

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22350104

研究課題名（和文）

生体適合性ナノファイバマトリクスによる細胞分化能の時空間制御

研究課題名（英文） To develop neural chips using hPSC-derived neurons for facilitating in-vitro investigations of neural networks by nanofibers

研究代表者

陳 勇（Chen Yong）

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：70512458

研究成果の概要（和文）：

申請者らが独自に構成した生体適合性ナノファイバマトリクスを用いた多能性マイクロ流体システムを構成し，胚性幹細胞(ES Cell)および誘導多能性幹細胞(iPS Cell)の分化過程とその方向を制御する．特に，神経細胞の形成に着目して神経細胞ネットワークの形成試験を行う．細胞増殖を促進しうる空間パターンと生化学材料を導入した基材を用い，神経軸索と樹状突起の生長およびシナプス接合の生成を促す．マイクロ流路と集積マイクロ電極アレイを組み合わせ，構成された神経細胞ネットワークの動的特性の解析と制御とを行う．本研究の進展により，神経系バイオマーカー・薬剤の高効率スクリーニング(HTS)テストのみならず，バイオマシニンタフェイスのモデルが提供される．

研究成果の概要（英文）：

We construct well-designed neural networks by using either embryonic or induced pluripotent stem cells. Both topographic and biochemical cell growth cues are patterned to guide the growth and connation of derived axons and dendrites. In addition, aligned nanofibers-based topographic and microfluidic circuits as well as integrated microelectrode arrays are used for more active control and monitoring cellular network activities. If successful, the derived neuron chips can be useful as model system for advanced study of drug screening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
平成 23 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
平成 24 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総 計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：高分子・繊維材料

キーワード：高分子機能材料、ナノファイバマトリクス、幹細胞工学、神経ネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は神経細胞が何らかの原因

により死に至る病気であり、その結果記憶形成障害や運動機能調節障害など人が生活す

る上で必要な機能が失われてしまう疾患である。これには、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、プリオン病などが挙げられるが、これらの神経変性疾患の根本的な治療薬は今のところなく、新規薬剤の開発が急務となっている。ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は生体内におけるどの細胞にも分化できる細胞であり、また自己複製が可能であることから、再生医療や細胞移植治療などへの応用が期待されている。また、生体外においてヒト ES/iPS 細胞を分化することによって、それを用いた薬剤評価試験の開発なども行われている。

ヒト ES/iPS 細胞を薬剤スクリーニングに用いる際に、高効率・高収率に目的細胞を得ることは、データの信用性を高めるために非常に重要である。現在行われているヒト ES/iPS 細胞の神経細胞分化誘導には大きく二つの方法があり、1) 胚様体 (Embryoid Body) を形成、その中で神経細胞へ分化する方法、2) ヒト ES/iPS 細胞に化学物質・生体物質などを添加し直接神経細胞へと分化する方法、が挙げられる。しかし、これらの方法は未だに分化効率・収率が低く、また長期において分化誘導が必要であるため、さらなる改善が必要である。

ここ数年、ヒト ES 細胞は分化した心筋、神経、肝臓細胞の創薬スクリーニング分野に広く応用されている。連携協力者である中辻憲夫教授は、遺伝子組み換え技術を用いたヒト ES 細胞の神経変性疾患モデルの開発に成功している (Wada et al. 2009)。また、ヒト iPS 細胞も疾患患者から体細胞を採取し、それを用いて作製することができることから、やはり同様に疾患モデルとして使用することが可能である。しかし、これらの細胞を効率よく目的細胞に分化誘導することは長年の課題であり、高効率、且つ再現性のある新規方法の開発が薬剤スクリーニングを行う上で必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) から神経変性疾患モデルを用いて、神経変性疾患の新規薬剤スクリーニングシステムの開発を行うため、これまでの細胞・分子生物学的アプローチだけではなく、物理学・化学・工学などの様々な角度からの視点

が重要である。本研究期間内、申請者らはこれまでにナノ・マイクロテクノロジーを駆使したヒト多能性幹細胞の実験系を用いて、以下の目的に着目した。

目的 1: 神経細胞の形成に着目して、微加工技術を用いた基板をパターン化によって、神経細胞ネットワークの形成試験を行う。

目的 2: マルチチャンネルマイクロ電極及びマイクロ流体システムを導入し、リアルタイムで神経細胞応答評価法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

