

図 2 2 (a) チップ内部の細胞ローリングを横から観察したときの図、(b) チップ内部の細胞ローリングを上から観察した時の図 (c-e) マイクロチップ内部で観察された細胞ローリングの様子 (上から見た様子)

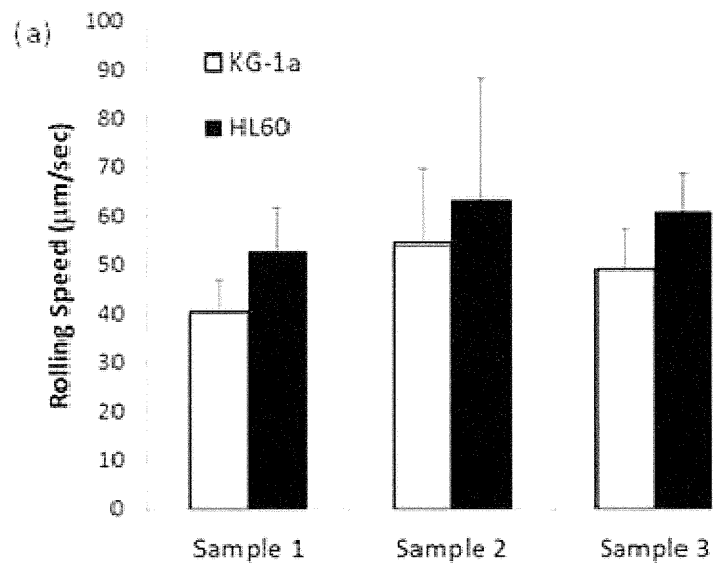


図 2 3 3 種類のパリマーでコートされた流路内部における KG-1a 細胞と HL-60 細胞のローリング速度の定量結果

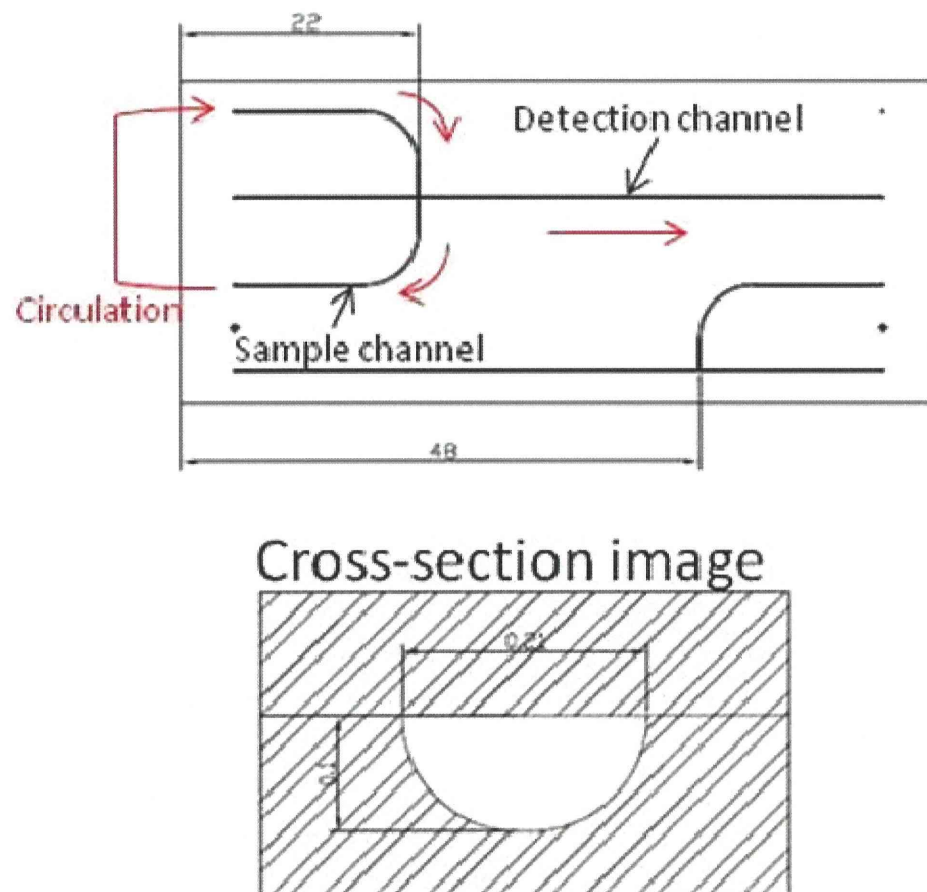


図2-4 交差型マイクロ流路の設計 (Sample Channel に検体となる細胞懸濁液を循環させ、Detection Channel には交差部分にある細胞懸濁液が一度に流れることで、細胞ローリングを一定の細胞数で誘起できる)

