

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19710112

研究課題名（和文） 筋管細胞の配列および電気化学的機能評価による筋組織の再構築

研究課題名（英文） Dielectrophoretic patterning with different cell types and its electrochemical estimation

研究代表者

安川 智之 (TOMOYUKI YASUKAWA)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・准教授

研究者番号：40361167

研究成果の概要：誘電泳動を用いて迅速、簡便に細胞をパターンニングできるデバイスを開発した。連続的に異種類の細胞を導入し、交流電圧の印加パターンを変化させることにより、1枚の基板上に違う種類の細胞を交互に配列することができた。マイクロ電極の先端に酸素選択的透過膜およびグルコースオキシダーゼを固定化することにより、細胞評価が可能なマイクログルコースセンサを作製できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：誘電泳動，電気化学顕微鏡，微粒子配列，細胞配列，グルコースセンサ，単一細胞，酵素センサ，酸素選択的透過膜

1. 研究開始当初の背景

筋組織が機能を持った筋組織として働くには、神経組織との連携・相互作用，すなわち、神経筋接合部の再構築が不可欠である。さらに、生体内では事故などで末梢神経が切れてしまい神経支配がなくなると、筋組織は萎縮してしまうことから、筋組織の維持にも神経・筋接合部を介した神経支配が不可欠であることが明らかである。再生医工学の立場から、筋組織には神経支配は必須であり、神経支配なくしては、筋肉は萎縮・退縮してしまう。本研究では、この不可欠な部分の構築法の創製を目指し、誘電泳動による異種細胞の配

列およびその電気化学的機能評価を立案した。

従来の培養皿上での細胞培養では、細胞はランダムに配置されるため、異種類の細胞を規則正しく配列させることは困難であった。複数種類の細胞を目的のパターンに配列することは、従来の単なる共培養による再生医工学の技術では全く不可能であった高度な機能を持った複雑な組織や臓器の構築の可能性を秘めている。

これまでに、マイクロ流路内に配置したくし型アレイ電極を用いて誘電泳動による微粒子の配列技術を開発した。微粒子をライン状、グ

リッド状およびドット状に配列することが可能であった(図 1). また, 配列された微粒子の架橋剤による固定およびハイドロゲル中への包括固定を行いユニークな構造体を構築できる. さらに, 微粒子表面の化学修飾によるタンパク質の局所固定に成功し, 新たなセンシングデバイスの可能性を示した.

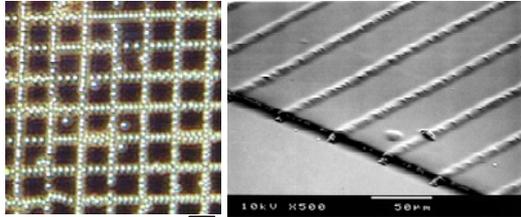


図 1. 微粒子のグリッドパターンおよびハイドロゲル中に包括固定された微粒子ライン

本研究では, この誘電泳動による微粒子配列化技術を細胞に適用し, 細胞の迅速な配列化を行った. 細胞を簡便・大量一括・迅速に操作する技術を異種細胞の配列に展開させ, 適用範囲を拡大することは, 将来の細胞工学, 組織工学および再生医工学の分野において必要不可欠であると考えられる.

また, リアルタイムで生きている培養細胞の機能を経時的に観測することが極めて重要である. これまでに, マイクロ電極をプローブとした電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy; SECM)を用いて, 単一細胞の機能評価を行ってきた. 特に, 細胞近傍の酸素濃度プロファイルを得ることにより, 単一細胞の光合成および呼吸活性の評価を定量的に行った. 現在, 世界的に SECM に細胞素子を組み込んだ薬剤スクリーニングシステムへと展開する気運が高まっている. 本研究では, SECM による単一細胞の代謝活性評価を目指し, マイクログルコースセンサの開発を行う.

2. 研究の目的

本研究の目的は, 「誘電泳動を利用する細胞配列技術の確立」により筋管細胞(myotube)を配列し, SECM システムを用いる機能評価により *in vitro* で筋組織を再構築することにある.

