

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310070

研究課題名（和文）マイクロ電極を用いる細胞インターフェースの制御

研究課題名（英文） Microelectrode Techniques for Cellular Engineering

研究代表者

西澤 松彦（NISHIZAWA MATSUHIKO）

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20273592

研究成果の概要（和文）：

細胞培養に適した硬さのハイドロゲル基板上に筋肉細胞を配列培養する方法を開発した。作製したゲルシート培養筋は、電気刺激によって1週間以上に渡って安定に収縮運動できる。一方で導電性高分子 PEDOT による電極をハイドロゲルに配線する電解重合法を新規に開発し、作製条件の最適化によって $50 \Omega/\square$ 程度と実用に耐える表面抵抗率を達成した。これらを組み合わせたハイブリット細胞チップは、2 型糖尿病における骨格筋糖代謝不全の分子機構解明と治療薬開発などに有効である。

研究成果の概要（英文）：

We have succeeded in developing a technique to culture myotubes on a fibrin gel sheet. The prepared myotube culture on the hydrogel stably contract on electrical stimulation for more than 1 week. We also succeeded in preparing PEDOT microelectrodes on hydrogels like collagen and agarose, that shows surface resistivity of $50 \Omega/\square$. The combination of these two hydrogel sheets, on which myotubes and PEDOT are micropatterned, provides a totally contractile biochip that will be a powerful tool for the muscle-targeted drug development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：バイオマイクロマシン工学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：細胞チップ、筋肉細胞、導電性高分子

1. 研究開始当初の背景

細胞培養技術の急速な進展によって、組織再生などによる先進医療の可能性が拡がり、大きな期待を集めていた。一方で、*in-vitro* 細胞工学の可能性も拡大しており、動物実験を代替する培養細胞実験、医薬品を生産するバイオリアクター、そして半導体チップと神経

細胞を融合した細胞エレクトロニクスの研究などが進展していた。中でも、動物実験に対する規制が欧州を発信源として急速に強まる状況を受け、培養細胞を用いる薬効試験や新規化合物の安全性試験に関する技術革新が急務となっていた。

本研究計画でターゲットとした筋細胞は、2

型糖尿病の原因解明や治療薬・治療法の探索への利用が期待される培養系である。しかしながら、当時の一般的な培養筋細胞には運動（収縮・弛緩）する能力が殆ど備わっておらず代謝活性も低いため、効果的な電気刺激法や神経筋接合部の役割などを取り込んだ新しい培養システムの開発が求められていた。これらの課題を解決するには、細胞/細胞および細胞/電極の接合界面を分子レベルで制御する「細胞インターフェース技術」が必要であった。

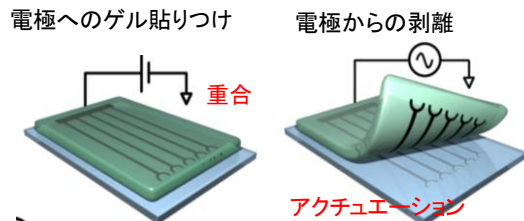
2. 研究の目的

動物実験を代替し得る高度に運動能力を獲得した培養筋細胞系の構築を目指し、筋収縮を適切にサポートする柔軟な培養基板上への配列培養を実現する。併せて柔軟で分子透過性を有する刺激用マイクロ電極の作製に取り組み、低侵襲刺激による長期安定収縮実験による筋代謝アッセイの可能性を具体的に示す事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 電気化学バイオリソグラフィもしくはフォトリソグラフィによって、ガラス板上に筋管細胞を配向・配列する技術を確立する。そこにフィブリンゲルを形成して剥離する事で、筋管の培養パターンをゲルシート状に写し取る。以上のプロセスを実現するため、ゲルの含水率などを最適化する。

(2) ハイドロゲルシートの表面に導電性高分子のマイクロパターンを作製する技術を開発する。ガラス板上の白金電極基板上にハイドロゲルシートを貼り付け、その状態で導電性高分子 PEDOT の電解重合を行う。その後、



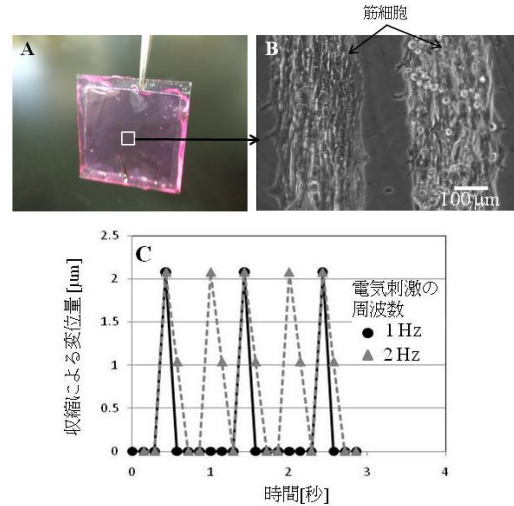
PEDOT を酸化還元収縮させることで（アクチュエーション）、剥離を誘導する試みを行う。

