

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22220008

研究課題名(和文)再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームの創製

研究課題名(英文)Development of a Nano-Micro Platform for Tissue Engineering Applications

研究代表者

生田 幸士 (Ikuta, Koji)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：90212745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医療の実用化を目指し、3次元組織を低コストかつ省スペースで培養し、個別操作できるマイクロデバイスの開発に取り組んだ。微細加工に適し、かつ細胞培養への適性を併せ持つ、新たな素材や、新規の単一細胞ハンドリング技術、新たなマイクロ流路作製技術等の要素技術を開発し、最終的には、それらを統合したオンチップ自動培養システムの実証機を完成させた。実証機では、1センチ角に100個の独立したマイクロウェルを配置し、人手を介することなく、組織体の形成から、分化誘導、ソーティングまで、個別に操作することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Tissue engineering is a research field thriving at an immense speed globally. In order to boost tissue engineering to a clinically applicable level, it is inevitable for low-cost automated tissue regeneration system to be developed, not at the cellular level, but at the tissue/organ level. We aim to contribute to the field by integrating originally developed root technologies such as 3-D nano-fabrication, micro-actuators, super-small force sensing, and nano-functional materials. The developed prototype system has deformable micro-wells arrayed 10x10 in 1cm square, and each well can be controlled independently by pneumatic actuation. By using this prototype, embryonic bodies of stem cells (human iPSc, mouse ESc and etc.) were formed, cultured, differentiated and sorted in a palm-sized closed device without manual works.

研究分野：医用マイクロ・ナノマシン

キーワード：医用マイクロマシン 再生医療 自動培養 スキャフォールド 光駆動マイクロロボット 細胞操作

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実用化には、細胞レベルではなく、組織・臓器レベルの大量生産技術の開発が必要不可欠である。しかし、厚みを持つ3次元的な組織の再生は、未だ困難である。また、培養条件の網羅的検討には、ピペットや分注器などを用いており、低速であるだけでなく、手作業に起因する再現性の低さ、人件費による高コスト体質など、多くの課題を抱えている。これらの課題に対し、昨今、産業ロボットを流用した実験室が開発されつつあるが、高価で広い占有面積を要し、実験速度を桁違いに加速することは困難である。

2. 研究の目的

我々は、新規のマイクロ/ナノマシン技術で再生医療の主要課題を抜本的に解決するを目指している。具体的には、独自に開発してきた3次元ナノ加工プロセス、新原理マイクロアクチュエータ、微小力センシング、ナノ機能材料等の新開発要素技術を統合し、細胞に生化学的および機械的刺激をピンポイントで与え、分化誘導を制御することのできる、コンパクトかつ低コストの、再生医療用プラットフォームを複数種実現する。

3. 研究の方法

本研究で開発する再生医療用プラットフォームは、nm, μ m, mm オーダーの3段階の階層から構成される。最も大きな階層は、1センチ四方程度の培養チップであり、培養チャンバー、培地供給用の流路、温度制御モジュール、CO₂制御モジュールを内蔵する。中段階の階層は、前記の培養チャンバー内に充填されたナノファイバースキャフォールドと、マイクロ流路網である。マイクロ流路によって、3次元培養に必須の物質交換が行われると共に、スキャフォールドによる増殖促進が行われる。最小レベルの階層は、細胞にピンポイントで刺激を与えるナノアクチュエータである。これにより機械刺激による分化誘導や、細胞の配置をサブミクロンオーダーで自在に調整することが可能となる。以上の3段階の階層構造によって、単一細胞レベルから組織レベルに至る全てのスケールで制御された分化誘導・3次元組織培養を実現する。

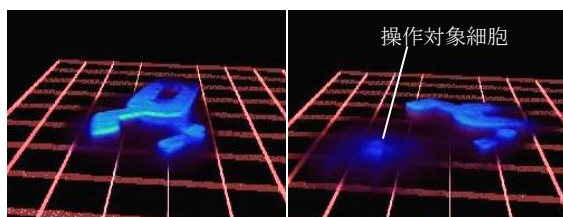


図1. 細胞操作ロボットのリアルタイム3次元共焦点観察像(左)と、操作対象の細胞にナノロボットが接近する様子(右)