基板上における *in vitro* な細胞培養は, 細胞の成長, 進展および分化がランダムに進行する無秩序な系である. 細胞を基板上に, 複雑, 高度に秩序を保って培養し, 生体内で発現している機能を再現することは, 細胞生物学, 組織工学および再生医工学等の分野において極めて魅力的な課題である. 本研究課題では, *in vitro* における機能を保持した筋組織の構築を目指している. 単核の筋芽細胞を誘電泳動により配列し, 分化・融合を促し多核の筋管細胞アレイを取得する技術を確立する. さらに, デュアル SECM システムを開発し, 配列化筋管細胞の機能評価を行う.

3. 研究の方法

(1) マウス筋芽細胞株 C2C12 のライン配列

交互型マイクロバンドアレイ電極を基板上に対向させ, 流路構造を有する誘電泳動デバイスを作製する. 電極および基板間に設けた微小流路(高さ 30 μm 程度)に細胞懸濁液を導入し, 電極に交流電圧を印加して誘電泳動力を作用させる. 電場勾配により細胞をライン状に配列し培養する. 誘電泳動を用いる細胞ライン配列形成のための, 印加電圧, 印加時間, 周波数, 細胞濃度, 懸濁液導電率および電極幅, ギャップサイズの最適化を行う.

(2) ライン配列されたマウス筋芽細胞株 C2C12 の分化誘導による配列化筋管細胞(myotube)の構築

上記手法により作製された配列化細胞の分化誘導を目指し, 配列細胞のゲル包括固定を行う. 細胞配列アレイを形成させたデバイスに光硬化性ハイドロゲルを導入し, 細胞アレイを包括したゲルラインを作製する.

(3) デュアルマイクロディスク電極による酸素およびグルコースの検出

基板上のマイクロアレイ電極を用いて泳動電着法による選択的な酵素修飾電極の作製を行い, センサの作製手法を確立する. 先端径が数ミクロンのガラスキャピラリー内に 2 極の独立した作用極を配置したデュアルマイクロ電極を用いて局所領域における酸素およびグルコースの同時定量検出を行う. 片方の電極にグルコースオキシダーゼ(GOD)を選択的に固定化する. 金ナノ微粒子にアビジン-ビオチン反応を利用して GOD を修飾し, 泳動電着法を利用する. 作製した電極特性を詳細に評価し, 筋管細胞の活性を計測の準備を整える.

4. 研究成果

(1) マウス筋芽細胞株 C2C12 のライン配列

交互くし型マイクロアレイ電極を用いた誘電泳動デバイスに細胞懸濁液を導入し, 電極に交流電圧を印加することにより細胞の配列を行った. デバイス内の電場強度を, COMSOL MultiphysicsTM 3.1a を用いてシミュレーションした. 図 2a に, バンド b とバンド a, c および d に 12 V を印加した際の電場強度の断面図を示す. バンド b の両エッジ, バンド a の右エッジおよびバンド c の左エッジに示された明るい部分は, 電場の高い所に相当する. 一方, 電場の弱い所は, バンド b の真上とバンド a からバンド b の間に現れた. 図 2B に, 上部基板表面における電場強度プロットを示す. この図から, バンド b の近傍に電場強度の強いピークが現れることがわかった. よって, 負の誘電泳動が作用する交流電圧を印加すると電場強度の弱いバンド b の真上に微粒子が集積化される. 図 2C に, この誘電泳動デバイスを用いた微粒子(15 μm diameter, 3×10^7

mL⁻¹)のパターンを示す。交流電圧(12 Vpp, 5 MHz)をバンド電極に印加すると微粒子は迅速に移動し、バンド b の真上でライン配列した。また、微粒子はバンド a とバンド c の間に幅広く集積化された。この微粒子の挙動は、シミュレーションの結果と一致している。同様の結果は、バンド d とバンド a, b および c 間に交流電圧を印加した際に得られた。よって、電圧を印加する電極パターンにより、微粒子のパターンを簡単に変化させることができることがわかった。

