

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18672

研究課題名（和文）がん転移に関わる細胞分化機構解明を目的とした細胞-細胞間引張強度測定技術の創成

研究課題名（英文）Development of cell-cell tensile strength measurement technique to elucidate cell differentiation mechanisms involved in cancer metastasis

研究代表者

菊池 将一（Shoichi, Kikuchi）

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：80581579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん転移に関わる細胞分化機構を解明するために、細胞-細胞間引張強度の測定スキームを確立した。細胞間の接着強度を計測するためには、細胞を計測用基板の先端に誘導したものを2つ用意し、それらを繋げて基板先端の細胞同士を接着させる必要がある。したがって、本研究では単一の細胞誘導挙動にフォーカスし、磁石から生じる磁場によって磁性ナノ粒子を取り込ませた細胞を誘導可能な基板形状の最適化を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞特性は細胞接着性と密接に関係しているものの、細胞-細胞間の接着強度をダイレクトに測定する手法は存在せず、ある基板に接着した細胞の強度を擬似的に計測するに留まっている。一方で本研究では、“磁力で誘導した細胞を押さえつけて引っ張る”という新発想を具現化し、接着細胞-細胞間の引張強度計測スキームを構築した。本研究で明らかにした単一細胞誘導に適した基板形状パラメータをもとに、細胞間接着強度計測への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a scheme for measuring cell-cell tensile strength to elucidate the cell differentiation mechanism involved in cancer metastasis. In order to measure cell-cell adhesion strength, it is necessary to prepare two cell-guided objects at the tip of a measurement substrate and connect them to form cell-cell adhesion at the tip of the substrate. Thus, we focused on single cell guidance behavior and achieved optimization of a substrate geometry that can guide cells with magnetic nanoparticles incorporated by a magnetic field generated by a magnet.

研究分野：磁気工学

キーワード：細胞接着 磁気工学 マイクロデバイス 材料強度学

### 1. 研究開始当初の背景

我が国におけるがん罹患数は、2020年代に100万例に達すると予測されている(国立がん研究センター試算)。血球系の細胞を除く大半の細胞は「接着性細胞」であるため、細胞は体内で基材(人体組織)や細胞同士で接着して生存している。そのため、増殖や分化といった細胞特性は細胞接着性と密接に関係しており、例えば、細胞の転移のしやすさは細胞接着力によって変化したり、がん細胞が転移細胞か否かを細胞の接着強度をもとに見分けることができる。したがって、工学的に細胞-細胞間の接着強度を定量化すれば、がん細胞転移や細胞死に関する新たな医学的知見を得ることが可能となる。

しかし、細胞-細胞間の接着強度をダイレクトに測定する手法は存在しない。これは、試験体としての接着細胞-細胞群をチャッキング(試験台に固定)できないという材料強度学的課題に起因している。そのため、細胞を把持しなくてもよい方法として、例えば細胞が接着した培養チャンバに水を流す方法や、カンチレバーを用いて基材に接着した細胞にせん断力を負荷させる方法がある。しかし、いずれの方法においても細胞-基材間の接着強度を擬似的に計測するに留まっている。工学者が現状の課題を解決し、細胞-細胞間強度(細胞膜の破壊強度)を定量測定できれば、がん治療研究への貢献は計り知れない。したがって、細胞-細胞間強度を計測するためのスキームを構築できるか?ということが材料強度学を専門とする研究代表者の問いであり、本研究を行うに至った背景である。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん転移に関わる細胞分化機構を解明するために、細胞-細胞間引張強度の測定スキームの構築を目的としている。材料強度学、マイクロデバイス、磁気工学の技術を融合することにより“磁力でおびき寄せた細胞を押さえつけて引っ張る”という新発想を具現化し、接着細胞-細胞間の引張強度の計測スキーム手法を創成することとした。具体的には、“橋渡し”された2つのマイクロ材料の先端に磁力で誘導・固定した接着細胞群を引っ張り、細胞-細胞間引張強度を計測する仕様である(図1)。細胞の接着強度を計測するためには、単一の細胞を計測用基板の先端へ誘導したものを2つ用意し、それらを繋げて基板先端の細胞同士を接着させる必要がある。そのため、細胞内に磁性ナノ粒子を取り込ませ、磁石から生じる磁場によって単一の細胞誘導を実現可能なマイクロ基板形状の最適化が必要である。

