

ラット間葉系幹細胞の分化活性と 誘電泳動浮揚法による誘電特性の関係

廣 田 祐 輔*, 箱 田 優**¹

(2009年8月3日受付; 2009年11月10日受理)

Relationship between Dielectric Characteristic by DEP Levitation and Differentiation Activity for Rat Mesenchymal Stem Cells

Yusuke HIROTA* and Masaru HAKODA**¹

(Received August 3, 2009; Accepted November 10, 2009)

The general methods of analyzing the differentiation activity of stem cells require much time, and the reagent and apparatus that are used for analysis are very expensive. Therefore, the dielectric characteristics ($\text{Re}[K(\omega)]$) of the stem cells were analyzed using the dielectrophoretic (DEP) levitation method for the purpose of developing an inexpensive and quick differentiation activity analyzing method, and the relationship between the dielectric characteristic and the differentiation activity was examined. The results revealed that $\text{Re}[K(\omega)]$ of Rat Mesenchymal Stem Cell (RMSC) decreased with increasing the passage number (PN). Moreover, bone differentiation induction was performed for the RMSC of each passage number, and the ALP activity was measured. As a result, the ALP activity decreased with increasing the passage number. Therefore, it was found that the differentiation activity of the stem cell could be evaluated by measuring the $\text{Re}[K(\omega)]$ due to the relationship between the $\text{Re}[K(\omega)]$ and the ALP activity.

1. はじめに

特定の細胞の分離あるいは濃縮は、研究分野だけではなく医療分野においても非常に重要な技術である。主な細胞分離技術として、遠心分離法や膜分離法、電気泳動法などがあるが、新規な分離法として誘電泳動法が研究されている。誘電泳動を用いた細胞分離研究として、動物細胞や酵母を用いた生死細胞分離¹⁻¹⁰⁾や、複数種の異種細胞を懸濁した溶液から特定の細胞の分離^{11,12)}などが報告されている。それらより、誘電泳動挙動は細胞径の違いだけではなく、細胞種によっても異なることから、非常に有効な分離およびマニピュレーション方法であることが示されている。

一般的に、細胞活性には増殖活性や抗体産生量などによる代謝活性がある。これらの測定には、24-48時間の培養を行うため、時間がかかり、高価な試薬と測定機器も必要である。さらに、測定に用いた細胞は再び培養や実験に用いることは

できないなどの問題を有している。一方、誘電泳動浮揚法は、装置は非常に安価で、試薬も使わないため、安価で簡単に測定が行える。さらに、測定した細胞も再び培養することも可能である。また、活性測定のための培養をする必要がないため、リアルタイムに細胞の状態を知ることができる。

幹細胞の特徴として、細胞分裂の際に、分裂した両方あるいは片方の細胞を、自己と同じ幹細胞にすることができる、自己複製能を持っている。つまり、幹細胞に分化誘導を行わなくても、細胞分裂によって幹細胞は次々に分化してしまう。さらに、一旦、分化した細胞は、他の細胞に分化することはできなくなり、分化能を失ってしまう。ゆえに、*in vitro*において、細胞が未分化なときに分化誘導を行わなければ、幹細胞は様々な細胞に分化してしまう。よって、分化活性が高い未分化な幹細胞を判別することは、再生医療において幹細胞を目的の細胞に分化させるために、非常に重要である。

幹細胞の分化活性を測定するには、幹細胞に分化誘導試薬を用いて、数週間程度の分化誘導期間を設けることで目的の細胞へと分化させ、分化した細胞が産生する酵素を測定する方法や分化した細胞に対する特異的マーカーなどを用いる方法がある。しかしながら、これらの測定方法は、細胞を分化させる必要があるため、時間がかかり測定用試薬や測定機器は非常に高価である。誘電泳動浮揚法によって分化活性を評価できれば、幹細胞を分化させることなく、未分化の状態での分化活性が評価できる。

キーワード：誘電泳動, 誘電泳動浮揚法, 幹細胞, 分化活性, 誘電特性

* 群馬大学大学院工学研究科 (376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Division of Environment Management, Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu 376-8515, Japan

** 群馬大学大学院工学研究科 (376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Department of Chemical and Environmental Engineering, Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu 376-8515, Japan