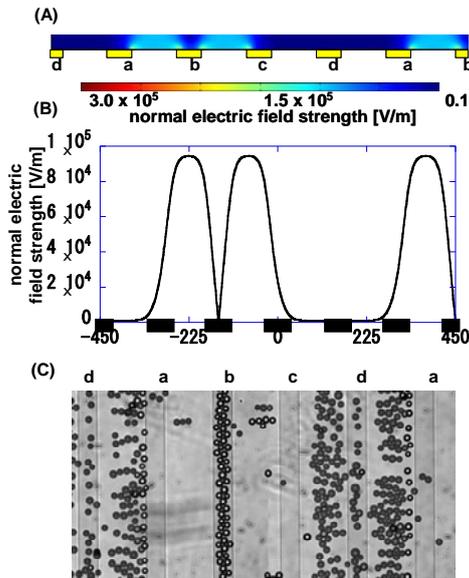


図 2. (A): バンド b とその他の電極間に 12 V の電圧を印加した際の電場強度のシミュレーション。IDA 電極基板-細胞培養基板間距離: 30 μm . (B): 細胞培養基板表面における電場強度プロット. (C)微粒子 (直径 15 μm) の誘電泳動パターンニング.

この誘電泳動デバイスを用いて、C2C12 細胞のパターンニングを行った。図 3 に、誘電泳動により配列された細胞のパターンを示す。バンド b とバンド a, c および d 間に交流電圧 (14 Vpp, 1 MHz) を印加すると 1 分以内に細胞の配列パターンが得られた。電圧を印加した状態で 5 分間細胞をインキュベートした。その後、電圧印加を停止し、培地を導入するとバンド c-バンド a 間の細胞は流され、細胞のライン配列が得られた。

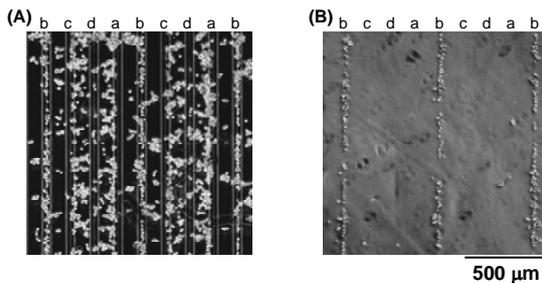


図 3. 負の誘電泳動により配列された細胞の顕微鏡写真. (A)電圧印加時. (B)培地による洗浄後

細胞のライン形成は印加電圧の強度に依存した。8, 10, 12 および 14Vpp の交流電圧を印加した場合、ラインを形成した細胞の密度は、 142.6 ± 18.6 , 184.7 ± 17.8 , 192.7 ± 14.6 および $225.5 \pm 21.5 \text{ cells mm}^{-1}$ であった。その後、デバイスを分離すると、いくつかの細胞ははがれた。8 Vpp の電圧で配列された細胞は、デバイスの分離操作によってほとんど全てが除去された。分離操作後に、残る配列化細胞の数は印加電圧強度の増加に伴って増加した。しかし、14 Vpp を印加した場合、残存する細胞の数は、12 Vpp を印加した場合に比べて減少した。これは、細胞が物理的な力と電場により損傷したと考えられる。よって、この誘電泳動デバイスを用いて細胞パターンを作成する場合には、12 Vpp が適していることがわかった。

基板上に配列された細胞を培養した。配列化した細胞は 1 時間後に扁平型に形を変えた。図 4 に、12 Vpp の電圧を 5 分間印加して作製した細胞パターンを示す。4 時間培養後、細胞の形は変形し、ライン幅はわずかに増加した。12 時間培養すると、細胞密度に変化はないが、細胞は最初のラインからランダムに遊走しパターンが崩壊し始めた。よって、ほとんどすべての細胞は、活性を維持していることがわかった。その後、細胞は増殖と遊走を続け、44 時間後にはラインパターンが消失した。よって、この方法は細胞の遊走と増殖を調査するための手法として使用可能であることがわかった。SECM を用いてこれらの細胞の呼吸活性を調査した。細胞の呼吸により細胞近傍で酸素濃度が低下していることがわかった。現在、誘電泳動時の印加電圧と細胞の呼吸活性の関連を調査している。

