

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成13年度採択研究代表者

岡野 光夫

(東京女子医科大学先端生命医科学研究所 教授・所長)

「新規組織再構成技術の開発と次世代バイオセンサーの創製」

1. 研究実施の概要

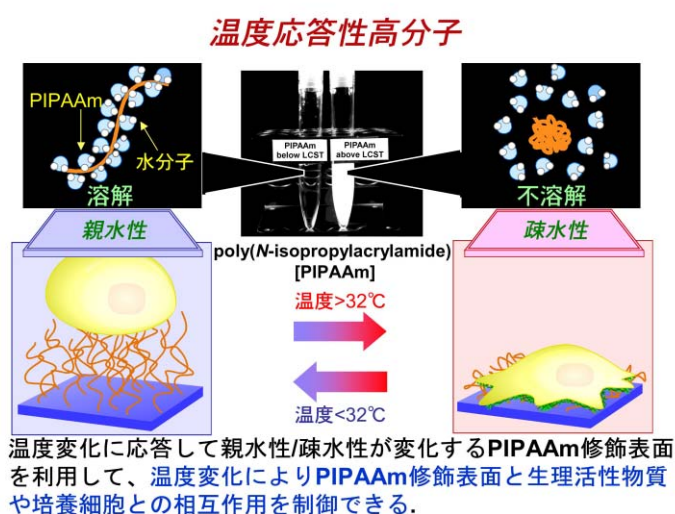
21世紀は様々な局面で培養細胞を用いることが期待されている。本件研究ではナノメートルに代表されるナノの領域で培養細胞を制御し、従来にはない高精度で細胞を活用する新テクノロジーを開発することを目的としている。特に、細胞・組織に観察されるナノドメイン構造を制御して細胞をインテリジェント材料として活用するまったく新しい方法論の確立を目的として、第3年度では、以下の研究をおこなった。1) ナノドメイン操作材料の開発および2) 新規組織再構成技術の開発については、微細加工技術を用いたパターン化表面を用いるトップダウン的手法に注力した。昨年度に引き続き、電子線重合を用いたナノメートルオーダーの厚さでの高分子のグラフト技術を用いる系の他に、リビングラジカル重合を用いる系を、今年度、新規に開発した。表面の微細加工については、引き続きUVエキシマレーザーを用いたレーザーアブレーションを用いる方法を洗練させると共に、昨年度に開発した液晶プロジェクターを改造して作製したマスクレス光重合装置を用いたマイクロ加工技術をさらに発展させた。これらを用いて、細胞・組織ナノドメインの再構成技術の開発と、細胞機能評価をおこなった。3) ナノ量化学物質のセンシング材料およびデバイスの開発では、循環器系細胞、免疫系細胞、神経系細胞が調節物質として産生する一酸化窒素やATPなどの核酸分子をナノモラーオーダーでリアルタイムかつ高感度にオンチップ検知することのできる「ナノ集積構造センサ材料（合成触媒）」の開発を昨年にも引き続きおこなった。また、半導体を利用した新規ナノセンサの開発としては、高速デバイスの一つであるHEMT構造に集中し、溶液中でのFET動作とゲート部分への検出分子の配置について実験を進めた。エッチングによるゲート表面の親水化など、生体高分子計測のためのインタフェースの最適化を検討した。作製したデバイスの初期的な特性評価として、プローブ顕微鏡を用いて埋め込みナノ構造への歪印加の影響を検討した。4) 細胞インテリジェント化技術の開発では、ストレスや薬剤、環境変化等に応答して変化する遺伝子の発現量を外部からリアルタイムで検出できる細胞株を樹立することを目指して、ストレスに応答して発現する遺伝子であるHSP70Bのプロモーターにレポーター遺伝子を融合させ、ストレスに応答して発光や蛍光を発する細胞を作製した。プロモーターの多重化などにより感度の向上を検討した。同様の手技を用いて細胞増殖、アポトーシス等に応答して発光、

あるいは蛍光を発する細胞を作製した。次年度以降の研究で、1) から4) の要素技術を統合して、種々の因子が細胞に与える影響を簡便かつ経時的にモニターできるバイオセンサーを創製する。

