

西澤松彦

東北大学大学院工学研究科 教授

電気化学的な異種材料ナノ集積化技術の開拓とバイオデバイス応用

§1. 研究実施の概要

本研究課題の目的は、タンパク質や細胞の接着、有機・無機材料の析出、といった界面の組織化現象を局所に誘導する技術の開発と、それによる異種材料の融合・集積化による、(1)オンデマンド集積流路型バイオシステム、(2)ハイブリッド細胞チップ、(3)バイオ有機電子素子の開発である。H22 年度は、(1)～(3)それぞれについて以下の成果が得られた。

(1)流路型バイオシステムでは、着脱式の共培養基板に流路を組み合わせ、細胞間シグナル伝達の解析を可能とした。また、誘電泳動力による微粒子の迅速操作技術を利用して、競合型免疫アッセイの所要時間を大幅に短縮できた。(2)ハイブリッド細胞チップについては、ハイドロゲル電極の開発に成功し、筋管細胞シート(昨年度の成果)と組み合わせて「収縮運動する細胞チップ」を実現した。これは筋肉細胞による *in-vitro* アッセイの可能性を拡張する成果である。一方で、筋細胞の収縮活動やその運動効果(治療効果)の評価法に関しても、蛍光ナノ粒子を用いた手法を開発するなどの進展を得た。(3)バイオ有機電子素子に関しては、時差式発電に成功した。また、畠グループ(産総研)との共同研究により、酵素を高密度内包した CNTF 電極の作製法を確立し、フルクトース燃料電池で世界最高の出力密度を達成した。

以上のように、順調な進捗状況にある。今後は、これまでと同様に新技術の開拓と融合を続けながら、最終的な実用化に向けた道筋を見定めたい。

§2. 研究実施体制

(1)「西澤」グループ(東北大学 I)

① 研究分担グループ長: 西澤 松彦 (東北大学工学研究科、教授)

② 研究項目

・オンデマンドバイオ操作システムの開発

- ・細胞アッセイシステムの開発
- ・バイオ電池の開発と応用

(2)「神崎」グループ(東北大学Ⅱ)

① 研究分担グループ長:神崎 展 (東北大学医工学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・収縮型筋管細胞のマイクロ培養システムの開発
- ・2型糖尿病の薬剤スクリーニング系の開発
- ・ヒト由来細胞を用いる収縮型筋細胞の作製と応用

(3)「安川」グループ(兵庫県立大学)

① 研究分担グループ長:安川 智之 (兵庫県立大学物質理学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・誘電泳動による細胞および微粒子の配列
- ・細胞の代謝活性評価用センサの開発

§3. 研究実施内容 (文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) オンデマンドバイオ集積・流路型バイオチップシステム

① 着脱式共培養基板(西澤・三宅・長峯)

着脱式のおス・メス培養基板を開発し、異なる細胞種を十分に培養した後に接合させる「オンデマンド共培養」を実現した¹⁾。血管内皮細胞(HUVEC)と腫瘍細胞(HeLa)の接合部では図1の様に HeLa の浸潤が起こったが、その際に「HUVEC が逃げる」挙動が見出された。マイクロ流路による流れ制御によって、HeLa 細胞が放出する可溶性因子(恐らく ROS)が HUVEC の後退を促していることが明らかになった。

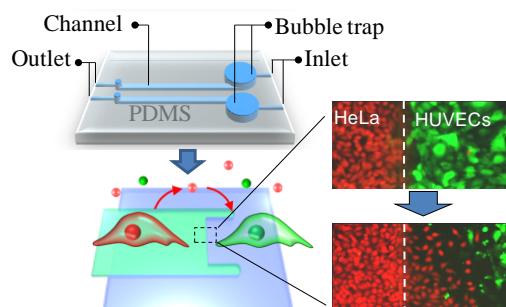


図1 腫瘍細胞が浸潤する過程の詳細を観察

② 電気化学スタンプシステム(西澤・三宅・長峯)

独自の表面改質技術「電気化学バイオリソグラフィ」を、汎用性が高いスタンプシステムへと展開した²⁾。スタンプ(凹凸構造)はハイドロゲルで作製し、ゲル内で電気化学的に反応物を生成させると、基板とスタンプとの接触部だけで表面改質反応が進行した。これは、インクをその場で供給するタイプの新規なスタンプである。さらに、微小電極のアレイをゲルの凸部に対応させて、凸ごとに On/Off 可能なアドレスラブルスタンプも実現した。

