

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23681028
 研究課題名（和文） in vitro 人工細胞外微小環境の開発とその細胞制御機構解明
 研究課題名（英文） in vitro artificial extracellular microenvironments to investigate the mechanisms of cell regulations
 研究代表者
 亀井 謙一郎（KAMEI KEN-ICHIRO）
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点助教
 研究者番号：00588262

研究成果の概要（和文）：細胞は生体・組織内において、非常に複雑、且つ厳密に制御された微小環境に置かれ、その機能・運命制御が行われている。本研究では、マイクロ流体・ナノテクノロジー技術を用いて人工細胞外微小環境を創出し、ヒト多能性幹細胞の新規制御法の開発を行った。本研究で得られた技術・知見はヒト多能性幹細胞を用いた再生医療・薬剤開発に大きく貢献することになる。

研究成果の概要（英文）：Cells in a body or tissues are placed in cellular microenvironments, and regulated their functions as well as fate decision in a highly regulated manner. In this study, I tried to create artificial cellular microenvironments with microfluidic and nanotechnologies to establish a new regulatory system for human pluripotent stem cells (hPSCs). The obtained results and findings will contribute the advancement of regenerative medicine and drug development using hPSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2012 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,600,000	6,180,000	26,780,000

研究分野：マイクロ・ナノデバイス

科研費の分科・細目：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロバイオシステム、ヒト ES/iPS 細胞、細胞外微小環境

1. 研究開始当初の背景

細胞は、生体・組織内において①成長因子や低分子などの可溶性因子、②細胞外マトリックスなどの不溶性因子、③細胞間相互作用、などで構成される細胞外微小環境に囲まれ、その運命を制御されている(Fig. 1、Discher et al., Science, 2009; Mohyeldin et al., Cell Stem Cell, 2010)。それ故、ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) を制御する際にも、目的組織に最適化した細胞外微小環境を構築する必要がある。

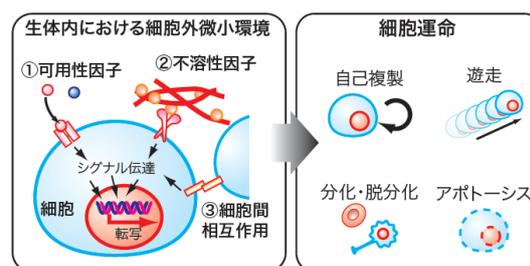


Fig. 1 細胞外微小環境による細胞運命制御

しかし、現在の使用されている培養細胞の実験系(*in vitro*系)では、このような環境の人工的な作製は非常に困難である。これを克服する1つの手段が、微細加工技術により微小空間制御できるマイクロ流体デバイス(μFD)を用いた細胞培養・実験系である。

μFDは細胞生物学において、

①fL~μLスケールの微量液滴の厳密制御

②nm~μmスケールでの微小空間制御

③単一空間内に二~多液層・濃度勾配の作製

④実験の自動化・High-Throughput(HT)化

⑤サンプル量の最小化

などの利点がある。つまりμFDを用いることによって、時・空間制御した多様な微小環境を単一デバイス内に作製でき、それを網羅的に解析することができる。申請者は、現在までにμFDを用いた新規ヒトES/iPS細胞培養・実験系の開発を行ってきた(Kamei, et al., Lab Chip, 2009; Kamei et al., Lab Chip, 2010)。実際にこの利点を利用し、システム生物学解析を通してそれまで見ることができなかったヒトES細胞とiPS細胞の性質の違いを明らかにしている。

さらに、*in vitro*系での細胞外微環境の構築には、連携研究者であるYong Chen教授(京都大学)と劉莉博士(京都大学)の研究が有効である。Chen教授らは、ナノファイバーを用いた細胞足場の作製により、細胞運命制御を可能とする足がかりを得た。本申請ではこれをより実用的なものとするために、多様なナノファイバーを作製・ライブラリー化し、μFD内に取り入れることによって、人工的細胞外微小環境の作製と、メカニズム解明に応用する。

本研究では、マイクロ流体デバイスとナノファイバーを用いて、時・空間制御できる人工細胞外微小環境を創出し、これを用いて細胞運命制御への作用機構を解明していく。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の三項目である。

- (1) 多様な細胞外微小環境を作製・試験できるハイスループットマイクロ流体デバイス(HT-μFD)の開発
- (2) ナノファイバーライブラリーの作製とHT-μFDへの組み込みによる細胞外微小環境ライブラリーの作製
- (3) ヒトES/iPS細胞の自己複製を促進する微小環境の同定とその作用機構の分子生物学的な解析を行う。

3. 研究の方法

上で記した研究背景と申請者が行ってきたこれまでの研究・成果を基に、本研究では、ヒトES/iPS細胞運命の一つである自己複製に着目し、細胞外微小環境によるその制御機構を、マイクロ流体デバイスとナノファイバ