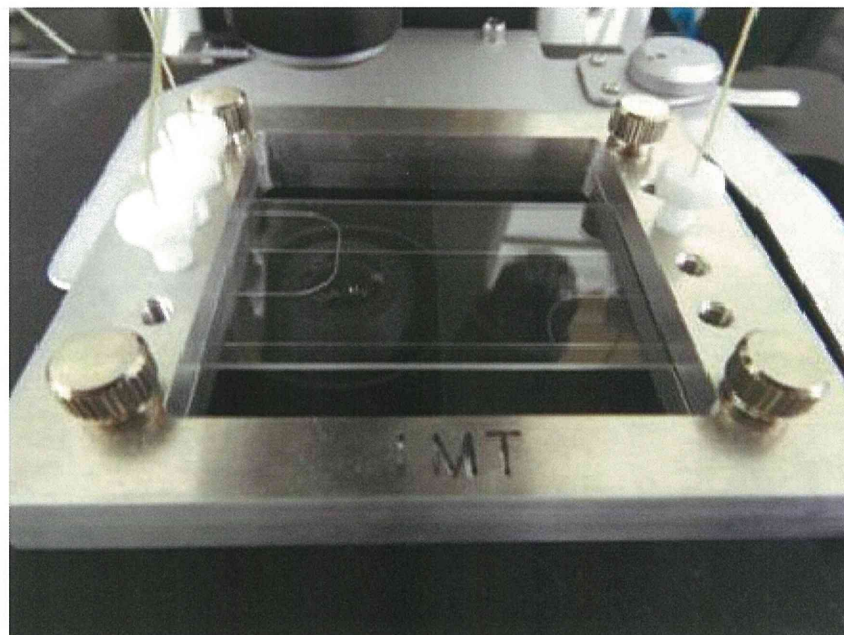


図25 交差型マイクロ流路の外観（各チャンネルに PEEK 製のマイクロチューブを接続している）



図 2 6 循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプ

1. 4ch Pomp system
2. Max Sample volume (1ml)
3. Injectable cell suspension :  $\sim 10^7$  cells
4. Non-specific absorption of cells :  $\sim 1/10^8$  cells