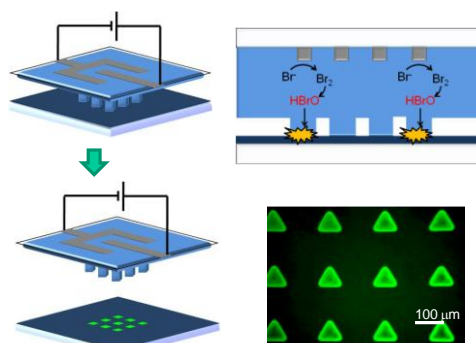


図2 スタンプ式の電気化学バイオリソグラフィ

③ 高感度迅速な免疫アッセイシステム(安川)

誘電泳動による微粒子の迅速操作を、競合型免疫アッセイに応用した¹⁷⁾。微粒子表面に抗体とともに DNA も修飾して基板と微粒子との結合を強化することで、感度を1桁向上させることもできた。この技術を、ヒト骨髄球性白血病細胞(HL-60 細胞)に発現する表面抗原 CD33 の解析に用い、細胞集団の約 70 %に目的とする CD33 抗原が発現していることが明らかになった。本手法の所要時間は 5 分と短いにもかかわらず、ウェルプレートを用いた従来法(30 分)と結果が一致した。

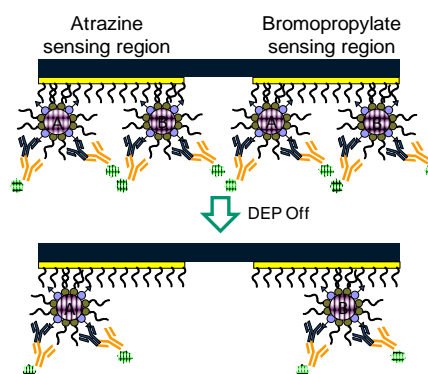


図3 高感度迅速なマルチ免疫アッセイ

(2)ハイブリッド細胞チップ

①収縮型筋細胞のマイクロ電極アレイによる制御 (西澤・神崎・長峯)

筋管細胞ゲルシート(昨年度開発)を、平板型微小電極アレイチップの表面に貼り付け、電気刺激箇所を任意に制御しながら収縮運動および代謝活性への影響などを観察した⁸⁾。適切な運動条件のもとで(2V, 10Hz, 3.5hour)、運動によるグルコース取り込み活性の向上が確認された。

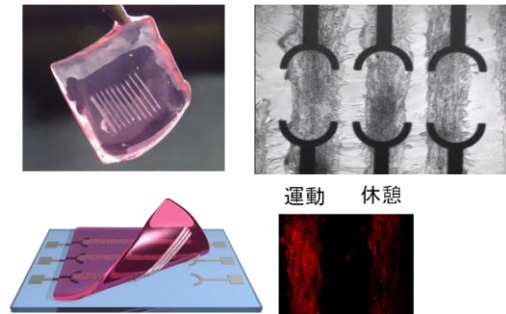


図4 筋管細胞の選択的運動による糖トランスポーターの発現(赤色)

②ハイドロゲルへの電極作製(西澤・長峯)

ハイドロゲルの表面に、導電性高分子による電極を作製する新手法を開発した⁷⁾。マスターである電極基板にゲルシートを張り、ゲルを通してモノマーを電解重合する。出来たポリマーを酸化還元して膨張収縮させると、 $300 \Omega/\square$ 程度の電極パターンが得られた。筋管シートと組み合わせれば、「細胞と電極基板が一体となって収縮運動出来る細胞チップ」の実現が期待できる。

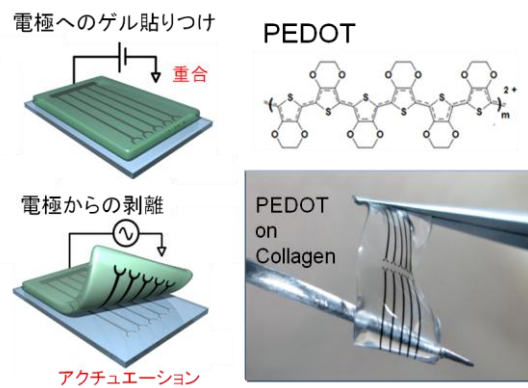


図5 コラーゲンへの導電性高分子電極の印刷

③インスリン抵抗性病態モデル細胞における GLUT4 機能障害の病態機序の解析(神崎)

高度発達型培養筋管細胞を利用して、その病態モデル(パルミチン酸誘導性のインスリン抵抗性状態)を作製し、その病態機序について解析した(図 6A-C)。マイオカインの発現変動以外にも、グルコーストランスポーター GLUT4 の細胞内輸送制御系に、これまで未知であった重篤な障害(sortilin 発現低下)が生じていることを明らかにした¹¹⁾。

