

「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フォーム技術の構築

1. 研究実施の概要

本プロジェクトは、これまで個々に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、シーズ・ニーズを元に、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個々に別れて進めることは困難である。下記の年次計画はそれぞれ主に担当する技術開発と主に連携を行う分野を示すが、それぞれ強固に連携して開発を進める。

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。

平成 19 年度は、平成 18 年度に行ったデバイスの有効性の検討及び問題点の抽出と開発項目の詳細な洗い出しの結果をもとに、デバイス開発と細胞実験を担当する各担当者が連携しながら、デバイスの開発と改良および細胞・組織レベルの実験を目的に研究を行った。

細胞間相互作用の研究においては、膵ベータ細胞のインシュリン放出の可視化および細胞反応の計測技術の構築を行うとともに、細胞間相互作用計測用の 2 種類のデバイスの設計および作製とそれを用いた予備実験を行い、平成 20 年度に目的としている細胞間相互作用の計測実験への準備を完了した。また、細胞への局所刺激用マイクロデバイスの試作および細胞から放出されるインシュリンの検出用素子の開発を行った。平成 20 年度においては、これらの計測デバイスを用いて細胞刺激および計測を行う予定である。

細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御の研究に関しては、細胞融合を効率的に行うことができるデバイスを考案した。開発したデバイスを用い、再生医科学研究所において平成 20 年度から実際の細胞での実験を開始する。

臓器組織の人為的構築の研究に関しては、マイクロ流路と組織誘導因子を用いて血管の

再生実験を行い、管構造の構築を行った。平成 20 年度には、これをより高度化し血管構造の再生とその機能計測を行う予定である。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

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

本研究で提案されているデバイスを用いて、膵島細胞の細胞間相互作用を計測するためには、①膵β細胞(MIN6-m9)をデバイス上で長期間培養し、②オリフィス構造上にある特定の細胞に刺激を与え(限局刺激)その応答を測定することが必要となる。しかしながら、MIN6-m9のような接着性細胞は本来、中空な足場構造上では生育・伸展が困難である。また、細胞間相互材用におけるシグナル伝播の観察において、伝播の起点となる一細胞にのみ刺激を与えることは従来の実験系において困難であった。本年度の研究においては、マイクロデバイスを用いることによる長期細胞培養と応答測定の実証を行った。その結果は図1に示すように、

- ① 直径4μmのオリフィス上でMIN6-m9の生育・伸展が行われ、長期細胞培養ができた
- ② 各オリフィス上にある細胞個々のみにグルコース刺激を与え、それに応じた細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こすことができた

また、細胞内部で起きる現象を詳細に観察するため、インスリン分泌顆粒の細胞内における3次元観察とインスリン放出現象の可視化を行うとともに、細胞1個への細胞内刺激応答可視化デバイスを作製し、細胞への物質導入を確認した(図2参照)。さらに、膵島細胞への局所刺激、局所成分回収を目的として、原子間力顕微鏡(AFM)の機能を備えた微小ディスペンサの試作をいった。図3に作製したデバイスの写真を示す。酸化膜の中空構造となっており、先端部には微小な開口を設けており、その先端部でAFM像を取得することができる。

