

平成23年5月27日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20686056

研究課題名（和文） 電気化学的手法を用いた再生医療技術の確立

研究課題名（英文） Tissue engineering by using electrochemical approaches

研究代表者

福田 淳二（FUKUDA JUNJI）

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号：80431675

研究成果の概要（和文）：金表面に形成させたアルカンチオール自己組織化単分子膜の還元脱離反応に伴って、接着細胞を脱離させる技術を確立した。脱離に要する時間は5分以下であり、他の原理に基づく既報の方法と比較して、非常に素早い細胞脱離法であることを示した。この方法は、さらに心筋や線維芽細胞の細胞シート、肝細胞球状組織体の脱離などに応用可能であった。また、金ワイヤへ応用することで、血管様構造を有する組織構築のための基盤技術となりうることを示した。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that cells were detached within 5 min via electrical desorption of alkane thiol self-assembled monolayers. This is the most rapid cell detachment approach compared to other previous approaches. This electrical approach could also be used to harvest cell sheets of cardiomyocytes and fibroblasts, and hepatocyte spheroids. Furthermore, this was applicable to fabricate vascular-like structures, by transferring cells to the internal surface of microchannels in hydrogel. This approach can be a fundamental tool for engineering tissues with vascular networks.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	18,800,000	5,640,000	24,440,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：医用化学工学、再生医療

1. 研究開始当初の背景

再生医療とは、生体外で組織や臓器を構築し、これを移植することで再生を促す技術であり、すでに皮膚や骨が実用化され世界的に臨床応用が始まっている。しかし、より複雑

な臓器・組織の再生医療の実現には、生体外で3次元的な組織を構築する技術が必要となる。現在までに、耳や鼻などの単純な構造体は、生分解性多孔質ポリマーを必要な形状に加工し、これに細胞を播種して移植すれば

再生可能であることが示されてきた。しかし、細胞そのものの機能や特性が重要となる他の多くの臓器・組織の再生医療には、より生体組織に類似した高密度な細胞からなる組織を構築する革新的技術が必要である。

本研究では、電気化学的原理に基づき基板表面から細胞を脱着する技術を確認し、これを用いて組織を構築する次世代再生医療の基盤技術を提案する。

2. 研究の目的

(1) 本研究の一つ目の目標は、細胞操作の基礎となる独自の細胞脱着技術を確認することである。

(2) 次に、この技術を組織構造の構築へと応用し、実際に具体例を示す。

3. 研究の方法

(1) 自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer, SAM) の還元脱離と細胞の脱着

SAMの還元脱離が細胞の脱着を引き起こす現象はすでに捉えていたことから、本研究ではこのデータをもとに、使用するアルカンチオール分子の検討、金電極の表面構造などが細胞の脱着挙動に及ぼす効果を検討し、素早い脱着条件を実験的に探索した。

(2) 2次元細胞シートの積層化

SAMを結合した金電極表面で、繊維芽細胞や内皮細胞などを培養すると、細胞同士が接着し細胞シートを形成する。5 mm×5 mm程度の大きさの繊維芽細胞シートでは、約10分の電位印加により基板から脱着可能であった。しかし、細胞シートがより大きくなった場合、電位のシート全体への均一な印加が細胞層の電気抵抗により妨げられることが予想される。そこで、多孔質フィルタに金をスパッタし、電極基板として使用することで、細胞シートの大きさに依存しない脱着技術が確立できないか検討した。

(3) 3次元細胞球状組織体 (スフェロイド) の構築

Fig. 1に示すように、微細加工と表面修飾技術により、基板上でスフェロイド形成を誘導し、かつSAMの還元脱離により回収する技術の開発に取り組んだ。ここで、ウェル底面の細胞付着領域と非付着領域は、Micro-contact printingと呼ばれるSAMのマイクロ領域修飾技術により行った。

(4) 血管構造導入手法の確立

細胞脱着技術を金ワイヤ上へ応用し、細胞組織内への血管構造を導入する技術の確立を試みた。まず、直径500 μm程度の金ワイヤに血管内皮細胞をSAMを介して接着させた。次にこのワイヤを培養チャンバー内で規則配置し、コラーゲンゲルを満たした後に、電位を印加して金ワイヤを引き抜いた。このようにして、血管構造を導入した。血管内皮細胞は、成長因子の添加によりゲル内で自発的な毛細血管網を形成することが知られており、微小な領域はこの血管新生を誘導することにより導入した。さらに次のステップとして、コラーゲンゲルにあらかじめ肝細胞を包埋した。これにより、血管構造をもつ生体類似の肝組織構造を構築した。