ーを融合して*in vitro*人工細胞外微小環境を開発・駆使することによって解明する。そこで本申請での研究期間内では、以下の項目について研究開発・解明を行う。

- (1) 多種類の細胞外微小環境を解析するHTマイクロ流体デバイス(HT-μFD)の開発
- (2) 材料・系・長さ・密度などを調節した多種類のナノファイバーを作製し、ライブラリーを作製する。
- (3) ナノファイバーライブラリーをHT-μFDに組み込むことによって、多種類の細胞外微小環境を作製する(細胞微小環境ライブラリー)。
- (4) 作製した多様な細胞外環境ライブラリーの中から、ヒトES/iPS細胞の自己複製に促進的に作用するものを同定する。
- (5) 同定した細胞外微小環境によるヒトES/iPS細胞自己複製への作用機構を解明するために、遺伝子発現、タンパク質発現、エピジェネティクス変化など多角的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究では、申請書にある研究計画に沿って、ハイスループットマイクロ流体デバイス(HT-μFD)の開発を行い、それに成功した。また、多種のナノファイバーをHT-μFDに組み込む研究にも成功しており、現在その結果に基づき、投稿論文を執筆中である。また、この開発したHT-μFDを用いて、細胞外微小環境が細胞に与える影響について詳細なメカニズム解析を行なっている。現在、ヒト多能性幹細胞が2次元環境下、3次元環境下において、その遺伝子発現に大きな違いがあることを明らかにしており、その結果に基づいた論文を執筆中である。

(2) また、「そもそもマイクロ流体デバイスに使用する材料はヒト多能性幹細胞に影響を及ぼしていないのか？」という原点に立ち返り、多角的な方法でデバイス作製に通常使用されている材料(PDMSやフォトレジスト)の評価を行った。その結果、幹細胞マーカーのタンパク質発現に関してはあまり影響が確認できなかったものの、遺伝子レベルで評価すると、確実にその材料がヒト多能性幹細胞に影響を及ぼしていることが確認でき、特に中内胚葉系の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった(Fig. 2)。現在、このような材料はBioMEMSやマイクロ流体デバイス作製、及び幹細胞生物学へと応用され始めているが、本研究で指摘した基礎的な部分に注意を払われない場合が多い。特に、本研究では分化系の遺伝子発現の上昇を確認しており、これが後の分化誘導実験に影響を及ぼすのは必然である。このような、細胞に対す

る材料の影響を知ることはこれからの応用研究を考慮すると非常に重要である。これらの結果は国際研究雑誌 *Advanced Healthcare Materials* 上にて発表した。

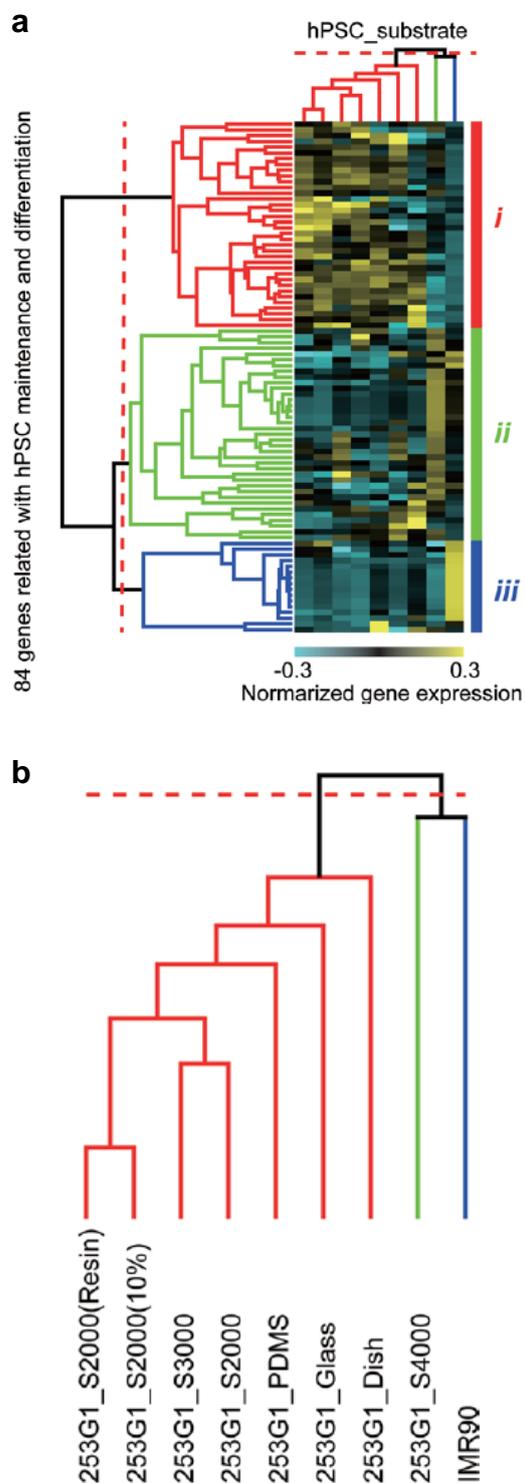


Fig. 2 微細加工技術に使用される材料がヒト多能性幹細胞の遺伝子発現に与える影響。(a) 84 種類のヒト多能性幹細胞に関連する遺伝子発現をヒートマップにて評価。(b) (a)を