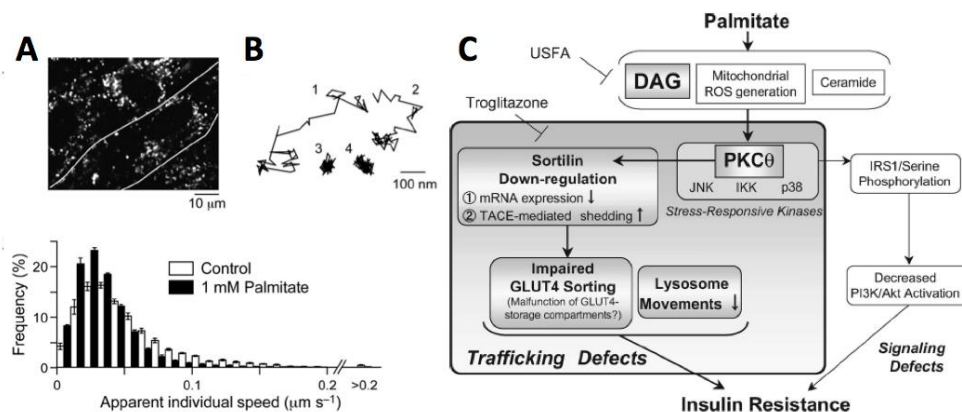


図 6 (A,B) 飽和脂肪酸(パルミチン酸)誘導性のインスリン抵抗性状態における細胞内小胞輸送系の障害。(C) 新たに解明されたその病態分子基盤。

④蛍光ナノ粒子を利用したインスリン応答性評価の基盤技術開発(神崎)

蛍光ナノ粒子(Qdot)にて GLUT4 を特異標識する技術を確立し、その細胞内での分子動態をナノ計測することに成功した¹²⁾。上記の高度発達型筋細胞で認められた病態機序は、脂肪細胞(肥満に直結する重要なインスリン応答性細胞)においても同様に確認できることから、インスリン抵抗性惹起の根源的な原因であることが考えられた(図 6C)。さらに、生体筋の運動刺激を負荷するとその障害に対する治療効果(インスリン応答性の回復)を確認した¹³⁾。本年度解明した病態分子基盤を新規標的とすることにより独自性の高い新規薬効スクリーニング系を確立できると考えている。

(3) バイオ有機電子素子の開発

① バイオ電池システムの時差式発電機構(西澤・三宅)

複数の小型バイオ燃料電池を順々に溶液に曝して(発電を開始して)リレーすることで、出力を長期間安定させる機構を開発した⁶⁾。積層したバイオ電池を、磁性プラスチック(磁性微粒子を含むプラスチック板)と生分解性 PLGA の接着剤で隔てた構造にした。PLGA の崩壊によって燃料溶液の流れが定期的にスイッチし、発電がリレーされて、出力の安定化が達成された。

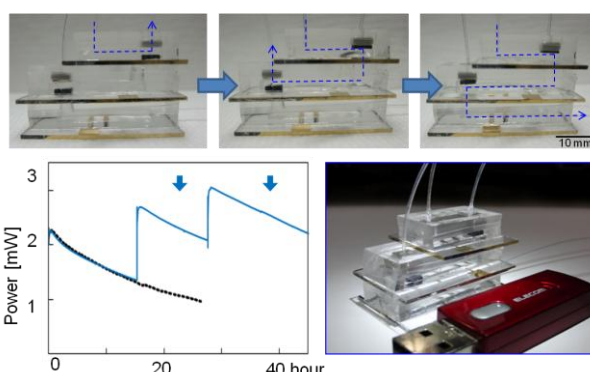


図 7 積層したバイオ電池(3 個)による時差発電

② カーボンナノチューブフォレスト(CNTF)による酵素電極

(西澤・三宅(東北大)、畠・山田(産総研))

産総研グループが作製した CNTF(チューブ間隔 16nm)に酵素溶液を染み込ませてから乾燥収縮させる方法で、チューブ間隔が酵素のサイズに自動調節された酵素電極フィルムを得た。フルクトースデヒドロゲナーゼ(果糖を酸化)とラッカーゼ(酸素を還元)によるバイオ電池について、世界最高の出力密度(1.8mW/cm²)を達成した。また、この酵素電極が自立した柔軟なフィルムであるため、貼ったり、巻いたりすることで容易にバイオ電池を構成できることも示した。