(3) 筋管細胞を培養したゲルシートと、PEDOT 電極を形成したゲルシートを組み合わせ、電気刺激による収縮運動と筋細胞の代謝活性との関連を調べる。

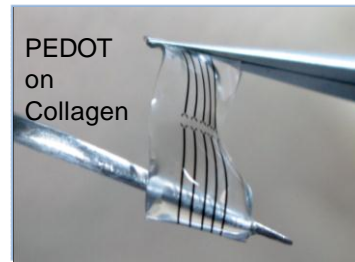
4. 研究成果

(1) フィブリンシート上に筋管細胞の配列培養が可能となった。電気刺激をしたところ、1 週間以上の比較的長期にわたって安定な収縮運動を維持できた。その間、筋管の収縮率は増大し、内部サルコメア構造の増強を反映

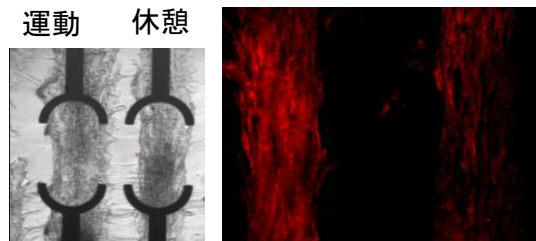
していると思われる。



(2) コラーゲン、アガロース、グルコマンナンなど多様なハイドロゲルの表面に PEDOT のパターンを形成する事が出来た。表面抵抗率は、最適化の結果、 $50\Omega/\square$ に至った。これは、ITO などの実用電極の値に迫るものである。



(3) 筋管細胞を培養したゲルシートと、PEDOT 電極を形成したゲルシートを用いて、収縮運動と筋細胞の代謝活性との関連を調べたところ、適切な運動によってグルコース取込みのトランスポーター GLUT4 の細胞膜移行が促進されることが明確に示された。



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 15 件) 総て査読あり

1. Kuniaki Nagamine, Takeaki Kawashima, Soichiro Sekine, Yuichiro Ido, Makoto Kanzaki, and Matsuhiko Nishizawa,

- “Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet”, *Lab Chip*, 11 (2011) 513–517.
2. Soichiro Sekine, Yuichiro Ido, Takeo Miyake, Kuniaki Nagamine and Matsuhiko Nishizawa, “Conducting Polymer Electrodes Printed on Hydrogel”, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 13174-13175.
 3. Lamy Ghenim, Hirokazu Kaji, Yu Hoshino, Takeshi Ishibashi, Vincent Haguët, Xavier Gidrol and Matsuhiko Nishizawa, “Monitoring Impedance Changes Associated with Motility and Mitosis of a Single Cell”, *Lab Chip*, 10 (2010) 2546-2550.
 4. Hirokazu Kaji, Takeshi Ishibashi, Kuniaki Nagamine, Makoto Kanzaki and Matsuhiko Nishizawa, “Electrically Induced Contraction of C2C12 Myotubes Cultured on a Porous Membrane-Based Substrate with Muscle Tissue-Like Stiffness”, *Biomaterials*, 31 (2010) 6981-6986.
 5. Hirokazu Kaji, Takeshi Yokoi, Takeaki Kawashima and Matsuhiko Nishizawa, “Directing the flow of medium in controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells with a microfluidic device”, *Lab Chip*, 10 (2010) 2374-2379.
 6. Soichiro Sekine, Shinya Nakanishi, Takeo Miyake, Kuniaki Nagamine, Hirokazu Kaji and Matsuhiko Nishizawa, “Electrodes Combined with an Agarose Stamp for Addressable Micropatterning”, *Langmuir*, 26 (2010) 11526-11529.
 7. Takeaki Kawashima, Takeshi Yokoi, Hirokazu Kaji and Matsuhiko Nishizawa, “Transfer of Two-Dimensional Patterns of Human Umbilical Vein Endothelial Cells into Fibrin Gels to Facilitate Vessel Formation”, *Chem. Commun.*, 46 (2010) 2070-2072.
 8. Kuniaki Nagamine, Takeaki Kawashima, Takeshi Ishibashi, Hirokazu Kaji, Makoto Kanzaki and Matsuhiko Nishizawa, “Micropatterning Contractile C₂C₁₂ Myotubes Embedded in a Fibrin Gel”, *Biotechnol. Bioeng.*, 105 (2010) 1161-1167.
 9. Soichiro Sekine, Hirokazu Kaji and Matsuhiko Nishizawa, “Spatiotemporal Subcellular Biopatterning Using an AFM-Assisted Electrochemical System”, *Electrochem. Commun.*, 11 (2009) 1781-1784.
 10. Takeshi Ishibashi, Yu Hoshino, Hirokazu Kaji, Makoto Kanzaki, Masaaki Sato and Matsuhiko Nishizawa, “Localized Electrical Stimulation to C2C12 Myotubes Cultured on a Porous Membrane-Based Substrate”, *Biomedical Microdevices*, 11 (2009) 413-419.
 11. Masahiko Hashimoto, Hirokazu Kaji and Matsuhiko Nishizawa, “Selective Capture of a Specific Cell Type from Mixed Leucocytes in an Electrode-Integrated Microfluidic Device”, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 2892-2897.
 12. Hirokazu Kaji, Takeshi Yokoi, Takeaki Kawashima and Matsuhiko Nishizawa, “Controlled Cocultures of HeLa Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Detachable Substrates”, *Lab on a Chip*, 9 (2009) 427-432.
 13. Hirokazu Kaji, Masahiko Hashimoto, Soichiro Sekine, Takeaki Kawashima and Matsuhiko Nishizawa, “Patterning Adherent Cells within Microchannels by Combination of Electrochemical Biolithography Technique and Repulsive Dielectrophoretic Force”, *Electrochemistry*, 76 (2008) 555-558.

