

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18004

研究課題名(和文) マイクロボイド細胞操作と多孔質組織創成への応用

研究課題名(英文) Microvoid cell manipulation and its application into porous-tissue engineering

研究代表者

田中 信行 (Tanaka, Nobuyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：00724692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、物理化学的特性を活用した高スループットな細胞操作法の実現を目指している。研究期間において、特に表面張力をキーワードに、気泡や界面物性を利用した細胞パターンニング技術を開発した。多数の気泡を生成したとき、これらの気泡の大きさが揃っていると、自発的に六角形状に整列させることができる。ここへ細胞が入った液体を流し込むことで、多数の気泡が壁となり大量の細胞を整列させることができ、結果として、高スループットな細胞操作に成功した。細胞の「壁」の候補としては、寒天などの身近な物質も有効であることを確認した。また、細胞数を増やすことで厚みのある細胞組織の作製も実施している。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to realize a high throughput cell manipulation method utilizing physico-chemical properties. During the research period, we developed a cell patterning technique using bubbles and interfacial properties, especially using surface tension as a key word.

When many bubbles with uniform size are generated in liquid, they can spontaneously be aligned in a hexagonal shape. By further pouring the liquid containing the cells into the aligned bubbles, the surface of the aligned bubbles became a kind of wall for cells, resulting in that hexagonal-patterned cell culture system was realized. As another candidate of "cell wall", we suggested that agar was quite useful material. In addition, by increasing the number of cells, we also performed the fabrication of thicker cellular tissue.

研究分野：機械工学

キーワード：細胞操作 物理化学 表面張力 細胞培養 組織工学

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS細胞やES細胞などの幹細胞培養法が確立され、大量の培養細胞を比較的容易に入手できるようになりつつある。このような培養細胞の利用が想定される領域の一つとして、人工的に生体組織を作製するための技術分野である組織工学が挙げられる。例えば、平面状の細胞培養表面で上皮細胞を培養することにより、皮膚や消化管、眼球表面を覆う上皮細胞組織を作製することが可能である。さらに人工的に作製された培養上皮細胞組織を病変部の代替組織としてヒトに移植する再生医療の取り組みも進んでいる。

一般的な細胞の大量培養では、細胞はタンクなどの容器内で液体培地中に浮遊しており、目的の組織の形状に細胞を構成するという組織化というステップが必要である。しかしながら、単に細胞を高密度に押し込めても、酸素・栄養素の供給や老廃物の排出を担う構造を付与しなければ、深部から細胞が壊死してしまうため、機能的な立体組織は作製できないことが本研究の基本的背景としてあった。

これに対して、シート状の細胞組織を積層することによって立体細胞組織を作製する際に血管内皮細胞を共培養することによって、数日で自発的に管腔構造を形成することが知られていた。この管腔構造に培地を灌流させることによって、立体細胞組織内外で酸素・栄養素・老廃物の交換が可能となる。一方、培養の初期段階でのこれらの交換のための構造付与が課題であり、自発的作用ではない人為的な構造作製法が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、従来のロボットのように動作が完全に制御されたシステムを利用するのではなく、物理化学的現象に基づく自発的構造化を活用した細胞操作を目的とした。特に細胞接着に着目し、この空間制御を培養細胞組織への構造付与の糸口とした。

3. 研究の方法

細胞接着の空間制御法として、(1) 気泡の自発的整列現象を用いる方法と (2) パターニングされた細胞非接着分子を用いる方法をそれぞれ導入した。

気泡の自発的整列現象を用いる方法は、図1に一連の流れを示すように、細胞培養皿に注がれた液体培地に、細いピペットで空気を吹き込むことで気泡を生成する。この時、気泡は表面張力によって自発的に整列し、気泡と気泡の間に液体が流れる状態

