

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790031

研究課題名(和文) 標識不要の免疫センサ電極フィルムの創出

研究課題名(英文) Hydrogel-based immunocapture sheet for in vitro evaluation of contraction-dependent myokine secretion in skeletal muscle cells

研究代表者

長峯 邦明(Nagamine, Kuniaki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00551540

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)：筋肉細胞や筋組織に貼り、筋運動による健康効果に関与するホルモン、マイオカイン分泌をその場で検出するパッチ型の免疫補足ゲルシートを開発した。細胞や組織など濡れた表面に安定して貼るための接着剤も併せて開発し、運動する筋肉細胞が分泌するマイオカインの検出、及び分泌領域のマッピングに成功した。本デバイスは筋運動と健康の関連解明に貢献し、運動に基づく予防治療の提案など社会的意義の高い応用展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hydrogel-based immunocapture sheet for in situ detection of myokines secreted from contracting skeletal muscle cell was developed to examine exercise-dependent metabolic regulation. For stable lamination of the immunocapture sheet on wet cell or tissue surface, fibrin-based biocompatible glue was also examined, and showed stable bonding of wet cationic and anionic hydrogels. The soft, molecularly permeable hydrogel-based immunocapture sheet was directly laminated to the skeletal muscle cells and displayed usefully measurable changes in myokine secretion of the muscle cells upon electrically-induced contraction. This hydrogel-based bioassay sheet will allow in vitro study of myokine-dependent regulation of glycemic homeostasis in the body, and will help us to understand the mechanism of exercise therapy for type-2 diabetes.

研究分野：細胞電気化学

キーワード：ハイドロゲル 骨格筋 マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

筋肉組織が体内恒常性維持に不可欠な組織であること、そしてそれが筋肉組織の運動により制御されていることが近年の研究で明らかにされつつある。運動に伴い筋肉組織から分泌されるホルモン分子、マイオカインがその中心的役割を果たし、血流を介して全身の組織の機能を制御し、体内恒常性維持、つまりは人の健康状態を維持していると考えられている。具体的には、マイオカインは、生活習慣病、癌、認知症、うつ病など現在深刻化している多くの病気に深く関連しており、運動によるこれらの疾病の改善例が多数報告されている。そのため筋肉組織は“ホルモン分泌組織”として認識されつつあり、研究が活発化している(2012年のnature reviews endocrinology, 2012, 8, 457.で特集が組まれた)。そのため、筋運動とマイオカインの関連性を明らかにすることは、運動治療に基づく予防医療の提案、老人など運動のできない患者への新規治療薬の開発など社会的意義が大きい応用展開を可能にする。

2. 研究の目的

マイオカインに関し説明すべき点は、「筋運動(強度、頻度、持続期間)とマイオカイン分泌(種類、量)の関連性」、及び「他組織に対する作用」である。本研究では「筋運動」にフォーカスし、組織や培養細胞から分泌されるマイオカインをその場で検出可能なパッチ型センサを開発することを目的とした。

申請者はこれまで、向きを揃えた筋肉細胞のラインパターンをアレイ化したハイドロゲル製培養シートを開発してきた。また、同じくハイドロゲルを基板とする伸縮性電極アレイを開発してきた。筋肉細胞シートを電極アレイに貼り合わせることで、個々の筋肉細胞ラインパターンへの電気刺激条件、つまり運動負荷を変えることを可能にし、1デバイスで種々の運動効果を同時に比較可能とした。またゲルシートの柔軟さのため筋肉細胞の活発な運動をサポートでき、従来の培養シャーレと比較し筋運動を長期に維持できる in vitro 筋細胞アッセイデバイスを構築した。本研究では、本デバイスの電極シート側にマイオカインの分泌をその場で検出する機構を搭載することを目指した。この目的を達成するため、(1)筋肉細胞ゲルシートとマイオカイン検出ゲルシートの接着法、及び(2)マイオカイン検出ゲルシートを開発した。

3. 研究の方法

(1) 筋肉細胞ゲルシートとマイオカイン検出ゲルシート間のウェット接着法の開発

細胞や組織への毒性が無く、濡れたハイドロゲル表面同士を接着させる接着剤としてフィブリンの可能性を検討した。フィブリンは血液凝固に関わるタンパク質であり、モノマであるフィブリノーゲンが静電相互作用

