

「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

下図に示すように、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2年度では、以下の研究をおこなった。

## 21世紀に期待される培養細胞活用技術



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。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と、UVエキシマレーザーを用いたレーザーアブレーションによる加工技術を開発し、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。また、従来、高価なマスクと照明系を用いておこなっていた光重合を簡便かつ安価におこなうことを可能にする新しい装置を開発した。

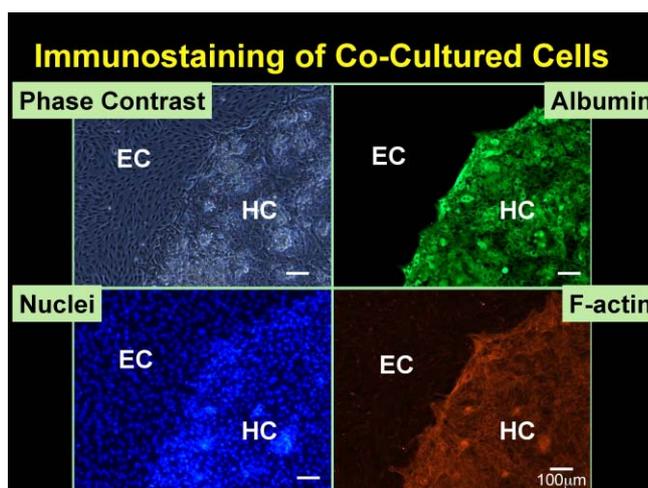
3) ナノ量化学物質のセンシング材料およびデバイスの開発では、循環器系細胞、免疫

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メートル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）」の開発をおこなった。また、高速高密度化が可能な半導体技術との融合を図るため、半導体表面とバイオ分子とのインターフェイスの実現を目指して、半導体表面への有機分子の配置、バンドの外乱による変化、検出感度の検討を行った。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た。具体的には、ストレスに応答して発現する遺伝子としてHSP70Bに着目し、この遺伝子のプロモーターとホタル発光タンパクやクラゲ蛍光タンパクの遺伝子を融合させ、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。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成中である。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

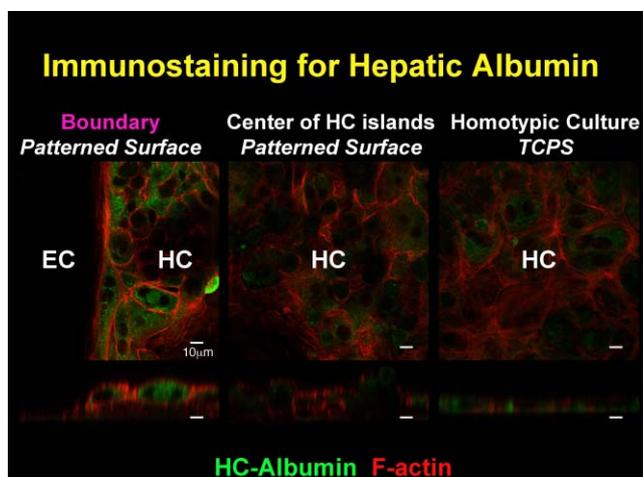
### 1) ナノドメイン操作材料の開発および2) 新規組織再構成技術の開発

電子線重合を用いて種々の高分子をナノメートルオーダーの厚さでの大面積表面にグラフトする技術をさらに発展させ、複数種の高分子をドメイン状にグラフトする技術を開発した。ここで用いている電子線は薄いガラスや金属のマスクで容易に遮蔽できるため、マスクを用いた多段階の電子線照射によりマイクロパターンを作製する条件を決定した。下図にこの方法により作製した、肝実質細胞と血管内皮細胞のマイクロパターン共培養を示す。

