

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 幹細胞を対象とする誘電泳動デバイス に関する研究

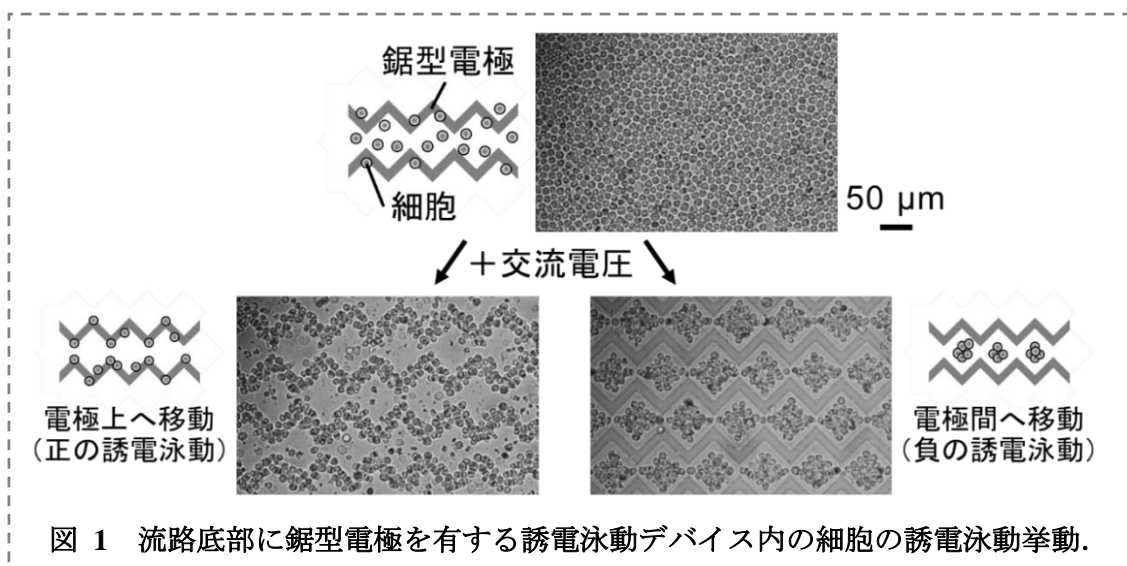
氏 名 吉岡純矢

**【研究背景】** 幹細胞とは、様々な細胞へと分化可能である多分化能と自己複製能をあわせ持つ細胞である。骨髄由来の間葉系幹細胞は最も古くに単離された幹細胞であり、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの中胚葉由来の細胞に分化する能力があるとされてきた。そして、近年の研究では、間葉系幹細胞は内胚葉や外胚葉などへの胚葉を超えた分化可塑性を有することが明らかとなり、ヒトの体の中に天然に存在するため倫理的問題が少なく、最も安全な細胞源であると考えられている。加えて、間葉系幹細胞は組織損傷後の炎症部位へのホーミング能力や損傷を受けた細胞の回復を刺激し炎症を抑制することができる複数の生体分子を分泌する能力などを有しているといわれている。また、臨床例も豊富で、移植片対宿主病の治療<sup>1</sup>や、肝硬変患者の治療<sup>2</sup>に間葉系幹細胞注射が有効であったという報告などがあり、幅広い症状において治療効果が見出されている。

異種細胞懸濁液から純粋な間葉系幹細胞集団を単離することは、前述した基礎研究や臨床応用において必要不可欠な技術であり、増え続ける間葉系幹細胞への需要によって、新たな間葉系幹細胞単離技術開発の必要性は高まっている。間葉系幹細胞単離技術には、高効率、簡便、迅速、汎用性があることが求められ、幹細胞を分離するための製品や方法は既にいくつか存在しているが<sup>3,4</sup>、どの手法も特異性が低い点や細胞への標識が必須な点で未だ問題を抱えている。そこで、

本研究では誘電泳動に注目した。溶液中において不均一電場にさらされた粒子は、溶液と粒子の界面に分極電荷が発生し双極子モーメントが誘起される。そして、溶液と粒子の電気的性質（導電率や誘電率）の違いによって粒子が電場の強い部分（正の誘電泳動）、もしくは弱い部分（負の誘電泳動）へと泳動される（図 1）。誘電泳動は細胞のサイズのみならず細胞固有の電気物理学的な性質を利用して細胞を分離することができるユニークな技術である。さらに、細胞への標識が不要で、迅速で非侵襲に分離可能であることが知られており、分離技術として優れた特徴を有している。誘電泳動デバイスを利用した細胞分離法はこれまで色々なデバイスが提案されてきたが<sup>5-7</sup>、構造が単純かつ高い分離効率を実現できる誘電泳動デバイスの設計は、未だ開発途上であるといえる。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分離において、誘電泳動の有効性を示した報告はない。したがって、誘電泳動によってヒト骨髄由来の間葉系幹細胞分離が可能であれば、誘電泳動による分離技術の新しい応用先として期待できる。そこで、本研究ではヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球のモデルとしてそれぞれ UE7T-13 と HL-60 を使用し、独自に設計した鋸型電極を有した誘電泳動デバイスの作製・評価をおこなった。