¹ hakoda@cee.gunma-u.ac.jp

幹細胞を対象とした誘電泳動研究は非常に少ないが、特定の幹細胞の濃縮および分離や、幹細胞とその幹細胞から分化した細胞との誘電特性の違いが報告されている^{13, 14}。また、誘電泳動浮揚法を用いた研究は、植物プロトプラスト細胞を用いて周囲媒質の導電率や pH などを変えることで誘電特性が変化することや¹⁵⁻¹⁷、マウスハイブリドーマ 3-2H3 細胞における増殖活性と誘電特性の相関関係が明らかとなっている¹⁸。しかしながら、誘電泳動浮揚法を用いた幹細胞の分化活性測定に関する研究は、全く報告されていない。

そこで、本研究は誘電泳動浮揚法を用いて幹細胞の誘電特性を測定し、分化活性と誘電特性の関係を明らかにすることで、分化誘導を行わなくても幹細胞の分化活性を迅速かつ簡便に測定する可能性の検討を行った。

2. 理論

細胞は不均一電場内では、細胞の誘電率と周囲媒質の誘電率の関係から、強電場側または弱電場側へ泳動する。これを誘電泳動と言う。誘電泳動の泳動方向は、周囲媒質と細胞の誘電率によって決まる。周囲媒質の誘電率より細胞の誘電率が大きければ、強電場へ引き寄せられる正の誘電泳動を示し、逆の場合であれば強電場から反発する負の誘電泳動を示す。誘電泳動力の式は (1) 式のように定義される。

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

r は細胞半径、 ϵ_m は周囲媒質の誘電率、 E は電場強度、 $\operatorname{Re}[K(\omega)]$ は Clausius-Mossotti 関数の実数部、 ∇E^2 は電場傾度である。誘電泳動浮揚法では、溶液中の細胞に加わる重力と浮力、誘電泳動力をバランスさせることで、細胞を静止させる。そのときの式は以下ようになる。

$$\frac{4}{3} \pi r^3 \rho_p g = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho_m g + 2\pi r^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (2)$$

ρ_p は細胞の密度、 ρ_m は周囲媒質の密度である。細胞を静止させることで、細胞径や抵抗力を考慮する必要がなくなる。よって、(2) 式より (3) 式を導くことができる。

$$\operatorname{Re}[K(\omega)] = \frac{2}{3} \cdot \frac{g(\rho_p - \rho_m)}{\epsilon_m \nabla E^2} \quad (3)$$

この $\operatorname{Re}[K(\omega)]$ を細胞の誘電特性とし、細胞活性評価の指標とした。また、図 1 に示したプレート電極からの細胞の静止位置 z における ∇E^2 は (4)、(5) 式より算出した。

$$\nabla E^2(z) = \frac{16V_0^2 h^2 z}{(h^2 - z^2)^3 \left\{ \ln \left(\frac{h + z_{\min}}{h - z_{\min}} \right) \right\}^2} \quad (4)$$

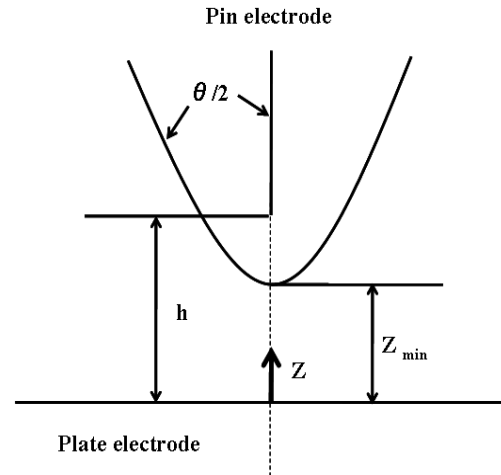


図 1 ピン・プレート型電極の概略図

Fig. 1 Schematic diagram of pin-plate type electrode.

$$h = \frac{z_{\min}}{\cos\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad (5)$$

V_0 は印加電圧、 z_{\min} は電極間距離である。また、ピン電極の先端は双曲線状になっており、 θ はその双曲線の二つの漸近線が交わった角度を表す。

3. 実験方法

3.1 細胞培養

ラット間葉系幹細胞 (RMSC, Rat Mesenchymal Stem Cell) (DS Pharma Biomedical Co, Ltd.) は、10%FBS と 100 U/ml ペニシリン G カリウム、100 mg/L を添加した DMEM (Sigma) を用いて播種密度 3.0×10^3 cells/cm² で培養した。培地交換は 1 日おきに行った。サブコンフルエントに達した後、0.05%トリプシン-0.53 mM EDTA 溶液 (GIBCO) により細胞をディッシュより剥離させ回収する。その細胞を 900 rpm、5 min の遠心分離操作を行い、上澄み液を除去し 8.5 wt%スクロース+0.3 wt%グルコース溶液に懸濁する。この細胞懸濁液を同じ条件で再び遠心分離操作を行う。上澄み液を除去し、8.5 wt%スクロース+0.3 wt%グルコース溶液に再懸濁したものを、測定用サンプルとした。

