

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 5 月 15 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22791919
 研究課題名（和文） 歯牙再生のための CNT コート電極を用いた iPS 細胞制御可能な基盤培養技術の開発
 研究課題名（英文） Development of control technique of iPS cell behavior using CNT-coated electrode for regeneration of tooth
 研究代表者
 赤坂 司（AKASAKA TSUKASA）
 北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：00360917

研究成果の概要（和文）：

iPS 細胞の機能制御のため、カーボンナノチューブ (CNT) 電極を持ったチャンバーを作製した。CNT コートは種類やコート量を制御することにより iPS 細胞の未分化培養ができる可能性が示された。インクジェットプリンターで CNT インクを使い繰り返しパターンを印刷することにより、十分な導電性を持った CNT 電極パターンを作製できた。得られた CNT 電極により誘電泳動を利用して iPS 細胞の配列が可能となった。

研究成果の概要（英文）：

For control of functions of iPS cells, chamber with carbon nanotubes (CNTs) electrode was prepared. CNT electrode could maintain undifferentiated state of mouse iPS cells by adjustment of coating and type of CNTs. Patterns of CNT electrode could be printed repeatedly with ink jet printer using CNT inks. The patterns of CNT electrode enabled an arrangement of mouse iPS cells by technique of dielectrophoresis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：カーボンナノチューブ、細胞培養、電気刺激、iPS 細胞、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究経緯として、海外研究動向およびカーボンナノチューブ (CNT) の生体親和性 CNT は日本にて発見された材料であるにも関わらず、近年、バイオ分野での応用研究は海外を中心として展開されつつあり、日本での早急なバイオ分野の研究開発・製品化が必要である。一方で、再生医療分野では、重大問題としてコスト問題が挙げられ、増殖効率の

高い培養器材や新しい機構を持つ培養器材の開発が求められている。申請者の研究グループでは、[CNT の生体親和性（毒性）について]マイクロ・ナノ微粒子の毒性に関する研究 (Sato et al, Molecular Biosystems, 2005)、(A.Yokoyama, et al., Nano Lett, 2005.) (厚労科 研萌芽的先端医療 H14-16、化学物質リスク H18-20) により、CNT に関して世界に先駆け急性毒性が低い材料である

ことを見出し、むしろ生体親和性がよいことを発見している。

(2)カーボンナノチューブ (CNT) 透明導電性薄膜上での細胞培養からの着想：申請者が開発したカーボンナノチューブ(CNT)コートディッシュは、高い生体親和性と高い透明導電性特性を併せ持ち、(1)高い細胞回収率、(2)付着免疫細胞や骨芽細胞など特殊な培養特性、(3)iPS細胞のフィーダーレスな未分化培養が可能であるなど興味深い培養特性を示す (Akasaka, MSE (C) 2009)。さらに、CNTコートディッシュは導電性が高いため、細胞に対する電気泳動、電気刺激、誘電泳動、細胞センサー、遺伝子導入などの電気的操作が可能で、いくつかに対しては基礎データもすでに取得しているところまで来ている (H20 JST 顕在化ステージ)。CNTの持つ血清成分の選択的吸着、ナノレベルの凹凸、マイルドな微刺激、強い吸着性、炭素によるナノ電気伝導性構造が、これらの特徴的な機能を引き出しているメカニズムと考えられる。CNTが発現するこれらの機能 (生体親和性と電気伝導性) は、他の生体材料や金属では見られない優位な特性であり、CNTを細胞と機器のインターフェイスに用いる電気的バイオ用途に最適な性質である。

(3)電気伝導性を持つシリコンチャンバーからの着想：申請者は、新たな組織再建材料として柔軟性および生体適合性が高いシリコンに、カーボンナノチューブを固定することにより細胞接着性および電気伝導性が向上することを見出している。この成果を基にすれば様々な培養容器への応用が可能となり、電気刺激および伸展刺激が同時に可能なシリコンチャンバーの作製が可能と考えられる。(Matsuoka, Akasaka, BMME, 2009)

2. 研究の目的

将来的目標は、iPS細胞からの歯牙再生を行うことにある。そのための初期課題としては、iPS細胞の未分化培養技術・細胞回収技術・分化制御技術などの基盤培養技術の発展が欠かせない。本研究では、申請者が発見したカーボンナノチューブ (CNT) の持つ生体親和性・電気伝導性・iPS未分化培養能を利用し、①CNTコート電極チャンバー作製、②iPS細胞の未分化培養法検討、③iPS細胞の電気的な細胞回収・分化制御・機能センサー検討により、1つの容器内でiPS細胞の様々な制御が可能なCNTコート細胞培養基材の開発を目指す。この課題が達成できれば、誰でも簡単にiPS細胞の機能制御が可能になるとともに、続く、歯牙幹細胞などへの分化・歯牙再生へ近づくと考えられ、学術的価値も高い。