2. 研究実施内容

1) ナノドメイン操作材料の開発および2) 新規組織再構成技術の開発

我々は、電子線重合を用いてナノメートルのレベルで厚みを制御して様々な高分子を大面積表面に固定化する技術を洗練するとともに、機能性高分子を固定化した高機能性表面を用いたバイオメディカル領域にける種々のアプリケーションの開発に取り組んで



きた。たとえば、温度応答性高分子を固定化した温度応答性培養皿を用いて移植可能な細胞シートを作製し、これを用いて組織再生をおこなう技術（細胞シート工学）を世界に先駆けて開発した。皮膚や角膜などではすでに臨床応用に成功している（この技術を絵柄のデザインとした記念切手が作製された）。

本研究ではこれらの技術を、さらに発展させ、細胞や再構成組織

中に観察される細胞接着構造や細胞成長因子受容体等のシグナル分子のクラスタリングなどに代表されるナノ構造（細胞ナノドメイン）を積極的に制御することにより、生き

た細胞や再構成組織を有効に活用する新規バイオセンサーの創成を目的として以下の研究をおこなった。

ナノドメイン操作材料としては昨年引き続き、細胞接着性ペプチドや細胞成長因子等の生理活性分子を分子配向や分子間距離を制御しながら培養表面に固定化する技術の開発をおこなった。

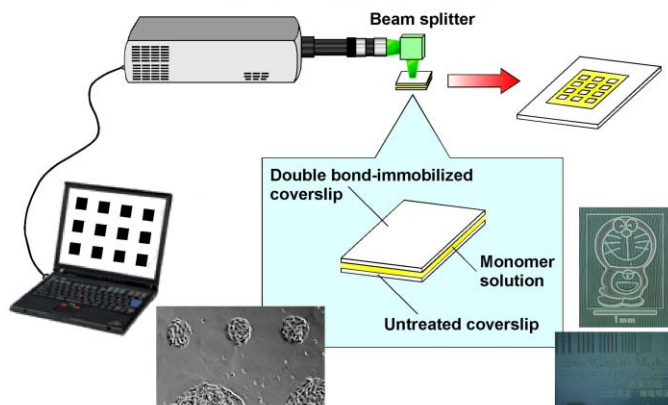
さらに、組織中でのみ観察される高度な細胞機能の発現には、組織中で共存する複数種の細胞を培養系においても、その位置関係や細胞数の比を精密に制御しながら、その共存を再現する必要があるとの考えから、複数種の細胞を任意の位置に配置させるマイクロパターン共培養用マイクロパターン化表面の開発をおこなった。また、昨年度にこの技術を用いて作製した肝実質細胞と血管内皮細胞のマイクロパターン化共培養系で、肝実質細胞の分化機能亢進の分子機構の検索を目的として、分化マーカーの遺伝子発現プロファイルを検討している。



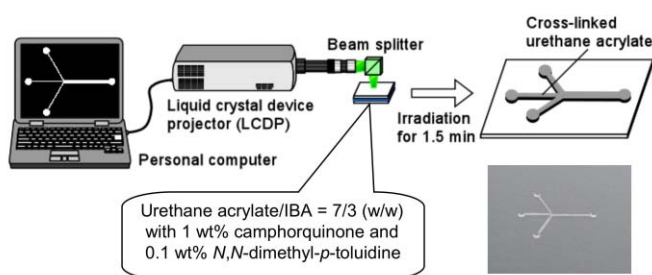
マイクロパターンの作製には金属製マスクを用いた電子線の多段階照射、あるいは電子線重合により作製したナノグラフト表面をUVエキシマーレーザーを用いて局所的にア

ブレーションし、基板層を再露出させる方法を用いてきたが、今年度はこれに加えて、昨年度に開発した液晶プロジェクターを改造して作製したマスクレス光重合装置を用いる新しい方法を利用し、マイクロパターン作製に用いる光反応性材料と作製法、反応条件の最適化をおこない、デザインに制限なく種々のマイクロパターンを作製することに成功した。

