

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23656520

研究課題名（和文） 幹細胞分化能の網羅的評価に向けた細胞核力学特性計測技術

研究課題名（英文） Measurement of mechanical properties of the cell nucleus for an exhaustive evaluation of stem cell differentiation

研究代表者

松永 是 (MATUNAGA TADASHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・学長

研究者番号：10134834

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞の deformability(変形能)の定量的評価を目的として、単一細胞を高密度に捕捉するマイクロキャビティアレイ基板を利用し、1万個の細胞を同時並列に吸引変形させる測定装置を開発した。さらに、共焦点顕微鏡を用いた細胞の3次元イメージングによりマイクロキャビティアレイ上に捕らえた細胞の3次元画像構築及び輝度・距離の定量的計測方法を確立した。本手法を用いて細胞の deformability を網羅的且つ定量的に計測し、細胞の分化や正常細胞のがん化などの進行度と deformability の相関性について評価した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the microcavity array which enables entrapment of 10,000 single cells with high efficiency was utilized for the quantitative evaluation of cellular deformability. A quantitative measurement procedure of the three dimensional image of the cells trapped on the microcavity array by image analysis using the confocal microscopy was established. Using these techniques, cellular deformability of normal cells and cancer cells were quantitatively evaluated for considering the correlation between their deformability and progress degrees of differentiation or canceration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：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：バイオペレーション

1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞などの幹細胞の樹立を受けて移植医療への期待が高まる中、分化細胞の大量調製法・質の評価法の確立が求められている。幹細胞の分化多能性評価には、多種の細胞表面マーカーが用いられているが、分化状態を把握できる万能マーカーは発見されていない。

一方で、幹細胞の核は終末分化細胞よりも柔軟であり、クロマチン構造や核内タンパク質等の構成が異なることが知られている。例

えば、幹細胞に対してマイクロピペットによる細胞吸引を行うと、細胞質と共に核質が変形し、ピペット内部へと陥入する。このような細胞核の変形能は分化進行に伴って低下し、徐々に柔軟性を失う。(Pajerowski et al., PNAS, (2007))。

当研究室では、細胞のサイズや変形性を指標として細胞を分画するマイクロキャビティアレイ基板を開発してきた(Matsunaga et al., Anal Chem., 81, (2009))。基板上にアレイ状に加工された十万個の微細貫通孔を介

して細胞を吸引すると、微細孔(直径 2–8 μm)よりも大きく、変形の小さな細胞は、細胞質の一部が孔内に陥入した形で捕捉される。一方で、微細孔よりも小さいか、変形能が高い細胞であると、孔内に細胞が進入し通り抜ける。この原理を利用して、サイズが大きく変形しにくい上皮細胞由来の腫瘍細胞を血球成分から特異的・効率的に分離する手法を開発した(Matsunaga et al., Anal Chem., 82, (2010))。

2. 研究の目的

本研究では、幹細胞の特徴の一つとして近年明らかにされた細胞の変形能を定量計測する新手法を開発することを目的とした。細胞核の変形能は分化進行に伴って低下し、徐々に柔軟性を失うため、幹細胞分化能の物理的指標の一つとなり得る。この力学特性計測には、研究代表者が独自に開発してきたマイクロキャビティアレイ基板を利用する。本基板の応用により、細胞集団中の単一細胞を微細孔に同時並列に吸引し、細胞核の変形を3次元観察することで核変形を網羅的に計測する。これにより、ヘテロな幹細胞集団内における個々の細胞を deformability(変形能)という新しい概念によって評価・選別する新技術を提案する。

3. 研究の方法

マウス ES, iPS 細胞、造血幹細胞、初代線維芽細胞などの測定を目指し、まずは正常乳腺細胞(MCF-10)および乳がん細胞(MCF-7)の細胞種をモデルとして利用した。これらの細胞株は同じ乳組織に由来するが、細胞骨格タンパク質 F-actin などの発現量の違いから細胞の変形能が異なることが示唆されており、細胞変形能評価モデル細胞として用いられている。これにより、正常細胞とがん化細胞における核変形の差について評価し、本手法の有効性と精度評価を行うこととした。