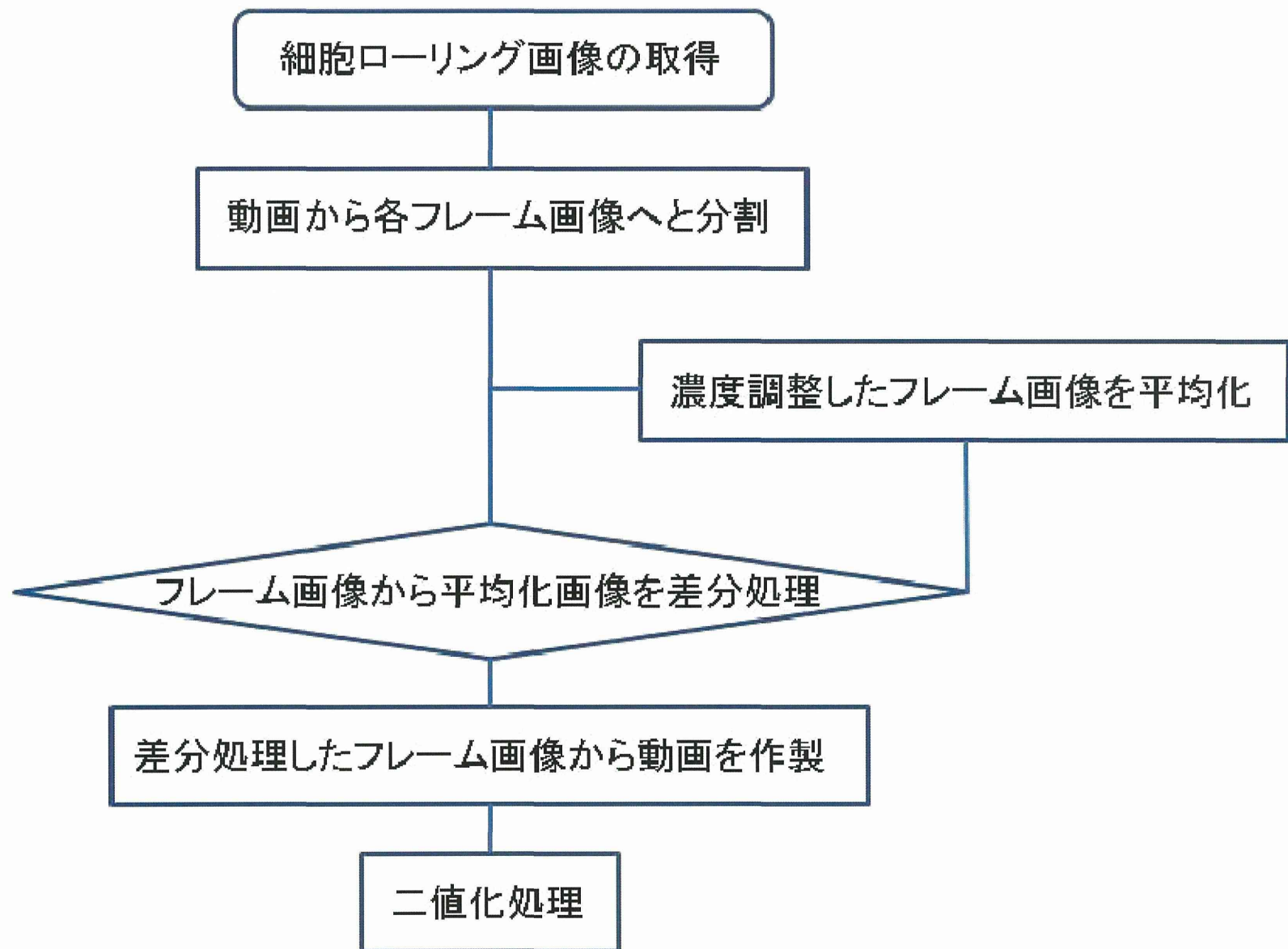


図 2 7 細胞ローリングを解析するための動画のアルゴリズム

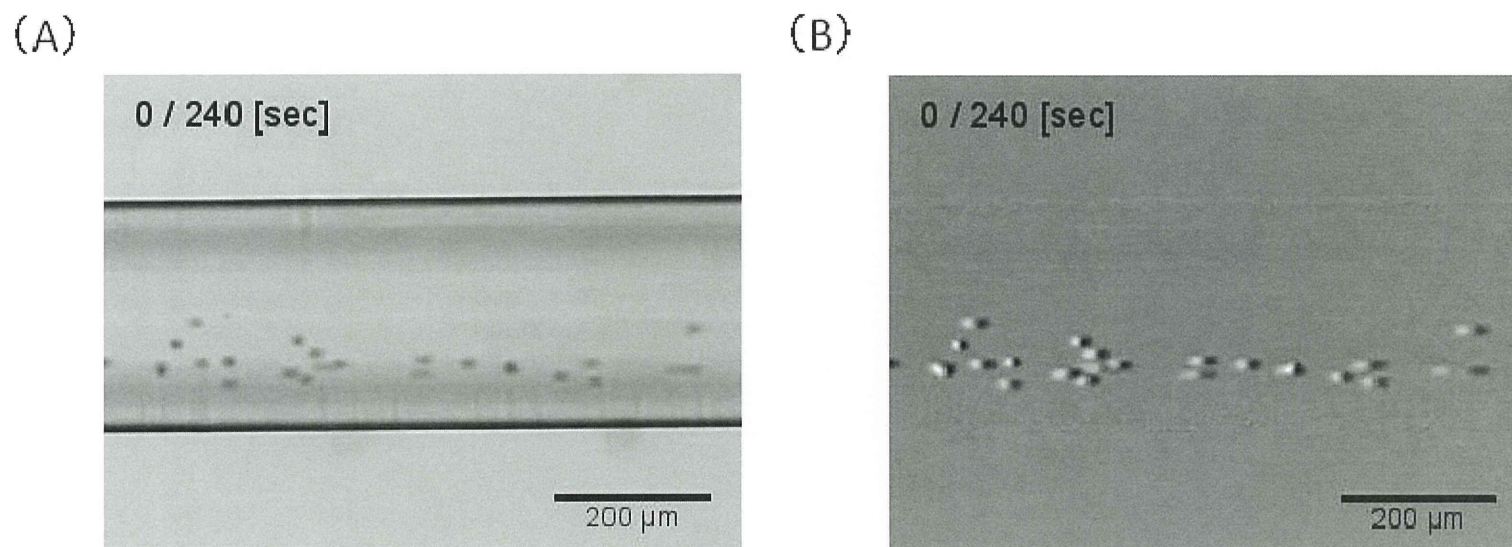


図 2 8 フレーム毎の差分処理前 (A) と処理後 (B) におけるローリング細胞の抽出画像

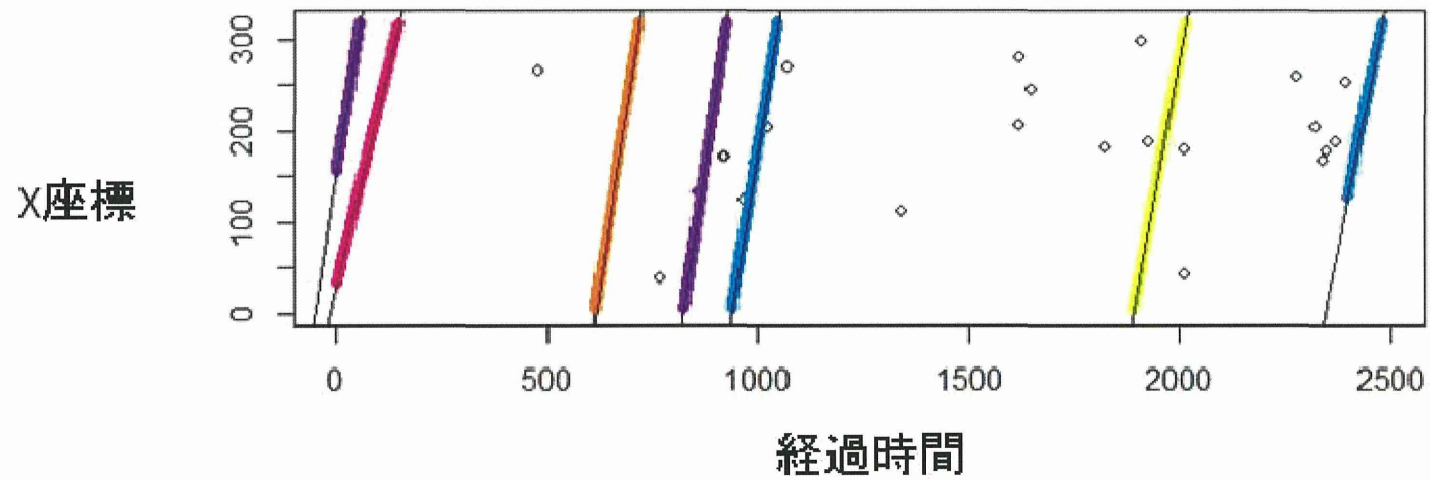


図 2 9 画像の速度解析から得られた個々の細胞の経過時間と X 軸座標の変位



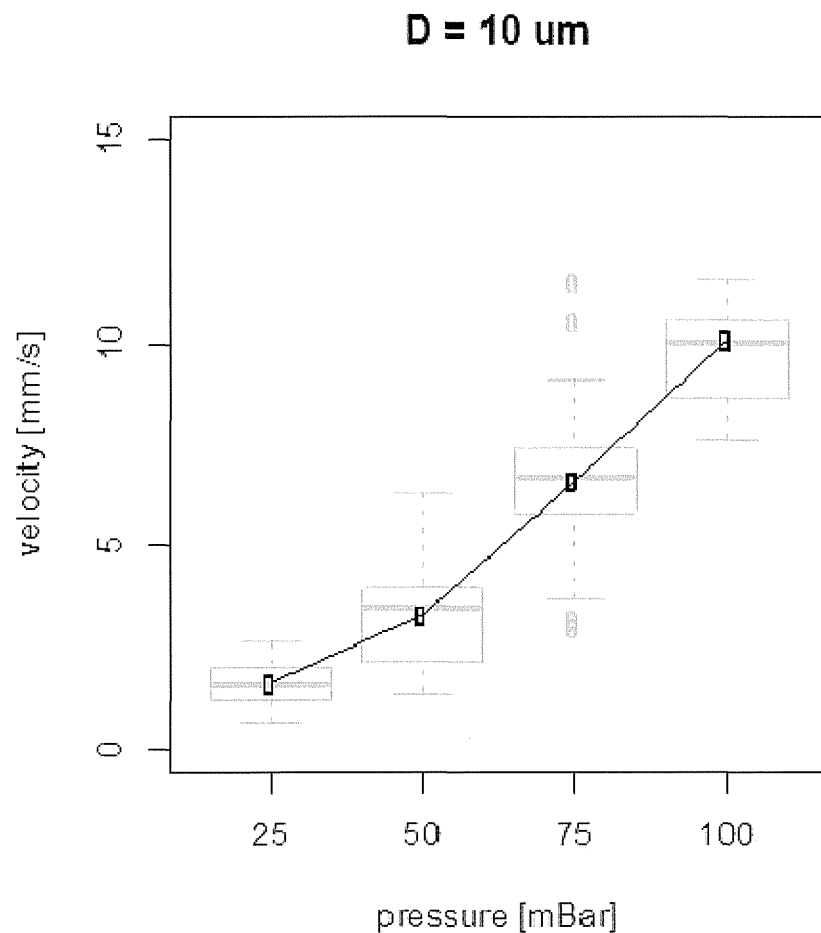


図 3 0 10 $\mu\text{m}$  のラテックス粒子を用いたマイクロ流口内部の圧力と粒子の移動速度 Asterisks