

平成 30 年 9 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23106008

研究課題名(和文)MEMSを利用した細胞の3次元組織構築

研究課題名(英文)3D Tissue Construction by using MEMS technology

研究代表者

竹内 昌治(Shoji, Takeuchi)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：90343110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 86,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロサイズの構造を形成する微細加工技術を利用することによって、細胞レベルのプレートを作製し、その上に接着細胞を播種し、培養した。このマイクロプレートをハンドリングすることにより、接着細胞を3次元的に操作した。具体的には、マイクロプレートにヒンジをつけることにより、細胞による折り紙を行い、3次元構造を構築した。また、マイクロプレート内に磁場応答性の合金であるパーマロイを導入することで非接触に細胞を3次元的に操作し、細胞表面で起こる現象を高分解能観察することに成功した。これらの成果は細胞の3次元組織の構築や細胞間の情報伝達解析や細胞の高分解能観察の発展に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed cell-cultured microfabricated microplates for manipulating adherent cells. We succeeded in three-dimensional manipulation of the adherent cells by handling the microplates with micro-tweezers, fluid flows, magnetic fields and cell traction force. In addition, we have also developed cell-cultured microplates connected with hinges, and constructed three-dimensional cellular structures by folding the microplates by the cell traction force. By embedding permalloy pieces in the cell-cultured microplates, we achieved magnetic handling of the cells on the microplates without physical contacts to both cells and microplates. Using the magnetized microplates, we developed a vertical confocal observation system. This system enables us to observe the boundary of cell membrane at a high-resolution. These progresses will contribute to construction of three-dimensional cellular structures, analysis of cellular interaction, and high-resolution observation of cells.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：知能機械 マイクロマシン マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織 再生医学

1. 研究開始当初の背景

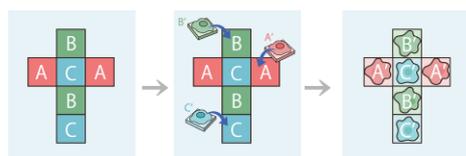
生体内での組織はチューブ構造など、3次元の構造であるにも関わらず、培養される細胞は平面の2次元構造であった。そのため、細胞を立体的に培養し、3次元の組織を人工的に構築することは、再生医療の発展や新薬の開発、また、生命理工学の基礎研究において必要不可欠であった。とくに、再生医療においては、3次元の組織を高速に構築することが必要不可欠である。しかし、本研究計画が開始した時には、微小な細胞組織のユニットを作製し、それらを集めて組み立てることで立体構造を構築するボトムアップアプローチや立体的な足場に細胞を播種するトップダウンアプローチが提案されていた。しかし、3次元的に細胞を操作することは難しく、また、3次元の足場から組織を作るには数日から数週間の時間がかかっていた。そのため、高速で細胞を操作する技術および3次元的に組織を構築する技術が渴望されていた。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、細胞の足場となるマイクロプレートを微細加工技術により作製し、これらのプレートを利用することで、細胞のハンドリング、および3次元の組立を可能にする技術を開発することを目的としている。

また、本研究計画が複数の研究グループが参画する新学術領域であることを活かし、ハンドリング技術を得意とする大阪大学・新井グループ、力場測定を得意とする北海道大学・水谷グループ、細胞シート技術を得意とする大和グループなどと連携をすることで、ハンドリング技術の開発、細胞のハンドリング・組立への応用を促進する。