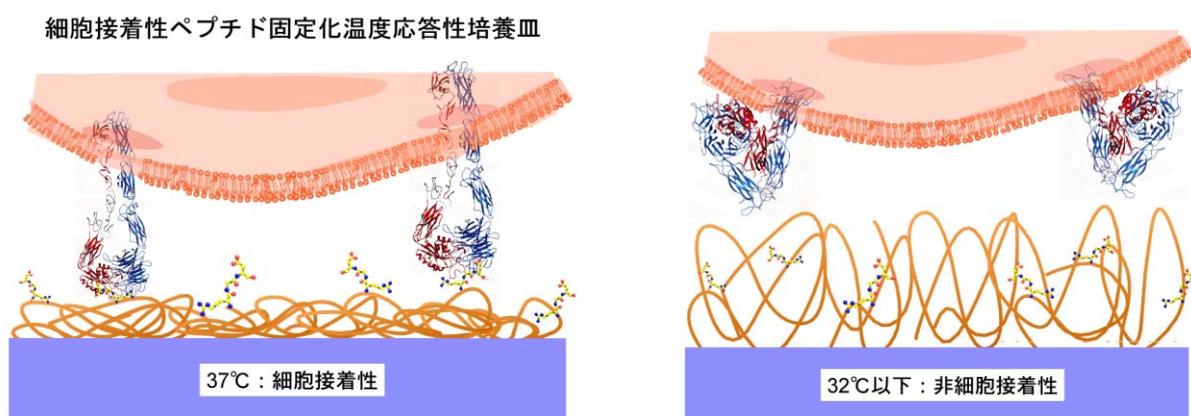


このマイクロパターン共培養下で血管内皮細胞と接している肝実質細胞が特異的にアルブミン産生等の分化機能を高度に発現することを明らかにした。今後、その分化誘導

の分子機構について引き続き解析する予定である。

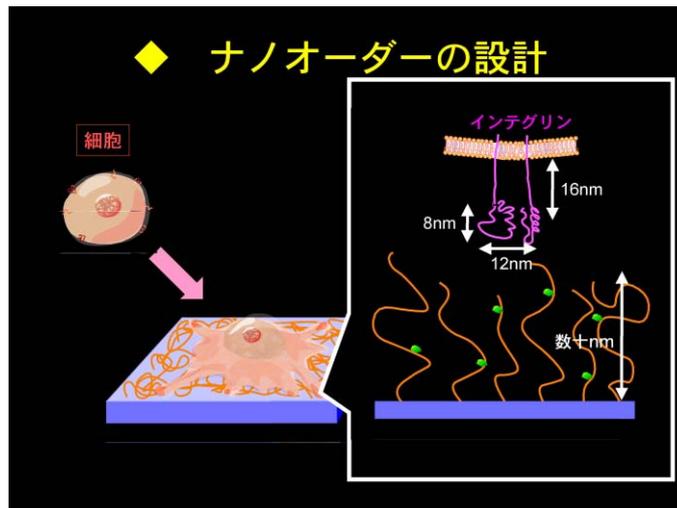


この他、フィブロネクチン由来細胞接着性ペプチドを温度応答性培養基板表面に共有結合的に固定化することで無血清条件下で細胞の接着・脱着を温度変化のみで制御することに成功した。

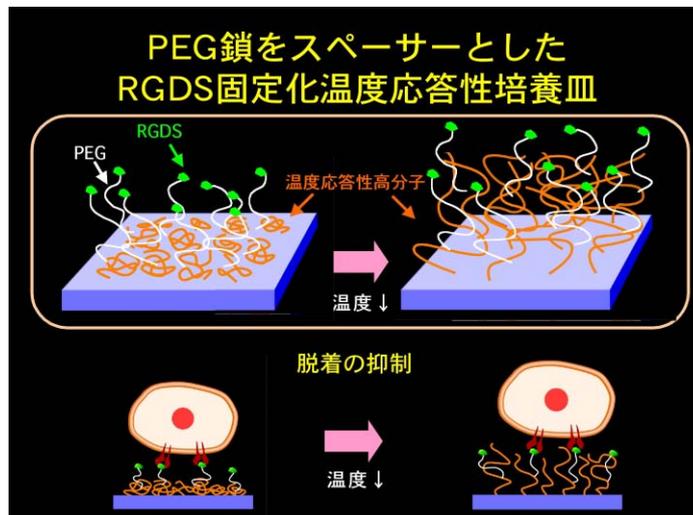


細胞膜表面に発現しているフィブロネクチン受容体の分子モデルから求めた分子の大きさを考慮して、ナノメートルオーダーで長さを制御したスペーサーを導入すると、温度依存性の脱着を消失させることにも成功した。