14. Matsuhiko Nishizawa, Takahiro Kitazume and Hirokazu Kaji, “Conducting Polymer-Based Electrodes for Controlling Cellular Functions”, *Electrochemistry*, 76 (2008) 532-534.
 15. Soichiro Sekine, Hirokazu Kaji, Takashi Abe and Matsuhiko Nishizawa, “Integration of Electrochemical-Based Bio-Lithography technique into AFM System” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 2711-2716.
- [学会発表] (計 11 件)
1. 西澤松彦、接合型・積層型共培養系の微細加工、動物実験代替法学会、2010年12月5日、東京
 2. M. Nishizawa, Nano/Micro Devices for Dynamic Control of Cellular Adhesion and Functions, *International Conference on Nanoscience and Nanotechnology*, 2010.11.8, Gwangju, Korea
 3. M. Nishizawa, Metabolic Bioassay Using Gel Sheet-Based Skeletal Muscle Cell Culture System, *KIST-Tohoku Joint Symposium on Nanobiomedical Engineering*, 2010.8.30, Seoul, Korea
 4. 西澤松彦、電気化学バイオリソグラフィの開発と応用、第19回日本MRS学術シンポジウム、2009年12月7日、東京
 5. 西澤松彦、先進バイオリソグラフィの細胞アッセイ応用、電気化学会、2009年9月10日、東京
 6. M. Hashimoto, H. Kaji and M. Nishizawa, Electrochemical Bio-lithography System for Capturing Cells within a Microfluidic Chip, *ISE Meeting*, 2009.8.20, Beijing, China
 7. 西澤松彦、バイオ機能を搭載した情報エネルギーデバイス、REDEEMシンポジウム、2009年7月25日、東京

8. M. Hashimoto, H. Kaji and M. Nishizawa, Rapid Capture of a Specific Cell Type within an Electrode-Integrated Microfluidic Chip, 215th Electrochemical Society Meeting, 2009.5.26, San Francisco, USA
 9. Matsuhiko NISHIZAWA and Hirokazu KAJI, Electrochemistry-Based Biointerface Engineering, *Asian Pacific Association of Biomechanics Conference*, 2009.4.17, Christchurch, New Zealand
 10. 西澤松彦、電気化学バイオリソグラフィのセンシング応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム、2008.11.18、東京
 11. Matsuhiko Nishizawa, Electrochemistry-Based Biointerface Engineering, *7th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering*, 2008.10.16, Taiwan
- [図書] (計 4 件)
1. K. Nagamine, Y. Ido, S. Sekine, T. Miyake, M. Kanzaki and M. Nishizawa, ECS, “Metabolic Assay System for Micropatterned Contractile Myotubes” *ECS Trans., Chemical Sensors 9 & MEMS/NEMS 9*, 33(8), 35-39, 2010.
 2. 西澤松彦、NTS、細胞接着の制御技術「自己組織化ハンドブック」2009、781-782ページ
 3. 西澤松彦、丸善、細胞操作「第3版現代界面コロイド化学の基礎」2009、353-355ページ
 4. 西澤松彦、ティー・アイ・シー、細胞操作・センシングのためのバイオリソグラフィ「先進化学センサ」2008、276-280ページ
- [産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)
1. 名称: 導電性高分子からなるパターンを備えた多孔質構造体及びその製造方法

発明者：西澤松彦、関根宗一郎、井門裕一郎

権利者：国立大学法人 東北大学

種類番号：特願 2010-73820

PCT/JP2011/57420 (2011/3/25)

出願年月日：平成 22 年 3 月 26 日

国内外の別：国内外

2. 名称：細胞検査用バイオアッセイ用キット

発明者：西澤松彦、神崎展、長峯邦明

権利者：国立大学法人 東北大学

種類番号：特願 2009-281158

出願年月日：平成 21 年 12 月 11 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.biomems.mech.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 松彦 (NISHIZAWA MATSUHIKO)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20273592

(2) 研究分担者

梶 弘和 (KAJI HIROKAZU)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70431525

(3) 連携研究者

()

研究者番号