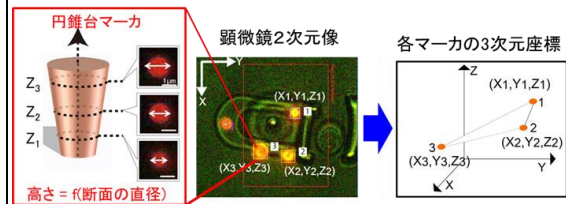


図2. 傾斜付マーカにより、顕微鏡の2次元画像から3次元姿勢をリアルタイム計測する手法

4. 研究成果

4.1 細胞操作ナノロボットシステム

チャンバー内で、ナノロボットを自由自在に駆動し、単一細胞レベルの操作・刺激を行うため、2光子光造形により、光トラップによる液中駆動可能なロボットを開発した。さらに、これまで2次元に限られていた操作・観察系を、3次元で可能にするため、共焦点顕微鏡と光トラップ光学系を干渉することなく統合した新たな光学系を考案した。顕微鏡の対物レンズを動かす代わりに、共役位置において可変焦点レンズを駆動して、共焦点3次元像を取得する。光トラップによって駆動する細胞操作ナノロボットを3次元空間で自由に操作しながら、ロボット及び細胞の位置や変形を、任意の方向から、リアルタイムで3次元操作・観察・録画できるハードウェア及び専用ソフトウェアを開発した(図1)(Ikeuchi et al., IEEE MEMS 2011)。これら要素技術については、特許出願から取得にまで至っている。

さらに、ナノロボット上に位置認識用蛍光マーカを付けることで、共焦点顕微鏡を用いずに、平面画像からナノロボットの3次元姿勢を算出するシステムを開発した(図2)。これにより、ナノロボットを用いた微小力計測の時間分解能を10倍以上向上させた(Shimada et al., Transducers 2013)。

これらの計測技術に加え、ナノロボットの特定部位にのみ、標的タンパクを捕捉するハイブリッド光造形技術を開発した。本技術を用いて、細胞骨格としての機能を担うアクチンファイバーを、対向する光駆動ナノロボットの間で捕捉し、伸展刺激を加えたところ、興味深い自己組織化現象を見出した(Shimada et al., Transducers 2013)。本現象のメカニズムについては、細胞生物学者らと、さらに探求を続けている。

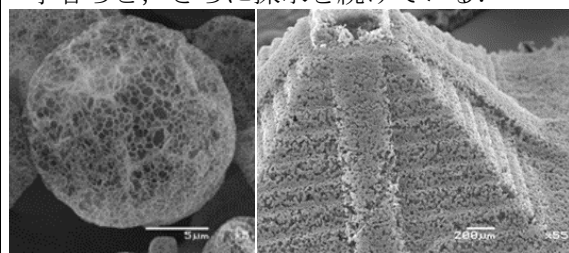


図3. 生分解性ナノメッシュカプセル(左)を積層して作製した3次元構造(右)

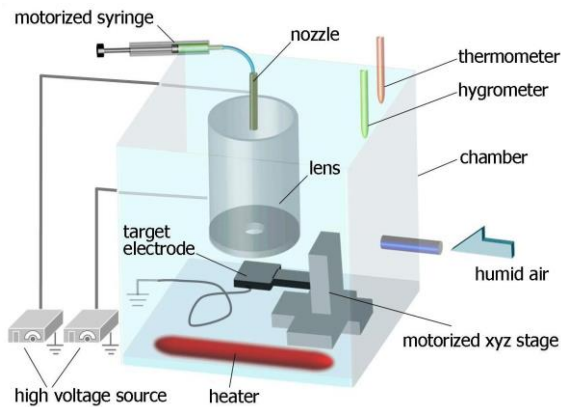


図4. 生分解性ナノメッシュカプセルを電氣的に集束させて、自由な形状の3次元スキャフォールドを作製するマイクロ3Dプリンタ

4. 2 ナノファイバースキャフォールド

高湿度環境でポリマー溶液をエレクトロスプレーにより噴霧することで、飛行中の微細液滴表面で相分離が起こる。液滴内の静電反発と、表面での相分離が同時に進行することで、最終的に、不織布様表面を持ったマイクロカプセルが生成する現象を発見し、安定した生産技術を世界で初めて確立した (Ikeuchi et. al., *Biomed. Microdev.* 2012). 従来、エレクトロスプレーにより作製されたナノファイバーが良好な細胞の足場となることは知られていたが、3次元化することは困難であった。我々の開発した手法は、従来用いられてきたナノファイバーと比して、連続的な繊維ではなく粒子であるため、微細な3次元パターンニングができる。また、ナノファイバーと異なり、球状の中空構造を持つため、高い空孔度を持った厚みのあるスキャフォールドが作製できるメリットを持つ (図3)。