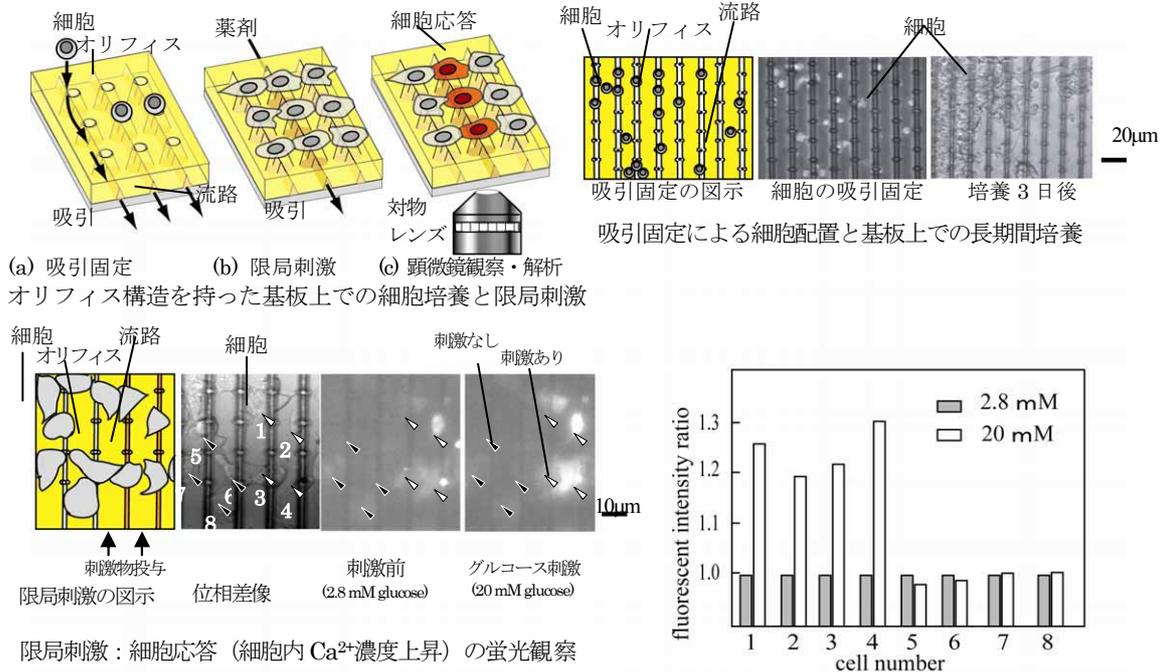
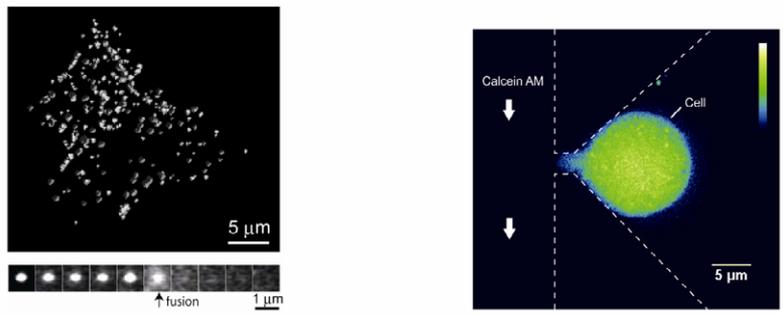


図 1 細胞間コミュニケーション計測に向けた細胞への限局刺激法の確立



細胞内インスリン顆粒分布・インスリン放出

1細胞への物質導入・内部可視化

図2 細胞内可視化計測の実現

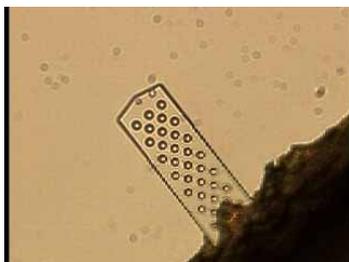
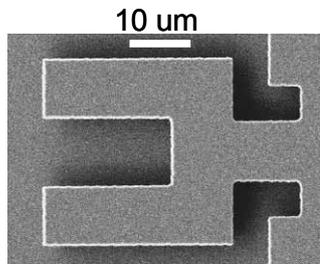
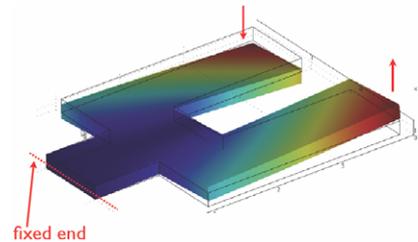