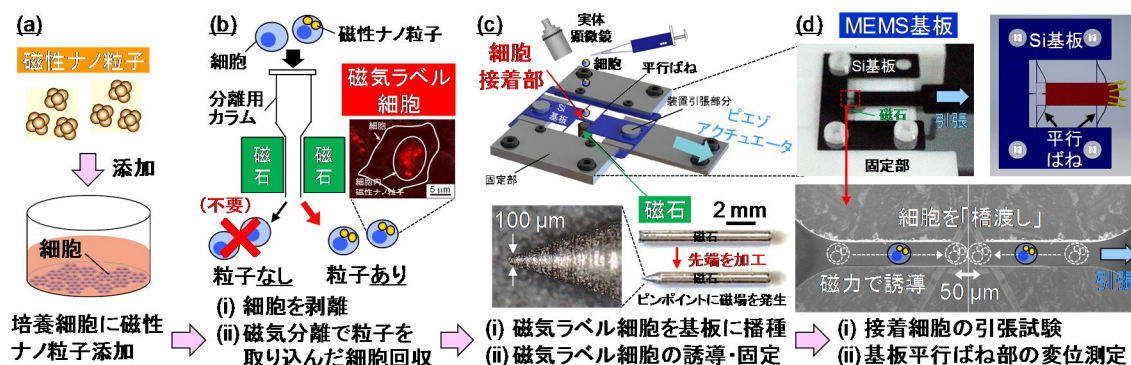


図1 接着細胞-細胞間引張強度の計測スキームの概念図

### 3. 研究の方法

本研究は、培養細胞に磁性ナノ粒子を添加 磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞の回収 磁気ラベル細胞をマイクロ基板に播種 基板先端への細胞誘導、という工程で実施した。

磁性ナノ粒子が細胞培養液中で過剰に凝集することを防ぐため、表面修飾を施した。マグヘマイト( $-Fe_2O_3$ )ナノ粒子を、カチオン性の高分子であるポリエチレンイミン(Polyethylenimine: PEI)で表面修飾した。200 mgの粒子を1 mg/mLのPEI溶液 10mL中に混合し、10分間超音波分散させた後、 $1,000 \times g$ で10分間遠心分離後に上澄みを回収した。その後、 $10,000 \times g$ で30分間遠心分離後に上澄みを除去してPEI修飾磁性ナノ粒子を得た。このPEI修飾 $-Fe_2O_3$ ナノ粒子は、従来研究と同様の手順で表面修飾を行っており、一次粒径が29 nm、凝集した二次粒径が $84 \pm 31$  nmである。

次に、磁性ナノ粒子を導入した細胞を磁氣的に分離した。間葉系幹細胞(MSC, UE7T)を培養し、35-mmディッシュに $1 \times 10^4$  cellになるように準備した。25-1000

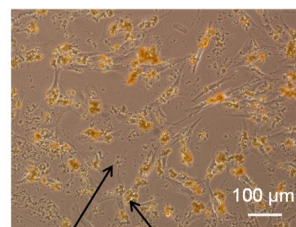


図2 磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞

$\mu\text{g}/\text{dish}$  の条件で磁性ナノ粒子を添加し、24 時間培養後にトリプリン処理を行うことにより細胞を剥離した後、磁気分離キット (Miltenyi Biotec 社) を用いて磁性ナノ粒子を内部に取り込むか表面に付着した細胞を分離・回収した。磁性ナノ粒子を含んだ細胞は磁場に反応するためカラム内に残り、粒子を含まない細胞は流れ出るため、粒子を含む細胞のみを分離可能である。図 2 に、磁性ナノ粒子を添加した細胞の観察結果を示す。

ここで、細胞の引張試験を実施するためには、細胞をマイクロスケールで加工した基板の端に誘導して培養する必要がある。そのため本研究では、細胞を磁性ナノ粒子と磁場を用いて誘導した際の基板上における局在の基板先端形状への依存性を検証した。特に、基板の端に単一細胞を培養する必要があることを考慮し、基板にマイクロ加工技術により突起を設けて、その先端に単一細胞を培養できる条件を検討した。研究開始当初はシリコン基板上で細胞誘導を行うことを想定していたが、取り回し易さの観点から細胞誘導の段階では倒立型の顕微鏡により観察を行うことにした。しかし、倒立顕微鏡では光源と対物レンズの間に基板が挟まれることから、光を透過する透明な基板を用意する必要がある。この点を鑑み、光が透過し強度のある OSTE (Off Stoichiometry Thiol Enes) ポリマーも使用することとした。図 3 に、(a) マイクロ加工を施した基板および (b) 顕微鏡下での細胞誘導実験の様子を示す。

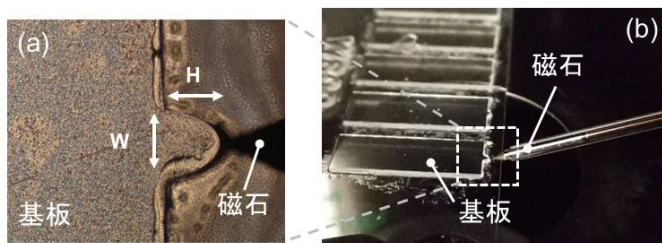


図 3 (a)基板および(b)細胞誘導実験システム

#### 4. 研究成果

図 3(a)に示す「半楕円状の突起の根元の幅  $W$ 」と「根元から先端までの長さ  $H$ 」を、系統的に変化させた。磁性ナノ粒子を細胞に取り込ませた後、磁場による位置操作を可能とした細胞を基板に添加し、基板先端への細胞誘導実験を実施した。顕微鏡下で細胞を観察しながら誘導を可能とするため、マニピュレータを顕微鏡に取り付けて小型の磁石を基板に近づけることによって細胞を誘導した(図 3(b))。その際、単一の細胞誘導を見据え、「根元から先端までの長さ  $H$ 」が極端に長い基板(図 4(a))を用いて実験を行った。図 4(b)に細胞誘導実験結果を示す。同図は、蛍光顕微鏡によって基板上に播種した細胞を観察した結果である。同図より、細胞は基板の先端に到達せず、基板の根元に密集していることがわかる。これは、表面張力によって細胞を含む液体が基板先端まで浸透しないためである。以上から、基板先端まで細胞を含む液体が浸透する基板形状の探索を解決すべき課題として抽出できた。