そこで、静電レンズを用いて、生成直後のマイクロカプセルをターゲット電極の一点に収束させた上で、ターゲット電極の下のステージをマイクロアクチュエータにより平面的に動かすことで、任意の3次元構造を直描できるマイクロ3Dプリンタを開発した (図4)。さらに、大量生産向け手法として、微細加工した導電性鋳型を対電極とすることで、立体スキャフォールドの作製を実証した。さらに予めポリマー溶液に薬剤を混合することで、薬剤徐放性ナノメッシュカプセルの生成にも成功した (Tane et. al., *IEEE MEMS* 2011)。

4. 3 光造形樹脂の毒性低減プロセス

一般に光硬化樹脂は毒性が高く、細胞レベルでの生体適合性はなかった。そのため、細胞や生体と常時接触する応用には課題があり、再生医療用細胞培養器材として利用できる光硬化樹脂は存在しなかった。我々は樹脂の軟化温度から少し上の高温で熱処理することで、細胞の培養が可能な生体適合性を付与できることを発見した (図5)

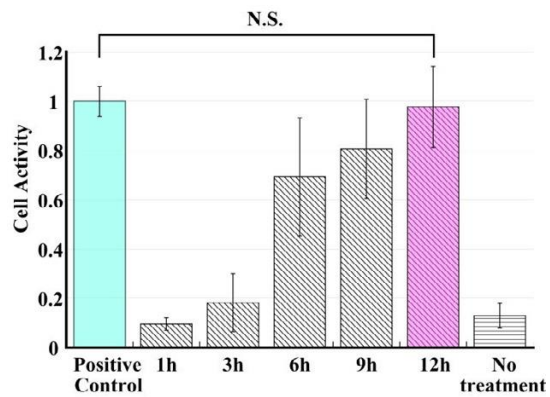


図5. 光造形樹脂の毒性を低減する熱処理の時間依存性. 12時間以上の処理で培養可能.

(Inoue et. al., *IEEE MEMS* 2012). その結果、細胞や DNA などと接触するバイオ、医用応用にも適用できる道を拓いた。本成果は、外科医が多い日本コンピュータ外科学会で論文賞として高い評価を得ている (Inoue et. al., *JSCAS* 2011)。

4. 4 3次元クラスタ培養器材

幹細胞の分化誘導では、3次元細胞凝集塊である胚様体を作製し、細胞間相互作用により分化を促進させる。胚様体形成には、ハンギングドロップ法や、超低接着培養皿が用いられるが、いずれの手法も、大量生産に不向き、あるいは、胚様体形状が不均一、という課題を有する。そこで、我々は3次元微細加工技術を利用し、一度の播種操作で、均一かつ大量の胚様体を形成できる、新規培養デバイス“TASCL”を開発した (図6) (Yukawa et. al., *Biomaterials* 2011)。

本デバイスは、シート上に高密度の貫通孔を有し、貫通孔の壁面は上部から下部に向かう傾斜面となっている。デバイス表面には水平面が全く存在せず、かつ、表面は親水化処理が施されているため、播種された細胞は、必ずいずれかの貫通孔の底面に向かって沈降する。細胞の播種数と密度は貫通孔の形状で決まるため、一度の播種操作で、任意の基材上で、同一条件下で大量の胚様体を形成できる。TASCLは通常の培養皿だけでなく、温度応答性表面、多孔質膜、マトリゲルなど、目的に応じた基材に直接貼付できることが特徴であり、様々な応用展開を図るとともに (Miyamoto et. al., *Cell Medicine* 2015)、企業と共同で実用化

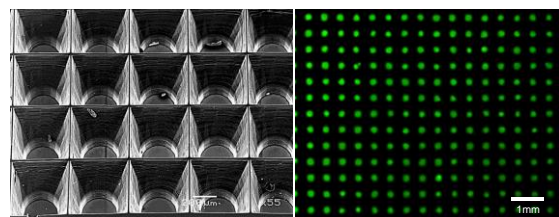


図6. 3次元クラスタ培養基材 (左) を用いて、大量生産中のヒト iPS 細胞由来胚様体 (右)

