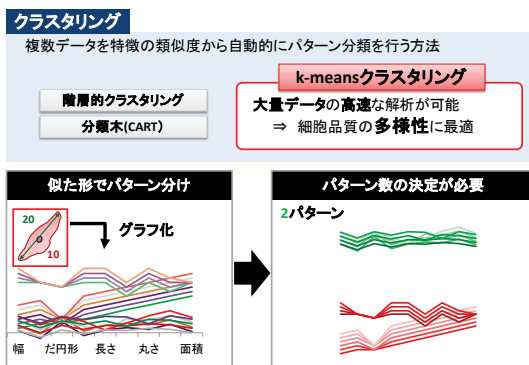


図 10 細胞画像の k-means クラスタリング

(7) 細胞機能解析法の実例開発 (がん細胞の機能解析) : 各種がん細胞の磁気ラベルを行い、磁気剣山状アレイを用いマイクロ磁場制御でパターンニングし、コラーゲンゲルで包埋して 3 次元培養し、ゲル内の浸潤増殖を評価した。各種のがん細胞で磁気パターンニングに成功し、間質細胞との混合培養系の構築にも成功した。また、間質細胞がある場合、抗がん剤に対する応答が変わり、増殖は抑えられるものの、細胞から多数の細い足(糸状仮足)が伸びていることがわかり、新しい細胞現象を見出したと思われる(図 11)。

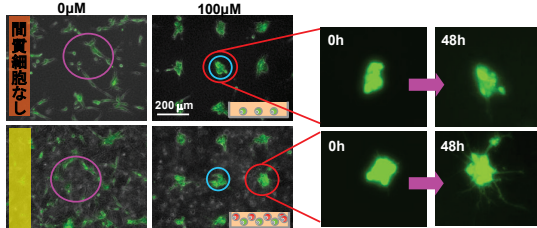


図 11 間質細胞混合系の抗がん剤影響評価 さらに細胞をパターンニングした培養器の中心に、抗がん剤封入エマルジョンを配置し、薬剤感受性を調べた。この方法で、薬剤濃度を 1000 倍以上変化させることができること

を明らかにした(図 12)。

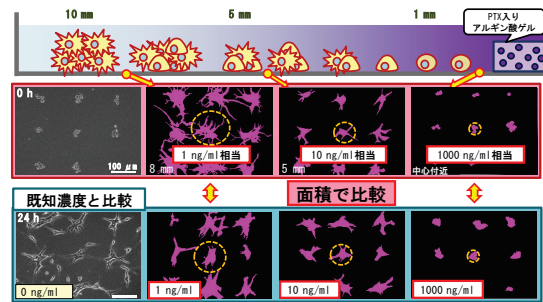


図 12 抗がん剤(パクリタキセル)封入ゲル配置による薬剤感受性評価

メラノーマ細胞に注目し、磁気剣山状アレイを用いたコラーゲンゲル包埋による 3 次元パターンニング培養を実施し、薬剤(NPrCAP、チロシナーゼ阻害剤)による感受性の IC50 値が 0.7mM 程度であることを見出した。間質細胞(マウス線維芽細胞 3T3)との混合培養系で、細胞塊からの遺伝子発現解析法も確立した。間質細胞シート上にヒトメラノーマ細胞 M-1 をアレイ配置することで、浸潤能が顕著に亢進し、IL-8 の発現量が 10 倍以上増加することを見出した(図 13)。

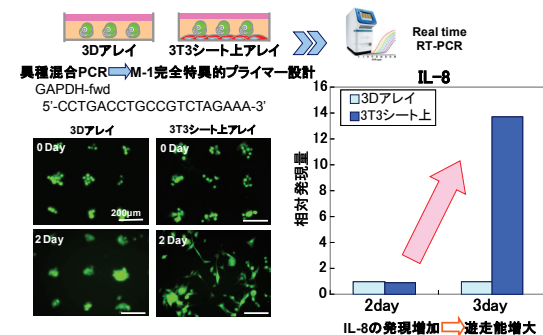


図 13 細胞アレイでの遺伝子発現検出

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 1 件)

- ① Hiroshi Ito, Ryuji Kato, Kousuke Ino, Hiroyuki Honda : Magnetic manipulation device for the optimization of cell processing conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **109**(2), 査読有, 182-188 (2010) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.07.006

[学会発表] (計 13 件)

- ① 松村 拓, 大河内美奈, 本多裕之 : 磁気細胞アレイによる生体模倣条件下でのがん細胞挙動及び遺伝子発現解析 : 第 6 3

回日本生物工学会大会（東京）
2011.9.26-28

- ② 山本修平、本多裕之、大河内美奈、加藤竜司：磁気細胞パターンニングを用いた薬剤刺激評価系の構築：化学工学会第43回秋季大会（名古屋）2011.9.14-16
- ③ 松村 拓、大河内美奈、本多裕之：磁気細胞アレイによる生体模倣条件下でのがん細胞挙動解析：J A A C T 2011（日本動物細胞工学会）（東京）2011.7.22-23
- ④ 佐々木寛人、加藤竜司、蟹江 慧、塩野博文、紀伊宏昭、魚住孝之、越馬隆治、清田泰次郎、富岡 研、本多裕之：細胞画像解析による継代培養における細胞ダメージ度予測：第10回日本再生医療学会総会（東京）2011.3.1-2
- ⑤ 小出寛展、伊佐治弥生、大河内美奈、本多裕之：磁気剣山状デバイスを用いた単一細胞機能解析：化学工学会第42回秋季大会（京都）2010.9.6-8
- ⑥ 小出 寛展、松村 拓、大河内美奈、本多裕之：3次元細胞アレイによる腫瘍細胞の浸潤評価：化学工学会第75年会（鹿児島）2010.3.18-20

[図書] (計1件)

- ① 本多裕之（共著）「シングルセル解析の最前線」シーエムシー出版、2010年、286

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 裕之 (HONDA HIROYUKI)
名古屋大学・工学研究科・教授
研究者番号：70209328

(2) 研究分担者

大河内 美奈 (OKOCHI MINA)
名古屋大学・工学研究科・准教授
研究者番号：70313301
加藤 竜司 (KATO RYUJI)
名古屋大学・工学研究科・助教
研究者番号：50377884
式田 光宏 (SHIKIDA MITSUHIRO)
名古屋大学・工学研究科・准教授
研究者番号：80273291

(3) 連携研究者なし