液晶プロジェクターを改造して作製したマスクレス光反応装置

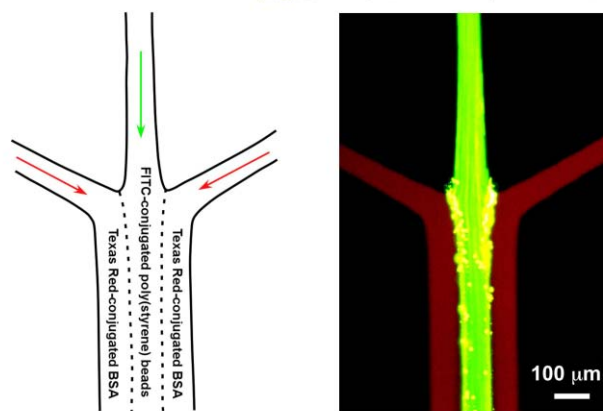


マスクレス光反応装置によるウレタンアクリレート製マスターの作製



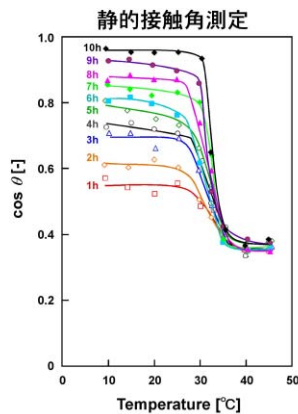
また、本計画の最終目的は、個々の要素技術を一つの基板（チップ）上にコンパクトに配列し、ナノドメインを解した細胞の機能制御・培養から細胞の刺激応答の高感度検出までをオンチップ上でおこなうデバイスの開発にある。このデバイス化に当たり、マイクロ流路内で実現される層流を活用すべく、シリコーンエラストマーのポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いたマイクロモールドの利用を想定している。これまで、試作的に外注により作製した高価な鋳型を用いてPDMS製マイクロモールドを作製してきたが、マスクレス光重合装置を用いて鋳型を作製し、これを利用してPDMS製マイクロモールドを作製する新規技術を開発した。現在、PDMS製マイクロモールド内で細

FITCラベル化ポリスチレンビーズとTexas Red-BSAの層流マイクロパターンニング



胞培養を安定におこない、細胞局所的に刺激を負荷する技術を開発中である。

反応時間を変化させたときのぬれ性変化



反応時間の増加に伴い、低温における接触角は小さくなった。

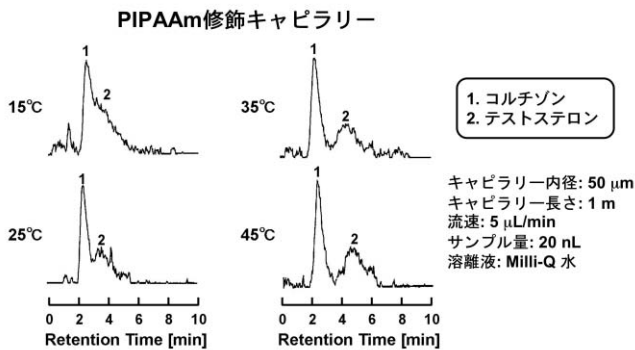
高温側では反応時間に関わらずほぼ一定。



PIPAAm分子鎖が強く凝集することで重合開始剤導入表面の影響が大きくなった。

リー内腔表面にATRPにより温度応答性高分子を数十ナノメートルの厚みでグラフトし、温度応答性ガラスキャピラリーを作製し、これを用いてクロマトグラフィーをおこなった。

ステロイド類のクロマトグラム

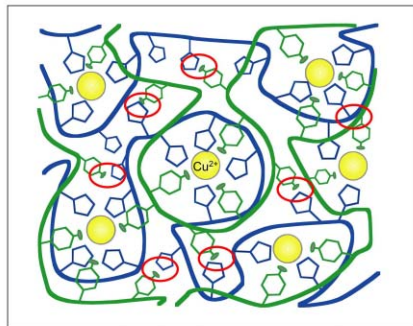
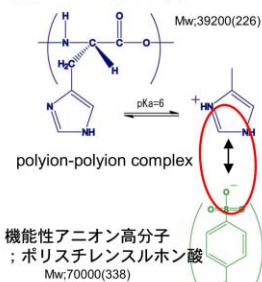


温度上昇によりテストステロンの保持時間が延長した。

でステロイド類を分離することができた。キャピラリー温度クロマトシステムは、最終形態である統合化チップデバイスに組み込むことを予定しており、これを用いてオンチップ上でマイクロ流路内の微量成分を解析することを目指している。

