

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」

平成 18 年度採択研究代表者

小寺 秀俊

(京都大学 大学院工学研究科 教授)

「再生医療に向けたバイオ/ ナノハイブリッドプラットホーム技術の構築」

1. 研究実施の概要

本プロジェクトは、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することを目的とする。具体的には、細胞の人為的配置と局所刺激による細胞間相互作用のリアルタイム解析、ナノ・マイクロ技術による細胞内物質導入等の細胞刺激を通じた分化・増殖の誘導と制御、増殖した細胞の有機的空間配置による臓器組織の人為的構築を通じ、膵島のみならず一般の臓器の再生医療を行うためのバイオ・ナノプラットホーム技術の実現を目指す。

最初の 3 年間で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、膵島細胞を構成する α 細胞・ β 細胞・ γ 細胞を対象に、細胞の分離技術さらに配置技術の開発、細胞間相互作用の計測を行う。後半の 3 年では、その計測結果を元に、膵島細胞の分化・増殖の制御を行い、さらに膵島の再構築を目指す。

2. 研究実施内容

本プロジェクトは、MEMS/NEMS 技術に基づいた、① 細胞の人為的配置と局所刺激による細胞間相互作用のリアルタイム解析、② 細胞内物質導入等の細胞刺激を通じた分化・増殖の誘導と制御、③ 増殖した細胞の有機的空間配置による臓器組織の人為的構築を通じ、膵島のみならず一般の臓器の再生医療を行うためのバイオ・ナノプラットホーム技術の実現を目指す。このためには、工学的技術要素の開発と、生物学・医学的見地からの研究を、協調的に推進する必要がある。具体的研究開発項目は以下である。

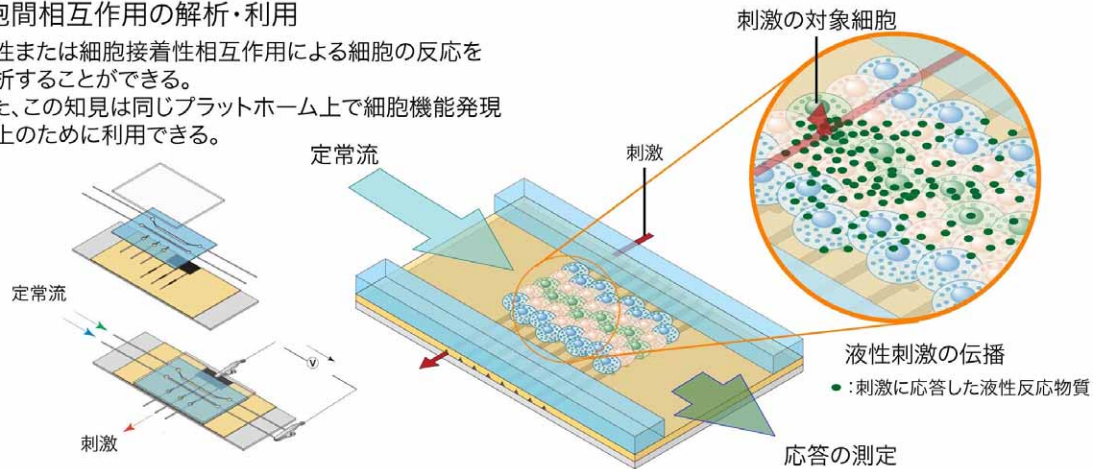
1) 細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発

マイクロシステムを用いて 1 細胞レベルでの細胞間相互作用の計測を行うためには、異なる種類の細胞を所望の位置に配置し、その活性を維持しつつ、細胞個々に各種刺激（化学的・物理的）を加え、細胞間伝達物質を拡散させてしまうことなく隣接する細胞に制御

された形で導き、その応答を計測することが必要になる（図1）。このための要素技術として、a) マイクロ構造を用いた細胞配置、b) その場でのエレクトロポレーションを用いた細胞内物質導入（図2-1参照）、c) ナノ・ディスペンサーを用いた局所化学刺激、d) 細胞応答の計測法の開発を行い、これら要素技術のマイクロ流体回路を用いた集積化を行う。細胞の活性を維持するための長時間にわたる培養液の環流を、現実的な培養液の量で実現するための、流体制御・送液技術の開発も大きな要素の1つである。また、この集積化デバイスを用い、分泌性の細胞間相互作用およびギャップジャンクションを含む接触性細胞間相互作用の計測を行い、細胞分化・再生のための条件の明確化を行う。