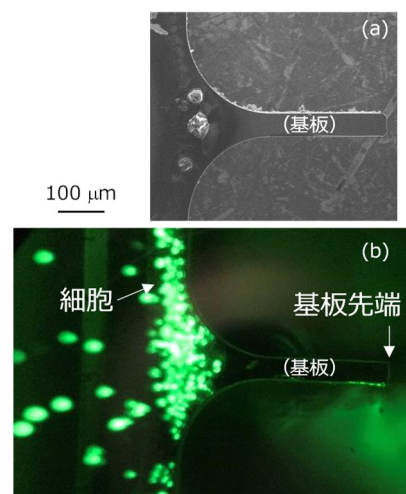


図 4 (a)電子顕微鏡による基板の観察結果および(b)細胞誘導実験結果

そこで、「半楕円状の突起の根元の幅  $W$ 」を増加させた基板を作製し、液体を注入した。その結果、基板先端まで液体が浸透することを確認した。次に、「半楕円状の突起の根元の幅  $W$ 」を  $400\ \mu\text{m}$  まで増加させた基板に対して細胞誘導実験を行った。図 5(a)は光学顕微鏡像、図 5(b)はそれに対応する蛍光顕微鏡像である。同図より、磁石に細胞が誘導され、基板先端に単一の細胞が誘導されていることがわかる(図 5(a))。したがって、本研究の第一の成果は、この細胞誘導試験の実験スキームを確立したことである。また、半楕円状の突起の根元の幅  $W$  は  $200\text{-}800\ \mu\text{m}$ 、「根元から先端までの長さ  $H$ 」は  $20\text{-}640\ \mu\text{m}$  の範囲で系統的に変化させて細胞誘導実験を行った。その結果、 $W=800\ \mu\text{m}$ - $H=80\ \mu\text{m}$  の突起形状が最も先端に細胞が到達しやすいことを明らかにした。このことから、細胞-細胞間接着強度の計測を見据えた基板先端への単一細胞誘導において、基板突起の最適形状を見出したことが本研究の第二の成果である。

以上から、細胞-細胞間強度(細胞膜の破壊強度)を定量測定するためのスキームを構築するのみならず、そのための基板形状の最適化を達成することができた。今後は、本研究の知見を活かし、細胞-細胞間接着強度の定量化への展開が期待される。

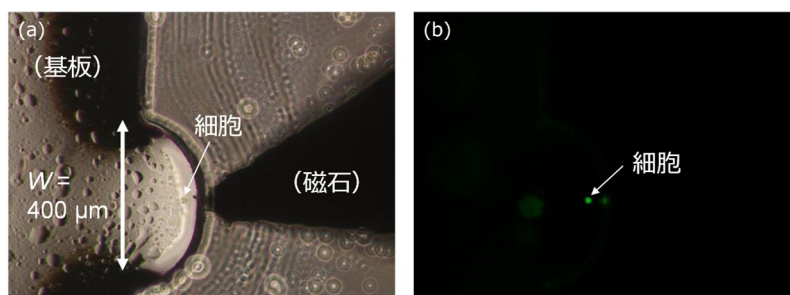


図 5 細胞誘導実験時の(a)光学顕微鏡像および(b)蛍光顕微鏡像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S. Ota, H. Yasuga, Y. Kurashina, K. Nakazawa and S. Kikuchi
2. 発表標題 Evaluation of single-cell manipulation via magnetic force on micromachined substrates
3. 学会等名 The 6th International Conference on Materials and Reliability (ICMR2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学教員データベース <a href="https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=11250&amp;l=0">https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=11250&amp;l=0</a> Google Scholar <a href="https://scholar.google.co.jp/citations?user=JDyyTcYAAAAJ&amp;hl=ja">https://scholar.google.co.jp/citations?user=JDyyTcYAAAAJ&amp;hl=ja</a> researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0151423/">https://researchmap.jp/read0151423/</a> Scopus <a href="https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=15071312000">https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=15071312000</a> ORCID <a href="https://orcid.org/0000-0003-1127-8748">https://orcid.org/0000-0003-1127-8748</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大多 哲史  (Ota Satoshi)  (30774749)	静岡大学・工学部・准教授   (13801)	
研究分担者	倉科 佑太  (Kurashina Yuta)  (40801535)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授   (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------