3.2 誘電泳動浮揚装置

誘電泳動浮揚装置を図 2 に示す。誘電泳動浮揚装置は 2 枚のガラス板の間に、厚さ 1 mm のアクリル板をスペーサーとして挟み、接着した。ピン電極の直径は $\Phi=700$ μ m、材質はステンレス、ピン電極先端の角度は $\theta=28^\circ$ である。プレート電極は厚さ 1 mm、材質はチタンである。ピン電極とプレート電極の距離は、300 μ m である。

3.3 誘電泳動浮揚法による測定

実験装置全体図を図 3 に示す。誘電泳動浮揚装置にシリン

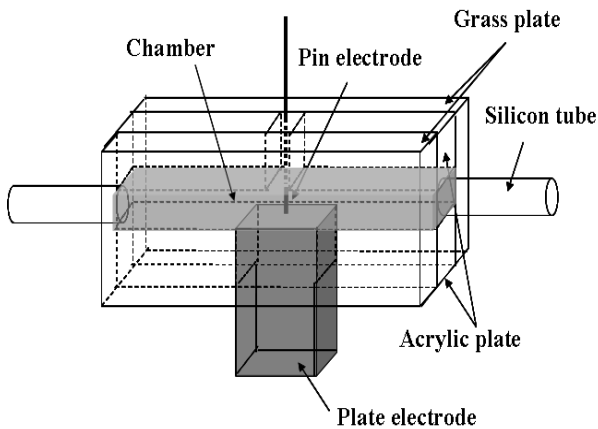


図2 誘電泳動浮揚装置図

Fig. 2 Schematic diagram of pin-plate type DEP levitation apparatus.

ジを用いて、細胞懸濁液を注入する。測定部は CCD カメラ (Inf-500 SG Moritex Co., Ltd.) から、モニターへ出力することで、モニターを見ながら任意波形ファンクションジェネレーター (33250A, Agilent Technologies Co., Ltd., USA) を用いて交流電圧を印加し、細胞を静止させ、そのときのプレート電極から細胞の静止位置までの距離を測定した。Re[K(ω)]の測定に用いた RMSC は、全て分化誘導を行っていない細胞を使用した。

3.4 分化誘導

細胞をディッシュに播種後、翌日に増殖用培地を除去し、骨分化サプリメント (KE200, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) を 5% 添加した増殖用培地にて培養を行う。分化誘導期間は 14 日間とし、培地交換は 3 回/週で行った。

3.5 ALP 活性測定

骨分化誘導を行った RMSC の分化活性評価を行うために、骨形成のマーカースとして一般的に用いられている ALP (Alkaline Phosphatase) 量の測定を行った。分化誘導を開始して 14 日後、培地を除去し、生理食塩水でディッシュを洗浄する。次に、生理食塩水に Nonidet-P40 (21-3277, Sigma Aldrich Co.) を 0.5% 添加した、0.5% Nonidet-P40 溶解生理食塩水で、ディッシュを洗浄した後、もう一度 0.5% Nonidet-P40 溶解生理食塩水を加え、セルスクレーパー (MS-93100, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) で細胞を剥離した。回収した細胞は数回の凍結融解を繰り返し、細胞膜を破壊した。その後、10,000 rpm, 2 min で遠心分離操作を行った。得られた上清を、LabAssay ALP (291-58601, Wako) を用いて、マイクロプレートリーダー (Synergy HT SIAFR, Bio Tek instruments, Inc.) により吸光度 (405 nm) を測定した。

また、ALP 活性評価は細胞 1 個当たりで評価するため、通常細胞数や DNA 量を測定することが一般的な方法であ

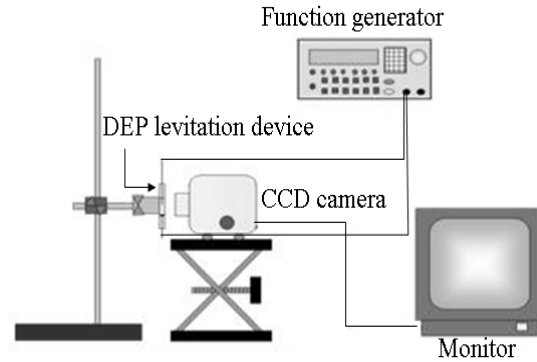


図3 誘電泳動浮揚法における実験全体図

Fig.3 Schematic diagram of the experimental apparatus of DEP levitation.