に基づき凝集したものである。この静電相互作用を利用し、電荷を有するハイドロゲル同士の接着を試みた。具体的には、同じ種類の2枚のハイドロゲル間にフィブリンプレポリマ(フィブリノーゲンと凝固促進酵素トロンビンの混合液)を塗布し、37℃で20分間ゲル化させ(図1A)、その後引っ張り試験により接着力を評価した(図1B)。ハイドロゲルには、カチオン性の poly(2-aminoethyl methacrylate) (PAEM)、アニオン性の poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate) (PAMPS)、及び中性の polyacrylamide (PAAm) を用いた。

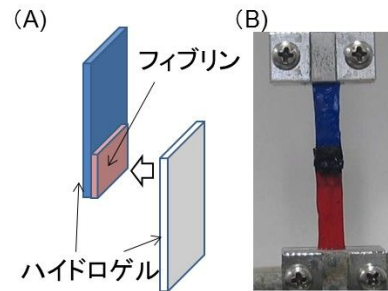


図1 (A)フィブリン接着方法。(B)引張試験による接着力評価の写真。

(2) マイオカイン検出ゲルシートの開発

抗 IL6 抗体修飾ゲルシート作製

本研究では、代表的なマイオカインである IL6(糖尿病予防に関連したマイオカイン)を検出対象とした。IL6 検出ゲルシートは、抗 IL6 抗体修飾したマイクロビーズ(直径 5 μ m)をハイドロゲル表面に固定化することで作製した。具体的には、アミノ基を表面に有するマイクロビーズをアミノ基間架橋剤であるグルタルアルデヒドで処理し、ビーズにアミノ基反応性を付与した。このビーズをガラス基板の上にモノレイヤ状に敷き詰めた後、PAAm ゲルをその上に貼り1晩放置した。これによりビーズがPAAmゲルのアミノ基と反応しゲル表面に固定化される。ゲルとの反応に使われなかった残りのアミノ基反応性部位へ抗 IL6 抗体を固定化し、抗 IL6 抗体修飾ゲルを得た(図2A)。

測定対象となる筋肉細胞は、まず培養シャーレでライン形状(幅 300 μ m)にパターン培養し、その後細胞表面でフィブリンをゲル化・剥離することでフィブリンゲル表面に転写した(図2C, 図4A)。

マイオカインの検出方法

まず、抗 IL6 抗体修飾ゲルが無い状態で、筋肉細胞ゲルシートだけに任意の時間パルス状の電気刺激(電圧 0.7V/mm, 周期 1Hz, パルス幅 2ms)を印加し、筋運動による IL6 の分泌を促した(pre-exercise)。その後、筋肉細胞ゲルシートに抗 IL6 抗体修飾ゲルシートを細胞とビーズが接触するように貼り(図2C, D)、同じ電気刺激をさらに1時間印加し、その間分泌された IL6 を抗体で補足した(図2B)。補足した IL6 は、抗 IL6 抗体修飾ゲル

を筋肉細胞から剥離した後，蛍光修飾 2 次抗体で染色することで可視化した．

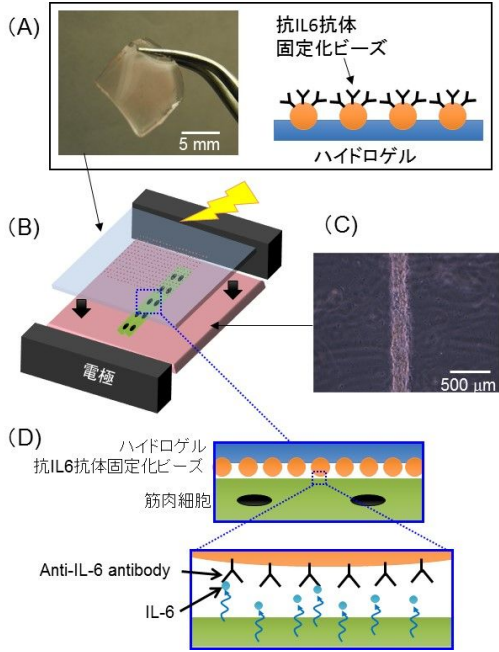


図 2 (A) 抗 IL6 抗体修飾ゲルシートの写真，及びシート表面の模式図．(B) 電気刺激培養のセットアップ．(C) 筋肉細胞ゲルシートの顕微鏡写真．(D) 筋肉細胞ゲルと 抗 IL6 抗体修飾ゲルの接触部の断面図．