単一細胞を高密度に捕捉するマイクロキャビティアレイ基板を利用し、 10^4 個の細胞を同時並列に吸引変形させる測定装置を開発した。また、共焦点顕微鏡を用いた3次元イメージング法の検討、核質・細胞質・各種の細胞内骨格タンパク質の染色法についての検討を行った。以上を元に、吸引圧に依存した細胞核および細胞質の形状変化を詳細な画像解析によって、定量的に評価する一連の手法を開発した。

具体的には、以下の様な操作で測定を行った。孔径 3 μm の微細貫通孔を 1.0×10^4 個もつ microcavity array と PDMS 製流路を統合し、細胞捕捉デバイスを構築した(図1)。ヒト乳がん細胞由来株である MCF-7 細胞及び、ヒト乳腺上皮由来株である MCF-10 細胞を CellTracker Green または Orange で染色

した。約 8000 細胞を含む懸濁液を作製した細胞捕捉デバイスに導入し、デバイスの下部から流量 0.2 ml/min で吸引することで微細貫通孔上に細胞を捕捉した。捕捉した細胞を共焦点レーザ走査型顕微鏡にて撮影し、3次元画像処理を行った。その後、孔内に陥入した細胞長を画像解析ソフトウェアにて計測した。

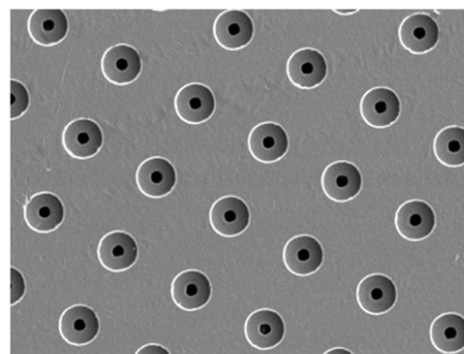


図1 1万孔マイクロキャビティアレイ
孔径: 3 μm .

4. 研究成果

マイクロキャビティアレイ基板材料は、これまで利用してきたプラスチックやニッケル等の金属ではなく、蛍光顕微鏡での観察性に優れた設計・加工の容易なプラスチック基板を用い、レーザ加工により規則的に貫通孔を配置した。孔径 3 μm の microcavity array にごん細胞と正常細胞のモデルとして乳がん細胞 MCF-7 と乳腺上皮細胞 MCF-10 を捕捉した後、共焦点顕微鏡を用いて細胞を観察した。その結果、微細貫通孔内部に細胞の一部が陥入していることが確認された(図2)。

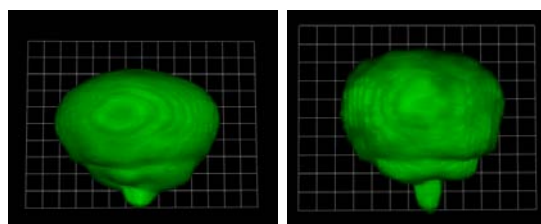


図2 正常乳腺細胞 MCF-10(左)と乳がん細胞 MCF-7(右)の3次元観察像

Z 軸スライスピッチ幅は、3次元構築した画像と照合して最適化を図り、0.1–1 μm とした。得られたスライス像はソフトウェアを用いて3次元画像に再構築し、吸引前後の断面観察像から、核変形量、細胞質変形量などを測定した。マイクロキャビティアレイ状に捕捉された細胞の3次元画像から輝度・距離の定量的計測を行うことで、微細貫通孔内部への細胞の変形陥入長や細胞質と細胞核の

変形長の比などについて、多数の細胞を対象として同時多並行に計測することが出来る。そこで、基板表面から微細貫通孔内に陥入した細胞長を細胞毎に測定し、ヒストグラムを作成して比較した。この結果、細胞に印加する吸引圧が大きくなるほど、細胞の変形は大きくなる傾向がある事が確認された(図3)。捕捉細胞の微細貫通孔内部に陥入した細胞長は、MCF-10 は短く収束した分布となった一方で、MCF-7 の細胞長は長い傾向があり、幅広の分布を示した(図4)。この結果から、がん細胞である MCF-7 細胞は正常細胞 MCF-10 と比較して吸引圧に対して変形を受けやすいことが示唆された。