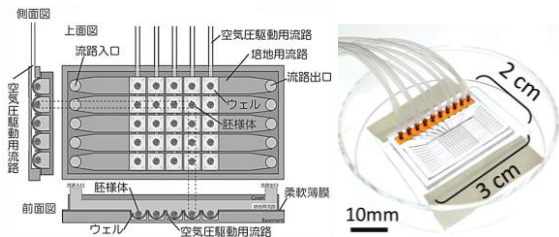


図7. 胚様体培養プラットフォーム PASCL のコンセプト図 (左) と、開発したプロトタイプ (右) のための研究も進めている。

4. 5 胚様体培養プラットフォーム

前項の TASCL は、均一な胚様体を大量に形成させる培養器材であり、培地交換や、分化誘導、選別などの操作は人手による作業を必要とした。再生医療の実用化を考えた場合、人手による作業を極力排除し、低コスト、かつ省スペース型の自動培養システムが必要不可欠である。この課題を解決するため、“Pneumatically Actuated Spheroid Culture Chip ; PASCL”を開発した (Nishijima et. al., IEEE MEMS 2012)。PASCL は指先サイズのデバイス上で胚様体の培養、試薬導入、観察、回収を行う新概念のマイクロ流体デバイスである (図7)。

PASCL は均一な大きさの胚様体を同時に多数培養することが可能で、さらに培養された多数の胚様体の中から選択的に胚様体を回収できる機構を備える。細胞培養部分は、PDMS 製の柔軟な薄膜と空気圧駆動ラインから成る。PDMS 薄膜の上部には流路が取り付けられている。空気圧伝達ラインには正方形の開放部を備えており、負圧を印加することで上部のPDMS 薄膜が開放部に沿って凹み、胚様体を培養するためのマイクロウェルを形成する。空気圧駆動ラインと送液ラインは垂直に配置されているため、アレイ上の任意の胚様体を選択的に回収することができる (図8)。プロトタイプ

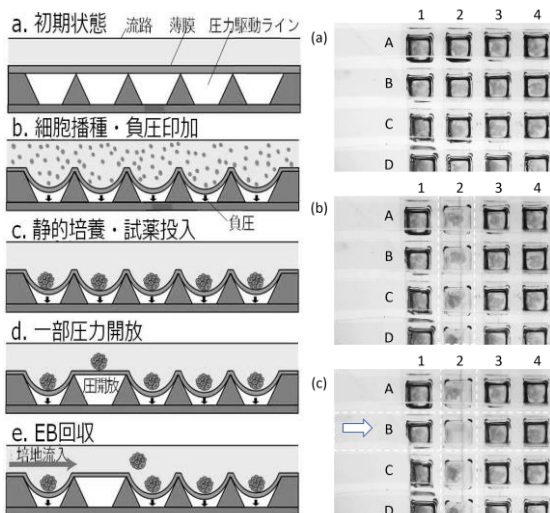


図8. PASCL による胚様体培養のフローチャート (左) と、選択的回収の様子 (右)

プは手のひらサイズに 100 個のマイクロウェルを備え、インキュベータ機能も有するため、研究者は実験条件を入力しておくだけで、胚様体形成から、分化誘導、回収までの実験を複数同時に実行できる (Yasukawa et. al., IEEE MEMS 2013)。

本プラットフォームは、再生医療製品の低コスト化や、品質保証の観点からも期待が大きく、臨床医療分野の日本臓器保存生物医学学会での会長賞や日本機械学会の Robomech 表彰を受け、企業と共同で実用化も進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, “Spheroid Formation and Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device”, Cell Medicine, accepted
2. Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, “Three-Dimensional in vitro Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device”, Cell Medicine 7(2), pp. 67-74, 2015
3. M Yasui, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Density controllable photocurable polymer for three-dimensional magnetic microstructures with neutral buoyancy”, Appl. Phys. Lett. 103, 201901, 2013
4. M Ikeuchi, R Tane, K Ikuta, “Electrospray deposition and direct patterning of polylactic acid nanofibrous microcapsules for tissue engineering” Biomedical Microdevices, Volume 14, Issue 1, pp 35-43, 2012
5. Y. Inoue, K. Ikuta, “Reduction of Cytotoxicity by High Temperature Heat Treatment for Microstereolithography”, Journal of Japan Society of Computer Aided Surgery 13, 67-73, 2011
6. H Yukawa, M Ikeuchi, K Ikuta, Y Miyamoto, H Noguchi, S Hayashi, “Embryonic body formation using the tapered soft stencil for cluster culture device.”, Biomaterials 32(15), pp.3729-38, 2011

