

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名:再生医療に向けたバイオ/ナノハイブリッドプラットフォーム技術の構築

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

小寺 秀俊 (京都大学大学院工学研究科 教授)

主たる共同研究者

藤田 博之 (東京大学生産技術研究所 教授)

3. 研究実施概要

本プロジェクトは、当研究グループに属する研究者がこれまで開発してきた細胞計測技術や細胞内への物質導入および MEMS/NEMS の創製技術と再生医療および再生科学を担当するものが有機的に連携し、細胞・組織の再生に関する研究シーズ・ニーズを基に、新たな研究手法としてのマイクロ・ナノシステムの構造と原理およびその使用方法を組織・細胞の再生の的確な実現に向けて進めるものであり、それぞれの研究者が強固に連携して開発を進めた。具体的な目的としては、NEMS/MEMS を用いたナノ・マイクロハンドリング技術やナノ・マイクロバイオデバイスを用いて、細胞の持つ分化増殖能(ボトムアップ)と人為的操作(トップダウン)の組み合わせによる再生医療のための基盤(バイオ・ナノプラットフォーム)技術を、特に再生医療において緊急の需要を持つ膵臓組織(膵島)をターゲットとして開発を進めた。

再生医療においては、細胞の刺激応答・細胞間コミュニケーションなどの機構の解明と、その知見を利用した組織・臓器の人為的構築法の開発の、両面からのアプローチが必要になる。これをナノ・マイクロデバイスを用いて実現するため、本プロジェクトでは、2つのグループを構成し、それぞれで研究を進めるとともに、共に問題点を共有化するように知識・課題・技術の共有化を図りながら、以下の課題に関して研究開発を推進した。

A. 細胞配列・相互作用計測グループ:マイクロデバイス内に人為的に配置・配列した細胞を用い、特定の膵島細胞に外部刺激を与えた場合の、1細胞内での応答局在の時間・空間分解応答解析、および細胞間の相互作用解析。

B. 再生・分化誘導グループ:細胞集合体としての臓器構築のための、マイクロカプセル形成とその中の細胞培養/毛細血管の再生、自発形成された毛細血管とマイクロ流路の接続、部品となる細胞の初期化・分化誘導のための、細胞内物質導入/細胞融合/細胞質移植法の開発。

各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、細胞の配置/物質導入/細胞融合/細胞質移植技術を確立し、膵β細胞を対象に、細胞間相互作用の計測を行ってきた。その主な成果は以下の通りである。

A. 細胞配列・相互作用計測グループ

① 細胞の配列固定デバイスの開発を行い、グルコース・インシュリン等の刺激に対するカルシウムオシレーション等のその場観察を行う手法を確立した。

② GFP-インシュリン遺伝子を組み込んだ膵β細胞株を確立し、インシュリン放出過程の1細胞レベルでの4次元解析を可能にした。

③ 1細胞の局所のみを薬剤刺激するためのデバイスを作製し、局在刺激に対する細胞応答の1細胞レベルでの4次元解析を可能にした。

④ 細胞周囲でのカルシウム・インシュリン濃度分布を計測するための、アレイ状センサを開発した。

B. 再生・分化誘導グループ

① ゲルカプセル内での膵βと血管表皮細胞の共培養を行い、毛細血管の再生を確認した。

② 膵β細胞を含有したゲルファイバーを移植し血糖制御機能を持つことを実証した。

③ 血管成長因子をパターンニングすることにより、マイクロ流路上に設けられたオリフィスに接続するような血管の形成を可能にした。

- ④ マイクロオリフィスを用い細胞内物質導入を行うオンチップエレクトロポレーションの手法を開発し、高収率・低侵襲での遺伝子やタンパク等の物質導入を実現した。
- ⑤ マイクロデバイスを用いた高収率細胞電気融合法を開発し、融合後過程の経時観察を可能にするとともに、細胞質移植の方法を開発した。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

本研究は、当初、マイクロ流路ナノデバイスを用いて膵島の再生を目指す提案であったが、現在も世界中で盛んに研究されているマイクロ流路デバイスの一つの有効な出口として、我が国が先鞭を付けるべきとして採択された。その一年後 iPS 細胞が発見されたことを契機に、当初目的にマイクロ流路を用いた細胞の初期化のテーマが加わり、相互に融合した研究として発展して行った。研究項目は、大きくは①細胞間相互作用、②細胞の初期化、③組織再生からなる。研究成果は、①では、細胞をマイクロ流路に固定し、刺激し、下流側での細胞応答を観察するが、まず、超低速ペリスタポンプ開発、Min6m9 膵β細胞の流路内培養やコミュニケーション観察を行う独創的マイクロ流路デバイスが開発された。これを用い、グルコース刺激・インシュリン刺激による細胞のCa⁺⁺振動の計測、GFP 導入したインシュリン放出の4次元解析、細胞分泌物の興奮のカスケードやマイクロカンチレバー共鳴器によるその場検出などが達成された。②では、独創的なオリフィスアレーに固定した ES 幹細胞に電界集中型の電気穿孔をさせ細胞液を通常細胞に注入することにより細胞の初期化を達成した。特筆すべきは、①で開発されたマイクロ流路内の微小流を正確に制御する技術を開発したことにより、現在再生医療の切り札として着目されているヒト iPS 細胞の継続的培養を可能にしたことである。③では、Min6m9 と血管内皮細胞(HUVEC)のカプセル化に成功し、この中で数日間にわたって共培養したところ、血管状の構造の形成を確認した。一方、Min6m9 細胞を内包させたハイドロゲルマイクロファイバーをラットの腎皮膜下へ移植し、血糖値の著しい低下を確認した。現在、ビオチン・アビジン接合したα細胞とβ細胞のファイバーへの移植を試みている。