基に各基質が遺伝子発現に与える影響の類似性を解析。

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) 査読有り

1. K. Kamei, “Cutting-edge microfabricated biomedical tools for human pluripotent stem cell research” *Journal of Laboratory Automation*. (in press) (Review)
2. K. Khalets kaya, J. Reboul, M. Meilikhov, M. Nakahama, S. Diring, S. Isoda, F. Kim, K. Kamei, R. A. Fischer, S. Kitagawa and S. Furukawa, “Integration of porous coordination polymers and gold nanorods into core-shell mesoscopic composites towards light-induced molecular release” *Journal of American Chemical Society* (Published on line); DOI: 10.1021/ja403108x
3. K. Kamei,^{‡*} Y. Hirai,[‡] Y. Makino, M. Yoshioka, Q. Yuan, M. Nakajima, Y. Chen, and O. Tabata,^{*} “Phenotypic and transcriptional modulation of human pluripotent stem cells induced by nano/microfabrication materials” *Advanced Healthcare Materials*, 2(2), 287-291 (2013); DOI: 10.1002/adhm.201200283 (*Corresponding authors; ‡These authors contributed equally to this work.)
4. S. S. Li, J. Shi, L. Liu, J. J. Li, L. M. Jiang, C. X. Luo, K. Kamei and Y. Chen “Fabrication of gelatin nanopatterns for cell culture studies” *Microelectron. Eng.* (2013); DOI: 10.1016/j.mee.2013.01.053 (in press)

[学会発表] (計 7 件)

1. K. Kamei, Y. Hirai, Y. Makino, M. Yoshioka, M. Nakajima, Q. Yuan, Y. Chen and O. Tabata “Phenotypic modulation of pluripotent stem cells (PSCs) induced by microfabrication materials.” The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS) (2012.10.28-11.02), Okinawa, Japan
2. 金 致源・Diring, Stephane・亀井 謙一郎・北川 進・古川 修平 「錯体フレームワークを用いた光駆動型生体ガス放出材料」日本化学会第 92 春季年会 (2012.03.25~28)
3. 中浜 雅士・Reboul, Julien・亀井 謙一郎・北川 進・古川 修平 錯体フレームワークと生体適合材料の融合による機能性細胞外マトリクスの構築」日本化学会第 92 春季年会 (2012.03.25~28)
4. K. Kamei, Y. Hirai, Y. Makino, L. Liu, Q.

- Yuan, M. Yoshioka, Y. Chen, O. Tabata
“Evaluation of Negative Photoresists on Phenotypes of Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs)” The IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS) (2012.3.8), Kyoto, Japan (Invited lecture)
5. L. Liu, Q. Yuan, J. Shi, X. Li, D. Jung, L. Wang, K. Yamauchi, N. Nakatsuji, K. Kamei, Y. Chen “Electrospun nanofibers for creating artificial cellular microenvironments for culturing mouse embryonic stem cells” 2nd Nanoday Conference (2011.12.11-15), Hawaii, USA
 6. K. Kamei, M. Ohashi, N. A. Graham, Y. Chen, A. T. Clark, O. N. Witte, T. G. Graeber, A. D. Pyle and H.-R. Tseng “Quantitative Cytological Feature Analysis by Microfluidic Image Cytometry Reveals Phenotypic Differences among Human Pluripotent Stem Cell Lines” The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS) (2011), Seattle, WA, USA
 7. K. Kamei, M. Ohashi, N. Graham, L. Liu, Q. Yuan, A. T. Clark, O.N. Witte, T. G. Graeber, A. D. Pyle, N. Nakatsuji, Y. Chen and H.-R. Tseng “Quantitative Cytological Feature Analysis by Microfluidic Image Cytometry Reveals Phenotypic Differences among Human Pluripotent Stem Cell Lines” 9th International Society of Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting (2011), Toronto, Canada

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称 : ファイバー・オン・ファイバーを用いた多能性幹細胞の3次元

培養方法及びそのための基材

発明者: 亀井 謙一郎、中辻 憲夫、劉 莉

権利者: 京都大学

種類: 特願

出願番号: 2013-117242

出願日: 2013年6月3日

国内外の別: 国内

名称: 多能性幹細胞の培養方法及びそのための基材

発明者: 陳 勇、亀井 謙一郎、劉 莉

権利者: 京都大学

種類: 特願

番号: 2012-127580

出願年月日: 2012年6月4日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chen.icems.kyoto-u.ac.jp/>

<http://ken1kamei.wordpress.com/>

1. 亀井 謙一郎、古川 修平「ナノバイオテクノロジーが創出する学際融合研究の場 : 6th Annual Symposium on Nanobiotechnology」実験医学, 31(3), 592-595 (2013)

2. 亀井 謙一郎「ナノメディシン: ナノ粒子の臨床応用に向けて」実験医学, 30(12), 1928-1929 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 謙一郎 (KAMEI KEN-ICHIRO)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・

特定拠点助教

研究者番号: 00588262