図 3 局所刺激用マイクロディスペンサ



(a) フォーク型の振動子



(b) 振動モード

図 4 振動型インシュリンセンサー

膵島細胞の活動を検知するセンサの研究開発においては,図 4 に示すような振動型のセンサの開発を行った.これは,MEMS技術で作ったマイクロ振動子の上に,選択的にインシュリンと結合する分子(例えば抗インシュリン抗体)を修飾することにより,マイクロ流路の中で振動子を断続的なレーザー照射で励振し,その共振周波数が表面へのインシュリン付着で低下するのを検出するものである.図 4(a)に示すようなフォーク型の振動子を作り,修飾のない状態で図 4(b)に示すモードを励振したところ 800kHz 程度の共振周波数で,共振の Q 値は 12~15 であった.これを用いて表面修飾を行い,インシュリンの検出を試みたところ 2kHz 程度の共振周波数の変化を得た.現在,再現性の確認と表面修飾の最適化を行っている.

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導入し,細胞の分化・増殖を人為的に制御するための手法として,平成 19 年度は主に細胞質移植のためのマイクロオリフィスを用いた高収率(>90%)細胞融合の原理の確立[1, 2]及び,実証と大量並列細胞融合デバイスの開発を行った(特願 2008-020873).図 5 に示すオリフィスを配列したシートの両側に異なる蛍光で染色した細胞を配置し,パルス電圧を印加したところ,融合による細胞質の混合が高収率で生ずることが実証された.また,1:1細胞融合システムを用いて体細胞と ES 細胞の細胞融合を想定して基礎実験を行った.体細胞としてこれまで用いてきた胸腺細胞は,細胞サイズが極端に小さいためオリフィス直径の設定が困難であった.そこで,ES 細胞とほぼ同じ細胞直径である繊維芽細胞を用いての電気細胞融合の条件設定を行った.その結果,繊維芽細胞を用いても融合細胞が高効率に得られることを明らかにした.また,細胞融合可視化を目的に ES 細胞に蛍光マーカー遺伝子の導入やウイルスベクターを用いての体細胞へのマーカー遺伝子導入系の構築をおこなった[3, 4, 5].今後,開発したデバイスを用いて,細胞の分化・初期化を試みる.