本研究領域成果を実用発展させるため、細



マイクロプレートを用いた異種類の細胞のパターニング ↓

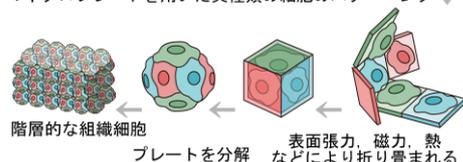


図1 ヒンジ付きマイクロプレートによる3次元構造の構築

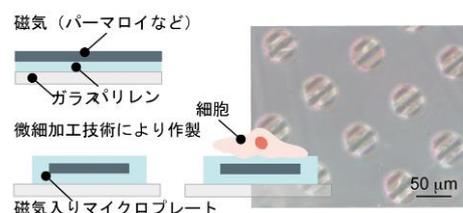


図2 磁場応答性マイクロプレート

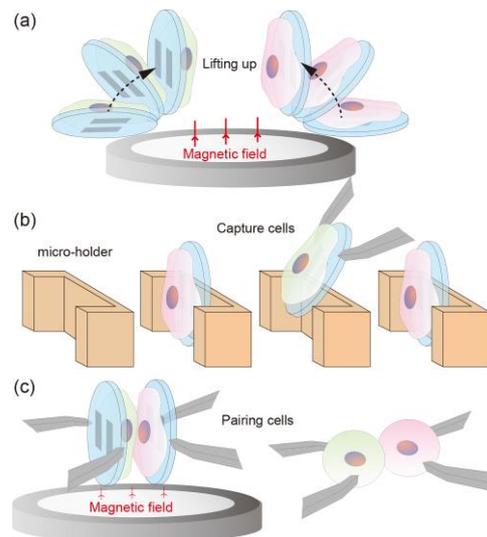


図3 (a) 磁場による細胞の傾斜化。(b) マイクロ構造体による細胞の捕捉とアレイ化。(c) マイクロハンドによる細胞の隣接配置。

胞シートを立体的な平面に転写するデバイスを開発した。具体的には中耳炎手術時にあける人工的な切削穴表面への転写を目的とした。重篤な中耳炎の際にあける人工的な穴は術後に細胞シートを転写すれば、中耳炎の再発防止効果も確認されている。しかし、細胞シートはハンドリングが難しく、人工穴壁面への転写に時間がかかっていることが現状である。そこで、容易かつ高速に転写するデバイスを開発した。

3. 研究の方法

本研究は、当研究室が得意とする微細加工技術を利用することで、様々なマイクロプレートを作製した。具体的には、ガラス基板上に犠牲層としてゼラチン、またはアルギン酸の層をつくり、化学蒸着法によって、パリレン層を形成させた。これをフォトリソグラフィによって任意の形状でエッチングすることにより、パリレン製マイクロプレートを作製した。このパリレンによる基本構造の内部に微細加工技術を利用して光硬化性樹脂であるSU8を組み込み、厚さが部分によって異なるマイクロプレート、すなわち、ヒンジ付きのマイクロプレートを作製した。同様にパリレンの内部に磁場応答性の合金であるパーマロイを導入した。磁場によって3次元的に操作できるマイクロプレート(図2)を作製した。

作製したマイクロプレート上に接着細胞を培養するため、マイクロプレート外の部分にMPCポリマー層を、マイクロプレート上の部分に細胞接着層を形成した。この上にNIH 3T3、PC12等の接着細胞を播種することで、マイクロプレート上で細胞を培養した。培養後、犠牲層を溶解させることで、マイクロプレートをガラス基板から分離させた。

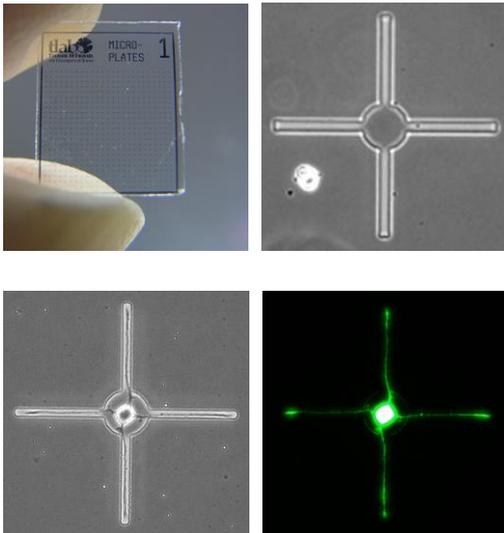


図 4 単一神経細胞の形態制御培養が可能なマイクロプレート。(左上) マイクロプレートをガラス上にアレイ化したデバイス。(右上) 円/線のパターンを持つマイクロプレート。(左下) パターンによって形態制御された単一神経細胞。(右下) 同細胞に対し生細胞が緑、死細胞の核が赤にそれぞれ染まる蛍光染色を行った後の蛍光画像。