3. 研究の方法

(1)シリコンモールドによるCNT電極の作製：

CNCフライス盤にて削り出し、アルリル板にパターンを形成した。得られたアクリル板にPDMSを流し込み加熱重合することによりパターン化したシリコンモールドを作製した。次に、得られたシリコンモールドをスライドガラス上へ貼り付けた。形成されたパターンへCNT分散液を滴下し、乾燥させることによりCNT電極パターンを得た。別に作製したシリコンチャンバーを装着し、CNT電極チャンバーとした。

(2-1) CNT薄膜上での細胞毒性試験：

ポリスチレンディッシュ上にCNT薄膜を作製し、UV滅菌を行った。略語は以下の通りである。NormalPS(無修飾ポリスチレン)、SWCNT0.5(SWCNTコート $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、MWCNT0.5(MWCNTコート $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、MWCNT5(MWCNTコート $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、Culture PS(細胞培養用ポリスチレン)。RAW264.7細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)に10%FBSと1%抗菌剤を添加し37°Cにて5%CO₂環境下で培養した。RAW264.7細胞を5000個/cm²となるように播種し、3日間培養した。TNF- α の産生量の測定はELISAにより行い、TetraColor Oneによる細胞量測定の値から補正した。

(2-2) CNT膜によるiPS細胞の未分化培養：ポリスチレンディッシュ上にCNT薄膜を作製し、UV滅菌を行った。マウスiPS細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17, 理研)をDMEMに15%FBS, 0.1mM NEAA, 0.1mM 2-Mercaptoethanol, 1000 U/ml mouse LIFを添加した培地にて5%CO₂条件下、37°Cにて細胞培養を行った。iPS細胞は購入した状態から1継代の細胞を使用し、培地交換は毎日行った。5日間培養後、常法によるギムザ染色を行い、iPS細胞のコロニー形態を観察した。

(3)パターンニングしたCNT電極による細胞集積：

CNT電極を持ったシリコンチャンバーに、線材を用いて交流刺激装置(ファンクションジェネレーター)に接続した。別に、マウスiPS細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17, 理研)をDMEMに15%FBS, 0.1mM NEAA, 0.1mM 2-Mercaptoethanol, 1000 U/ml mouse LIFを添加した培地にて5%CO₂条件下、37°Cにて細胞培養を行った。その後、ピペッティングにより回収し、誘電泳動バッファーに分散させた。この溶液を、シリコンチャンバーに加え、周波数を3~10MHzとして、光学顕微鏡下、細胞の集積状態を観察した。

(4)より複雑なCNT電極の作製

(4-1)スクリーン印刷：

OHP フィルムにプリンターで電極パターンを印刷した。その後、シルクスクリーンに OHP フィルムを接触させ、感光・水洗することにより、シルクスクリーン電極パターンを作製した。そこに、CNT ペーストを載せ、刷毛で伸ばすことにより印刷を行った。

(4-2)金属マスクによる印刷：

200 μ ドットパターンを持った市販のエッチングメッシュ(金属マスク)を紙の上に載せた。そして、情報からCNT分散液を少しずつスプレーし、乾燥させることにより、CNT パターンを印刷した。

(4-3)インクジェット印刷：

市販インクジェットのインクタンクの中身を洗浄し、代わりにCNT分散液に入れ替えた。インクジェットプリンターの設定を、濃く印刷する設定として、紙に印刷した。印刷された紙を再びプリンターにセットし、印刷を繰り返した。20回程度、印刷を繰り返すことにより、CNT電極パターンを得た。

4. 研究成果

(1)シリコンモールドによるCNT電極の作製：

はじめにシリコンゴムを用いてマスクを作製し、CNT分散液を塗布し乾燥させる方法にてパターンニングを検討した。その結果(図1)、CNTコートによるパターン化においては、電極間距離が200 μ m~1mm楕円電極の透明導電性薄膜作製を達成できた。その際には、一回のCNT分散液の乾燥工程で、比較的、濃い電極パターン形状が得られ十分な電気伝導度が得られることが分かった。また、一方で、シリコンゴムの柔軟性が問題となる場面もあり、薄い壁構造による倒壊やスライドガラス板からの剥離などの問題もあった。このことは作製できる形状に制限があることを示している。さらに、CNT電極印刷済みガラス基板とシリコンチャンバー壁の強固な固着のため、プラズマ処理を検討した。その結果、容易に固着できることが判明した。