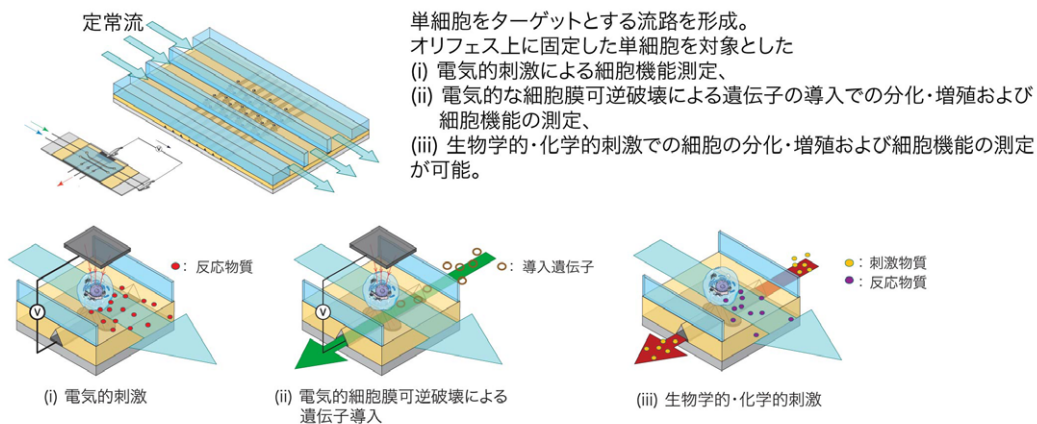
①細胞間相互作用の解析・利用

液性または細胞接着性相互作用による細胞の反応を解析することができる。
また、この知見は同じプラットフォーム上で細胞機能発現向上のために利用できる。



②細胞内物質導入による細胞の分化・増殖制御

(1)単細胞に対する分化・増殖制御



(2)多細胞に対する分化・増殖制御

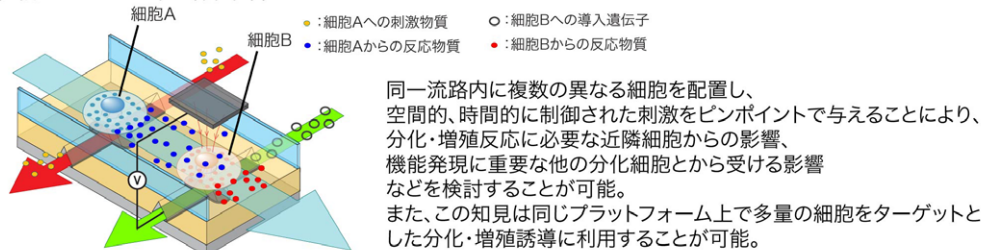


図1 集積化ナノデバイス上への細胞配置による細胞間コミュニケーション計測

2) 細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御

分化・増殖にかかわる因子を細胞に定められたタイミングで添加し、細胞の分化・増殖を人為的に制御するための手法の開発を行う。因子としては、その影響が永続する遺伝子よりも、一過性の影響を持つタンパクの導入また転写因子の一時的発現に主に注目する。細胞表面に働く因子の場合は、上記1)で開発した流体回路を用いて培養細胞の暴露を行う。因子を細胞内に導入する場合には、それが精製可能なら図2-1に示すその場エレクトロポレーション法を用いる

が、特定の細胞内に含まれているが微量で精製不能の場合に対しては、図2-2に示す細胞質移植法の開発を行う。すなわち、マイクロオリフィスを用いて、細胞質ドナーとレシピエントの電気細胞融合を行い、吸引によりドナーの核を分離することにより、ドナーの細胞質のみをレシピエントに移植する。MEMS技術によるオリフィスアレイ構造を用いることにより、大量並列の操作が可能である。