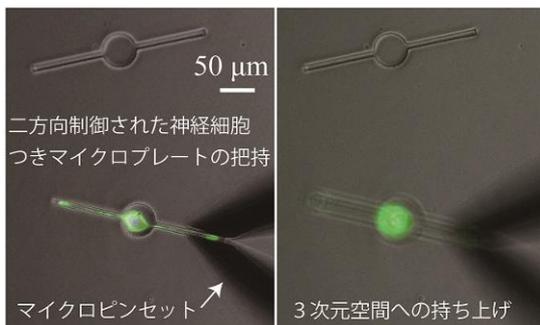


図 5 マイクロピンセットによる神経細胞つきマイクロプレートの三次元操作。

ヒンジ構造を利用した 3 次元的組織構築では、細胞の牽引力を利用して、自発的にヒンジ部分で折れ曲がらせることで、3 次元的組織を構築した。ハンドリングについては、マイクロピンセットを利用して、マイクロプレートを操作することで、細胞を任意の位置に動かした。磁場応答性合金を組み込んだマイクロプレートでは、外部から磁場をかけることにより、細胞を非接触で三次元的に操作した (図 3)。

4. 研究成果

・マイクロプレートのハンドリングによる神経細胞ネットワークの構築

微細加工技術を用いて、パリレン製マイクロプレートをガラス基板上にアレイ化した状態で作製した。マイクロプレート上には、細胞接着性のコラーゲンをパターンニングすることにより、選択的に細胞が接着できるようにデザインした。このマイクロプレート上で神経様細胞である PC12 を培養することにより、デザインした通りに成長させた単一

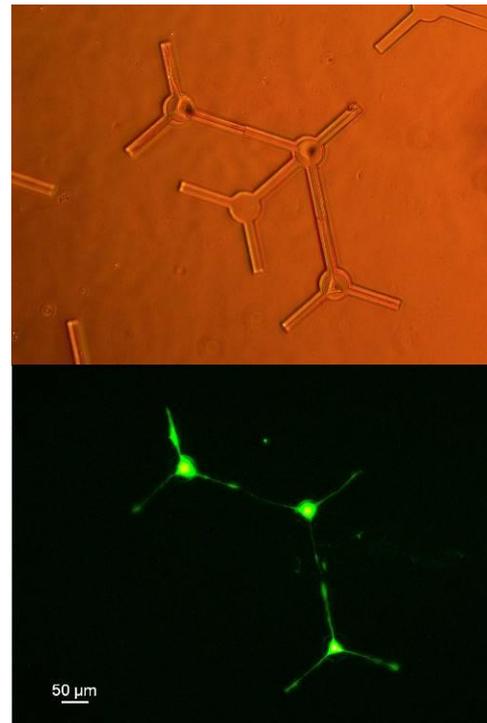


図 6 (a)中空な 3 次元立体構造 (b)折り畳み順の制御。

細胞を得ることに成功した (図 3)。また、電圧印加により開閉が可能なマイクロピンセットを用いて、単一神経細胞が培養されたマイクロプレートを培養液中で 3 次元的に操作した (図 4)。その操作後も、神経様細胞が生存していることも確認した。これにより、従来は接着状態で制御困難な培養神経細胞を一細胞単位で形態・位置制御することが可能になった。また、神経細胞が任意の形状に成長したマイクロプレートを接近させることにより、マイクロプレート間の神経細胞が物理的に接着することが確認された (図 6)。

また、ラットのプライマリー細胞に対しても同様の実験を行った。プライマリー細胞においても、マイクロプレートの形状にそって成長することが観察され、マイクロプレートのデザインによって細胞体と軸索に分化することも観察された。さらにプライマリーセルが接着したマイクロプレートのハンドリングにも成功した。

・磁場応答性マイクロプレートによる細胞表面の高分解能観察

マイクロプレートに磁場応答性金属であるパーマロイを内包することにより、磁場応答性のマイクロプレートを作製した。このマイクロプレートに接着細胞を培養し、外部から磁場をかけることで物理的な接触なく細胞の 3 次元的な操作を実現した。また、プレートの細胞接着面積を最適化することで、単一細胞と多細胞の両方を用途に応じてマイクロプレート上にパターンニングすることに成功した。この結果を利用し、多細胞体ハ