## ◆ ナノオーダーの設計

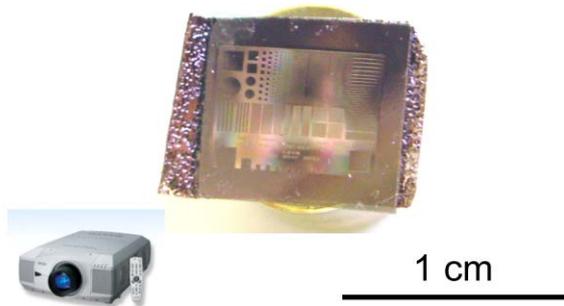


## PEG鎖をスペーサーとした RGDS固定化温度応答性培養皿

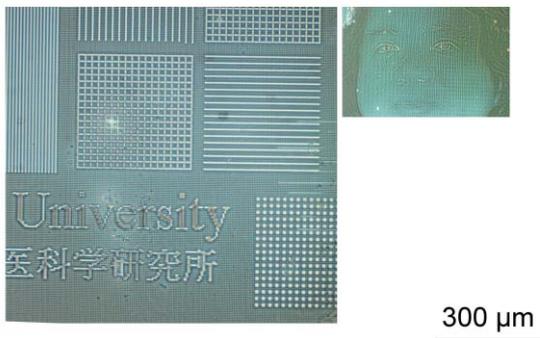


また、従来、高価なマスクと照明系を用いておこなっていた光重合を簡便かつ安価におこなうことを可能にする新しい装置を開発した。具体的には市販の液晶プロジェクタの光路を改造し、コンピュータから出力した任意の形状に光重合が可能である。これを用いて、パターン化表面やマイクロ流路が用意に作製でき、次年度以降に予定しているデバイス化においても活用が期待できると考えている。

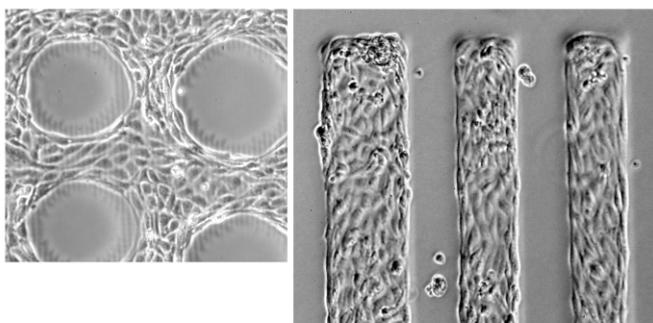
液晶パネルを用いたマスクレス光重合による  
表面微細加工



コンピュータからパターンを出力することにより  
10 μmの分解能で任意のマイクロパターン化表面を作製



作製したマイクロパターン上に  
選択的に接着した細胞



2) 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

自己集積構造形成によるナノ集積分子構造を有するPIM触媒の設計と合成に成功した。  
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元的に自己集積した構造であるため、酸化還元電位が低くなり、反応活性を高くすることができた。さらに、低い酸

化還元電位のために電極反応とのカップリングが良いため、この場合の基質となるATPなどの核酸、NOの高感度（ナノモラーオーダー）センシングが可能となった。

半導体ナノ構造（量子ドット）を埋め込んだ材料を対象として、その表面に有機分子を配置するための基礎実験と表面への微小分布圧の印加による半導体物性の変化を調べた。光エッチング行ってからチオール分子を配置すると、GaAs 表面に有機分子を配置できることをオージェ電子分光によって確認した。ナノインデンテーションによる微小分布圧によって半導体の特性（エネルギーバンド）がどのような影響を受けるかを、理論計算によって調べた。半導体表面近傍（深さ65nm）に軽い正孔の閉じ込めポテンシャルが形成されている可能性が大きいことが分かった。これらの結果を基に、n型半導体表面に配置した有機分子の極性が変化した場合のバンドベンディング量の評価を行った。