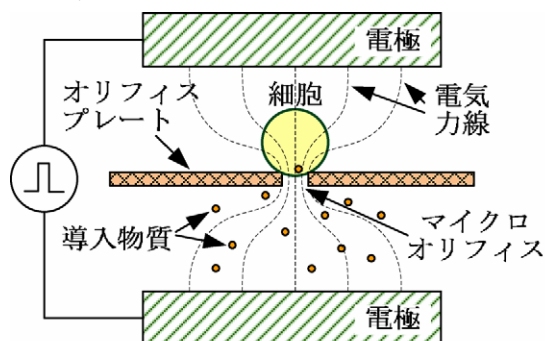


図 3-1 その場エレクトロポレーション法

絶縁性オリフィスプレートに設けられたマイクロオリフィスの作る電界集中を利用して、オリフィス上の膜を部分的に可逆破壊して物質を細胞内に導入する

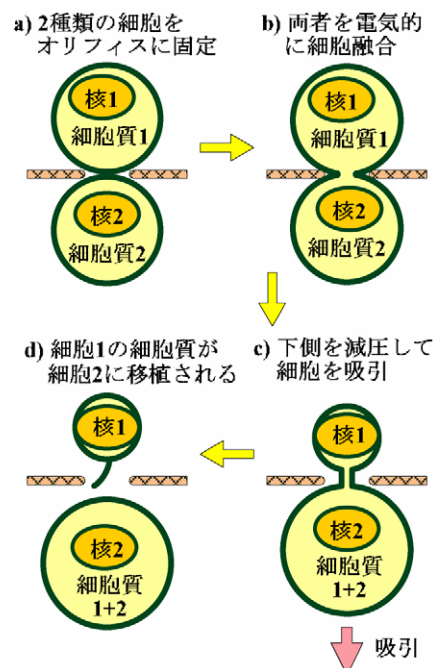


図 3-2 マイクロオリフィス上での電気融合を用いた細胞質移植

3) 臓器組織の人為的構築

2)により分化・増殖された細胞を、1)の研究等から得られる最適な配置で組立て、組織を人為的に構築するには、細胞の正確かつ生産性の高い配置法、およびカプセルング技術が必要になる。配置には1)と共通の手法およびその積層による3次元配置を用い、カプセルングにはマイクロ流体回路内での微小ゲル粒子作製法を用いる。

2006 年度(2006 年 10 月～2007 年 3 月)の研究においては、これまで開発してきたデバイスの高集積化と微細化を進め、チップ内での細胞培養条件の最適化を行うとともに、その場エレクトロポレーション法による細胞内物質導入効率の評価と、細胞活性に影響を与えないことの確認、細胞間相互作用計測および分化誘導観測技術の検討、細胞ハンドリングおよび機械的な物質注入のためのナノデバイスの作製法の検討、マイクロオリフィス上での電気融合の実証、さらに細胞組立のためのマイクロ流体回路を用いたゲル包埋技術の開発を行った。

3. 研究実施体制

(1)「ナノデバイス構築・細胞計測」グループ

①研究分担グループ長:小寺 秀俊(京都大学 教授)

②研究項目

- ・細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発
- ・細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御
- ・臓器組織の人為的構築

(2)「細胞の分化・増殖の誘導・制御」グループ

①研究分担グループ長:鷺津 正夫(東京大学 教授)

②研究項目

- ・細胞内物質導入・細胞質移植法の開発と細胞分化・増殖の誘導・制御

(3)「細胞並列同時操作と一分子観測」グループ

①研究分担グループ長:藤田 博之(東京大学 教授)

②研究項目

- ・半導体マイクロ・ナノ加工技術の細胞並列同時操作と一分子観測への応用

(4)「細胞並列同時操作と一分子観測」グループ

①研究分担グループ長:橋口原(香川大学 教授)

②研究項目

- ・半導体マイクロ・ナノ加工技術の細胞並列同時操作と一分子観測への応用

(5)「細胞並列同時操作と一分子観測」グループ

①研究分担グループ長:横川 隆司(立命館大学 講師)

②研究項目

- ・半導体マイクロ・ナノ加工技術の細胞並列同時操作と一分子観測への応用

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N., Tada, T.: "Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cell nuclei." *Nature Methods* 4:23-25 (2007)
- Yasuda, S., Tsuneyoshi, N., Sumi, T., Hasegawa, K., Tada, T., Nakatsuji, N., Suemori, H.: "NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer", *Gene. Cell* 11: 1115-1123 (2006)
- Popova, B.C., Tada, T., Takagi, N., Brockdorff, N., Nesterova, T.B.: "Attenuated spread of

X-inactivation in an X;autosome translocation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:7706-7711 (2006)

- Tada, T.: "Toti-/Pluripotential Stem Cells and Epigenetic Modifications", *Neurodegenerative Diseases*,3: 32-37 (2006)
- Hasegawa, K., Chuma, S., Tada, T., Sakurai, T., Tamura, M., Suemori, H., Nakatsuji, N.: "Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation", *Biochem . Biophys. Res. Commun.* 341: 369-375 (2006)
- Boonchai Techaumnat and Masao Washizu: "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 1831–1837 (2007)