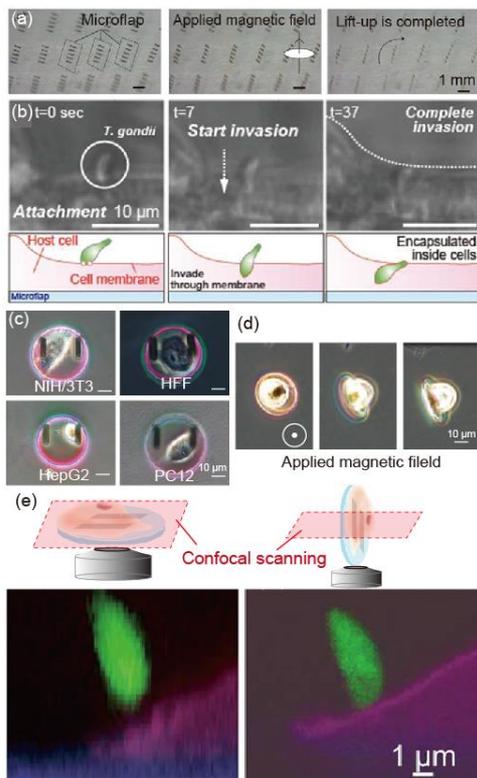


図 7 (a)多細胞ハンドリングを行うマイクロフラップ。(b)細胞を傾斜後、寄生虫の膜内侵入のリアルタイム観察に成功した。(c) マイクロプレート上での単一細胞の培養。(d)磁場によるマイクロプレートの操作。(e)共焦点顕微鏡下での細胞の観察。

ンドリングマイクロフラップ (図 7a)、単一細胞ハンドリング用マイクロプレート (図 7c) の 2 種類を開発した。

このマイクロプレートを用いることにより、細胞の高解像度 3 次元光学計測が可能になった。共焦点顕微鏡は 3 次元の構造情報を得る強力なツールであるが、従来の観察方法では、XY 軸方向に比べて Z 軸方向では 3 倍低い分解能の情報しか得ることができなかった。しかし、磁場応答性マイクロプレートを用いることによって、試料を垂直に傾けた上での観測が可能になるため (図 7e)、実質、全方向でも XY 軸方向と同等の高い分解能で観察することが可能になった。これにより、細胞の膜構造体の鮮明な画像を取得やリアルタイムでの寄生虫の侵入 (図 7b、e) の観察に成功した。本研究成果は国内外の学会で高い評価を得ており、国内では科学とマイクロナノシステム学会及び寄生虫学会という工学と生物の両分野の学会からポスター賞を、国外では International Joint Symposium on Single-Cell Analysis からポスター賞を授与されている。

・細胞折り紙による 3 次元組織構築

細胞の足場となるマイクロプレートの用い、細胞の牽引力を用いることで、高速に中

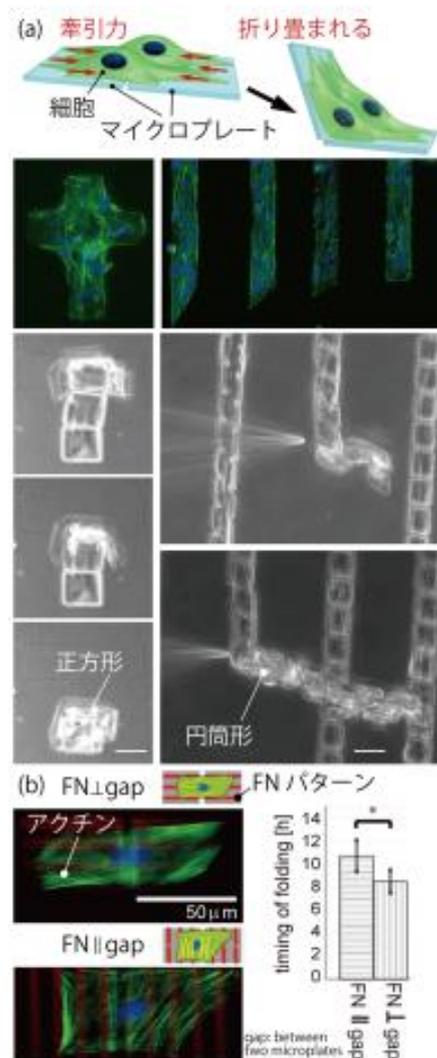


図 8 (a)中空な 3 次元立体構造 (b)折り畳み順の制御。

空な 3 次元組織を構築する手法を確立した。プレート上に細胞を培養すると細胞は隣り合ったプレートにまたがって増殖する。その後、プレートをガラス基板から剥がすと、細胞の牽引力によって、プレートが引き寄せられて立ち上がり、細胞の立体構造が折り畳まれることがわかった。この原理を利用し、プレートの形を変えることにより、簡単に様々な立体組織構造を高速に作製することに成功した (図 8a)。立体構造を構築してから 7 日後に Live/Dead アッセイを行った結果、細胞は立体構造内でも増殖していることがわかった。さらに、プレート上に細胞マトリックス(フィブロネクチン-FN)をパターンし、細胞骨格(アクチン)の向きを折り畳む方向に揃えることで、短時間で折り畳まれるようになった。よって、プレート上の FN のパターンを変えることで折り畳む順番を制御することに成功した(図 8b)。この方法を用いることにより、同一のマイクロプレートの 2 次元平面展開図を用いても異なる形の立体構造を同時に作製することが可能になった。マイクロプレートのデザインをかえることで、谷