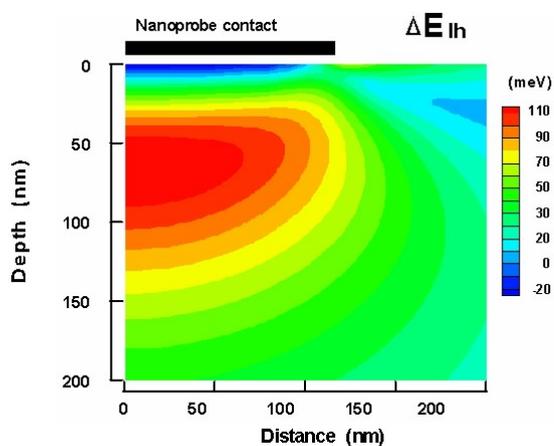


図 ナノインデンテーションによる GaAs の軽い正孔のエネルギーレベルの変化量

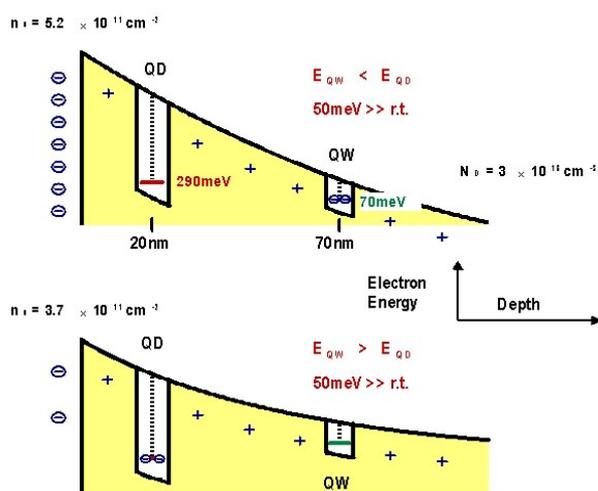


図 表面電荷量の変化による GaAs のバンドベンディングの変化

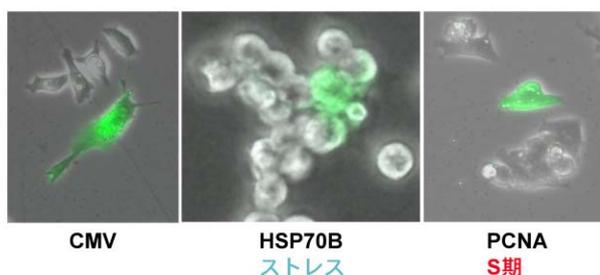
#### 4) 細胞インテリジェント化技術の開発

ストレスに応答して蛍光を発する細胞を構築するために、ヒトHSP70B遺伝子の転写調節

領域1.2kbpの配列をクローニングし、クラゲ由来の蛍光タンパク（GFP）をコードする配列の上流に組み込んだベクターを構築した。このベクターをヒト肝ガン由来の細胞株であるHepG2にリポフェクション法を用いて導入したところ、熱ストレスに応答して、蛍光を発する細胞を構築することに成功した。HSP70Bプロモーター以外に、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GFPに組み込んだベクターの構築が終了している。