リン酸エステル分子センシングを行う分子トランスデューサとしての分子設計・合成

配位カチオン高分子; ポリ-L-ヒスチジン



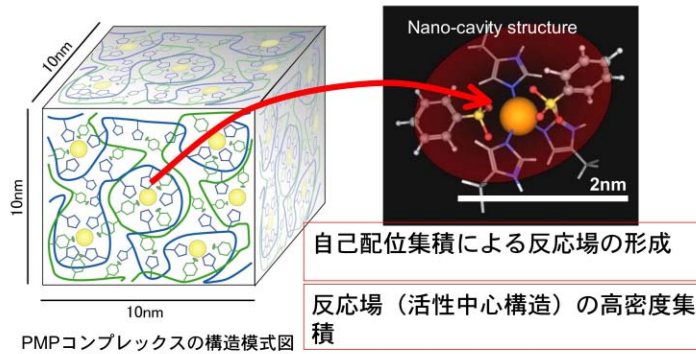
加えて、機能性高分子グラフト層の精度のさらなる向上を目的としてリビングラジカル重合（原子移動ラジカル重合：ATRP）を用いる方法を開発した。このATRPを用いて、これまでにカラムクロマトグラフィーとして実現してきた温度応答性クロマトグラフィーを、充填剤を用いない中空流路表面で実現することに成功した。すなわち、内径数十から数百マイクロメートルのガラスキャピラ

リー内腔表面にATRPにより温度応答性高分子を数十ナノメートルの厚みでグラフトし、温度応答性ガラスキャピラリーを作製し、これを用いてクロマトグラフィーをおこなった。グラフト厚は、20ナノから80ナノメートルまできわめて精度良く反応時間依存的に表面リビング重合することにより達成できた。またAFMにより求めた表面のラフネスは2ナノメートル以下であり、従来のラジカル重合では達成できない平坦な高密度高分子ブラシ表面を達成できた。また、この温度応答性ガラスキャピラリーを用いることにより有機溶媒を必要とすることなく温度変化のみ

3) ナノ量化学物質のセンシング材料およびデバイスの開発

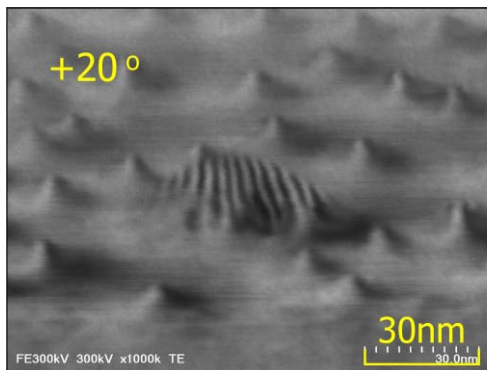
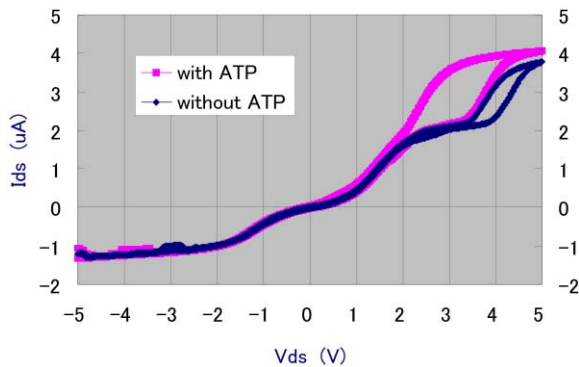
昨年度に引き続き、自己集積構造形成によるナノ集積分子構造を有するPIM触媒を用いたナノ化学量物質のセンシング技術の開発をおこなった。この触媒は電子吸引性の強い官能基を触媒中心周囲に三次

Polymer-Metal-Polymer complex (PMP コンプレックス)



元の自己集積した構造をとり、他では見られない低い酸化還元電位と高い反応活性を実現でき。電極反応とのカップリングにより、ATPなどの核酸、NOなどを基質としてナノモラーオーダーの高感度のセンシングが可能である。これまでに、金属イオンを配位する高分子の合成を終了しているが、さらなる高感度、安定性を実現するために、電極上への固定化法、製膜技術の最適化をおこなっている。活性中心の分子構造についてはコンピュータシミュレーションにより、自己配位集積に要求される条件などを検討した。