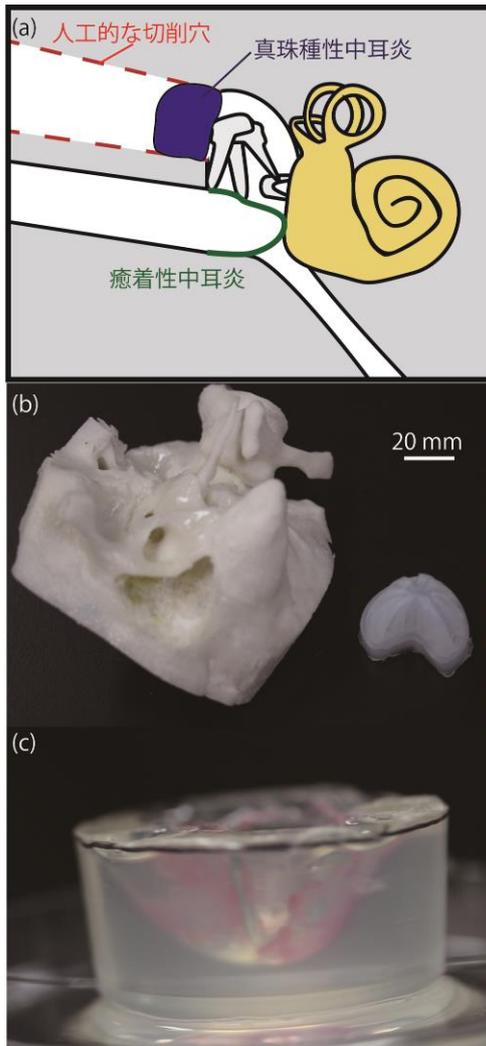


図 9 (a)中耳炎手術時に切削する人工穴 (b)人工切削穴をあけたヒト頭部モデルの一部 (左) と作製した風船デバイス (右) (c)切削穴をあけたゼラチン上に転写した細胞シート

折りだけでなく、山折りを細胞牽引力で実現することに成功した。

また、パリレン以外の材料からのマイクロプレート作製も検証した。大和グループとの連携により、細胞接着層として温度応答性樹脂を導入し、温度応答性樹脂とマイクロプレート上の細胞接着の相関関係を調べた。また、バクテリアセルロースによるマイクロプレートも構築し、バクテリアセルロース上でも細胞を接着・培養することに成功した。これらの知見を発展させることで、細胞折り紙によって形成された 3 次元組織からマイクロプレートをかき離させ、細胞のみからなる 3 次元組織を構築できることが期待できる。

・中耳手術時の応用を目指した細胞シート転写デバイスの開発

細胞シートの作製を得意とする A03 班大和グループと連携し、人工穴の壁面に細胞シートを転写するデバイスを作製した。エラストマーの一種である EcoFlex を 3D プリンターで造形したモールド内で固めるこ

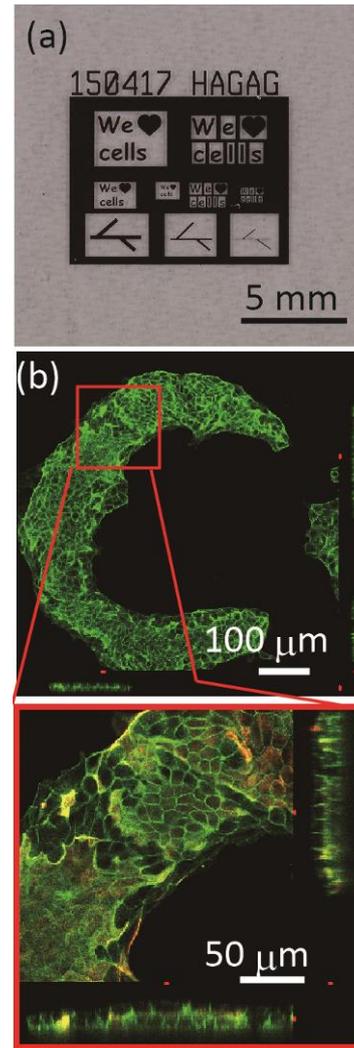


図 10 (a)作製したパターン (b)蛍光顕微鏡観察。F-Actin(緑色)、apical マーカーの GP135 (赤色)