[学会発表] (計 81 件)

1. A. Yasukawa, T Nishijima, M Ikeuchi, K Ikuta, “Integrated micro culture device for fully automated closed culture experiment of embryonic body”, Proc. IEEE MEMS 2014, 181-184, 2014 (Oral)
2. M. Ikeuchi, S. Hayashi, K. Ikuta, “Mass-production and prolonged undifferentiated state of embryonic bodies by using a semipermeable tapered microwell array”, Proc. IEEE MEMS 2014,

- 2014
3. M. Ikeuchi, S. Hayashi, K. Ikuta, “Co-cultured Cluster Formation and Self-organization of Cells in Hydrophilic Tapered Microwell Array”, 9th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2014
 4. M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Membrane Microchannel Made of Collagen with Self-Assembled Microfibril Structures for Tissue Engineering”, Proc. Transducers 2013, 641-644, 2013 (Oral)
 5. N Shimada, M Ikeuchi, K Ikuta, “Real-Time 3D Force / Position Sensing System by a Single CCD for Optically Driven Micro-Robot”, Proc. Transducers 2013, 645-648, 2013 (Oral)
 6. N Shimada, K Kadoguchi, M Ikeuchi, K Ikuta, “Mechanical Properties Analyzer for Nano-Size Protein with Optically Driven Nano-Beam”, Proc. Transducers 2013, 550-553, 2013
 7. M. Ikeuchi, Y. Koyata, K. Ikuta, “Sealless 3-D microfluidic channel fabrication by sacrificial caramel template direct-patterning”, Proc. IEEE MEMS 2013, 931-934, 2013
 8. M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Centrifugal imprinting during vitrification (CIV) of collagen hydrogel for highly biocompatible 3D membrane scaffold”, Proc. IEEE MEMS 2013, 291-294, 2013
 9. A. Yasukawa, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Combinatorial differentiation induction of embryonic bodies in "PASCL (Pneumatically Actuated Spheroids Culture Lab-on-chip)”, Proc. IEEE MEMS 2013, 311-314, 2013
 10. M Yasui, K. Ikuta, “3-D General Photocurable Model of Resin with Various Kinds of Microparticles”, Proc. IEEE MEMS 2013, 453-456, 2013
 11. M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Fabrication of Membrane Microchannel by Using Vitrified Collagen for Regeneration of Thick Tissues in Vitro”, 35th Annual International IEEE EMBS Conference, 2013
 12. A. Yasukawa, T. Nishijima, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Fabrication and Differentiation of Embryonic Bodies in “PASCL (Pneumatically Actuated Spheroid Culturing Lab-On-A-Chip)”, 35th International IEEE EMBS Conference, 2013
 13. M Yasui, M Ikeuchi, K Ikuta, “Magnetic micro actuator with neutral buoyancy and 3D fabrication of cell size magnetized structure”, Proc. IEEE ICRA 2012, 745-750, 2012 (Oral)
 14. T. Nishijima, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Pneumatically Actuated Spheroid

Culturing Lab-On-A-Chip for Combinatorial Analysis of Embryonic Body”, Proc. IEEE MEMS 2012, 92-95, 2012

15. Y. Inoue, K. Ikuta, “Cell culture biochemical IC chip with cell-level biocompatibility”, Proc. IEEE MEMS 2012, 788-791, 2012
16. M. Ikeuchi et al., “Multifunctional Optically Driven Microrobot for Realtime 3D Bio-Manipulation and Imaging”, Proc. IEEE MEMS 2011, 29-32, 2011 (Oral)
17. M. Yasui, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “3D Remote Controllable Nano Actuation System For Cell Handling And Micro Surgery”, Proc. IEEE MEMS 2012, 1117-1120, 2012 (Oral)
18. S. Nakamoto, K. Kobayashi, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Mobile Micro Screw Pump with Flow Sensing Capability for On-Site Flow Control in Microchannel Device”, Proc. IEEE MEMS 2011, 1166-1169, 2011
19. R. Tane, M. Ikeuchi, K. Ikuta, “Multi-Layer Signal Encoded Tissue Culture Device Formed of Nano-Fibrous Microcapsules”, Proc. IEEE MEMS 2011, 1047-1050, 2011
20. M. Ikeuchi et al., “Soft Tapered Stencil Mask for Combinatorial 3D Cluster Formation of Stem Cells”, Proc. μ TAS 2011, pp.641-643, 2011