indicate significant difference between 10  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  in diameter. p-values = 0.05 or lower were considered as statistically significant using the t-test. (\*\*\*)  $p < 0.005$ ,  $n = 16-87$ )

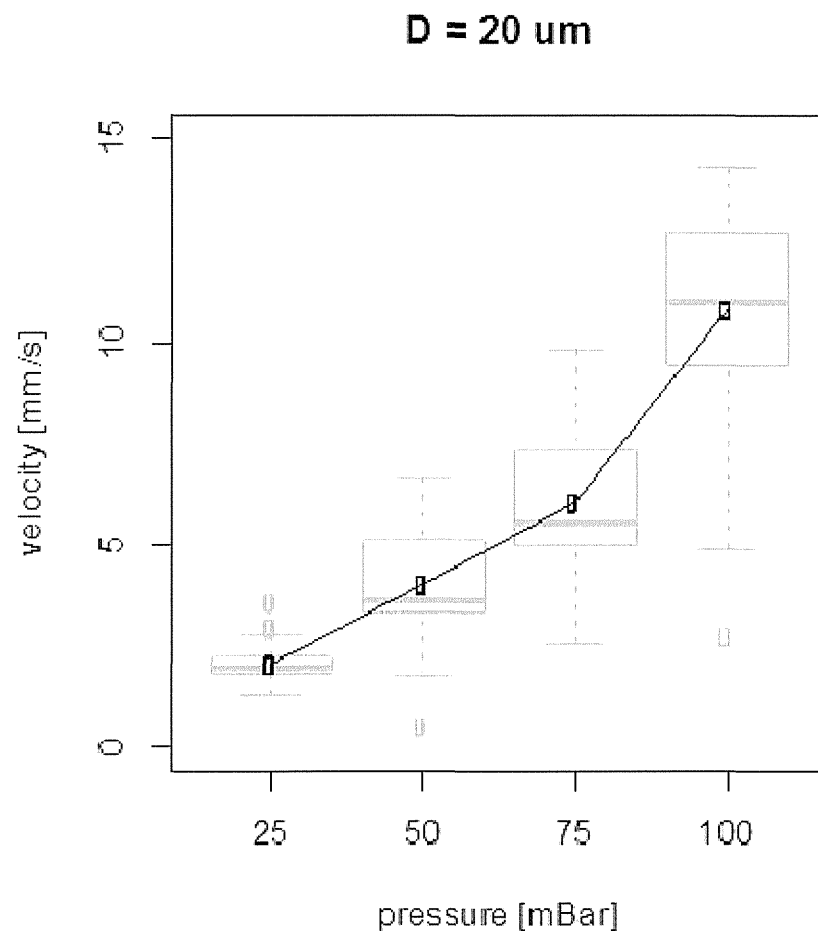


図3 1 20 $\mu\text{m}$  のラテックス粒子を用いたマイクロ流口内部の圧力と粒子の移動速度 Asterisks indicate