とで、人工穴の形を模した風船デバイスを作製した。剥離した細胞シートを市販の支持体上に転写し、風船デバイス上に張り付けた。モデルとしてゼラチンで作製した人工穴内で風船デバイスを膨らませたところ、支持体から人工穴壁面へ細胞の転写が見られた。また、転写された細胞を回収し、Live/Dead assay を行ったところ、90% 以上の細胞の生存が確認された。このことから、本デバイスは中耳手術時にあける人工穴壁面へ細胞シートを転写することに適していると考えられる。

・任意形状のチューブ形状形成

A02 班公募班 (2014 年度まで) の芳賀グループにより、シート状に培養した細胞上にゲルを載せることで、筒状の構造体を作られることが報告されている。さらに形成される形状を観察し、細胞の運動を解析するためには、精度よく任意のパターン状に細胞を培養する必要がある。そこで、当グループが得意とするマイクロ加工技術を用いることで、任意のパターンで細胞が培養できる基盤を作

製し、芳賀研究室に提供した。このパターン上に細胞を培養することで、設計したパターン通りに細胞が培養され、ゲルを載せることで細胞の折り返しも観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. K. Kuribayashi-Shigetomi, H. Onoe, S. Takeuchi: Cell Origami: Self-folding of Three-Dimensional Cell-Laden Microstructures Driven by Cell Traction Force, PLoS ONE, vol. 7(12), p. e51085, 2012
2. T. Teshima, H. Onoe, H. Aonuma, K. Kuribayashi-Shigetomi, K. Kamiya, T. Tonooka, H. Kanuka, S. Takeuchi: Magnetically Responsive Microflaps Reveal Cell Membrane Boundaries from Multiple Angles, Advanced Materials, vol. 26(18), pp. 2850–2856, 2014
3. S. Yoshida, T. Teshima, Kaori K., S. Takeuchi: Mobile microplates for morphological control and assembly of individual neural cells, Advanced Healthcare Materials, vol. 5(4), pp. 415–420, 2016
4. Tetsuhiko Teshima, H. Onoe, S. Tottori, H. Aonuma, T. Mizutani, K. Kamiya, H. Ishihara, H. Kanuka, S. Takeuchi: High-Resolution Vertical Observation of Intracellular Structure using Magnetically Responsive Microplates, Small, online

他 8 報

[学会発表] (計 59 件)

1. S. Takeuchi, “Cell-Laden Hydrogel Beads, Fibers and Plates for 3D Tissue Construction”, Transducers 2013, Barcelona, Spain, 18. Jun. (2013)
2. T. Teshima, H. Onoe, H. Aonuma, H. Kanuka, S. Takeuchi, “MULTI-ANGLE CONFOCAL ANALYSIS OF SINGLE”, Frontiers of Single Cell Analysis meeting, Stanford University, California, USA, 6. Sep.
3. S. Yoshida, T. Teshima, K. Kuribayashi-Shigetomi, S. Takeuchi, “Mobile Microplates for Handling Morphologically Controlled Single Neural Cells”, MicroTAS2013, Freiburg, Germany, 31. Oct.

他 56 件

[図書] (計 2 件)

S. Yoshida, D. Serien, F. Tomoike, H. Onoe, S. Takeuchi, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Springer, 2015 年

他 1 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 昌治 (TAKEUCHI, Shoji)

東京大学 生産技術研究所 教授

研究者番号: 90343110

(2)研究分担者

尾上 弘晃 (ONOE, Hiroaki)

慶應義塾大学 理工学部 専任講師

研究者番号: 30548681

(2014 年から連携研究者)

(3)連携研究者

森本 雄矢 (MORIMOTO, Yuya)

東京大学 生産技術研究所 助教

研究者番号: 60739233

繁富 (栗林) 香織

(SHIGETOMI-KURIBAYASHI, Kaori)

北海道大学 高等教育推進機構

特任准教授

研究者番号: 90431816

友池 史明 (TOMOIKE, Fumiaki)

名古屋大学 物質科学国際研究センター

助教

研究者番号: 70708586