4. 研究成果

(1) 筋肉細胞ゲルシートとマイオカイン検出ゲルシート間のウェット接着法の開発

図 3 に，各種ハイドロゲルに対するフィブリンゲルの接着力を示す．カチオン性ゲルの PAEM に対して約 4.3kPa，アニオン性ゲルの PAMPS に対し約 0.3kPa の接着力を示した．一方，中性の PAAm ゲルには接着せず，フィブリンは電荷を有するハイドロゲル同士を接着可能であることが示された．カチオン性との接着力が大きいのは，フィブリンの正味の電荷が負であることに起因すると考えられる．一方，トロンビンとの反応でフィブリンの局所に正電荷が生じることから，微弱ながらもアニオン性ゲルと接着したと考えられる．

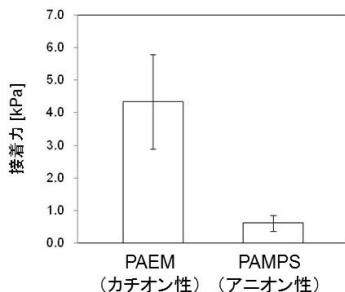


図 3 各種ハイドロゲルへのフィブリンの接着力．

本フィブリン接着剤を用いて筋肉細胞ゲルと伸縮性電極アレイゲルを接着し，培地中

での接着の安定性評価と電気刺激による筋運動制御を実施した．図 4A は筋肉細胞ゲル，図 4B, C は筋肉細胞ゲルを接着した電極アレイゲルの全体，及び側面写真である．電極アレイは，正味電荷が正であるアテロコラーゲンゲルフィルム上に作製した．本接着構造は培地中で 1 週間以上剥離することが無かった．図 4D は 1Hz の電気刺激印加時の筋肉細胞の収縮運動である．刺激パルスの周期に応じた収縮運動を示したことから，本ゲルシートが筋肉細胞アレイの安定した電気刺激培養が可能であることが示された．

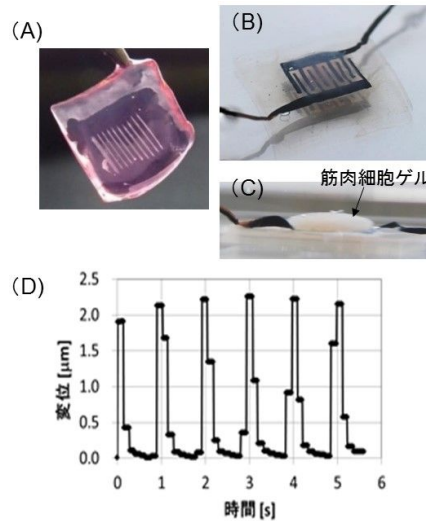


図 4 (A) 筋肉細胞ゲルの写真．(B, C) 筋肉細胞ゲルを接着した電極アレイゲルの全体 (B)，及び側面写真 (C)．(D) 1Hz 電気刺激時の筋収縮運動挙動．

(2) マイオカイン検出ゲルシートの開発

図 5A に 抗 IL6 抗体修飾ゲルで検出した筋肉細胞からの IL6 分泌を示す．各 pre-exercise 時間後に 1 時間 IL6 を補足し，その量を蛍光標識 2 次抗体の輝度で評価した．Pre-exercise 時間の増加に伴い IL6 の分泌量が増加した．IL6 の分泌は約 6 時間の収縮運動後から増加し始めることが過去の論文で報告されていることから，本結果は妥当と言える．以上より，抗 IL6 抗体修飾ゲルが筋肉細胞の分泌する IL6 の検出に有効であることが示された．

図 5B, C は，pre-exercise を 14 時間行った筋肉細胞ラインパターンの顕微鏡写真，及び同じ場所を蛍光標識 2 次抗体処理したときの蛍光イメージである．筋肉細胞のラインパターン近傍のみ蛍光を示したことから，筋肉細胞周囲に分泌されたマイオカインをマッピングするという，これまでに報告例の無い成果を得ることができた．これは，個々の筋肉細胞ラインパターンへの電気刺激条件，つまり運動負荷を変えながら，1 デバイスでマイオカイン分泌を同時に比較可能であることを示唆している．本抗体修飾ビーズはアミノ基を有するゲルに固定化可能であり，上述の伸縮性電極アレイゲル (アテロコラーゲン