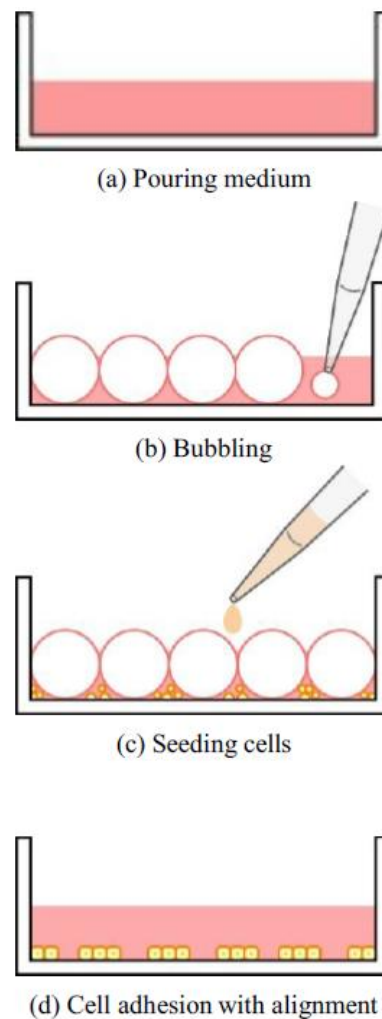


図1 気泡の自発的整列現象を使った細胞接着制御の模式図

となる。このとき細胞懸濁液を流し込むと気泡がある部分には細胞が接着せず、液体培地の部分にのみ細胞接着が起こる。このようにして、整列した気泡の形状に細胞接着を制御することができる。

もう一方のパターニングされた細胞非接着分子を用いる方法は、図2に示すように。細胞が接着しにくい分子を精密な鑄型に流し込むことで細胞接着領域と非接着領域を細胞培養皿表面に作り込むものである。事前に微細加工技術を用いて、鑄型を作製する必要があるものの、鑄型をポリジメチルシロキサン製とすることでガス透過性を活用した自発的吸引作用を応用することにより、細胞培養を行う現場での作業量を低減している。

各手法によって作製した細胞培養表面を用いて、種々の細胞を培養し、実現可能性や実際の医学・生物学分野での実験への応用可能性を検証した。

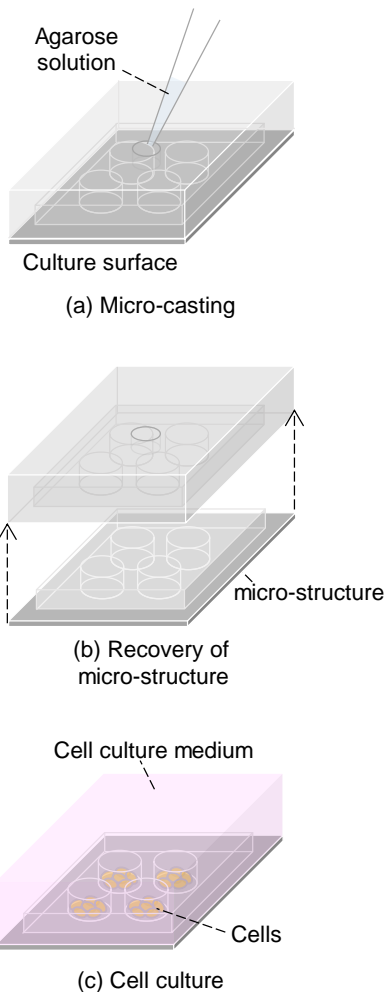


図2 パターニングされた細胞非接着分子を用いる方法の模式図

4. 研究成果

細胞接着の空間制御法として、(1) 気泡の自発的整列現象を用いる方法と(2) パターニングされた細胞非接着分子を用いる方法に関するそれぞれの研究成果を以下に示す。