Cu-complex polymer on HEMT gate with/without ATP in electrolyte

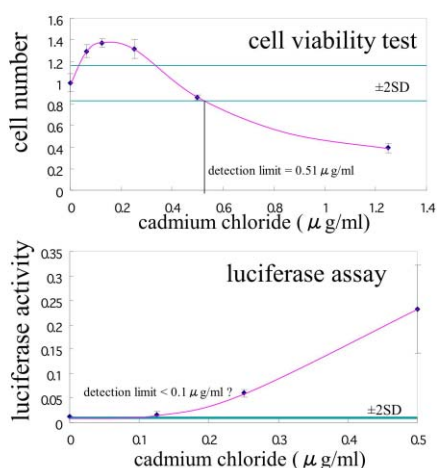


配位させる金属原子および組み合わせる分子選択膜の最適化により、高タンパク質濃度である培養条件下でも細胞機能測定に十分な基質特異性と高感度を実現すべく、電極上へのアセンブル法を検討中である。

半導体を用いたナノ計測デバイスについては、まずゲートを修飾しない状態でHEMT構造をバッファ溶液に浸漬した状態で電圧電流特性を調べた。ゲートに接する溶液が浮遊状態であるかぎり、特性に変化は見られないが、溶液に電圧をかけた場合、およびゲート電極に電気化学反応を起こす分子を配置した場合には、特性変化が観察された。GaAs表面に化学反応が生じている可能性もあり、ゲート電流との関係が重要であることが示唆された。また、HEMT構造は表面がGaAsであるが、その親水性を増して修飾分子との結合を強化するために親水化処理を検討した。

アンモニアと過酸化水素水のごく薄いエッチャント（体積比 100:1）により、接触角が85度から20度へと変化し、大きく親水化することが可能であった。エッチャントの部分蒸発によって酸化物残留領域が生じていた。作製したデバイスの初期的な特性評価として、プローブ顕微鏡を用いて埋め込みナノ構造への歪印加の影響を検討し、

HSP70Bプロモーターを用いた細胞毒性評価



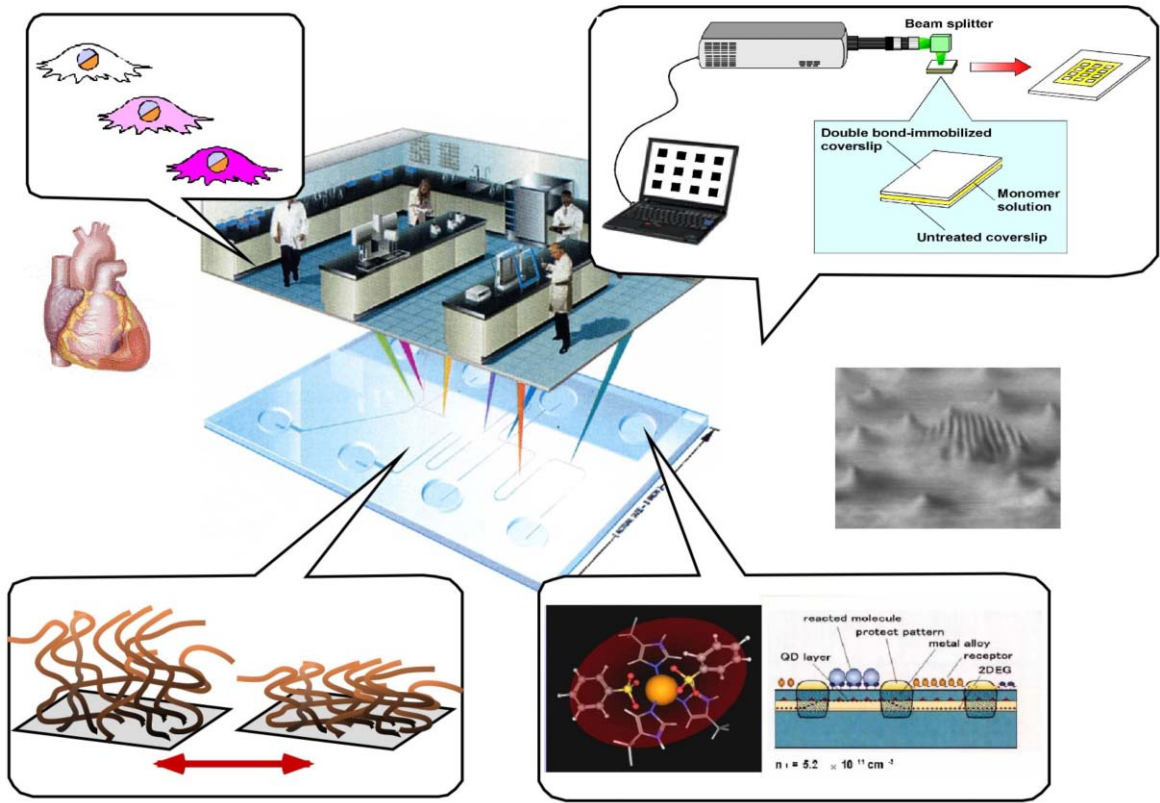
リアルタイムで検出できる細胞株を樹立することを目指して、ストレスに応答して発現する遺伝子であるHSP70Bのプロモーターにレポーター遺伝子を融合させ、ストレスに応答して発光や蛍光を発する細胞を作成した。レポーター遺伝子としては昨年度来用いているGFPの他にルシフェラーゼを採用した。ルシフェラーゼを用いた系では、カドミウムの細胞毒性の検出において従来法より1桁以上高い感度を実現し、ナノグラムオーダーの毒性検出が可能になった。さらにプロモーターの多重化などにより感度の向上を検討中である。また、同様の手法を用いて細胞増殖、アポトーシス等に応答して発光、あるいは蛍光を発する細胞を作成した。細胞増殖、アポトーシスのマーカーとして、それぞれPCNA、p53遺伝子のプロモーターを用いた。