る。そこで、今回は細胞数測定が困難なため、DNA 量を測定し単位 DNA 量当たりの ALP 活性値として評価した。DNA 量の測定は、ALP 測定の際に遠心分離操作によって得られた上清を、PicoGreen dsDNA Quantitation kit (P11496, Molecular Probes, Invitrogen Co.) を用いて、マイクロプレートリーダーにより蛍光強度 (励起波長: 485nm, 蛍光波長: 528 nm) を測定した。

4. 実験結果および考察

4.1 ラット間葉系幹細胞の誘電特性

ラット間葉系幹細胞 (RMSC) を 10 回継代培養し、各継代回数における Re[K(ω)]を測定することで、Re[K(ω)]に及ぼす継代回数の影響を検討した。また、異なるロット番号の RMSC についても、10 回継代培養を行い、各継代回数における Re[K(ω)]を測定し、Re[K(ω)]に及ぼす継代回数およびロット番号の影響を検討した。図 4 に Re[K(ω)]に及ぼす継代回数の影響を示す。RMSC の周波数特性により 10kHz 未満では負の誘電泳動力を示すため、誘電泳動浮揚法による測定はできなかった。よって、誘電泳動浮揚法による測定は、周波数 10kHz~1MHz, 印加電圧 5V_{pp} で行った。測定結果より、RMSC の Re[K(ω)]は 500kHz において最大値を示し、継代回数が増えると 500kHz における Re[K(ω)]が他の周波数に比べ顕著に低下することがわかった。これは、継代回数が増えることで、培養期間が長くなる。つまり、長期間の培養過程で幹細胞が未分化な状態から分化してしまい、状態が変化することで幹細胞本来の誘電特性が変化したと考えられる。前述の理由から、Re[K(ω)]が高ければ、多くの幹細胞が多分化能を有しているため、目的の細胞へ分化させることが可能であり、分化活性は高いと考えられる。一方、Re[K(ω)]が低ければ、ほとんどの細胞が分化してしまい、分化能を失っているため、分化活性は低いと考えられる。Re[K(ω)]に及ぼすロット番号の違い

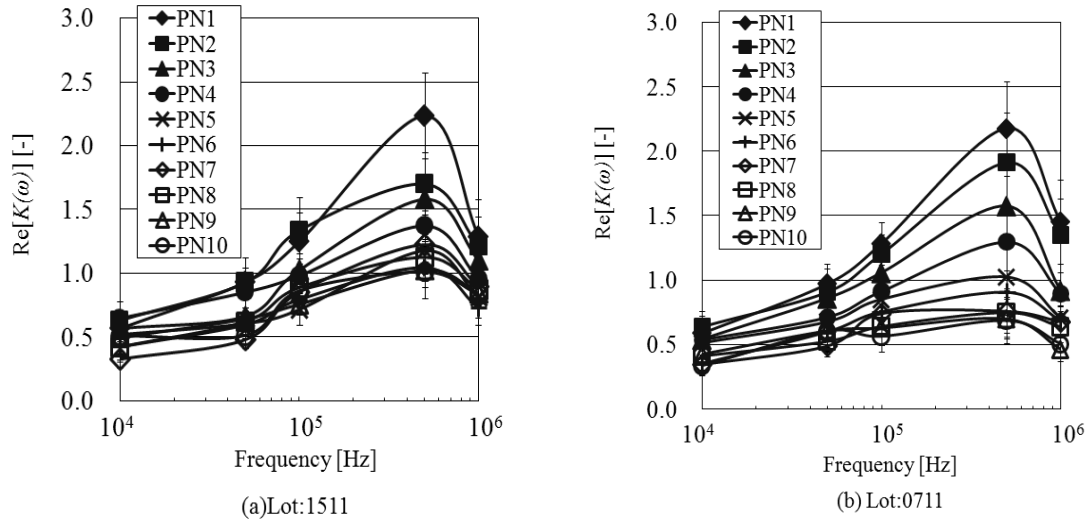


図4 Re[K(ω)]に及ぼす継代回数とロット番号の影響

Fig. 4 Effect of passage number and lot number on Re[K(ω)].