フィルムはアミノ基含有)へ固定化も可能である。

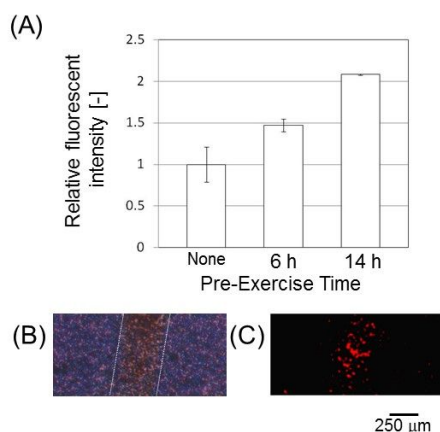


図5 (A) IL6分泌のpre-exercise時間依存性。(B, C) pre-exercise 14時間後の筋肉細胞の写真(B), 及び2次抗体処理した抗IL6抗体修飾ゲルの蛍光イメージ。

以上の成果より、筋肉細胞ゲル、マイオカイン補足ビーズ、及び伸縮性電極ゲルフィルムを貼り合わせて作るマイオカイン分泌アッセイシステムの実現可能性を示すことができた。非標識でのIL6検出に向けた基盤技術を確立できたといえる。

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 3 件)

Kuniaki Nagamine, Kohei Okamoto, Shingo Otani, Hirokazu Kaji, Makoto Kanzaki, Matsuhiko Nishizawa, "Hydrogel-based bioassay sheets for in-vitro evaluation of contraction-dependent metabolic regulation in skeletal muscle cells", *Biomaterials Science*, 査読有, 2巻, 2014, 252-256.

DOI: 10.1039/C3BM60179J

Kuniaki Nagamine, Kohei Okamoto, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, "Bonding of synthetic hydrogels with fibrin as the glue to engineer hydrogel-based biodevices", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, 118巻, 2014, 94-97.

DOI: 10.1016/j.jbiosci.2013.12.024

Masato Sasaki, Bijoy Chandapillai Karikkineth, Kuniaki Nagamine, Hirokazu Kaji, Keiichi Torimitsu, Matsuhiko Nishizawa, "Highly conductive stretchable and biocompatible electrode-hydrogel hybrids for advanced tissue engineering", *Advanced Healthcare Materials*, 査読有, 3巻, 2014, 1919-1927.

DOI: 10.1002/adhm.201400209

〔学会発表〕(計 5 件)

長峯邦明、平田卓也、岡本滉平、梶 弘和、西澤松彦、神経細胞パターンを有するハイドロゲルフィルムの開発と細胞機能評価、2014年 電気化学会秋季大会、2014年9月27日、北海道大学(北海道、札幌市)。

Kuniaki Nagamine, Kohei Okamoto, Takuya Hirata, Hirokazu Kaji, Makoto Kanzaki, Matsuhiko Nishizawa, "Hydrogel film with skeletal muscle cell micropatterns to develop the soft fluidic tube of the perfusion culture system", *Micro-TAS 2014*, Oct.27, 2014, 査読有, San Antonio, Texas, USA.

長峯邦明、岡本滉平、梶 弘和、神崎 展、西澤松彦、ハイドロゲル間接着法による筋細胞電気刺激デバイスの構築、2014年 電気化学会第81回大会、2014年3月29日、関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市)。

長峯邦明、岡本滉平、梶 弘和、神崎 展、西澤松彦、センサ分子修飾ハイドロゲルによる骨格筋細胞の代謝活性イメージング、2013年 電気化学会秋季大会、2013年9月27日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)。

Kuniaki Nagamine, Kohei Okamoto, Hirokazu Kaji, Makoto Kanzaki, Matsuhiko Nishizawa, "Hydrogel-based imaging sensor for the assay of exercise-dependent metabolic regulation in skeletal muscle cells", *The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS 2013)*, Oct. 27-37, 2013, 査読有, Freiburg, Germany.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

東北大学・大学院工学研究科 西澤・梶研究室
ホームページ：
www.biomems.mech.tohoku.ac.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長峯 邦明 (NAGAMINE, Kuniaki)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：00551540