significant difference between 10  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  in diameter. p-values = 0.05 or lower were considered as statistically significant using the t-test. (\*\*\*) p < 0.005, n = 16-87)

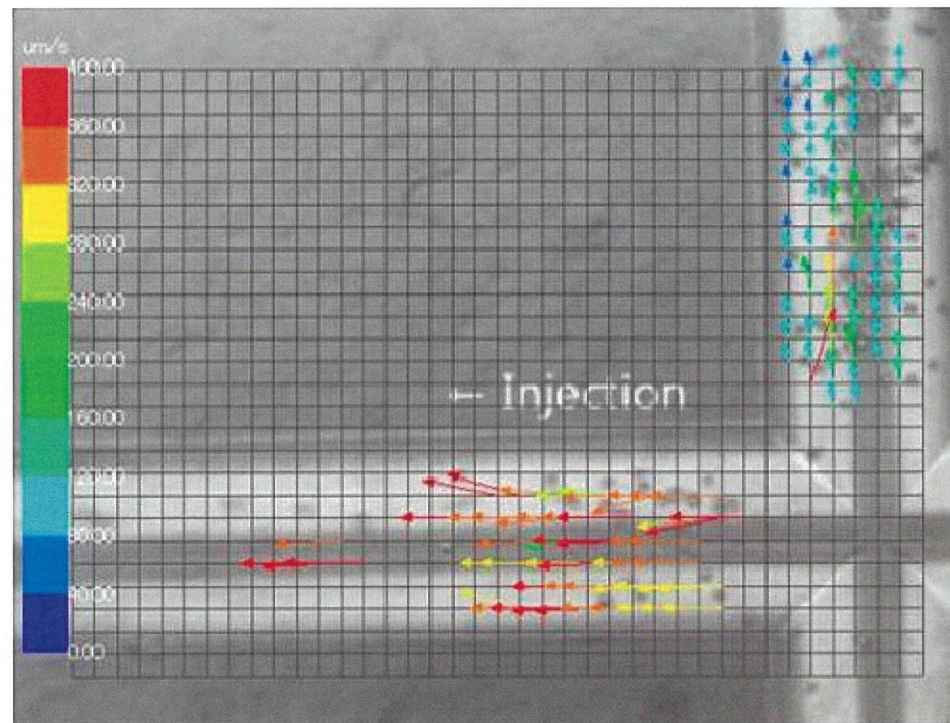


図3 2 交差流路付近における粒子の動き。流路の切り替えにより流路の交差している箇所にある細胞懸濁液を検査流路へとインジェクトすることが可能になった。(画像解析による速度分布解析画像)