#### (4) 細胞インテリジェント化

##### 各種プロモータ融合EGFP遺伝子導入による リポータ細胞の開発



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。

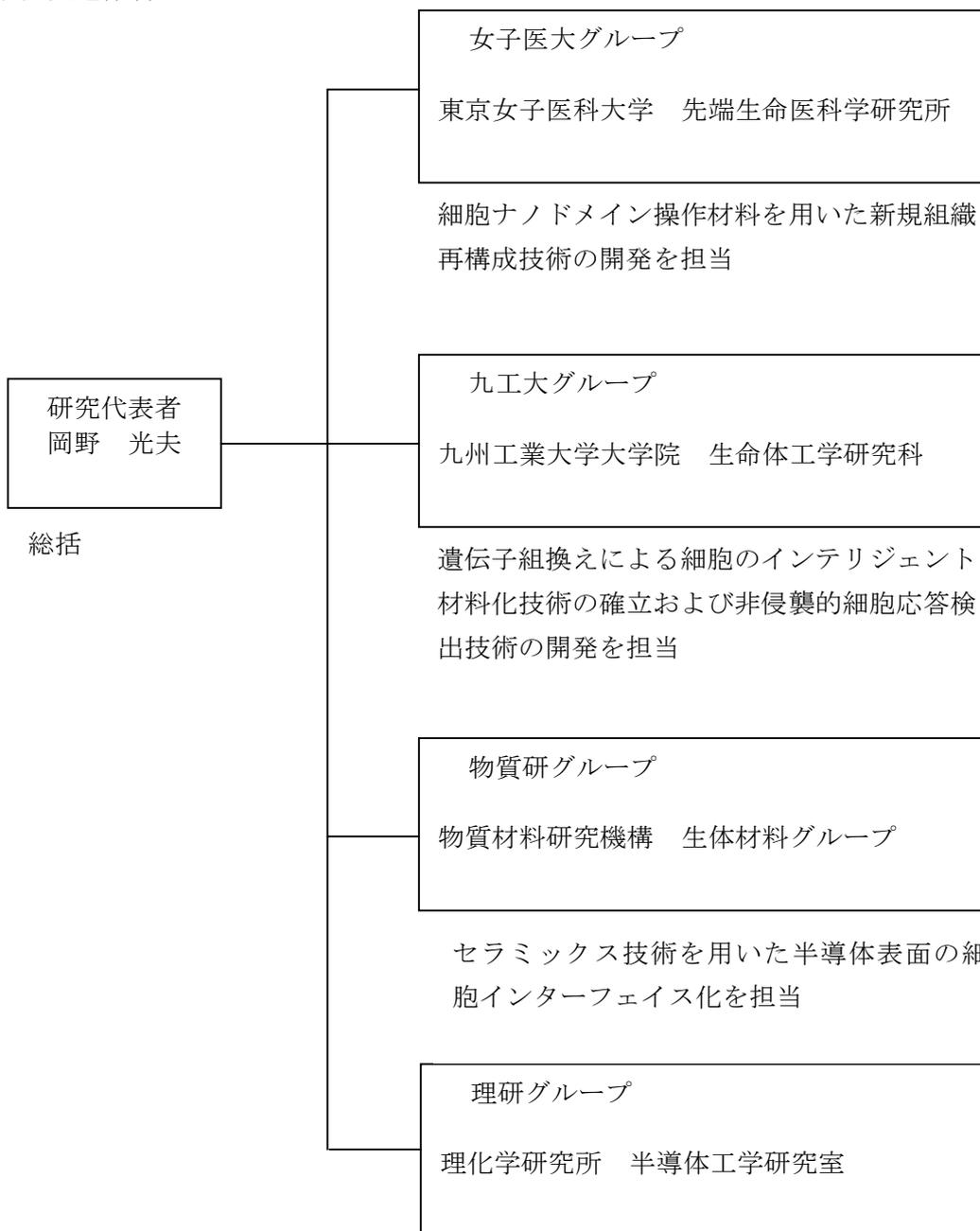
### 研究計画

#### H13,14年度：各要素技術の確立

- (1) 細胞培養基板加工技術  
ナノファブリケーション
- (2) 微小组織構造の再構築  
ナノティッシュエンジニアリング
- (3) 細胞ナノ応答検出技術  
ナノセンシング（人工触媒、バイオ分子固定化量子ドット）
- (4) 細胞インテリジェント化技術  
各種プロモータ融合リポータ遺伝子導入