(1) 気泡の自発的整列現象を用いる方法
 ウシ胎児血清を 10v/v% 添加したダルベッコ変法イーグル培地を細胞培養皿に注ぎ、3 種類の異なるサイズのマイクロピペットチップ (10 μ L、200 μ L、1mL) を用いて、起泡させた。表 1 に示すように、ピペットチップの内径が大きくなるほど大きな気泡が生成されることが分かる。また、今回の条件では 200 μ L、1mL のチップで気泡の大きさのばらつきが小さく、特に 200 μ L のチップでは変動係数が 3% 程度と精度よく起泡できることが分かった。図 3 に示すように、10 μ L のチップでは気泡のサイズが不均一であり、明確な整列現象が確認できなかった。一方で、200 μ L、1mL のチップを

表 1 起泡時におけるピペットチップと気泡の大きさの関係

	The sizes of micro-pipette tip		
	10 μ L tip	200 μ L tip	1 mL tip
Inner diameter of pipette tips (mm)	0.59	1.0	1.7
Diameter of bubbles ^a (mm)	0.93 \pm 0.18	2.1 \pm 0.065	3.0 \pm 0.31

a) Mean \pm SD

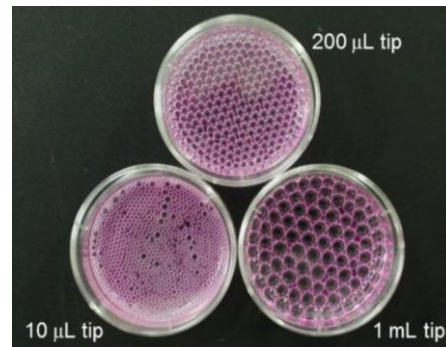


図3 生成された気泡の自発的整列現象

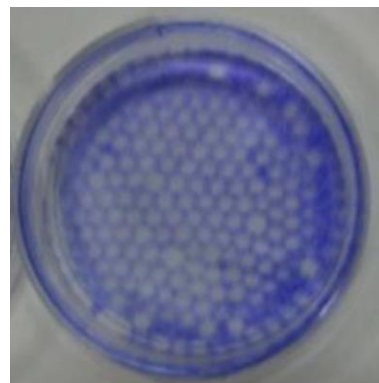


図4 接着した細胞の染色結果

用いた場合、気泡のサイズがほぼ均等になり、隣り合う気泡同士が自発的に最密構造である六方状に並ぶことが確認できた。気泡サイズの均一性が自発的整列現象の要であると推察される。

次に、ウシ頸動脈正常血管内皮細胞を、気泡が自発的に整列した培養皿に播種した。その後、温度 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 濃度 5% で加湿された CO₂ インキュベータ内で、2 時間静置したところ、播種した細胞が細胞培養皿の底面に沈降、接着する様子が確認できた。その後、未接着の細胞をリン酸緩衝液で洗い流し、接着細胞のパターンを確認するために 0.4w/v% のクリスタルバイオレットメタノール溶液にて染色した。染色された接着細胞のパターンを図 4 に示す。細胞培養皿の壁面付近では、細胞接着のパターンがぼやけて広がっている様子が見受けられるものの、壁面から離れた部分では、気泡の自発的整列に伴う六方状の明瞭なパターンが観察できた。