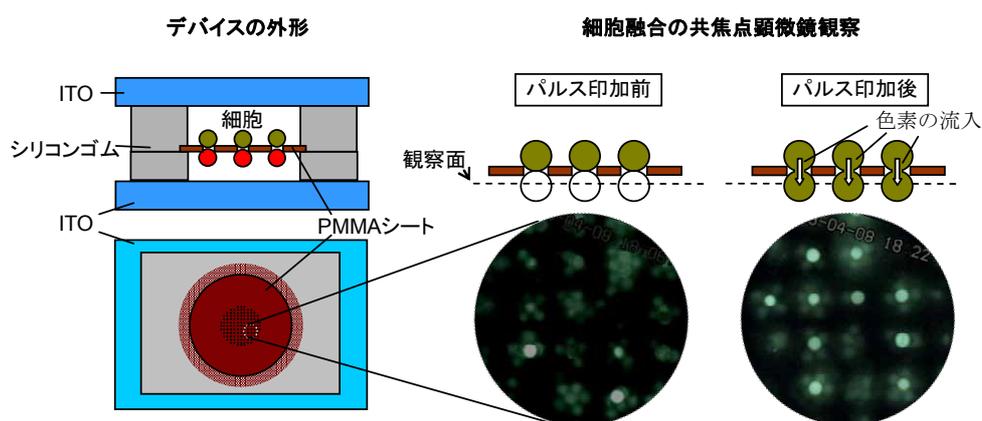


図 5 細胞質移植のためのマイクロオリフィス

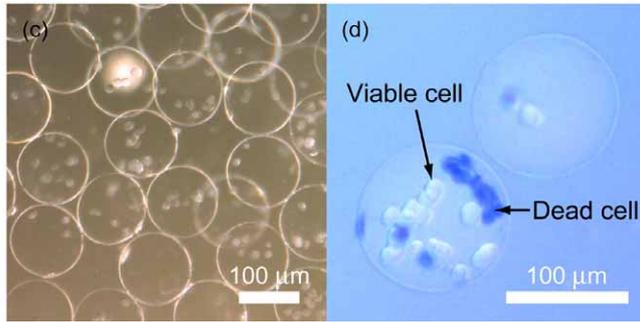


図 6 ハイドロゲル中にカプセル化した白血球培養細胞

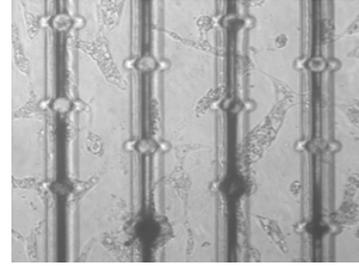


図 7 デバイス上に形成された内皮細胞の流路ネットワーク

3) 臓器組織の人為的構築

膵島細胞をハイドロゲルでカプセル化する方法に関して検討している。マイクロ光造形を用いて製作した AFFD (Axisymmetric Flow-Focusing Device) を利用して、均一直径をもつハイドロゲルカプセルを作ること成功した (図 6)。また、内部に白血球培養細胞や肝臓培養細胞を包埋しても細胞が死滅していないことがわかった。これらの成果の一部は, Advanced Materials 誌や Lab on a Chip 誌にて公表した [6, 7]。現在, これらのデバイスを利用して, 実際に膵島細胞のカプセル化を試行している。

細胞培養系での形態形成の制御技術の開発に関しては, 脈管構造の再構築の実験をマイクロデバイスを用いて行う研究を行った。内皮細胞は Matrigel 上で自発的に腺管構造のメッシュワークを形成するが, この管は流路として用いるのには細すぎる。従って, 培養細胞をコラーゲンゲル内に包埋し, また, 培地中の VEGF 量を最適化することで, 内部に腔を持ったメッシュワーク構造を生成させることができた。また, MEMS 技術を用いて, 内皮細胞の流路系と結合させるためのマイクロ流路系を開発し, その上で細胞を培養しても毒性がないことを確認した (図 7) [8, 9]。今後, これらのシステムを接続し, vitro で形成した流路に液体を流すための技術開発を行う。

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)

1. 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. vol.40, p.1831- 1837, 2007
2. Masao Washizu and Boonchai Techaumnat: "Cell Membrane Voltage During Electrical Cell Fusion Calculated by Re-expansion Method", J. Electrostatics vol.65, p. 555- 561, 2007
3. Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N. and Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cell nuclei. Nature Methods, 4, 23-25, 2007
4. Matsumura, H., Tada, T.: Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. BRMOnline, 16, 51-56, 2008
5. Otsuji, T., Matsumura, H., Suzuki, T., Nakatsuji, N., Tada, T. and Tada, M.: Rapid

induction of large chromosomal deletions by a Cre/inverted loxP system in mouse ES hybrids. J.Mol.Biol. (in press)

6. W-H. Tan and Shoji Takeuchi: Dynamic microarray system with gentle retrieval mechanism for cell encapsulating hydrogel beads, Lab on a Chip, vol. 7, pp. 259 - 266, 2008
7. Wei-Heong TAN and Shoji TAKEUCHI: Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation, Advanced Materials, vol. 19, pp. 2696-2701, 2007.
8. " Modulation of activator diffusion by extracellular matrix in Turing system" , Takashi Miura, RIMS kokyuroku Bessatsu B3 , 165-176, 2007
9. " Mathematical analysis of a free-boundary model for lung branching morphogenesis" , Dirk Hartmann and Takashi Miura, Mathematical Medicine and Biology 24, 209 -224, 2007

(2) 特許出願

平成 19 年度国内特許出願件数: 2件 (CREST 研究期間累積件数: 2件)