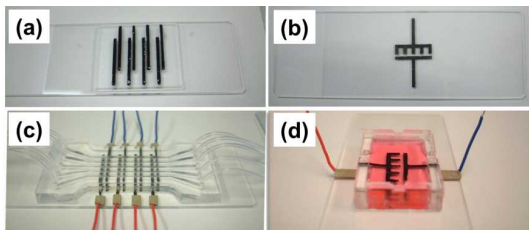


図1 シリコンモールドによるCNT電極のプ

リント

(a)平行型CNT電極パターン、(b)くし型CNT電極パターン、(c)平行型電極チャンバー、(d)くし型CNT電極チャンバー

以上の結果より、CNT電極の形状には制限があるもののセンサーや刺激装置など目的に応じた装置(チャンバー)作製が可能となった。

(2-1)CNT薄膜上での細胞毒性試験：

CNT電極の毒性試験を行うため、免疫系の細胞であるマクロファージRAW264.7を用いて評価した。その結果(図2-1)、CNT電極上でのTNF- α の産生量は、比較物質であるNormal PSやCulture PSと同程度の低い産生量であった。また、SWCNTおよびMWCNTは同程度の低さであることが分かった。一方、刺激することが知られているLPSとの比較では、1/40倍程度の低い値であった。このことより、CNT電極は、急性毒性は示さないものと考えられる。

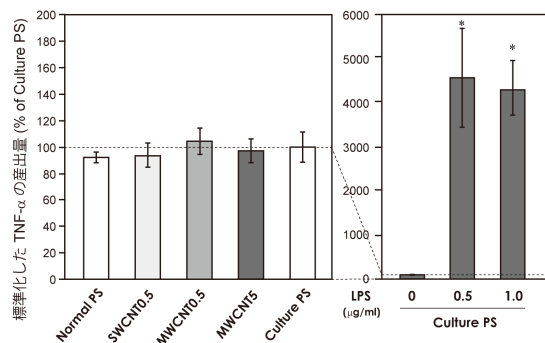


図2-1 CNT薄膜上での細胞毒性試験

(2-2)CNT膜によるiPS細胞の未分化培養：

パターン化したCNT電極上にてiPS細胞の細胞培養を行ったところ、現在のところ、未分化度については未検討であるが良好な細胞増殖が観察された。とくに、SWCNT電極よりもMWCNT電極の方が、iPS細胞の付着量が多かった。また、コート量が多いほど、iPS細胞の付着量が多かった。マウスiPS細胞の未分化培養においては、細胞培養用ディッシュよりも、CNTコートディッシュの方がコロニーは丸く成長することが分かった(図2-2)。このことは、iPS細胞培養の初期における未分化状態をCNTコート量により調節することが可能であることを意味しており、その後の分化誘導段階を効率よく実行できる可能性を内包している。

以上より、CNTの種類を選択およびコート量を調節することにより、未分化培養に有利な条件を見出すことに成功した。

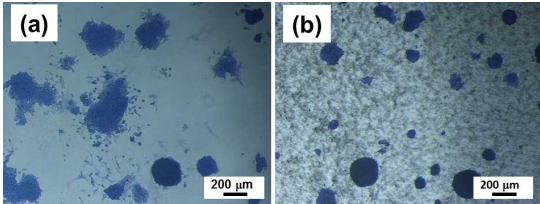


図2-2 CNT薄膜上でのiPS細胞の未分化培養 (a)細胞培養用ディッシュ上、(b)CNTディッシュ上

(3) パターニングしたCNT電極による細胞集積 :

次に、交流電場による誘電泳動による細胞回収・細胞集積を検討した。マウス由来のiPS細胞において、最適な電極間距離および交流電場条件を検討したところ、CNT電極間距離が100 μmから1mm幅において電極間へのパールチェーン構造を持った細胞集積が観察された(図3)。また、CNTコート量が少ない透明電極状態においても細胞の良好な細胞集積が達成された。これにより100 μm電極間隔ではあるが、ある程度の細胞パターンが可能となった。