申請者らのグループでは、これまでにナノテクノロジーを基にした新規細胞足場基材の開発を行ってきた。ナノファイバーを代表とするナノテクノロジーとは、細胞の大きさにより小さいスケールを扱える技術であり、従来の平らな培養皿上の細胞に比べ、ナノ構造体上の細胞は基材への接着力が向上され、それに伴い細胞内シングルの活性化・細胞の増殖や分化などが促進される。

さらに、ナノファイバーの技術と微加工技術と融合により、申請者が特化したオリジナルナノ・マイクロパターンを開発した。これにより、多能性幹細胞分化効率が向上する可能性がある。

一方、マルチチャンネルマイクロ電極システムは多能幹細胞の電気生理学的な研究用ツールとして、一般的に使われている

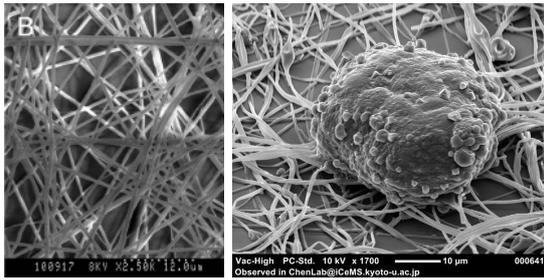
(Hecheler et al. 2001, Illes, et al., 2007)。マルチチャンネルマイクロ電極システムを利用すると、細胞外電位を記録し、細胞内活動電位のパラメータを抽出することができる。このシステムを用いて、パターン化した電極ディッシュ上に心筋細胞の電位波を観察することに成功した (投稿中)。本研究では、マルチチャンネルマイクロ電極ディッシュ上にパターン化されたナノファイバーを取り組むことで、ヒト ES/iPS 由来の神経細胞の作製の効率化が高くなり、さらに神経興奮電位波形の変化により、リアルタイムに薬剤の効果を評価する。

## 4. 研究成果

研究期間中に、申請者らは生体適合性ナノファイバーを用いた幹細胞の未分化状態を制御する新規手法の開発に成功した (Fig. 1, 2nd NanoToday International Conference 2011, 8th iCeMS international symposium

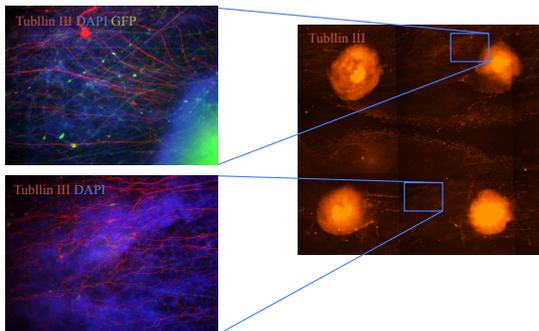
2010,10th ISSCR 2012, Biotech. Lett. 2012)。

Fig. 1 ナノファイバー上で培養されたマウス ES 細胞



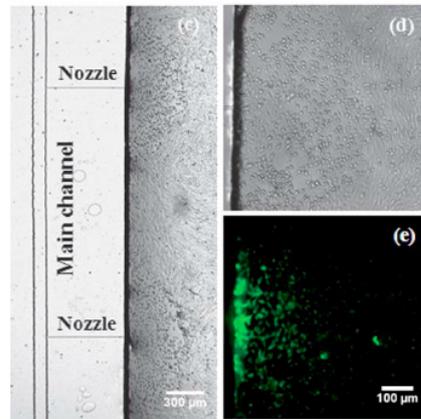
さらに、申請者らは MEMS 加工技術を利用して、ナノファイバーをパターン化させる新規方法を開発した。このパターン化されたナノファイバー上で、マウス ES 細胞由来の神経細胞を培養し、パターン制御による細胞のネットワーク形成に成功し、神経軸索と樹状突起の生長およびシナプス接合の生成を促したことが明らかとなった(Fig. 2, MNE 2012)。ここまで、細胞増殖を促進しうる空間パターンと生化学材料を導入した基材を用い、ヒト多能性細胞から神経細胞分化誘導に最適なナノファイバー材料を見出した。現在、パターン化されたナノファイバー上で、ヒト ES/iPS 細胞由来の神経細胞ネットワーク形成に取り組んでいる。

Fig. 2 パターン化されたマウス ES 細胞から神経細胞ネットワーク形成



また、申請者らは新規オープン式マイクロ流路デバイスシステムの開発に成功した (Fig. 3, Lab on chip 2011)。このデバイスを用いて、これまで不可能だった薬剤を厳密に放出することができる。現在、このデバイスをマルチチャンネルマイクロ電極システムに融合して、基板パターン化によって形成された神経細胞ネットワークに定量・定位に薬剤を投入し、神経細胞の特異的な興奮電位波形の変化反応を行っている。