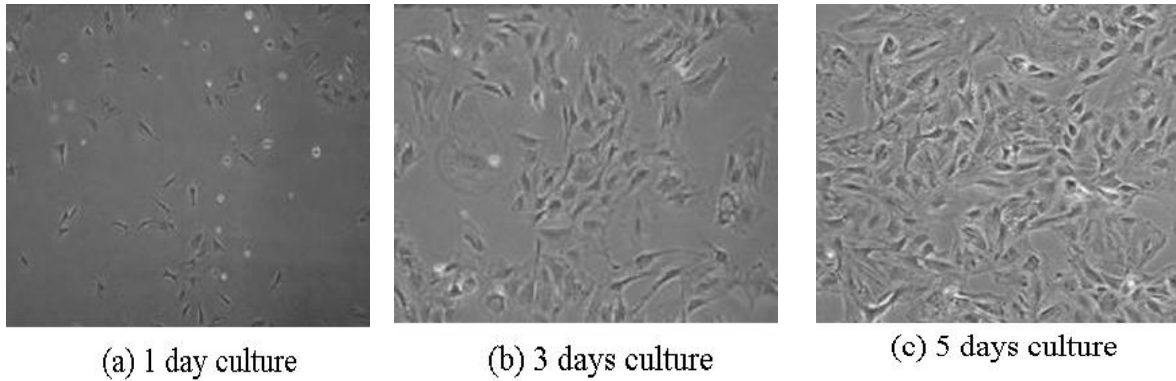


図5 PN2 (Lot:0711) の各培養日数における培養画像

Fig. 5 Culture photo of each culture days in PN2 (Lot: 0711).

については、Lot:1511 と Lot:0711 の両方とも、継代回数が増えると、 $Re[K(\omega)]$ が低下した。しかしながら、500kHzにおける各継代回数の $Re[K(\omega)]$ の値が、ロット番号によって異なることがわかった。これは、個体差によって、 $Re[K(\omega)]$ が異なると考えられる。以上の結果から、誘電泳動浮揚法を用いることで、RMSCの継代回数およびロット番号の違いにおける誘電特性の変化を測定することができた。

4.2 RMSCの増殖活性と誘電特性

図4より、継代回数が増えると $Re[K(\omega)]$ が低下することがわかったが、RMSCは無限に増殖しないため、継代回数が増えることで増殖活性が低下することも考えられる。また、培養日数によっても増殖活性は異なると考えられる。そこで、誘電特性と増殖活性の関係について検討した。RMSCのロット番号は異なるが、PN2 (Lot: 0711) とPN10 (Lot: 1511) のRMSCを播種密度 $3.0 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ で播種した。1日おきに培地交換を行い5日間培養し、PN2における培養1, 3, 5日目のディッシュ底面写真を図5に、増殖速度を図6, PN2とPN10

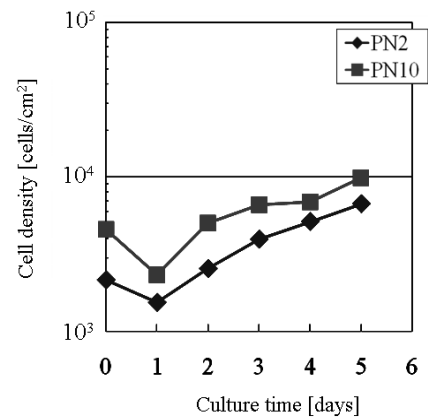


図6 PN2 (Lot:0711) とPN10 (Lot:1511) のRMSCにおける増殖曲線

Fig.6 Growth curve of RMSC at PN2 (Lot: 0711) and PN10 (Lot: 1511).

の各培養日数における $Re[K(\omega)]$ を図7, 8にそれぞれ示した。図5より、培養3日目でサブコンフルエントまで細胞が増殖

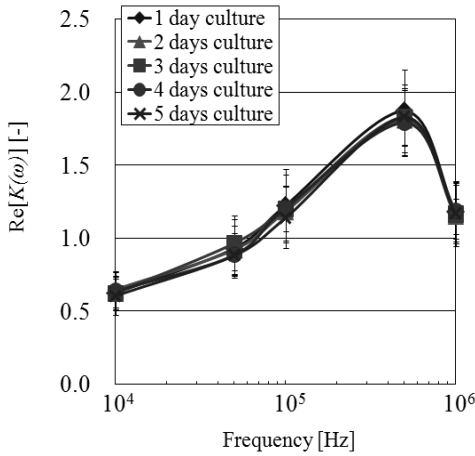


図7 PN2における $Re[K(\omega)]$ に及ぼす培養日数の影響
Fig.7 Effect of culture time on $Re[K(\omega)]$ in PN2.