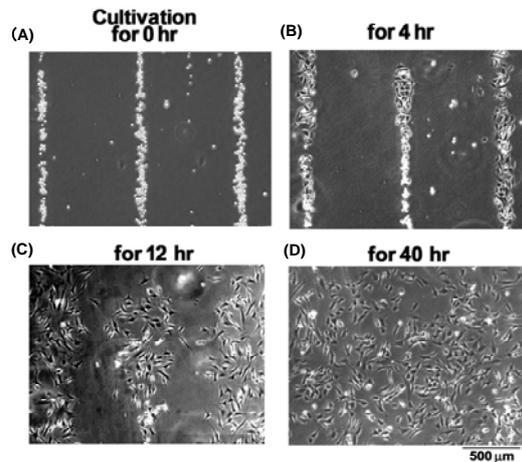


図 4. 誘電泳動 (12 Vpp) によって作製された細胞パターンの経時変化. 細胞培養時間: (A) 0, (B) 4, (C) 12, (D) 40 時間. 温度: 37 $^{\circ}\text{C}$.

この誘電泳動デバイスを用いて異種細胞の繰り返し交互配列を行った。図 5 に、作製された C2C12 細胞の繰り返し交互ライン配列を示す。上記の手法を 2 回繰り返して作製した。最初の細胞パターンは、交流電圧(12 Vpp, 1 MHz)を用いてバンド b の上に細胞を配列した。細胞配列後、5 分間電圧を印加して基板に細胞を接着させた。配列化細胞を蛍光染色 (CMFDA) し、2 回目の細胞配列をバンド d の電極の真上に行った。5 本の細胞ラインパターンが 250 μm 間隔で得られた。第一段階で配列された細胞ラインは蛍光を示していることがわかる。また、第二段階の細胞配列をバンド c の真上に行うと、ライン間隔の異なる異種細胞配列が可能であった。この手法を用いると、細胞の繰り返し交互配列が簡便に迅速に行える。

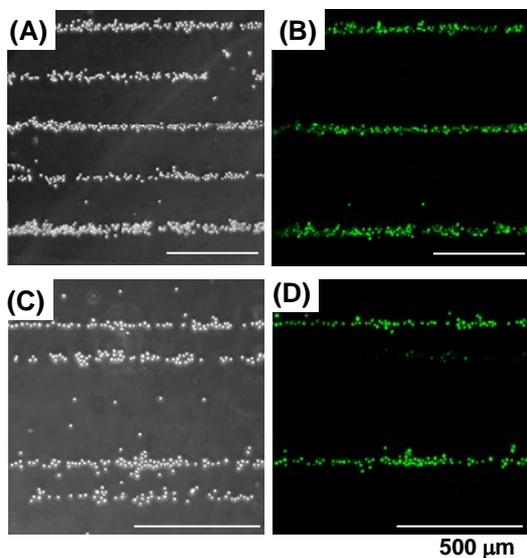


図 5. 連続パターンニングによる異種細胞の配列化。(A)および(B):等間隔で配列された異種細胞の顕微鏡写真。(C)および(D):異なる間隔で配列された異種細胞の顕微鏡写真。

(2)ライン配列されたマウス筋芽細胞株 C2C12 の分化誘導による配列化筋管細胞 (myotube) の構築

電極幅、間隔共に 50 μm 、スペーサー厚 50 μm の誘電泳動デバイスに、ミエローマを懸濁したプレポリマー溶液(2.0 $\times 10^7$ particles/mL)を導入して配列させた。上下電極に、10 kHz, 30 Vpp の交流電圧を印加した。120 s 後、パターン形成した細胞に紫外光(254 nm, 12 w, 60s)を照射した。図 6 に、電極を除去した後の光学顕微鏡写真を示す。2 \times 2 mm、高さ 50 μm のゲルシートの中に 140 μm ピッチの細胞アレイを得ることができた。作製したゲルシートをシャーレに移し、培養液中で 15 分間培養した。しかし、この手法で配列固定化した細胞は、ほとんどが死細胞であり、今後、ポリマー材料の検討を行う必要があった。