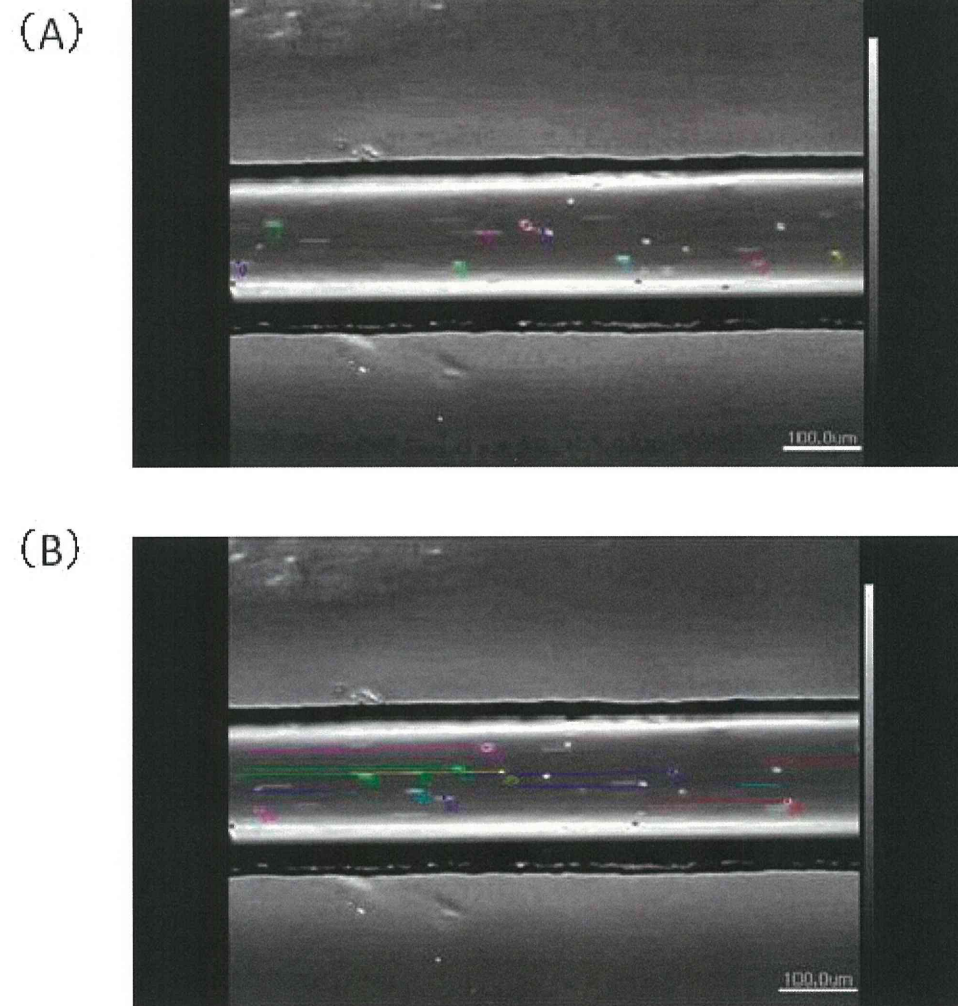


図 3 3 (A) マイクロ流炉内における画像解析後の細胞認識部位の重ねあわせ画像。(B) 速度解析後の各細胞のベクトル表示

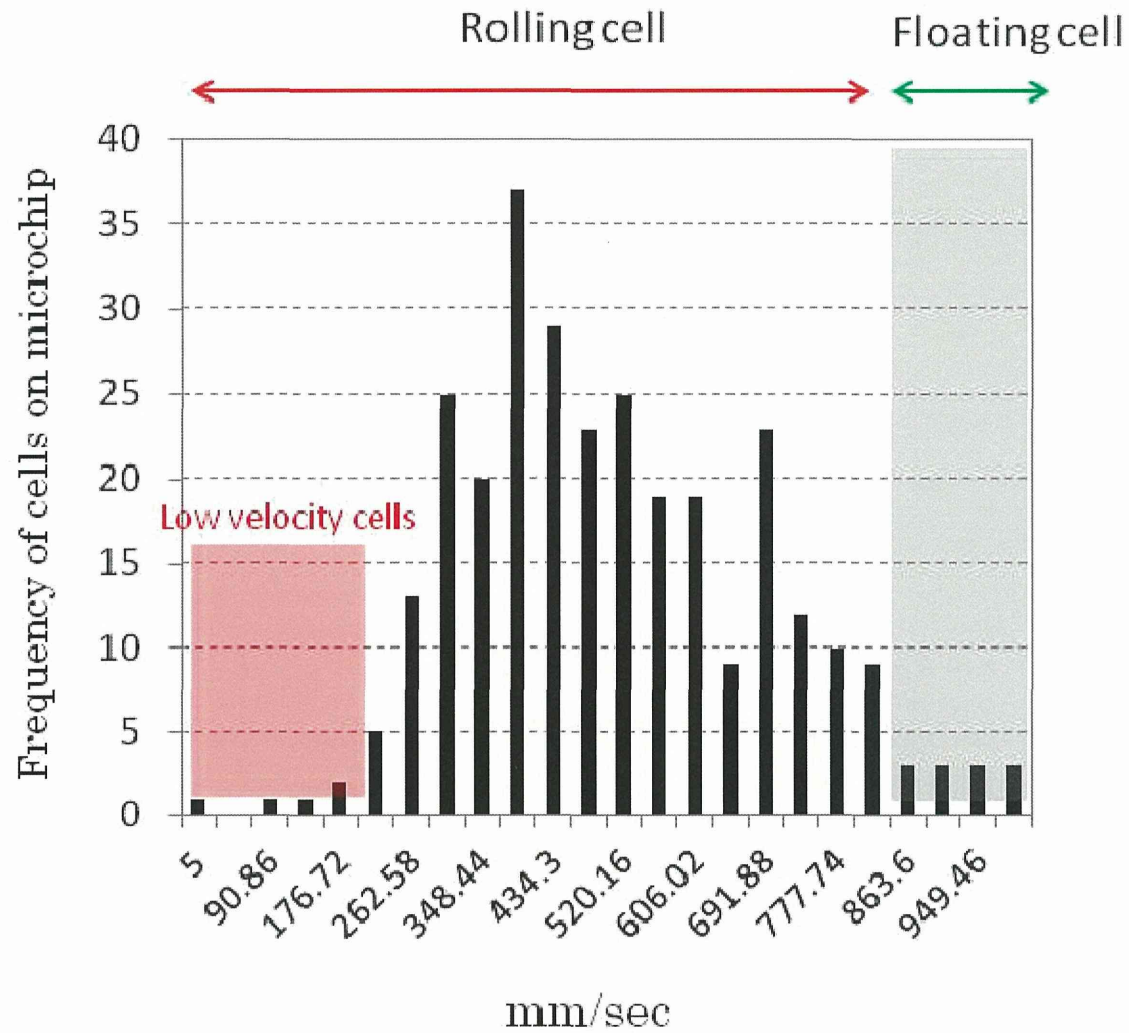


図 3 4 脂肪由来間葉系幹細胞をマイクロチップ内で流した場合の流速分布

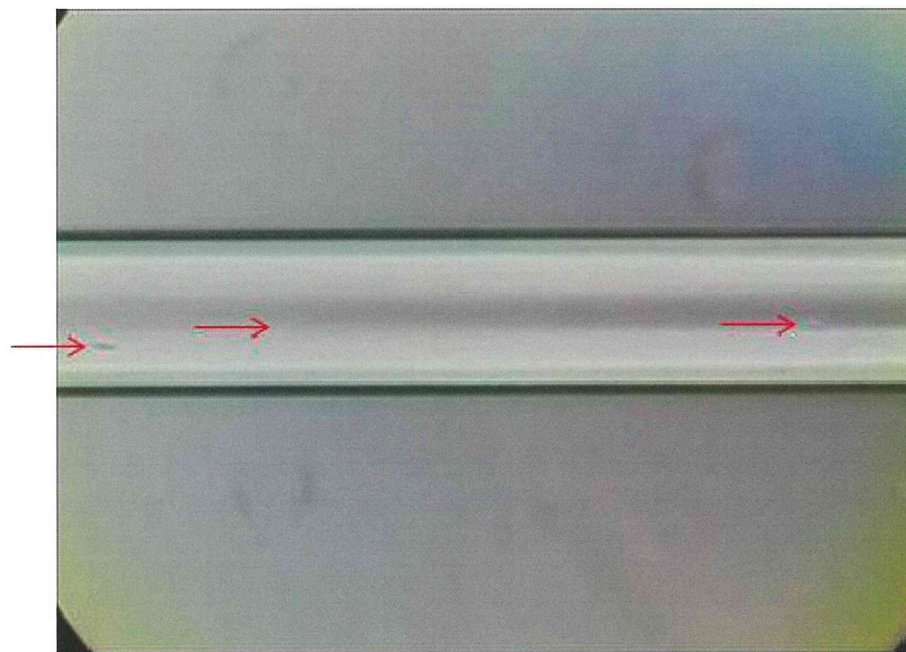


図 3 5 CTC 検査標準サンプルをマイクロ流路内で分析した場合の様子

別添4

II 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山岡哲二 馬原 淳	生体高分子の界面化学 抗体固定化界面での細胞ローリングの再現と幹細胞分離への応用	高分子学会	高分子	高分子学会	東京	2011	P743-744

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Yamaoka T., Mahara A.,	Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells	Reactive & Functional Polymers	71	362-366	2011
Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T.	Three-dimensional culture and differentiation of stem cells in elastin-like polypeptide hydrogel	ICBS2011	1	313-314	2011
Mahara,A., Chen H., Ishihara K.,	Phospholipid polymer-based antibody	Journal of Biomaterial Science:	Under revise process		2014

Yamaoka T	immobilization for cell-rolling surface in a system for stem cell purification.	Polymer Edition			
Mahara, A., Chen H., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T.,	Vertical crossed micro-chamber for cell rolling column to lead definite cell rolling	Preparation			