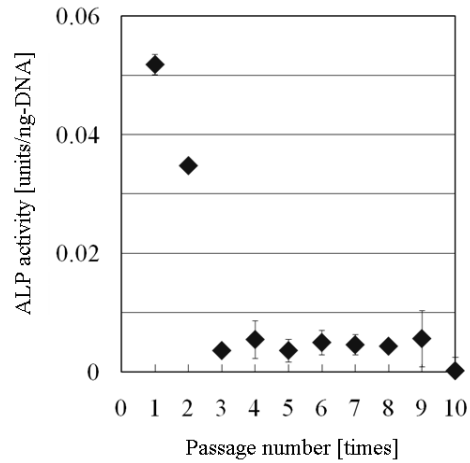


図9 ALP 活性に及ぼす継代回数の影響
Fig. 9 Effect of passage number on ALP activity.

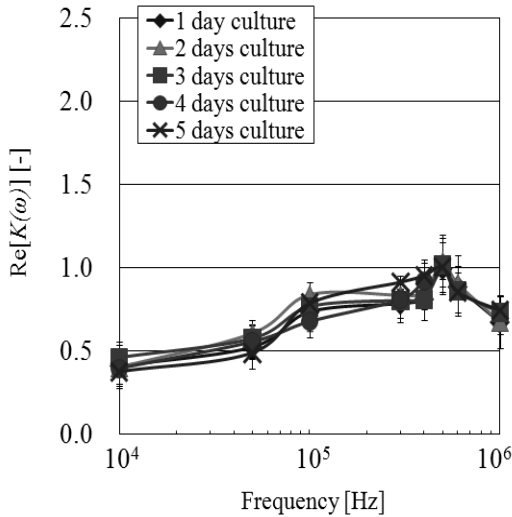


図8 PN10における $Re[K(\omega)]$ に及ぼす培養日数の影響
Fig. 8 Effect of culture time on $Re[K(\omega)]$ in PN10.

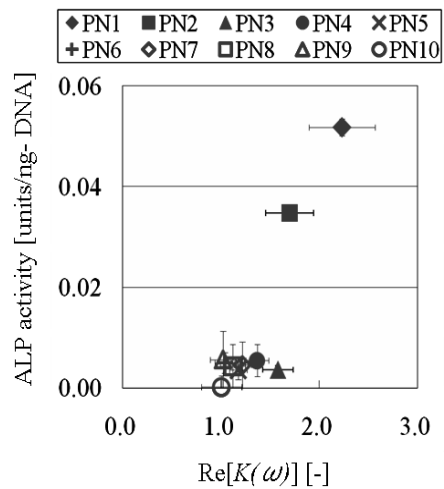


図10 $Re[K(\omega)]$ と ALP 活性の関係
Fig. 10 Relationship between $Re[K(\omega)]$ and ALP activity.

し、培養5日目ではほぼコンフルエントの状態に達した。図6より、PN2とPN10の増殖曲線の傾きは同じであった。つまり、継代を10回行っても、増殖速度は全く低下しないことがわかった。ゆえに、継代回数の増加による $Re[K(\omega)]$ の低下は、増殖活性が低下したことによるものではないことがわかった。また、図7.8より、PN2とPN10の両方について、培養日数によって $Re[K(\omega)]$ は変化しなかった。よって、RMSCの $Re[K(\omega)]$ は増殖活性よりも継代回数との相関があることが明らかとなった。

4.3 ALP 活性測定

骨芽細胞分化用サプリメントを用いて、RMSC (Lot:1511) の分化誘導を行った。PN1~10の各継代回数の細胞について、3回週の培地交換で14日間の分化誘導を行った。分化誘導期間終了後、細胞を回収しALP活性測定を行った。各継代回