以上の結果から、特殊な器具を用いずと

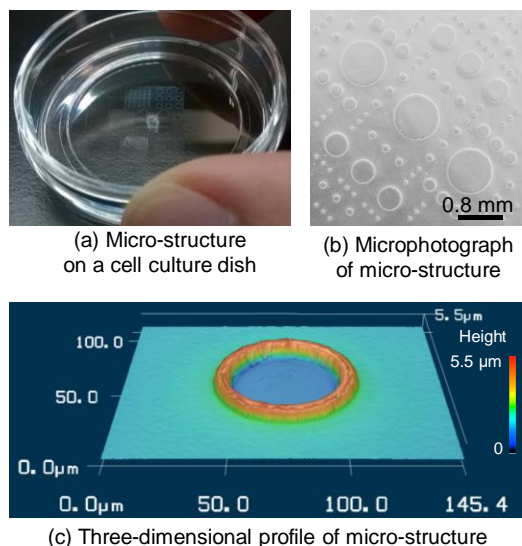


図5 作製した細胞非接着分子の微細構造パターン

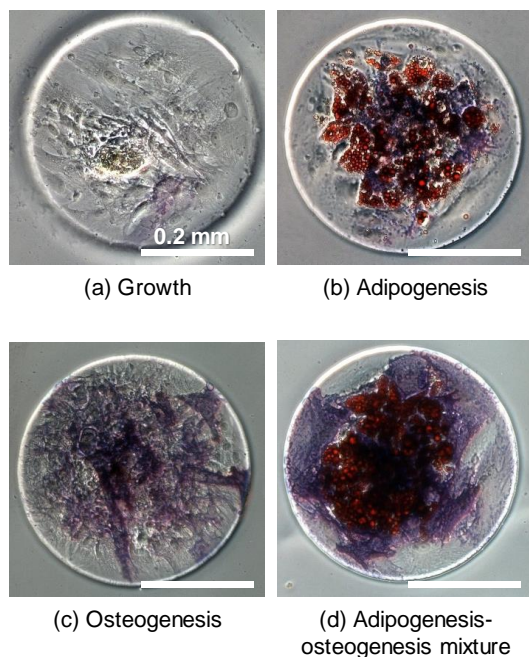


図6 円形パターン内で各種条件のもと培養した間葉系幹細胞のオイルレッド(赤)およびアルカリフォスファターゼ活性(青)に対する染色結果

も一般的な細胞培養作業で使用するマイクロピペットチップを利用して、均等な大きさの気泡を生成し、細胞を播種することで円形状の穴あきパターンを有する細胞培養系を実現できることを確認した。

(2) パターニングされた細胞非接着分子を用いる方法

事前に、フォトリソグラフィの手法を使って、必要な細胞非接着分子のパターンが彫り込まれたポリジメチルシロキサン(PDMS)製の鋳型を作製した。これは一般

的には半導体製造技術に基づくものであるが、近年外注などで簡便に入手できることを確認している。

次に、細胞非接着分子として寒天の主成分であるアガロースを選定し、PDMS製鋳型に2w/v%アガロース溶液を流し込むことで鋳造法と同様な流れで微細構造を作製した。アガロース溶液は、一般的に高粘度であるため流動性が乏しいものの、PDMSを事前に脱気することによって鋳型内に負圧を発生させることができ、この負圧による吸引力によって鋳型内の隅々までアガロースを行き渡らせることができた。結果として、図5に示すように、細胞非接着分子の微細パターンニングに成功している。

作製した細胞非接着分子の円形パターンを利用して間葉系幹細胞の培養および分化誘導を行った。培養条件は、増殖培地、脂肪分化培地、骨分化培地、脂肪分化-骨分化混合培地の4条件であり、細胞播種後、増殖培地で1日培養した後、各培地に交換し2週間に渡って培養を継続した。最終的に、間葉系幹細胞の分化の方向性を確認するために、脂肪分化マーカーの脂肪滴と骨分化マーカーのアルカリフォスファターゼ活性をそれぞれ染色した。染色結果を図6に示す。増殖培地では、明瞭な染色箇所は確認できない。脂肪分化条件では脂肪滴を有する赤色に染色された細胞が円形パターンの中央部に集中している様子が確認できた。これに対して骨分化条件ではアルカリフォスファターゼ活性を有する青紫色に染色された細胞が比較的全面に広がっている。また、脂肪分化培地と骨分化培地を混合した条件では中心部が脂肪分化、周辺部が骨分化を生じ、さらにその周辺部に未分化な領域があることが確認できた。これは、円形パターンが細胞集団に対する空間的な境界条件となったためと考えられ、このことがパターン内の細胞の力学的不均衡を生み、分化の空間的分布につながったと考えられる。