〔図書〕 (計 1 件)

1. 生田幸士, “世界初をつくり続ける東大教授の「自分の壁」を越える授業”, ダイヤモンド社, 全 192 頁, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 7 件)

名称：細胞培養装置および細胞培養方法
 発明者：池内真志, 林衆治, 豊田悠司
 種類：特許
 番号：特願 2014-232224
 出願年月日：2014/11/14
 国内外の別：国内

名称：細胞培養装置およびこれを備える細胞培養試験観察システム
 発明者：池内真志, 生田幸士, 安川あかね
 権利者：東京大学
 種類：特許
 番号：特願 2014-151084
 出願年月日：2014/7/24
 国内外の別：国内

名称：細胞培養用シートおよびその製造方法
 発明者：池内真志, 林衆治, 豊田悠司
 権利者：東京大学ほか
 種類：特許
 番号：特願 2014-123483
 出願年月日：2014/6/16

国内外の別： 国内

名称：細胞を複数の集団へと分けるためのマスク材

発明者：池内真志，林衆治，豊田悠司

種類：特許

番号：特願 2013-037627

出願年月日：2013/2/27

国内外の別： 国内

名称：樹脂構造体の生体適合化処理方法、生体適合化処理された樹脂構造体

発明者：生田幸士，井上佳則，池内真志

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2010-171467

出願年月日：2010/7/30

国内外の別： 国内

名称：Device for Observing Three-Dimensional Confocal Point, and Observation Focal Plane Displacement/Correction Unit

発明者：生田幸士，池内真志

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：W0 2012-035903

出願年月日：2011/7/27

国内外の別： 国外

名称：Three-Dimensional Polymer-Metal Composite Microstructure and Method for Producing Same

発明者：生田幸士，池内真志

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：W0 2011/162095

出願年月日：2011/6/7

国内外の別： 国外

○取得状況（計 2 件）

名称：3次元共焦点観察用装置及び観察焦点面変位・補正ユニット

発明者：生田幸士，池内真志

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2010-208971

出願年月日：2010/9/17

取得年月日：2013/3/15

国内外の別： 国内

名称：3次元ポリマー-金属複合マイクロ構造体、及びその製造方法

発明者：生田幸士，池内真志

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2010-143724

出願年月日：2010/6/24

取得年月日：2015/5/1

国内外の別： 国内

〔その他〕

【研究室ホームページ】

<http://www.micro.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

【新聞掲載】

1. 日経新聞 2011年12月5日朝刊 11面「細胞培養技術 再生医療後押し ― 東大生産効率20倍に」
2. 日刊工業新聞 2013年1月28日 19面「磁性光硬化樹脂、液体の中で停止、微小ロボットへ応用期待」
3. 日経新聞 2013年10月1日朝刊 17面「iPS細胞を自動培養」
4. 日刊工業新聞 2014年1月24日 27面「微小電気機械システム」

【TV 放映】

1. NHK総合 「爆問学問」2010年11月16日
2. 関西テレビ 「未来コーナール大学」2011年11月26日
3. TBS 「超平凡博士★タナカ」2012年3月24日、31日
4. 日本テレビ 「Zip!」2013年2月6日
5. テレビ東京 「スーパー最先端博覧会～あの日の夢がリアルになった!」2013年2月24日(日)
6. 日本テレビ 「世界一受けたい授業」2015年3月28日

【公開行事】

1. 東京大学5月祭 「未来医療のためのマイクロナノマシンと医療ロボット」開設。500名(2010-2014)
2. 駒場キャンパス公開 「医療を改革するマイクロマシンとナノロボット」開設。200名(2011-2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

生田幸士 (Koji Ikuta)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号：90212745

(2)連携研究者

辰巳仁史 (Hitoshi Tatsumi)

名古屋大学大学院・医学研究科・准教授
研究者番号：20171720

林衆治 (Shuji Hayashi)

名古屋大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号：30218573

池内真志 (Masashi Ikeuchi)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教
研究者番号：90377820

井上佳則 (Yoshinori Inoue)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教
研究者番号：20402505