学会発表

演者	演題名	学会名	場所	開催年月日
馬原 淳	Novel cell rolling colum for stem cell separation	1st International cengress on Advanced Materilas 2011	中国済南	2011/5/13-16
馬原 淳	抗体固定化スルホベ タイン界面を用いた 細胞分離カラムの応 用	第60回 高分 子討論会	岡山	2011/9/28-30
馬原 淳	抗体固定化スルホベ タイン界面をもつ細 胞分離カラムの開発	第33回日本バ イオマテリア ル学会大会	京都	2011/11/21-2 2
馬原 淳	Development of antibody-immobilize d interface for cell-rolling column	15th Internationa l Conference on Thin Films	京都	2011/11/8-11
馬原 淳	細胞分離技術の現状 と新展開	第28回医用 高分子研究会	東京	2011/11/24
馬原 淳	Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the	第21回日本 MRS 学術シン ポジウム	横浜	2011/12/19-2 1



	cell-rolling column			
C. Agudero	Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system	Teremis-NA 2011	米国	2011/12/11-14
山岡哲二	, Biomaterials for Stem Cell Transplantation -Cell Purification and Cell Tracking-	3th Asia Biomaterial Congress	中国・釜山	2011/9/15-17
Hao CHEN	Development of cell rolling column modified with betain polymers	第62回高分子討論会	名古屋	2012年9月19日-21日
Atsushi MAHARA	Elastin-like polypeptide hydrogel for vascular tissue reconstruction based on the guided-tissue regeneration	ACS fall meeting	Philadelphia, USA	2012年8月19日-23日
馬原 淳	再生医療の実用化を目指した循環器疾患に対する新たな医療デバイスの開発、	北陸先端科学技術大学院大学 藤本研究室セミナー	石川	2012年10月20日
馬原 淳	ソフト界面の構築に基づく新たな医療デバイスの開発～細胞分離カラムと小口径人工血管の開発	ソフトインターフェースの分子科学 武田研・吉本研 Joint Seminar 2012	東京	2012年12月21日
馬原 淳	細胞ローリングを利用した細胞診断用マイクロチップの開発	文部科学省・科学研究費補助金・新学術	東京	2013年7月11日-12日

		領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」		
Atsushi MAHARA	Cell-rolling microchip for the detection of circulating -tumor cells	ACS fall meeting	Indianapolis, USA	2013年9月8日-12日
<u>Atsushi MAHARA</u>	Circulating tumor cell detection system on cell rolling microchip	The 15th International conference on biomedical engineering	Singapore	2013年12月4日-7日
Atsushi MAHARA	Cell-rolling microchip for diagnosis of peripheral circulating cells such as CTCs	ACS Spring meeting	Dallas, USA	2014年3月16日-20日

特集 バイオポリマーインターフェース—生体分子が拓く新たな高分子界面—

## 生体高分子の界面化学 抗体固定化界面での細胞ローリングの再現と 幹細胞分離への応用

### Stem Cell Rolling and Their Purification on an Antibody-Immobilized Column

**Abstract:** We have recently developed a novel stem cell separation column on the basis of cell rolling phenomena widely observed in our body. Mouse mesenchymal stem cells are rolling on the anti CD34 (or anti CD90) antibody-immobilized surface at a rolling rate determined by the cell

surface CD34 (CD90) density. With this system, we succeeded to purify stem cells with specific cell differentiation features.  
**Keywords:** Mesenchymal Stem Cell / Cell Purification / CD34 / CD90 / Cell Differentiation / Cell Rolling

#### 1. はじめに

1980年頃からスキャホールドと体細胞を用いた再生医療が精力的に研究されてきた。その後の幹細胞研究の発展にもなっており<sup>1)~3)</sup>、近年ではスキャホールドを用いない「幹細胞移植療法」が大きな注目を集めている。とくに、患者自らの幹細胞を移植する「自己幹細胞移植療法」の臨床化が進んでいるが、幹細胞の不均一性は治療効果と安全性に大きく影響し、いかに細胞の純度を上げるかがきわめて重要である。本稿では、筆者らが開発を進めている細胞ローリング現象を利用した幹細胞分離カラムについてご紹介させて頂きたい。

#### 2. 幹細胞の純度

再生医療のための有用な幹細胞ソースとしては、(1) 間葉系幹細胞 (MSC) や造血幹細胞 (HSC) など生体内に存在する幹細胞を取り出す、あるいは、(2) ES細胞やiPS細胞から目的細胞を作成する、の二つが考えられる。近年注目されている後者の臨床応用が心待ちにされるところではあるが、倫理的問題あるいは遺伝子操作の安全性に対する課題などまだ時間がかかる。また、分化誘導したとしても目的の分化ステージの細胞だけを単離するのは容易ではなく、混入する細胞によっては重篤な副作用をもたらす危険性も否定できない。一方、前者については、国内で140を超える臨床プロトコルがオープンになり、平成22年11月に改訂されたヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する

指針では、自己幹細胞移植への配慮も盛り込まれ、その実用化に対する制度的支援も着々と進んでいる。

たとえば、ヒト骨髄細胞をシャーレに播種して接着した細胞を骨髄MSCとして用いられることが多いが、ここに多くの細胞が混在していることは明らかである。幹細胞は、細胞表面に特有の「表面抗原分子 (表面マーカー分子)」を持っているので、これに対するモノクローナル抗体の結合で細胞を同定することができる。このモノクローナル抗体の国際分類 (CD, Cluster of differentiation) を用いて細胞の特性を表記する。たとえば、ヒトHSCはCD34陽性であるが、CD34陽性細胞がヒトHSCというわけではなく、さらに詳細に細胞を同定するための表面マーカー分子の検討が続いている。細胞の純化にもこの表面マーカー分子が利用されている<sup>4),5)</sup>。Fluorescence activated cell sorting (FACS) 法は、特定の細胞表面マーカーに対して蛍光標識抗体を結合させることで目的細胞を識別して電場によりソーティングする。一方、近年急速に普及してきMagnetic activate cell sorting (MACS) 法では、抗体修飾磁気ビーズにより認識された細胞を磁場によりトラップして特定の細胞ポピュレーションを分離する。装置が簡便で大量の細胞を一度に処理できる。両手法の最大の弱点は、単離した幹細胞が、蛍光修飾抗体や磁性微粒子修飾抗体と結合したままであることである。このような背景から、筆者らは、表面分子マーカー発現の「程度」、すなわち、表面マーカー分子の細胞表面での密度を連続的に分離することができ、かつ、抗体などの混入がない「細胞ローリングカラム」の開発を始めた。



山岡哲二 Tetsuji YAMAOKA

国立循環器病研究センター研究所・  
生体医工学部  
[565-8665] 吹田市藤白台5-7-1  
部長、博士 (工学)、  
専門はバイオマテリアル、再生医工学。