(3)デュアルマイクロディスク電極による酸素およびグルコースの検出

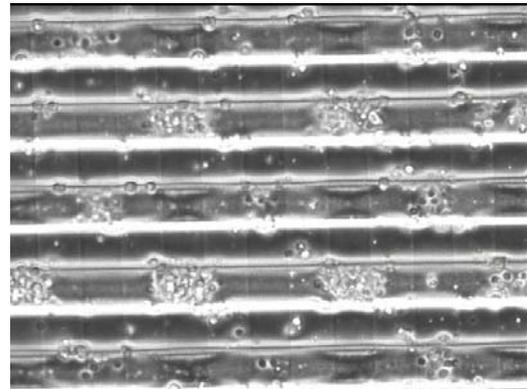


図 6. ゲルシートに包括された細胞

マイクロ白金電極表面を酸素選択的透過膜であるポリジメチルシロキサン膜で被覆した。これにより、GOD の酵素反応生成物である過酸化水素の透過をほとんど抑制できた。また、PDMS の酸素含有量は、溶液中の 10 倍以上であることがわかり、酸素検出型の酵素センサとして極めて有効であることがわかった。PDMS 表面に GOD を固定化し酵素センサを作製した。図 7 に、作製した酵素センサを用いたグルコースセンシングを示す。グルコース濃度の増加に伴い、酸素還元電流の増加が観測された。よって、この電極は酸素の還元電流検出型のマイクロ酵素センサとして利用可能である。また、デュアル電極を用いた局所領域への酵素の固定化も達成できており、今後、これらのマイクロセンサを用いて細胞計測を行う予定である。

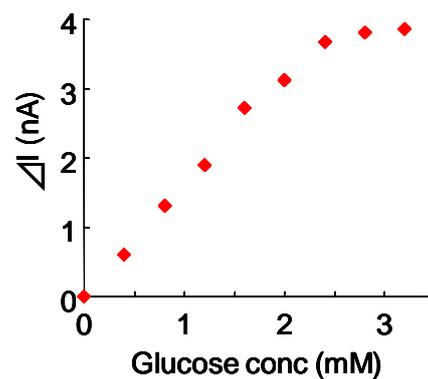


図 7. グルコース濃度に対する酸素還元電流のプロット

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 20 件)