次年度では以上の要素技術をさらに洗練させると共に、これらを相互に組み合わせてデバイス化をおこなう。

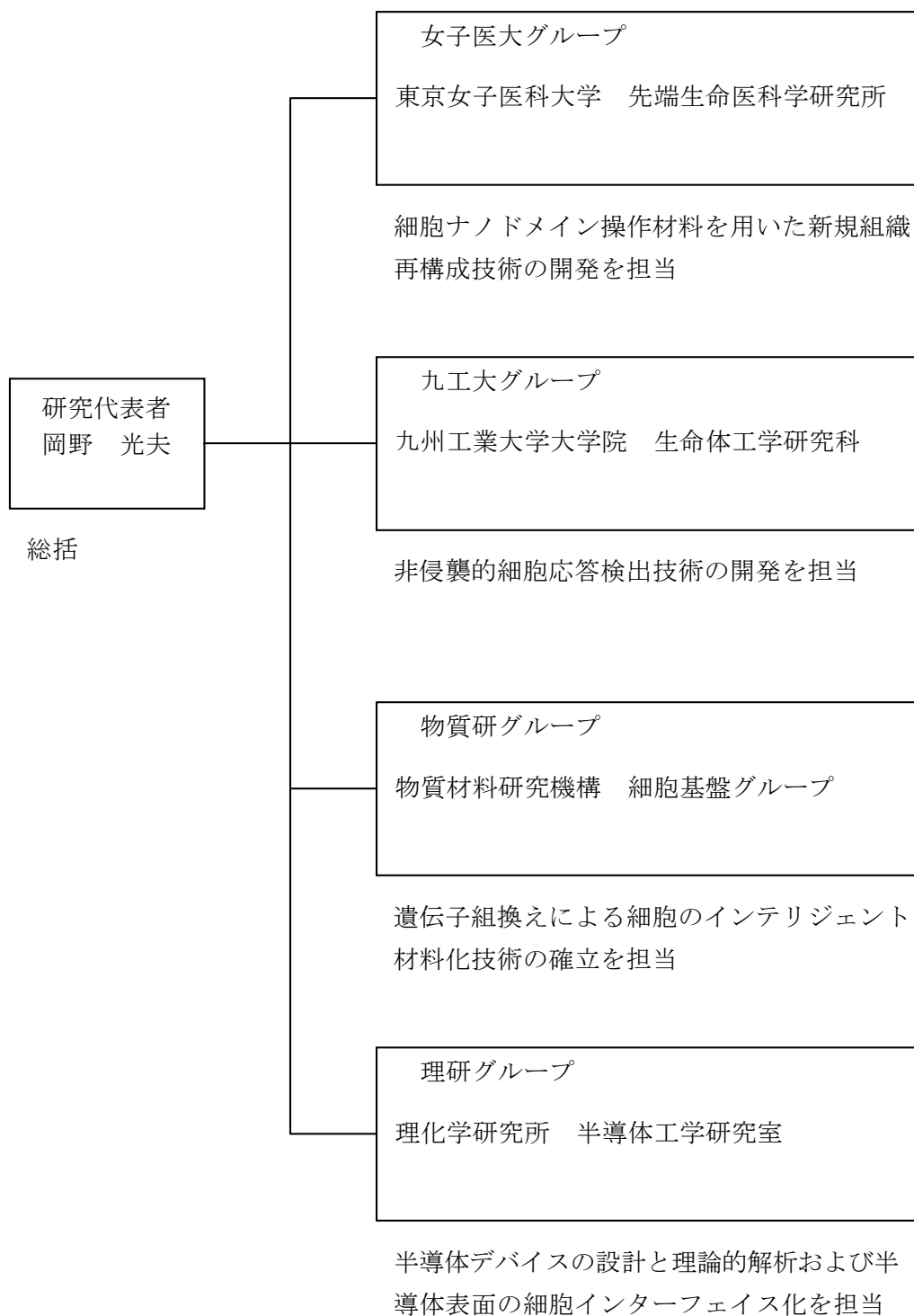
歪の効果を明らかにした（左図：電子顕微鏡像に現れたナノスケールの歪の影響）。現在、ゲート表面における化学反応を電流変化によって検出することを目的として、溶液中HEMTの動作特性についてさらに実験を継続中である。ゲート表面への化学修飾については酵素の固定化を検討中である。