以上、マイクロ流路デバイス・計測デバイスを用いた細胞間の相互作用を基礎的に研究するプラットフォームの構築に成功し、マイクロ流路を有するナノデバイスを用いて、膵β細胞を用いた細胞間相互作用の計測実験を行い、個々の細胞の計測と微細操作を可能にしたことは高く評価でき、当初計画の項目はほとんど達成された。特に、インスリン分泌細胞のカプセル化されたチューブの作製と埋め込みについて、新しい展開が見られており、大変期待される。

- ① 原著論文(国内6件、海外143件)、その他の著作物・総説、書籍18件
- ② 学会招待講演(国内会議51件、国際会議27件)
- ③ 学会口頭発表(国内会議41件、国際会議23件)、ポスター発表(国内会議68件、国際会議71件)
- ④ 国内特許出願(6件)、海外特許出願(0件)
- ⑤ 受賞16件、新聞報道等24件

原著論文数、国内外の学会発表は多く大変評価されるが、大規模な研究チームの割に特許件数が6件という結果は少し寂しく感じる。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

本研究は、膵島再生をターゲットにし、マイクロ流路デバイスを用いて人工的に *in vitro* で培養したαとβ細胞の3次元構造化の構築と、iPSの分化からの膵島再生の二つの方向からアプローチしている。世界的に見ても、糖尿病患者の数は多く、病状のメカニズムの解明が活発に研究されているが、それに基づく再生膵島の移植が可能となれば、大きな福音となる。本研究で達成された科学技術として、①マイクロ流路デバイスとそれを用いた膵β細胞の培養、インシュリンやグルコース応答、コミュニケーション観察、②マイクロカンチレバー共鳴器デバイスによる分泌物その場検出、③オリフィスアレー電界集中型電気穿孔デバイスと ES 幹細胞液による通常細胞の iPS 化、④微小な流速制御が可能①のマイクロ流路を用いた iPS 細胞の培養の長寿命化と iPS の実用化促進、⑤Min6m9 細胞内蔵ハイドロゲルマイクロファイバーのラットの腎皮膜下への移植に

よる血糖値低下応答などの成果は社会へ大きなインパクトを与える。マイクロ流路デバイスは製薬企業を通して商品化されることが決定したことは社会還元の一環として評価される。

本研究は、膵島再生実現への第一歩として位置づけられるが、まだ実用にはかなりの時間が必要とされるものの、本研究を通して開発された手法や関連するデバイスは、医療、バイオ系の広い分野に応用出来る可能性が大きく、将来きわめて有用な技術に成長すると期待される。iPS 細胞の継続培養につながる成果は独創的なマイクロ流路が実現して初めて達成され、実用化へ停滞しているマイクロ TAS が今後大きく注目されることは必至である。達成された本マイクロ流路のプラットフォーム群は、特に ES 細胞、iPS 細胞の研究グループと協力して発展させて行くことにより、再生膵島に関して、世界に先駆けた再生医療研究を展開出来ると期待される。

4-3. 総合的評価

本チームの研究は、京都、東京の二か所に分かれながらも密接な連携の下に、細胞工学とMEMS技術を融合して、新しい研究の方法・分野を形成し、価値ある成果を達成したことは、研究代表者のリーダーシップが大いに発揮された結果と考えられる。独創的マイクロ流路を有するナノデバイスを用いて、*In vitro* による人工膵島の創製を目指し、膵β細胞の培養、細胞間の応答やコミュニケーションなどの相互作用の計測などを可能にしたことは高く評価できる。本研究の成果は、世界中で多くの研究者が競って研究しているマイクロ TAS の分野で、風穴を開けると期待される。また、並行して研究されたオリジナリティの高い電界集中型電気穿孔により ES 幹細胞液を通常細胞に導入することが可能になり、細胞初期化の効率化につながる効果が得られたことは、今後大きく期待できる。特に、従来課題であった iPS 細胞の長寿命化が当該マイクロ流路の流速の精密制御機能が開発されたことにより実現したことは、大変な貢献である。流速は何の機能をしているのか？また、遺伝子レベルで何が起きているのか是非解明され、iPS の実用化の加速を強く望む。今後は膵島の再生医療に向けて、このマイクロ流路プラットフォームを駆使して、ES 細胞、iPS 細胞研究グループとどのように協力して研究を進めるかが重要課題である。

そのため、本 CREST の研究終了後も、二か所のコミュニティの結束を一層強めた研究体制を維持し発展出来るよう心がけていただきたい。是非とも、この研究プロジェクトの更なる展開に資金が提供されるよう心からお願いしたい。