Fig.3 薬剤を細胞に定位・定量に放出するオープン式マイクロ流路デバイスシステム



## 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 18 件)

- ① S. S. Li, J. Shi, L. Liu, J.J. L. Li. M. Jiang, C. X. Luo, K. Kamei, Y. Chen, “Fabrication of gelatin nanopatterns for cell culture studies” *Microelectron. Eng.* (2013) *in press* 10.1016/j.mee.2013.01.05 (査読有)
- ② Li Liu, Qinghua Yuan, Jian Shi, Xin Li, Dong Jung, Li Wang, Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen, “Chemically defined scaffolds created with electrospun synthetic nanofibers to maintain mouse embryonic stem cell culture under feeder-free conditions” *Biotechnol. Lett.* 34 (10), 1951-1957 (2012) doi: 10.1007/s10529-012-0973-9 (査読有)
- ③ Li Wang, Jiayi Liu, Xin Li, Jian Shi, Jie Hu, Ran Cui, Zhi-Ling Zhang, Dai-Wen Pang, and Yong Chen “Growth propagation of yeast in linear arrays of microfluidic chambers over many generations” *Biomicrofluidics*, 5(4), 044118-044127 (2011) doi: 10.1063/1.3668243 (査読有)
- ④ X. Li, F. Zhang, J. Shi, L. Wang, J.H. Tian, X.T. Zhou, L.M. Jiang, L. Liu, Z.J. Zhao, P.G. He and Y. Chen, “Microfluidic devices with disposable enzyme electrode for electrochemical monitoring of glucose concentrations” *Electrophoresis* 32(22),

- 3201–3206 (2011) doi:  
10.1002/elps.201100355 (査読有)
- ⑤ Li Wang, Zhi-Ling Zhang, Joanna Wdzieczak-Bakala, Dai-Wen Pang, Jianmiao Liu and Yong Chen, “Patterning cells and shear flow conditions: Convenient observation of endothelial cell remoulding, enhanced production of angiogenesis factors and drug response” *Lab Chip* 11 4235-4240 (2011) doi: 10.1039/c1lc20722a (査読有)
- ⑥ Jing-Hua Tian, Jie Hu, Si-Si Li, Fan Zhang, Jun Liu, Jian Shi, Xin Li, Zhong-Qun Tian and Yong Chen, “Improved seedless hydrothermal synthesis of dense and ultralong ZnO nanowires” *Nanotechnology* 22(24) 245601 (2011) doi: 10.1088/0957-4484/22/24/245601 (査読有)
- ⑦ Y. Orlova, N. Magome, Li Liu, Y. Chen, K. Agladze, “PMGI nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue” *Biomaterials* 32, 5615-5624 (2011) doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.042 (査読有)
- ⑧ Xin Li, Li Liu, Li Wang, Ken-ichiro Kamei, Qinghua Yuan, Fan Zhang, Jian Shi, Akihiro Kusumi, Min Xie, Zhenjie Zhao and Yong Chen, “Integrated and diffusion-based micro-injectors for open access cell assays” *Lab Chip* 11, 2612-2617 (2011) doi: 10.1039/C1LC20258H (査読有)
- ⑨ Li Wang, Jian Shi, Li Liu, Emilie Secret, Yong Chen, “Fabrication of polymer fiber scaffolds by centrifugal spinning for cell culture studies” *Microelectron. Eng.* 88, 1718-1721 (2011) doi:10.1016/j.mee.2010.12.054 (査読有)
- ⑩ Jian Shi\*, Li Liu\*, Yong Chen “Investigation of cell culture in microfluidic devices with different bi-layer substrate” *Microelectron. Eng.* 88, 1693-1697 (2011) (\*contributed equally) doi:10.1016/j.mee.2011.01.047 (査読有)
- ⑪ Differentiating stem cells on patterned substrates for neural network formation Chunxiong Luo\*, Li Liu\*, Xiaofang Ni, Li Wang, Shi-ichiro Nomura, Quyuan Qi, Yong Chen *Microelectron. Eng.* 88, 1707-1710 (2011) (contributed equally) doi:10.1016/j.mee.2010.12.062 (査読有)
- ⑫ Fan Zhang, Jinghua Tian, Li Wang, Pingang He, Yong Chen “Correlation between cell growth rate and glucose consumption determined by electrochemical monitoring” *Sens. & Act B* 156, 416-422 (2011) doi: 10.1016/j.snb.2011.04.067 (査読有)
- ⑬ Li Liu, Jun Shi, QH Yuan, Li Wang and Y. Chen “Growth and attachment of embryonic stem cell colonies on single nanofibers” *Micro and Nanosystems* 2, 269-273, (2010) doi: 10.2174/1876402911002040269 (査読有)
- ⑭ Zhou XT, Zhang F, Hu J, Li X, Ma XM, Chen Y “Cell imprinting and AFM imaging of cells cultured on nanoline patterns” *Microelectronic Engineering* 87, 1439-1443 (2010) doi:10.1016/j.mee.2009.11.128 (査読有)
- ⑮ Hu Jie, Shi Jian, Zhang F, Lei L, Li Xin, Wang Li, Liu Li, Chen Yong “High resolution and hybrid patterning for single cell attachment” *Microelectronic Engineering* 87, 726-729 (2010) doi: 10.1016/j.mee.2009.12.022 (査読有)
- ⑯ Lounaci Malika, Chen Yong, Rigolet Pascal “Channel height dependent protein nucleation and crystal growth in microfluidic devices” *Microelectronic Engineering* 87, 750-752 (2010) doi: 10.1016/j.mee.2009.11.154 (査読有)
- ⑰ Liu Jun, Shi Jian, Secret Emilie, Wang Li, Zhang Haoli, Chen Yong “Parametric optimization of micro-contact printing based thermal transfer of electrospun nanofibers” *Microelectronic Engineering* 87, 2513-2517 (2010) doi: 10.1016/j.mee.2010.06.001 (査読有)
- ⑱ Zhou Xiongtu, Shi Jian, Zhang Fan, Hu Jie, Li Xin, Wang Li, Ma Xueming, Chen Yong “Reversed cell imprinting, AFM imaging and adhesion analyses of cells on patterned surfaces” *Lab on Chip* 10, 1182-1188 (2010) doi: 10.1039/b926325j (査読有)