このことは、CNT電極のパターンを変えることにより、iPS細胞の集積・配列・選別等の細胞操作(マニピュレーション)が可能であることを示している。

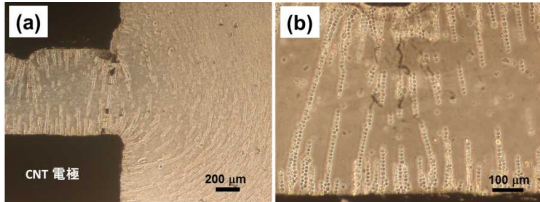


Fig. 3 CNT電極による細胞の誘電泳動の光学顕微鏡写真

(a)弱拡大、(b)強拡大

(4) より複雑なCNT電極の作製

(4-1) スクリーン印刷

粘性のあるインクを印刷できるスクリーン印刷でのパターニングを検討した。スクリーン印刷のパターン形状は、メッシュ構造の上にパターンを形成するため比較的自由度が高い。CNTインクの粘性を調整することによりCNT電極の印刷は可能であった(図4-1)。また、mmスケールのパターンや濃いCNT電極の作製に向いていた。しかしながら、スクリーンメッシュに依存するため、微細なパターンを得るのが困難であることが分かった。

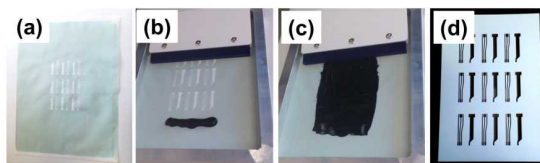


Fig. 4-1 スクリーン印刷によるCNT電極の印刷 (a)スクリーン、(b)CNTインク塗布、(c)スクリーン印刷、(d)CNT電極

(4-2) 金属マスクによる印刷

微細形状を持ったフォトマスクを用いてCNT分散液の塗布によるパターン形成によっても同様にCNT電極パターンが作製できることが分かった(図4-2)。200 μmのドットは、きれいに印刷でき、電気伝導性を持たせるためには十分な濃度であった。フォトマスクの形状は比較的自由度が高いが、パターンの中空構造は不可能と考えられる。また、フォトマスクの汚れの問題もあり、繰り返し多くのCNTパターンを印刷するのは効率が悪いことが推測された。

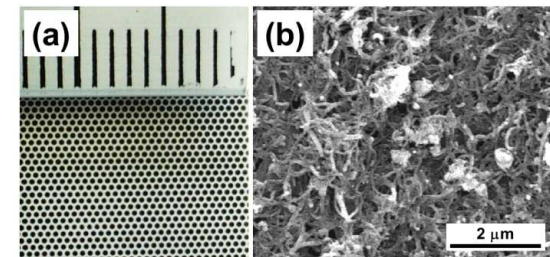


Fig. 4-2 金属マスクによるCNT電極の印刷 (a)印刷後のCNTドット、(b)CNTドットのSEM像

(4-3) インクジェット印刷

次に、複雑な構造を持つCNT電極とチャンバー作製を検討した。汎用のインクジェット小型プリンターのインクタンクを改良し、単層カーボンナノチューブ(SWCNT)および多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の分散液を加え、印刷によるパターニングを検討した。その結果、自由度の高いパターン形状が得られたが、一回の印刷では薄く、好ましい電気伝導度は得られなかった。しかしながら、繰り返し印刷することにより、十分な電気伝導度が得られることが分かった。これにより、自分で設計したCNTパターンが、安価な機器により印刷により自由度の高いパターニングができるようになった。

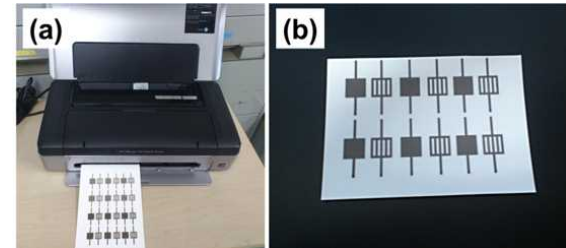


Fig. 4-3 インクジェットプリンターによるCNT電極の印刷

以上より、これらの成果により、CNTをパターン化した培養容器内でのiPS細胞の機能制御も容易になると考えられる。

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2件)

① Tsukasa Akasaka, Murine Macrophage RAW264.7 Cells Response for the Carbon Nanotubes Immobilized on Substrate, Key Engineering Materials, 査読有, 529-530, (2013), 379-384.

② Tsukasa Akasaka, Atsuro Yokoyama, Makoto Matsuoka, et al., Maintenance of hemispherical colonies and undifferentiated state of mouse induced pluripotent stem cells on carbon nanotube-coated dishes, Carbon, 査読有, 49, (2011), 2287-2299.