(写真左)

馬原 淳 Atsushi MAHARA

同左

研究員、博士 (学術)、  
専門は細胞工学、機能的な高分子。

(写真右)

### 3. 細胞ローリング現象と幹細胞分離

細胞が固相界面上で転がる(ローリングする)現象は、血管内を流れる白血球が炎症部位付近の血管内腔面に集積する際の白血球ローリング現象として知られている<sup>6)</sup>。炎症部位の血管の内腔にセレクチンと呼ばれる白血球表面糖鎖と結合できる分子が多く現れ、白血球はこのセレクチンと相互作用して血管の内腔表面を転がって炎症部位にたどりつく<sup>7),8)</sup>。この細胞ローリングを人工的に再現することも可能で<sup>9)</sup>、筆者らは、この関係を逆転させることで幹細胞分離カラムを開発しようと考えた。すなわち、幹細胞表面マーカーであるCD34に対する抗体を均一に固定化した界面上で幹細胞をローリングさせる(図1)。細胞ローリング速度の定量的な解析は、Hammerらのグループを中心に詳細に報告されており、速度はリガンドとレセプターとの相互作用点の数(密度)によって規定されることが報告されている<sup>10)</sup>。すなわち、細胞ローリングカラムに注入された幹細胞のうちCD34密度が低い細胞が早く溶出し、高い細胞は遅れて溶出してくるはずであり、溶出時間によって目的のCD34密度(発現)の幹細胞を単離できる。この手法の利点は、表面マーカーの発現密度により細

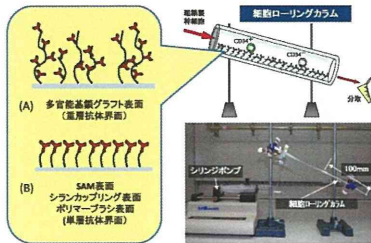


図1 細胞ローリングを模倣した新たな幹細胞分離カラム

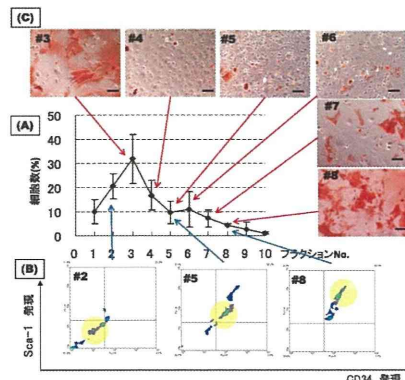


図2 CD34固定化細胞ローリングカラムでの(A) MSC分離パターンと、各フラクション中の細胞の(B)細胞表面マーカー特性、および(C)骨芽細胞分化能

胞を分離できることのみならず、分離された幹細胞に抗体などの混入がないことである。さらに、複数の抗体やリガンドをカラムに固定化することでさまざまな表面マーカーパターンに基づく分離が達成できる。

この分離システムの有効性を評価するため、マウス骨髄細胞から培養皿へ接着する細胞分画を採取して「粗MSC」とし、CD34抗体を固定化した細胞ローリングカラムにより分離したときの細胞溶出パターンを図2Aに示した<sup>11),12)</sup>。抗体を固定化していないコントロールカラムの場合、細胞はフラクション#2-3付近ですべて溶出するのに対して、CD34抗体固定化カラムを用いた場合には溶出時間の遅延が確認され、2ピークが確認できる。また、それぞれの、フラクションに存在する細胞の表面マーカー(CD34とSca-1)をFACSにて定量したところ、溶出時間とともにCD34発現密度が上昇しており、上述の細胞分離機構が機能していることが確認された(図2B)。さらに、それぞれの細胞に常法により骨芽細胞への分化を誘導し、所定時間後に染色法により骨芽細胞への分化効率を検討した結果を図2Cに示した。フラクション#4-6の細胞の骨分化能が低く、CD34発現の非常に低い画分(#3)と非常に高い画分(#7-8)が赤く染まり骨芽細胞に分化する能力が高いことがわかる。これらの二つのポピュレーションは分化ステージの異なるものであると考えられ、幹細胞分離において、特定の細胞表面マーカー密度をもつ細胞核分を単離することの有用性を示しており、細胞ローリングカラムにより、従来困難であった幹細胞純化が達成されたと考えている。

### 4. おわりに

今後、幹細胞を利用した医療が急速に拡大することは疑う余地がない。上述の細胞ローリングカラムもまだ多くの課題を抱えており、細胞の非特異的吸着を抑制するために抗体の単層固定化技術を導入するなど、さらなる改良を進めているところである(図1B)。細胞工学的手法や分生学的技術の急速な進歩に遅れることなく、細胞純化・細胞送達・3D組織構築など、材料科学により解決されるべき課題を一つずつ解決して行かなくてはならない。

### 文献

- 1) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones, *Science*, **282**, 1145 (1998)
- 2) M. F. Pittenger, *et al.*, *Science*, **284**, 143 (1999)
- 3) K. Takahashi, *Cell*, **131**, 861 (2007)
- 4) R. S. Molday, *et al.*, *Nature*, **268**, 437 (1977)
- 5) P. L. Kronick, *et al.*, *Science*, **200**, 1074 (1978)
- 6) H. Ulrich, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7538 (1991)
- 7) M. R. King, *et al.*, *Biophys. J.*, **81**, 799 (2001)
- 8) D. A. Hammer, *et al.*, *Biophys. J.*, **52**, 475 (1987)
- 9) M. B. Lawrence and T. A. Springer, *Cell*, **65**, 859 (1991)
- 10) D. A. Hammer, *et al.*, *Biophys. J.*, **63**, 35 (1992)
- 11) A. Mahara and T. Yamaoka, *Biotechnol. Prog.*, **26**, 441 (2010)
- 12) A. Mahara and T. Yamaoka, *Biomaterials*, **31**, 4231 (2010)