- ① T. Yasukawa, M. Suzuki, T. Sekiya, H. Shiku, T. Matsue, Flow sandwich-type immunoassay in microfluidic devices based on negative dielectrophoresis., *Biosens. Bioelectron.*, 22, 2730-2736 (2007), 査読有
- ② Y. Torisawa, A. Takagi, Y. Nashimoto, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip., *Biomaterials*, 28, 559-566 (2007), 査読有
- ③ K. Nagamine, S. Onodera, A. Kurihara, T. Yasukawa, H. Shiku, R. Asano, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical screening of recombinant protein solubility in *Escherichia coli* using scanning electrochemical microscopy (SECM), *Biotechnology and bioengineering*, 96(5), 1008-1013, (2007), 査読有
- ④ M. Suzuki, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Patterning and Encapsulation with Colloidal Particles into Hydrogel using Negative-Dielectrophoretic Method, *Langmuir*, 23(7), 4088-4094, (2007), 査読有
- ⑤ T. Yasukawa, Y. Hirano, N. Motochi, H. Shiku, T. Matsue, Enzyme Immunosensing of Pepsinogens 1 and 2 by Scanning Electrochemical Microscopy, *Biosens. Bioelectron.*, 22(12), 3099-3104, (2007), 査読有
- ⑥ K. Inoue, P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, A Competitive Immunochromatographic Assay for Testosterone Based on Electrochemical Detection, *Talanta*, 73, 886-892, (2007), 査読有
- ⑦ Nashimoto, Y., Takahashi, Y., Yamakawa, T., Torisawa, Y.-S., Yasukawa, T., Ito-Sasaki, T., Yokoo, M., Abe, H., Shiku, H., Kambara, H., Matsue, T., Measurement of gene expression from single adherent cells and spheroids collected using fast electrical lysis, *Analytical Chemistry*, 79(17), 6823-6830, (2007), 査読有.
- ⑧ Wu, C.-C., Saito, T., Yasukawa, T., Shiku, H., Abe, H., Hoshi, H., Matsue, T., Microfluidic chip integrated with amperometric detector array for in situ estimating oxygen consumption characteristics of single bovine embryos, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 125(2), 680-687, (2007), 査読有
- ⑨ Torisawa, Y.-S., Nashimoto, Y., Yasukawa, T., Shiku, H., Matsue, T., Regulation and characterization of the polarity of cells embedded in a reconstructed basement matrix using a three-dimensional micro-culture system, *Biotechnology and Bioengineering*, 97(3), 615-621, (2007), 査読有
- ⑩ H. Q. Luo, H. Shiku, A. Kumagai, Y. Takahashi, T. Yasukawa, T. Matsue, Microcontact printed diaphorase monolayer on glass characterized by atomic force microscopy and scanning electrochemical microscopy, *Electrochemistry Communications*, 9(11) 2703-2708, (2007), 査読有
- ⑪ H. J. Lee, T. Yasukawa, M. Suzuki, Y. Taki, A. Tanaka, M. Kameyama, H. Shiku, T. Matsue, Rapid Fabrication of Nanoparticles Array on Polycarbonate Membrane Based on Positive Dielectrophoresis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131(2), 424-431, (2008), 査読有
- ⑫ T. Yasukawa, K. Nagamine, Y. Horiguchi, H. Shiku, M. Koide, T. Itayama, F. Shiraiishi, T. Matsue, Electrophoretic cell manipulation and electrochemical gene-function analysis based on a yeast two-hybrid system in a microfluidic device, *Anal. Chem.*, 80(10), 3722-3727, (2008), 査読有
- ⑬ M. Suzuki, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Negative dielectrophoretic patterning with two different cell types, *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1049-1053, (2007), 査読有
- ⑭ K. Y. Inoue, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Cell-Based Electrochemical Assay for Endotoxin Using a Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System, *Electrochemistry*, 76(8), 525-528, (2008), 査読有
- ⑮ F. Mizutani, E. Ohta, Y. Mie, O. Niwa, T. Yasukawa, Enzyme immunoassay of insulin at picomolar levels based on the coulometric determination of hydrogen peroxide, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 135 (1), 304-308 2008, 査読有
- ⑯ H. J. Lee, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Rapid and separation-free sandwich immunosensing based on accumulation of microbeads by negative dielectrophoresis, *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1006-1011, (2008), 査読有

〔学会発表〕 (計 60 件)

- ① 安川智之, 鈴木雅登, 珠玖 仁, 末永智一, 3次元マイクロアレイ電極システムを用いる細胞のドット配列および電気回転, 第15回化学とマイクロナノシステム研究会, 東北大学, 2007年5月26日
- ② 安川智之, 村田達哉, 珠玖 仁, 末永智一,