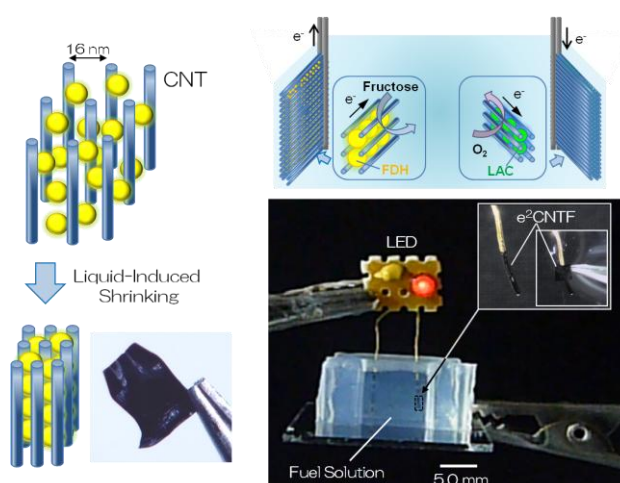


図 8 酵素を取込んだ CNTF フィルムで発電(果糖水溶液)

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. H. Kaji, T. Yokoi, T. Kawashima and M. Nishizawa, “Directing the Flow of Medium in Controlled Cocultures of HeLa Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells with a Microfluidic Device”, *Lab on Chip*, vol. 10, pp. 2374-2379, 2010. (DOI: 10.1039/c004583g)
2. S. Sekine, N. Shinya, T. Miyake, K. Nagamine, H. Kaji and M. Nishizawa. “Electrodes Combined with an Agarose Stamp for Addressable Micropatterning”, *Langmuir*, vol. 26, pp. 11526-11529, 2010. (DOI: 10.1021/la100735e)
3. N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa and T. Abe, “Preparation and Characterization of Collagen Microspheres for Sustained Release of VEGF”, *J Mater Sci: Mater Med.*, vol. 21, pp. 1891–1898, 2010. (DOI: 10.1007/s10856-010-4054-0)
4. H. Kaji, T. Ishibashi, K. Nagamine, M. Kanzaki and M. Nishizawa, “Electrically Induced Contraction of C2C12 Myotubes Cultured on a Porous Membrane-Based Substrate with Muscle Tissue-Like Stiffness”, *Biomaterials*, vol.31, pp. 6981-6986, 2010. (DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.05.071)
5. L. Ghenim, H. Kaji, Y. Hoshino, T. Ishibashi, V. Haguët, X. Gidrol and M. Nishizawa, “Monitoring Impedance Changes Associated with Motility and Mitosis of a Single Cell”, *Lab on Chip*, vol. 10, pp. 2546-2550, 2010. (DOI: 10.1039/c004115g)
6. T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda and M. Nishizawa, “Automatic, Sequential Power Generation for Prolonging the Net Lifetime of a Miniature Biofuel Cell Stack”, *Lab on Chip*, vol. 10, pp. 2574-2578. (DOI: 10.1039/c004322b)

7. S. Sekine, Y. Ido, T. Miyake, K. Nagamine and M. Nishizawa, “Conducting Polymer Electrodes Printed on Hydrogel”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, pp. 13174-13175, 2010. (DOI: 10.1021/ja1062357)
8. K. Nagamine, T. Kawashima, S. Sekine, Y. Ido, M. Kanzaki and M. Nishizawa, “Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet”, *Lab on Chip*, vol.11, pp. 513 – 517, 2011. (DOI:10.1039/C0LC00364F)
9. T. Kawashima, N. Nagai, H. Kaji, N. Kumasaka, H. Onami, N. Osumi, M. Nishizawa and T. Abe, “A Scalable Controlled-release Device for Transscleral Drug Delivery to the Retina”, *Biomaterials*, vol. 32, pp. 1950-1956, 2011. (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.006)
10. T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata and M. Nishizawa, “Self-Regulating Enzyme-Nanotube Ensemble Films and Their Application as Flexible Electrodes for Biofuel Cells”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, pp. 5129–5134, 2011. (DOI:10.1021/ja111517e)
11. Y. Tsuchiya, H. Hatakeyama, N. Emoto, F. Wagatsuma, S. Matsushita and M. Kanzaki, “Palmitate-induced Down-regulation of Sortilin and Impaired GLUT4 Trafficking in C2C12 Myotubes”, *J. Biol.Chem.*, vol. 285, pp. 34371-34381, 2010. (DOI: 10.1074/jbc.M110.128520)
12. H. Fujita, H. Hatakeyama, TM. Watanabe, M. Sato, H. Higuchi and M. Kanzaki, “Identification of Three Distinct Functional Sites of Insulin-mediated GLUT4 Trafficking in Adipocytes using Quantitative Single Molecule Imaging”, *Mol Biol Cell.*, vol. 21, pp.2721-2731, 2010. (DOI: 10.1091/mbc.E10-01-0029)
13. K. Funai, GG. Schweitzer, CM. Castorena, M. Kanzaki and GD. Cartee, “In Vivo Exercise Followed by In Vitro Contraction Additively Elevates Subsequent