以上の結果から、本手法では、微細加工による事前の準備が必要であるが、細胞接着を比較的精密に空間制御することが可能であると言える。長期にわたって細胞培養が可能であり、幹細胞の分化誘導実験など医学生物学分野への応用も期待できる。

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15件)

- David G. Priest, Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka, Yuichi Taniguchi, Micro-patterned agarose gel devices for single-cell high-throughput

- microscopy of *E. coli* cells, Scientific Reports, 査読有, 7, 2017, 17750, DOI: 10.1038/s41598-017-17544-2
2. Nobuyuki Tanaka, Yoshihide Haruzono, Hiromitsu Nasu, Yuki Nakanishi, Junko Takahara, Akane Awazu, Yo Tanaka, Contamination-free non-contact wettability assessment system, ROBOMECH Journal, 査読有, 4, 2017, 21, DOI: 10.1186/s40648-017-0089-z
 3. Yaxiaer Yalikhun, Nobuyuki Tanaka, Yoichiro Hosokawa, Takanori Iino, Yo Tanaka, Embryonic body culturing in an all-glass microfluidic device with laser-processed 4 μ m thick ultra-thin glass sheet filter, Biomedical Microdevices, 査読有, 19, 2017, 85, DOI: 10.1007/s10544-017-0227-7
 4. Nobuyuki Tanaka, Tadahiro Yamashita, Asako Sato, Viola Vogel, Yo Tanaka, Simple agarose micro-confinement array and machine-learning-based classification for analyzing the patterned differentiation of mesenchymal stem cells, PLoS ONE, 査読有, 12, 2017, e0173647, DOI: 10.1371/journal.pone.0173647
 5. Shun-ichi Funano, Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka, Analysis of long-term morphological changes of micro patterned molecules and cells on PDMS and glass surfaces, Analytical Sciences, 査読有, 33, 2017, 723-725, DOI: 10.2116/analsci.33.723
 6. Shun-ichi Funano, Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka, Vapor-based micro/nano-partitioning of fluorofunctional group immobilization for long-term stable cell patterning, RSC Advances, 査読有, 6, 2016, 96306-96313, DOI: 10.1039/c6ra16906f
 7. Yaxiaer Yalikhun, Nobuyuki Tanaka, Yoichiro Hosokawa, Takanori Iino, Yo Tanaka, Ultrathin glass filter fabricated by femtosecond laser processing for high-throughput microparticle filtering, Applied Physics Express, 査読有, 9, 2016, 66702, DOI: 10.7567/APEX.9.066702
 8. Nobuyuki Tanaka, Hiroyuki Moriguchi, Asako Sato, Takayuki Kawai, Kenta Shimba, Yasuhiko Jimbo, Yo Tanaka, Microcasting with agarose gel via degassed polydimethylsiloxane molds for repellency-guided cell patterning, RSC Advances, 査読有, 6, 2016, 54754-54762, DOI: 10.1039/C6RA11563B
 9. Nobuyuki Tanaka, Yuji Haraguchi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Jun Miyake, Massively-multicellular alignment with the self-aggregate of air bubbles, Proceedings of 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 査読有, , 2015, 3537-3540, DOI: 10.1109/EMBC.2015.7319156
- [学会発表] (計 3 5 件)
1. 田中信行, バイオユーザーフレンドリーなものづくり, 第 1 7 8 回大阪大学大学院生命機能研究科研究交流会, 2018 (招待講演)
 2. Nobuyuki Tanaka, Member, Tadahiro Yamashita, Asako Sato, Viola Vogel, and Yo Tanaka, An ensemble of agarose microwells and AI for understanding hMSC differentiation patterns, 2017 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems, 2017
 3. Nobuyuki Tanaka, Junko Takahara, Akane Awazu, Yoshihide Haruzono, Hiromitsu Nasu, and Yo Tanaka, Dynamic interaction between cultivated cells and liquid on cell differentiation, 2017 MRS Fall Meeting & Exhibit, 2017 (国際学会)
 4. 田中信行, バイオユーザーフレンドリーなものづくり, 横浜国立大学主催ものづくりライフイノベーション最先端科学技術融合セミナー (第 1 回), 2017 (招待講演)
 5. Nobuyuki Tanaka, Hiroyuki Moriguchi, Asako Sato, Takayuki Kawai, Yo Tanaka, Gel-casting using micro-fluidic channels with vacuum conserved in polydimethylsiloxane elastomer toward patterned cell culture system, 8th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, 2016 (国際学会)
 6. Nobuyuki Tanaka, Tadahiro Yamashita, Viola Vogel, and Yo Tanaka, Agarose Micro-Cast for the Patterned Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, 27th 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2016 (国際学会)
 7. Nobuyuki Tanaka, Yuji Haraguchi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Jun Miyake, Massively-Multicellular Alignment