**【結果】** 間葉系幹細胞を分離するために、フォトリソグラフィ技術とエッチング技術を用いて独自に設計した鋸型電極を有する誘電泳動デバイスの作製に成功した。有限要素解析の結果、作製した鋸型電極は先行研究で使用される直線型の電極に比べ電場密度勾配が大きく、効率的に誘電泳動を生じさせられることが分かった（図 2）。また、作製した誘電泳動デバイス上で様々な周波数の交流電圧を使用して UE7T-13 と HL-60 の泳動挙動を個別に調査した結果、両細胞



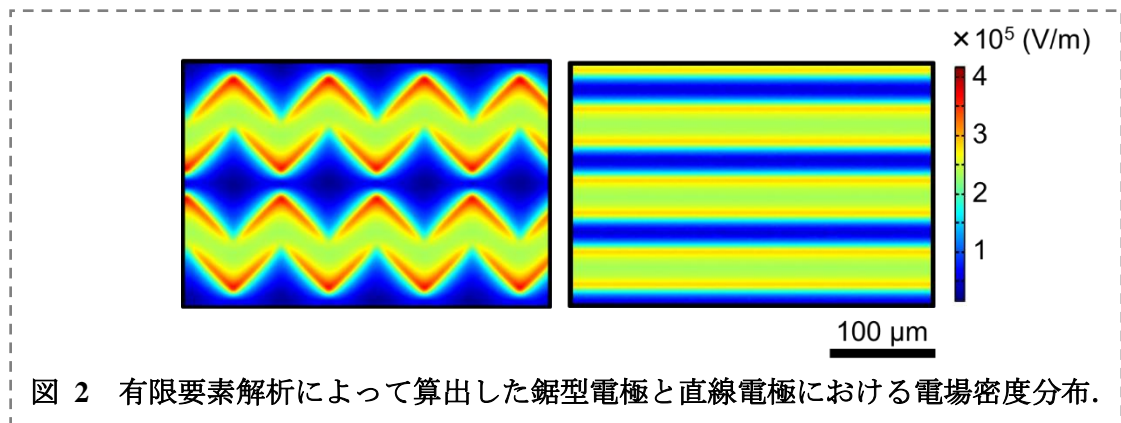


図 2 有限要素解析によって算出した鋸型電極と直線電極における電場密度分布.

は同周波数において異なる泳動挙動を示した.

UE7T-13 と HL-60 をそれぞれ  $1 \times 10^7$  cells/mL と  $2 \times 10^7$  cells/mL の割合になるように混合し、誘電泳動デバイスを使用して 30 kHz の周波数で UE7T-13 を分離した結果、UE7T-13 は正の誘電泳動が生じて鋸型電極の真上に集まったのに対し、HL-60 は負の誘電泳動が生じて鋸型電極の間に集まった. その後、誘電泳動用溶液の 250 mM スクロース溶液を流路中に送液すると、負の誘電泳動挙動を示していた HL-60 を選択的に流路外に排出することに成功した (図 3). デバイス中で分離に要した時間は約 5 分間であり、分離前後の UE7T-13 の存在割合は 33% から  $83.5 \pm 7.1\%$  になった (図 4). また、UE7T-13 の回収率は  $29.1 \pm 4.1\%$ 、濃縮率は 2.3 倍であった.

UE7T-13 の分離したときと同条件の誘電泳動を UE7T-13 単体におこなった後、細胞が接着・伸展能と生存率を維持しているか増殖培地中で 2 時間インキュベートして調べた結果、