Insulin-stimulated Glucose Transport by Rat Skeletal Muscle”, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 298, pp. E999-1010, 2010. (DOI:10.1152/ajpendo.00758.2009)

14. Y. Takahashi, Y. Murakami, K. Nagamine, H. Shiku, S. Aoyagi, T. Yasukawa, M. Kanzaki and T. Matsue, “Topographic Imaging of Convolute Live Cells by Scanning Ion Conductance Microscopy in a Standing Approach Mode”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, pp. 10012-10017, 2010. (DOI: 10.1039/c002607g)

15. N. Sakamoto, K. Segawa, M. Kanzaki, T. Ohashi and M. Sato M., “Role of p120-Catenin in Morphological Changes in Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 398, pp. 426-462, 2010. (DOI:10.1016/j.bbrc.2010.06.092)

16. T. Yasukawa, K. Goto and F. Mizutani, “Determination of the Apparent Michaelis Constant of Glucose Oxidase Immobilized on a Microelectrode with Respect to Oxygen”, *Electroanalysis*, vol. 22, pp. 927-930, 2010. (DOI: 10.1002/elan.200900501)

17. J. Ramón-Azcón, T. Yasukawa, H. J. Lee, T. Matsue, F. Sánchez-Baeza, M. Marco and F. Mizutani, “Competitive Multi-immunosensing of Pesticides Based on the Particle Manipulation with Negative Dielectrophoresis”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, pp. 1928-1933, 2010. (DOI: 10.1016/j.bios.2010.01.006)

18. Y. Hirano, T. Yasukawa, Y. Sawayashiki, H. Shiku, F. Mizutani and T. Matsue, “Preparation of Immuno-sensors Using a Microfluidic Device with Interdigitated Array Electrodes Modified with Antibody”, *Electrochemistry*, vol. 78, pp. 175-177, 2010.

19. H. Shiku, A. Kumagai, H. Q. Luo, Y. Takahashi, T. Yasukawa, H. Yamada and T. Matsue, “Electrochemical Estimation of Surface Activity of Enzyme and Immunoglobulin G Patterned Using Microcontact Printing”, *Electrochemistry*, vol. 78, pp. 122-125, 2010.

20. T. Yasukawa, M. Suzuki, H. Shiku and T. Matsue, “Fabrication of Line and Grid Patterns with Cells Based on Negative Dielectrophoresis”, *J. Robotics and Mechatronics*, vol. 22, pp. 613-618, 2010.
21. 大谷由華子, 安川智之, 水谷文雄, “酸素透過性を有するポリジメチルシロキサン膜表面におけるグルコースサイクリングを利用する高感度グルコースセンシング”, *分析化学*, vol. 59, pp. 721-725, 2010. (DOI: 10.2116/bunsekikagaku.59.721)
22. M. Koide, T. Yasukawa, K. Nagamine, H. Shiku, T. Itayama and T. Matsue, “An Electrochemical Device with Microwells for Determining the Photosynthetic Activity of a Single Cyanobacterium”, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 153, pp. 474-478, 2011. (DOI: 10.1016/j.snb.2010.10.051)
23. T. Goto, T. Yasukawa, K. Kanda, S. Matsui and F. Mizutani, “Inhibition of Electrochemical Fouling Against Biomolecules on a Diamond-Like Carbon Electrode”, *Anal. Sci.*, vol. 27, pp. 91-94, 2011. (DOI: 10.2116/analsci.27.91)
24. K. Ino, A. Ishida, K. Y. Inoue, M. Suzuki, K. Masahiro, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue, “Electrorotation chip consisting of three-dimensional interdigitated array electrodes”, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 153, pp. 468-473, 2011. (DOI: 10.1016/j.snb.2010.11.012)
25. J. Ramón-Azcón, T. Yasukawa and F. Mizutani, “Sensitive and Spatially Multiplexed Detection System Based on Dielectrophoretic Manipulation of DNA-encoded Particles Used as Immunoreactions Platform”, *Anal. Chem.*, vol. 83, pp.1053-1060, 2011. (DOI: 10.1021/ac102854z)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)