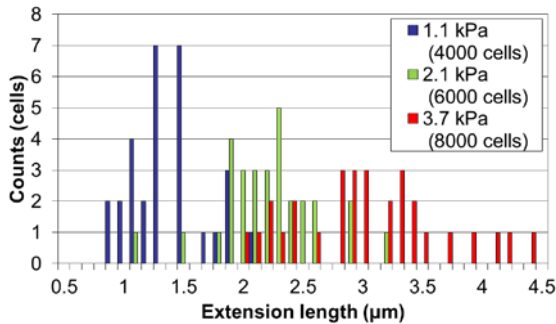


図3 吸引圧と細胞変形長の相関性

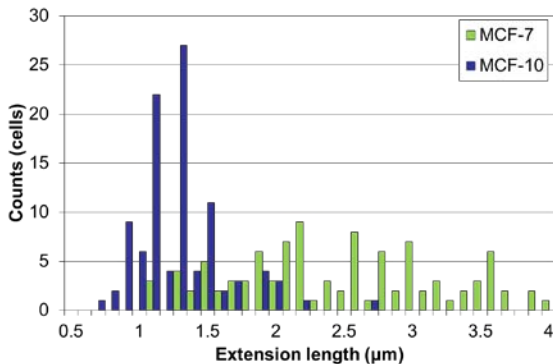


図4 正常乳腺細胞 MCF-10 と乳がん細胞 MCF-7 の変形長の比較

このような変形能の差異は、細胞骨格タンパク質及び核構造タンパク質の発現量に依存すると考えられたため、F-actin および核を染色した細胞の3次元観察を行った。この結果、MCF-7 の場合では細胞質とともに細胞核も吸引圧により変形を受けていること、F-actin の発現量が正常細胞に比べて低いことが確認された(図5)。本技術により、数百から数万個の細胞の変形能を網羅的に解析可能であることが示された。以上より、microcavity array を利用した細胞変形長の測定は、細胞のがん化、がん細胞の悪性度判定への応用が可能であることが示唆された。さらに、技術を高度化することにより幹細胞

の分化進行度の評価指標にも応用可能であり網羅的解析の実現が期待される。

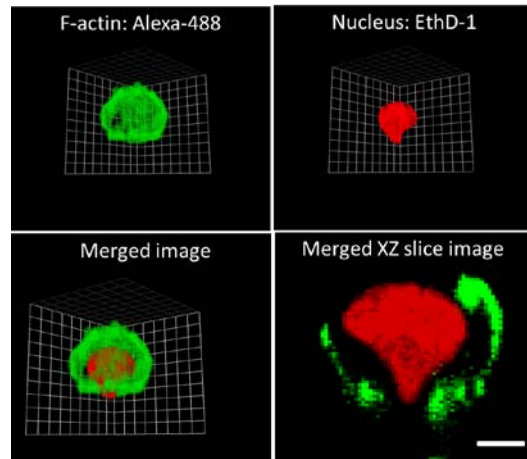


図5 細胞骨格タンパク F-actin 及び細胞核の3次元観察
Alexa-488 標識 Phalloidin 及び EthD-1 にて細胞を染色

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)

Masahito Hosokawa, Marie Asami, Seita Nakamura, Tomoko Yoshino, Noriyuki Tsujimura, Masayuki Takahashi, Satoshi Nakasono, Tsuyoshi Tanaka and Tadashi Matsunaga; "Leukocyte Counting from a Small Amount of Whole Blood Using a Size-Controlled Microcavity Array" *Biotechnol. Bioeng.* (2012) DOI: 10.1002/bit.24471 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 松永是 「Microcavity array を用いた単一細胞集積化技術」日本化学会第92春季年会(招待講演)2012年3月26日 慶応義塾大学
- ② Tadashi MATSUNAGA "Bioelectrochemistry for Health, Environment and Energy" 62nd annual meeting of the International Society of Electrochemistry (招待講演) 2011年9月15日 朱鷺メッセ
- ③ 吉川貴之, 細川正人, 吉野知子, 菊原得仁, 上原寿茂, 金久修, 松永是 「全血からの循環腫瘍細胞濃縮に向けたマイクロフィルター構造の最適化」第63回生物工学会 2011年9月27日 東京農工大学

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 是 (MATSUNAGA TADASHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・学長

研究者番号：10134834

(2) 研究分担者

吉野 知子 (YOSHINO TOMOKO)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30409750

(3) 連携研究者

なし