#### H15年度以降：各要素技術の統合・デバイス化

3. 研究実施体制



研究代表者  
岡野 光夫

総括

女子医大グループ

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

細胞ナノドメイン操作材料を用いた新規組織再構成技術の開発を担当

九工大グループ

九州工業大学大学院 生命体工学研究科

遺伝子組換えによる細胞のインテリジェント材料化技術の確立および非侵襲的細胞応答検出技術の開発を担当

物質研グループ

物質材料研究機構 生体材料グループ

セラミックス技術を用いた半導体表面の細胞インターフェイス化を担当

理研グループ

理化学研究所 半導体工学研究室

半導体デバイスの設計と理論的解析および半導体表面の細胞インターフェイス化を担当

#### 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

- M. Yamato, C. Konno, M. Utsumi, A. Kikuchi, T. Okano, “Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture”, *Biomaterials*, 23, 561-567(2002)
- M. A. Nandkumar, M. Yamato, A. Kushida, C. Konno, M. Hirose, A. Kikuchi, T. Okano, “Two-dimensional cell sheet manipulation of heterotypical co-cultured lung cells utilizing temperature-responsive culture dishes results in long-term maintenance of differentiated epithelial cell function”, *Biomaterials*, 23, 1121-1130 (2002)
- T. Shimizu, M. Yamato, T. Akutsu, T. Shibata, Y. Isoi, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, “Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets”, *J Biomed Mater Res.*, 60, 110-117 (2002)
- T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, “Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces”, *Circ Res.* 90:e40-e48 (2002) DOI: 10.1161/hh0302.105722
- J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, “Aqueous chromatography utilizing hydrophobicity-modified anionic temperature-responsive hydrogel for stationary phases”, *J. Chromatography A*, 958, 109-119(2002)
- M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes”, *J Biomed Mater Res.*, 62(3), 464-470 (2002)
- T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, “Tissue engineering for myocardial regeneration”, *J. Artif. Organs*, 5, 216-222 (2002)
- Kazunari OZASA and Yoshinobu AOYAGI, “Nanoprobe photoluminescence of quasi-zero-dimensional InGaAsP quantum dots”, *Physica. E.*, 13(2-4), 212-215, (2002)
- Y. Suetsugu, J. Tanaka, “Crystal Growth and Structure Analysis of Twin-Free Monoclinic Hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine*, 13, 767-772, (2002)
- K.-I. Wada, H. Takahashi, S. Katsuta, H. Soya, “No decrease in myonuclear number after long-term denervation in mature mice”, *Am. J. Physiol. Cell*

Physiol., 283, C484-C488, (2002)

- P. L. Wang, M.O-Mori, T. Fujii, Y. Kowashi, M. Kikuchi, Y. Suetsugu, J. Tanaka, Y. Azuma, M. Shinohara, K. Ohura, “Effect of anti-CD14 antibody on experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide”, Japanese Journal of Pharmacology, 89, 176-183, (2002)
- T. Haruyama, Saknan Bongsebandhuphubhade, Ibuki Nakamura, David Mottershead, Kari Kainanen, Eiry Kobatake, Masuo Aizawa, “Novel Method for Evaluation of Ion Gated Glutamate Receptor Function Based on Outer Cell Potential Measurement.”, Analytical Chemistry, 75(4), 918-921 (2003)
- H. Funabasi, T. Haruyama, Y. Yanagida, E. Kobatake, M. Aizawa, “Non-distractive monitoring of LUP0-S promoter activity as a stress marker for evaluating cellular physiological status.”, J. Biotechnol., 95(2), 85-93, (2002)
- T. Haruyama, E. Kobatake, M. Aizawa, “Cellular Biosensing System for Discovery of Protein Synthesis Inhibitors with an Electrochemical Phosphate Modulator to Regulate the PHO Gene Expression of Saccharomyces cerevisiae.” Biosensors and Bioelectronics, 17(3), 201-215, (2002)
- Tetsuya Haruyama, “Micro- and Nanobiotechnology for biosensing sellular responses.”, Adadvanced Drug Delivery Reviews, 55, 393-401 (2003)

(2) 特許出願

1 件