数におけるALP活性値を図9に、図4(a)の500kHzにおける $Re[K(\omega)]$ とALP活性の関係をFig.10に示す。Fig.9より、PN1~3にかけて、ALP活性値は継代回数が増えるに従い急激に低下することがわかった。さらに、PN3以上では、ALP活性値に変化はなくほぼ一定の値を示した。つまり、PN1とPN2は、骨芽細胞に分化し、PN3以上はほとんどの細胞が骨芽細胞には分化しなかった。よって、継代回数が増えることでALP活性が低下する。すなわち、分化活性が低下することが明らかとなった。また、図10より、ALP活性の低下と $Re[K(\omega)]$ の低下に相関関係が得られたことから、誘電泳動浮揚法による幹細胞の分化活性測定の可能性が示唆された。

5. まとめ

本研究では、誘電泳動浮揚法を用いて幹細胞の分化活性評価の可能性について検討を行った。各継代回数におけるRMSCの $Re[K(\omega)]$ を測定したところ、500kHzで最大値を示

し、継代回数が増えると $\text{Re}[K(\omega)]$ が低下することがわかった。さらに、RMSC のロット番号の違いによって各継代回数における $\text{Re}[K(\omega)]$ の低下の程度が異なった。 $\text{Re}[K(\omega)]$ に及ぼす増殖活性の影響として、PN2 と PN10 をそれぞれ5日間培養し、各培養日数の $\text{Re}[K(\omega)]$ を測定した。その結果、PN2 と PN10 で増殖速度はほぼ同じであり、培養日数によって $\text{Re}[K(\omega)]$ は変化しなかった。また、各継代回数の RMSC に骨芽細胞への分化誘導を行い、ALP 活性を測定した。その結果、継代回数が増えることにより ALP 活性が低下することがわかった。つまり、500kHz における $\text{Re}[K(\omega)]$ を測定すれば、分化誘導を行わなくても、RMSC の分化活性を推測することが可能であると考えられる。以上の結果より、継代回数の増加による $\text{Re}[K(\omega)]$ の低下と ALP 活性の低下に相関が得られたことで、誘電泳動浮揚法による幹細胞の分化活性測定の可能性が示唆された。

参考文献

- 1) G.H. Markx, P.A. Dyda and R. Pething: J. Biotechnol., **51** (1996) 175
- 2) J.S. Crane and H.A. Pohl: J. Electrochem. Soc., **115**, 6 (1968) 175
- 3) B.D. Manson and P.M. Townsley: Can. J. Microbiol. **17** (1970) 879
- 4) H.A. Pohl and K. Kaler: Cell Biophys., **1** (1979) 15
- 5) G.H. Markx, M.S. Talary and R. Pething: J. Biotechnol., **32** (1994) 29
- 6) G.H. Markx and R. Pething: Biotechnol. Bioeng., **45**, 4(1995) 337
- 7) A. Docosilis, N. Kalogerakis, L.A. Behie, K.V.I.S. Kaler: Biotechnol. Bioeng., **54**, 3 (1997) 239
- 8) Z.Z. Abidin, L. Downes and G.H. Markx: Biotechnol. Bioeng., **96**, 6 (2007)1222
- 9) Z.Z. Abidin, L. Downes and G.H. Markx: J. Biotechnol., **130** (2007) 183
- 10) J. Suehiro, G. Zhou, M. Imamura and M. Hara: IEEE Trans. Ind. Appl., **39** (2003) 1514
- 11) F.F. Becker, X.B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal and P.R.C. Gascoyne: Cell Biol., **92** (1995) 860
- 12) J. Yang, Y. Huang, X.B. Wang, F.F. Becker and P.R.C. Gascoyne: Biophys. J., **78** (2000) 2680
- 13) J. Vykoukal, D.M. Vykoukal, S. Freyberg, E.U. Alt and P.R.C. Gascoyne: Lab. Chip, **8** (2008) 1386
- 14) L.A. Flanagan, J. Lu, L. Wang, S.A. Marchenko, N.L. Jeon, A.P. Lee and E.S. Monuki: Stem Cells **26** (2008) 656
- 15) K.R. Foster, F.A. Sauer and H.P. Schwan: Biophys. J., **63** (1992) 180
- 16) K.V.I.S. Kaler, J.P. Xie, T.B. Jones and R. Paul: Biophys. J. **63**, (1992) 58
- 17) K.V.I.S. Kaler and T.B. Jones: Biophys. J., **57** (1990) 173
- 18) M. Hakoda, T. Hachisu, Y. Wakizaka, S. Mii and N. Kitajima: Biotechnol. Prog., **21** (2005) 1748