〔学会発表〕 (計 25 件)

1. Joint SCA and iCeMS Symposium, 2013. 2. 12-13 Merbourne (Australia) “Gelatin

- nanofibrous scaffold to maintain human ES/iPS cells for long-term period” Ken-ichiro Kamei
2. The 1st Bristol-Kyoto Symposium 2013, 2013. 1. 10. Bristol (UK) “Gelatin nanofibrous scaffold enables maintaining human ES/iPS cells for long-term period” Ken-ichiro Kamei
  3. Mini-symposium of WPI-iCeMS and Edinburg University, 2013. 1. 8 Edinburg (UK) “Nanofiber scaffolds to maintain human pluripotent stem cells under feeder-free conditions” Ken-ichiro Kamei
  4. 6th Nanobiotechnology Symposium, 2012. 11. 7 Kyoto (Japan) “Gelatin nanofibrous scaffold enables expanding human pluripotent stem cells for long-term period” Ken-ichiro Kamei
  5. IEEE Nanotechnology Material and Devices Conference, (IEEE-NMDC) 2012. 10. 16 Hawaii (USA) “Artificial regulatory microenvironments (niche) for controlling cell function” Ken-ichiro Kamei
  6. MicRO Alliance Meeting 2012, 2012. 6. 29 Freiburg (Germany) “Phenotypic and transcriptional modulation of human pluripotent stem cells induced by nano/microfabrication materials” Ken-ichiro Kamei
  7. Inauguration du DIM Analytic IdF, 2012. 6. 4 Saclay (France) “Impedance monitoring of cell behaviors: Application of microfluidic platforms” Yong Chen
  8. CLS-iCeMS Joint Symposium: Crossing Boundaries: Stem Cells, Materials, Mesoscopic Sciences, and Beyond, 2012. 4. 20-22 Beijing (China) “Development strategy of artificial cellular microenvironments” Yong Chen
  9. Workshop on Microsystems and Bioanalysis Platforms for Health Care, 2012.6.8 Paris (France) “Biomimetic approach of next generation cell culture and tissue engineering platforms” Yong Chen
  10. 2nd NanoToday, Hawaii, 2011. 12. 11~15 “Electrospun nanofibers for creating artificial cellular microenvironments for culturing mouse embryonic stem cells” Li Liu, Qinghua Yuan, Jian Shi, Li Wang, Xin Li, Dong Jung, Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen
  11. Termis NA Conference, 2011.12.11 Houston (USA) “Isoquercitrin-Induced Changes in Neuron Morphology: Possible Applications in Neural Networks” Gemma Palazzolo, Jian Shi, Yong Chen, Janos Vörös and Marcy Zenobi-Wong
  12. 8th iCeMS Interventional Symposium, Meso-Control of Functional Architectures, Kyoto (Japan), 2010.11.9~11 “Long-term feeder-free culture of mouse embryonic stem cells on electrospun nanofibers” Li Liu, Q. Yuan, K Kamei, Jian Shi, Xin Li, Li Wang, Dong Jung, Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji and Yong Chen
  13. International Conference On Nanoimprint and Nanoprint Technologies (招待講演), 2011.10.19 Juju (Korea) “Biomimetic engineering of in vitro cellular microenvironments” Yong Chen
  14. The 3rd Chinese-French symposium on microfluidics, 2011.10.30 Dalian (China) “Integrated and diffusion-based micro-injectors for open access cell assays” Xin Li, Li Liu, Li Wang, Ken-ichiro Kamei, Fan Zhang, Jian Shi, Akihiro Kusumi, Min Xie, Zhenjie Zhao and Yong Chen
  15. The 3rd Chinese-French symposium on microfluidics, 2011.10.30 Dalian (China) “Microfluidic devices with disposable enzyme electrode for electrochemical monitoring of glucose concentrations” Fan Zhang, Xin Li, Jian Shi, Li Wang, Jing-Hua Tian, Xiong-Tu Zhou, Lian-Mei Jiang, Li Liu, Zhen-Jie Zhao, Pin-Gang He, Yong Chen
  16. The 3rd Chinese-French symposium on microfluidics (招待講演), 2011.10.30 Dalian (China) “Artificial cellular microenvironment: Tools for next generation life sciences” Yong Chen
  17. Heidelberg-Kyoto Joint Symposium Crossing Boundaries, Stem Cells, Materials, and Mesoscopic Sciences, 2011. 7. 21 Heidelberg (Germany) “Nano-engineered substrates in conjunction with microfluidic devices for controlling cell behaviors” Y.