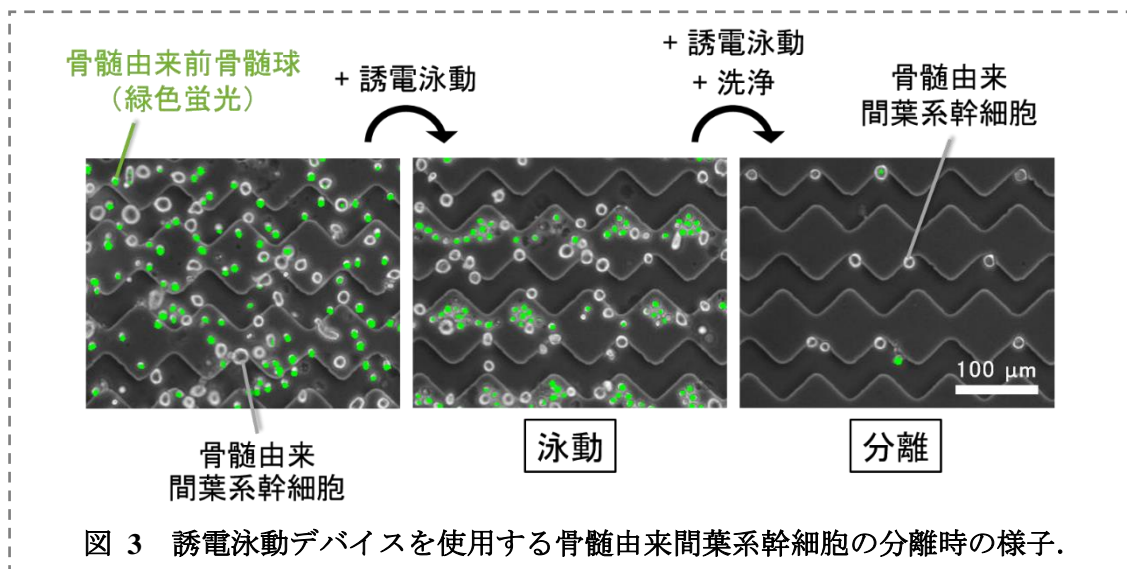


図 3 誘電泳動デバイスを使用する骨髄由来間葉系幹細胞の分離時の様子.

UE7T-13 は基板に接着・伸展していた。そして、 $90.1 \pm 3.5\%$  の高い生存率を維持していた。また、分離時の条件における誘電泳動後の遺伝子発現量の変化を調査した結果、本研究室でおこなった先行研究において 1 時間の正の誘電泳動後に発現量に変化したとされる 4 種の分化または物理刺激関連遺伝子 *RUNX2*, *PPAR $\gamma$* , *NES*, *ADGRE5* において発現量に変化はみられなかった。

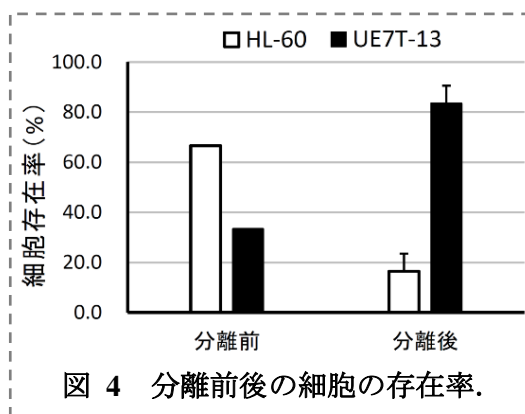


図 4 分離前後の細胞の存在率。

**【結論】** 骨髓由来の間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髓球を分離するために鋸型電極を有する誘電泳動デバイスの作製に成功した。本研究において独自に設計された鋸型電極は構造が比較的単純であり、同電圧を印加した際に直線型の電極デザインと比べより大きな電場勾配を生み出すことができるため、効率の良い誘電泳動が可能である。周波数と印加電圧の最適化後には、迅速かつ高い生存率を保ったまま遺伝子発現量の変化を伴わずに非標識で骨髓由来間葉系幹細胞を分離することができた。

本論文は、鋸型電極を有する誘電泳動デバイスが、ヒト骨髓由来の間葉系幹細胞を同組織由来の前骨髓球から分離するために有用であることを示した最初の報告である。また、本研究は、鋸型電極を有する誘電泳動デバイスが、幹細胞を使用する研究や医療分野において優れたポテンシャルを有していることを示唆している。

#### 【参考文献】

1. Müller, I. *et al.* Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells, Mol. Dis.* **40**, 25–32 (2008).
2. Kharaziha, P. *et al.* Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I–II clinical trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1199–1205 (2009).
3. Pösel, C. *et al.* Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
4. Pruszek, J., Sonntag, K.-C., Aung, M. H., Sanchez-Pernaute, R. & Isacson, O. Markers and Methods for Cell Sorting of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Cell Populations. *Stem Cells* **25**, 2257–2268 (2007).
5. Deng, Y.-L., Chang, J.-S. & Juang, Y.-J. Separation of microalgae with different lipid contents by dielectrophoresis. *Bioresour. Technol.* **135**, 137–141 (2013).
6. Yildizhan, Y., Erdem, N., Islam, M., Martinez-Duarte, R. & Elitas, M. Dielectrophoretic separation of live and dead monocytes using 3D carbon-electrodes. *Sensors (Switzerland)* **17**, 1–13 (2017).
7. Lalonde, A., Romero-Creel, M. F. & Lapizco-Encinas, B. H. Assessment of cell viability after manipulation with insulator-based dielectrophoresis. *Electrophoresis* **36**, 1479–1484 (2015).