誘電泳動による細胞配列および電気化学顕微鏡による活性評価, 第16回化学とマイクロナノシステム研究会 つくば 2007年10月30日

- ③ T. Yasukawa, M. Suzuki, H. Shiku, T. Matsue, Micropatterning with different cell types by dielectrophoretic manipulation, *MHS2007 & Micro-Nano COE@ Nagoya University*, 12 November 2007
- ④ T. Yasukawa, M. Suzuki, T. Matsue, F. Mizutani, Patterning with different cell types based on the negative dielectrophoresis, 18th MRS-J Academic Symposium, 日本大学, 2007年12月7-9日
- ⑤ 安川智之, 水谷文雄, マイクログルコースセンサをプローブとした電気化学顕微鏡の開発, 第117回講演大会, 日本大学, 3月12-14日
- ⑥ 安川智之, 誘電泳動を利用した細胞配列と免疫測定, (社)表面技術協会第24回『ナノテク部会』研究会, 東京理科大学, 2008年5月13日
- ⑦ T. Yasukawa, K. Inoue, P. Ferrante, Yu Hirano, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Electrochemical Immunochromatographic Assay of Testosterone using Nitrocellulose Membrane, 12th International Meeting on Chemical Sensors (Columbus), 2008.7.
- ⑧ 安川智之, 誘電泳動を用いる微粒子操作技術の免疫測定への応用, 実環境計測・診断システム協議会 表面・界面研究会講演会－電気化学の新展開と表面・界面－, 産業技術総合研究所九州センター, 2008年7月30日
- ⑨ 安川智之, 吉村友希, 吉本有希, 後藤圭佑, 水谷文雄, 酸素濃度制御型マイクログルコースセンサの開発, 日本分析化学会第57年会, 福岡大学, 9月10-12日
- ⑩ T. Yasukawa, E. Ohta, Y. Mie, O. Niwa, F. Mizutani, Enzyme Immunoassay for Insulin Using Highly-Sensitive Hydrogen Peroxide Sensors Based on Charge Accumulation Systems, 214th ECS Meeting - Honolulu, HI, 10/12/2008 - 10/17/2008
- ⑪ T. Yasukawa, J. Ramón-Azcón, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Negative dielectrophoretic manipulation with microparticles for rapid immunosensing, *MHS2008*, Nagoya University, 8 NOV 2008
- ⑫ T. Yasukawa, J. Ramón-Azcón, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Rapid immunosensing based on microparticle manipulation by negative dielectrophoresis, *IUMRS-ICA 2008*, Nagoya, 10 DEC 2008

[図書] (計4件)

- ① 高橋康史, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一,

バイオ電気化学の実際－バイオセンサ・バイオ電池の実用展開－ 実用編－バイオセンサ, 第13章 生体物質の局所分析と電気化学イメージング, シーエムシー出版, pp207-227, 2007

- ② マイクロフルーイディックシステムを用いた細胞デバイス, 鳥澤勇介, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一, バイオセンサ・ケミカルセンサ事典, 第3編 微小(マイクロ)アナリシシステム, 第2章(μ TAS)(787-797), テクノシステム, 2007.
- ③ H. Shiku, K. Nagamine, T. Kaya, T. Yasukawa, T. Matsue, "Whole-cell biosensors", in *Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques, and applications*, Chapter 7, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, UK. (Eds. P.N. Bartlett) p. 249-266, (2008, April 11th). ISBN 978-0-470-84364-2
- ④ 安川智之, 鈴木雅登, 末永智一, 細胞分離・操作技術の最前線, 第三編 第2章 誘電泳動による微粒子および細胞配列, シーエムシー出版, pp177-186, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

名称:電気化学測定装置の製造方法

発明者:板山朋聡, 小出昌弘, 末永智一, 安川智之, 長峯邦明, 珠玖 仁

権利者:独立行政法人国立環境研究所

種類:

番号:特願 2008-012608

出願年月日:2008年1月23日

国内外の別:国内

名称:電気化学測定装置

発明者:末永智一, 林 振宇, 高橋康史, 北川雄介, 梅村太三, 安川智之, 国方亮太, 珠玖 仁

権利者:国立大学法人東北大学

種類:

番号:特願 2008-175120

出願年月日:2008年7月3日

国内外の別:国内

名称:細胞のパターニング方

発明者:安川智之, 鈴木雅登, 珠玖 仁, 堀 義生, 稲垣明子, 駒林 真理子, 末永智一

権利者:国立大学法人東北大学

種類:

番号:PCT/JP2008/065294 特願 2008-528802

出願年月日:

国内外の別:国内

[その他]

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.htm