- Chen, L. Liu, K. Kamei, Q.H. Yuan, J. Shi
18. The 4th Biotherapy and Regenerative Medicine International Symposium (招待講演), 2011. 6. 18 Wuhan (China) “Micro and nanotechnologies for regenerative medicine” Yong Chen
  19. 9th iCeMS International Symposium (招待講演), 2010. 12. 3 Kyoto (Japan) “Cardiomyocytes on Patterned Surfaces: Formation of Cellular Microclusters and Guided Electric Conduction” Yong Chen
  20. 2nd International Conference of the Chinese Society of Micro-Nano Technology (招待講演), 2010. 10. 28 Xi'an (China) “Exploring nanopatterns and microflows for cell microenvironmental regulation and monitoring” Yong Chen
  21. 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology (招待講演), 2010. 10. 8 Munich (Germany) “Regulation and monitoring of cell adhesion, proliferation and differentiation activities on patterned surfaces and in microfluidic devices” Yong Chen
  22. 1st DNTAC Symp. Nano Technol (招待講演), 2010. 7. 14 Seoul (Korea) “Nanopatterns and microfluidics for integrated cell-material sciences” Yong Chen
  23. Symposium on Physics at WUH, strength and opportunities (招待講演), 2010. 6. 18 Wuhan (China) “On chip biology: Applications and perspectives of contributions coming from Physics” Yong Chen
  24. ISCAS 2010, Satellite Workshop “Nano-Electronics and Nano-Biotechnologies” (招待講演), 2010. 5. 29 Paris (France) “Lab on chips for nanomedicine and analyses” Yong Chen
  25. 2nd KESTCAP Top Down Forum (招待講演), 2010. 4. 29 Saarbrücken (Germany) “Nanopatterns and microfluidics for cellular microenvironment control” Yong Chen

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：多能性幹細胞の培養方法及びそのための基材

発明者：陳 勇(Chen, Yong), 亀井 謙一郎 (Kamei, Kenichiro), 劉 莉(Liu, Li)

権利者：京都大学

種類：特許願

番号：2012-127580

出願年月日：平成24年6月4日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：多能性幹細胞の培養方法及びそのための基材

発明者：陳 勇(Chen, Yong), 亀井 謙一郎 (Kamei, Kenichiro), 劉 莉(Liu, Li)

権利者：京都大学

種類：特許願

番号：2012-127580

取得年月日：平成24年6月4日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chen.icems.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

陳 勇 (Chen, Yong)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：70512458

(2)研究分担者

劉 莉 (Liu Li)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定助教

研究者番号：50380093

亀井 謙一郎

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定助教

研究者番号：00588262