4) 細胞インテリジェント化技術の開発

細胞インテリジェント化技術の開発では、ストレスや薬剤、環境変化等に応答して変化する遺伝子の発現量を外部から



3. 研究実施体制



4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, “Accelerated cell sheet recovery by co-grafting of PEG with PIPAAm onto porous cell culture membranes”, *Biomaterials*, 24, 1223-1232, (2003)
- Z. Feng, M. Yamato, T. Akutsu, T. Nakamura and T. Okano, “Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering”, *Artificial Organs*, 27(1), 84-91, (2003)
- M. Ebara, M. Yamato, M. Hirose, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, “Copolymerization of 2-carboxyisopropylacrylamide with N-Isopropylacrylamide accelerates cell detachment from grafted surfaces by reducing temperature”, *Biomacromolecules*, 4, 344-349, (2003)
- J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, “Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides”, *Anal. Chem.*, 75, 3244-3249, (2003)
- Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma and T. Okano, “Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature”, *Tissue Engineering*, 9(5), 1005-1012, (2003)
- M. Yamato, C. Konno, S. Koike, T. Shimizu, A. Kikuchi, K. Makino and T. Okano, “Nanofabrication for micropatterned cell arrays by combining electron beam irradiated polymer-grafting and localized laser ablations”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A, 1065-1071, (2003)
- K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano and T. Okano, “Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface”, *Transplantation*, 77(3), 379-385, (2004)
- K. Itoga, M. Yamato, J. Kobayashi, A. Kikuchi and T. Okano, “Cell micropatterning using photopolymerization with a liquid crystal device commercial projector”, *Biomaterials*, 25, 2047-2053, (2004)
- N. Takeda, E. Nakamura, M. Yokoyama, and T. Okano, “Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses”, *J. Control. Rel.*, 95(2), 343-355, (2004)
- 大和雅之, 岡野光夫, 「温度応答性高分子ナノグラフト表面」, *蛋白質 核酸 酵素*, 48(11), 1602-1608, (2003)
- M. Harimoto, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “Cell Sheet Engineering:

Intelligent Polymer Patterned Surfaces for Tissue Engineered Liver” ,
Macromol. Symposia, 195, 231-235, (2003)

- A. Kikuchi, T. Okano, “Temperature- Responsive, Polymer- Modified Surfaces for Green Chromatography” , Macromol. Symp., 207, 217-227, (2004)
- 池野慎也, 春山哲也, “細胞・組織バイオセンシングの進展” , 分析化学, 53(3), 135-146 (2004)
- K. Ozasa, Y. Aoyagi, M. Iwaki, and H. Kurata, “Facets, indium distribution, and lattice distortion of InGaAs/GaAs quantum dots observed by three dimensional scanning transmission electron microscope” , J.Appl.Phys., 94, 313-317, (2003)
- K. Ozasa, Y. Aoyagi, A. Yamane, and Y. Arai, “ Enhancement of photoluminescence of InGaAs/GaAs quantum dots induced by nanoprobe pressure effects” ,