[学会発表] (計20件)

① 赤坂 司、カーボンナノチューブ薄膜上での細胞培養、第7回ナノバイオメディカル学会、2013年01月24日、京都テルサ(京都府)

② Tsukasa Akasaka、Murine macrophage RAW264.7 cells response for the carbon nanotubes immobilized on substrate、Bioceramics24、2012年10月22日~2012年10月24日、九州大学(福岡市)

③ 赤坂 司、カーボンナノチューブ薄膜上での細胞培養、第6回ナノバイオメディカル学会、2012年07月09日~2012年07月10日、筑波産業総合研究所(茨城県)

④ Tsukasa Akasaka、Cell culture on carbon nanotubes thin films、9th World Biomaterials Congress、2012年06月01日~2012年06月05日、International Conference Center (China)

⑤ 赤坂 司、カーボンナノチューブ膜を用いた細胞培養および操作、第59回日本歯科理工学会、2012年04月14日~2012年04月15日、徳島あわぎんホール(徳島県)

⑥ 赤坂 司、阿部薫明、橋本 剛、亙理文夫、カーボンナノチューブ薄膜上での細胞培養、第24回代用臓器・再生医学研究会、2012年1月31日、北海道大学(札幌市)

⑦ 赤坂 司、カーボンナノチューブ薄膜上での細胞培養、第24回日本動物実験代替法学会(招待講演)、2011年11月11日、宮城県建設産業会館(仙台市)

⑧ T. Akasaka, S. Abe, M. Uo, F. Watari, Cell culture on carbon nanotubes thin films, The Symposium on Micro/Nano Aspects of Biomaterials, 2011年7月19日、京都テルサ(京都府)

⑨ T. Akasaka, S. Abe, M. Uo, F. Watari,

Cell proliferation on carbon nanotubes-coated dishes in different cell lines、3rd International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials、2011年7月13日、北海道大学(札幌)

⑩ 赤坂 司、松岡真琴、横山敦郎、橋本 剛、亙理文夫、カーボンナノチューブ薄膜上での細胞培養、ナノ学会第9回学会、2011年6月2日、北海道大学(札幌市)

⑪ T. Akasaka, S. Abe, M. Uo, F. Watari, Cell proliferation on carbon nanotubes coated dishes in different cell lines, The International Dental Materials Congress 2011, 2011年5月27日、Yonsei University (Korea)

⑫ Tsukasa Akasaka, Makoto Matsuoka, Atsuro Yokoyama, et al.、Cell proliferation on carbon nanotubes coated dishes in different cell lines、第40回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、2011年3月9日、名城大学(名古屋)

⑬ 赤坂 司、阿部薫明、宇尾基弘、亙理文夫、カーボンナノチューブ薄膜上での細胞培養、ナノ・バイオメディスン シンポジウム、2011年2月21日、名古屋大学(名古屋市)

⑭ 赤坂 司、カーボンナノチューブ薄膜上における細胞培養、ナノカーボン物質の基礎と応用：現状と展望に関する若手研究会、2010年12月27日、筑波大学(茨城県)

⑮ 赤坂 司、橋本 剛、松岡真琴、横山敦郎、亙理文夫、カーボンナノチューブ薄膜上における細胞培養、第32回日本バイオマテリアル学会、2010年11月30日、グランドプリンスホテル広島(広島県)

⑯ 赤坂 司、阿部薫明、宇尾基弘、亙理文夫、カーボンナノチューブ薄膜上における各種細胞培養挙動、第56回日本歯科理工学会 学術講演会、2010年10月10日、長良川国際会議場(岐阜県)

⑰ 赤坂 司、iPS細胞の未分化培養に有効な北海道産材料を用いた培養基材の探索、ノーステック財団 研究開発助成事業 若手研究者理事長賞表彰式・交流会(招待講演)、2010年10月29日、コラボ北海道(札幌市)

⑱ 赤坂 司、松岡真琴、横山敦郎、亙理文夫、カーボンナノチューブ薄膜上における細胞培養への影響評価、生体医工学シンポジウム2010、2010年9月10日、北海道大学(札幌市)

⑲ Tsukasa Akasaka, Kouta Ishii, 1 Makoto Matsuoka, Takeshi Hashimoto, Toshio Taira, Fumio Watari, Murine macrophage Raw 264.7 cells response for the carbon nanotubes immobilized on substrate, The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sep. 3, 2010、北海道大学(札幌)

幌市)

⑩赤坂 司、カーボンナノチューブのバイオ
応用、北海道バイオ産業クラスター・フォー
ラム 平成22年度 第1回 技術シーズ
公開会 (招待講演)、2010年7月16日、アス
ペンホテル (札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤坂 司 (TSUKASA AKASAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：00360917

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：