with the Self-Aggregate of Air Bubbles, 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015 (国際学会)

8. Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka, Bubble elimination with a temperature-responsive polymer for cell culture, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015 (国際学会)

〔図書〕(計 4件)

1. 春園嘉英、田中信行、サイエンス&テクノロジー株式会社、超親水・親油性表面の技術(「第5章 新しい濡れ性評価法－非接触濡れ性評価システム－」担当)、2018
2. 田中信行、理化学研究所、理研ニュース (No. 432, p. 16「日本古来のスマートガジェット!？」担当)、2017
3. 田中信行、日本バイオマテリアル学会、バイオマテリアル－生体材料－ (Vol. 35, No. 2, p. 132「Essays バイオマテリアルの夢を語る」担当)、2017
4. 田中信行、産経新聞社、産経新聞兵庫・京都総合版および関西オンライン版(【理研が語る】「科学の中のモノづくり」担当)、2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3件)

名称：物質の濡れ性の評価方法及び評価装置

発明者：田中信行、中西雄紀、高原順子、栗津茜、田中陽、春園嘉英、那須博光

権利者：理化学研究所、北川鉄工所

種類：特許

番号：特願 2016-161465

出願年月日：2016/8/19

国内外の別：国内

名称：物質の濡れ性分布の評価方法及び評価装置

発明者：田中信行、中西雄紀、高原順子、栗津茜、田中陽、春園嘉英、那須博光

権利者：理化学研究所、北川鉄工所

種類：特許

番号：特願 2016-161462

出願年月日：2016/8/19

国内外の別：国内

○取得状況(計 2件)

名称：Wettability evaluation method of substance

発明者：Nobuyuki Tanaka、Ryohei Uchida、Makoto Kondo、Masayuki Yamato、Teruo Okano、Makoto Kaneko

権利者：Tokyo Women's Medical University

種類：特許

番号：JP6189291B2

取得年月日：2017/8/30

国内外の別：国内

名称：Method of evaluating wetting characteristics of object

発明者：Nobuyuki Tanaka、Ryohei Uchida、Makoto Kondo、Masayuki Yamato、Teruo Okano、Makoto Kaneko

権利者：Tokyo Women's Medical University

種類：特許

番号：EP2857824B1

取得年月日：2016/10/12

国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

1. 理化学研究所 集積バイオデバイス研究ユニット

(日本語)

<http://www.qbic.riken.jp/ibd/jpn/>

(英語)

<http://www.qbic.riken.jp/ibd/en/>

2. 細胞のうるおいを測る | 理化学研究所

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170919_3/

3. 細胞個性をハイスループット解析 | 理化学研究所

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171221_1/

4. 「どこでも微小構造体」で幹細胞の分化パターンを解析 | 理化学研究所

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170406_1/

5. 簡単手順で長期安定的な細胞の区画培養 | 理化学研究所

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161011_2/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 信行 (Nobuyuki Tanaka)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：00724692