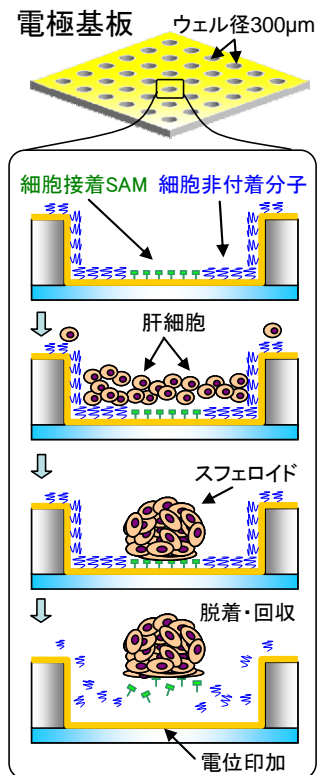


Fig.1 スフェロイド用基板

胞は、成長因子の添加によりゲル内で自発的な毛細血管網を形成することが知られており、微小な領域はこの血管新生を誘導することにより導入した。さらに次のステップとして、コラーゲンゲルにあらかじめ肝細胞を包埋した。これにより、血管構造をもつ生体類似の肝組織構造を構築した。

4. 研究成果

(1) 自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer, SAM) の還元脱離と細胞の脱着

10-Carboxy-1-decanethiol、7-Carboxy-1-heptanethiol、L-Cysteineの3種類のチオール分子を用いて、まず細胞の脱離に及ぼす効果を検証した。その結果、それぞれの分子の還元電位は、-0.93V、-0.89V、-0.71Vと異なるにも関わらず、細胞脱離に及ぼす差異は全く見られないことが分かった。この結果は、細胞脱離の律速過程がチオール分子の還元脱離過程ではなく、接着細胞のコントラクション過程であることを示唆している。

(2) 2次元細胞シートの積層化

脱離した細胞シートの取り扱いを容易にするため、第一層の細胞シートの上に脱離前にコラーゲンゲルを支持層として付与した。そして、電位印加により細胞シートを剥離し、そのまま別の細胞シート上に静置し、再び電位印加により脱離させた。この操作を繰り返すことで、肝細胞や繊維芽細胞、心筋細胞シートを多層積層化できることを示した。

(3) 3次元細胞球状組織体 (スフェロイド) の構築

微小マイクロウェル構造と micro contact printing 法を利用して、粒径の均一な肝細胞スフェロイドアレイを作製し、そのアルブミン分泌およびアンモニア代謝能を評価した。その結果、少なくとも2週間高い活性を維持することを確認した。さらに、このスフェロイドは電位印加により回収可能であった (Fig. 2)。

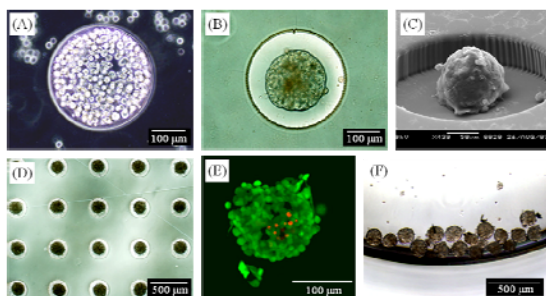


Fig. 2 肝細胞スフェロイド (A)播種直後、(B)培養2日目に形成されたスフェロイド、(C)電子顕微鏡写真、(D)各ウェルにスフェロイドが形成されている様子、(E)生死染色、(F)電気化学的に回収したスフェロイド

(4) 血管構造導入手法の確立

直径 500 μm 程度の金ワイヤに血管内皮細胞をチオール分子層を介して接着させた。次にこのワイヤを培養チャンバー内で規則配置し、コラーゲンゲルを満たした後に、電位を印加して金ワイヤを引き抜いた。このようにして、内表面が血管内皮細胞に覆われた血管様構造を導入した。培養培地中に種々の成長因子を添加して還流培養したところ、血管内皮細胞は、ゲル内へ向けて自発的に管腔構造を伸長し、血管様構造間を橋渡しするように伸長した。さらに次のステップとして、コラーゲンゲルにあらかじめ肝細胞を包埋し、血管構造をもつ肝組織様の構造体の作製に取り組んだ。その結果、肝細胞は還流培養中に増殖することが示され、内表面を血管内皮細胞に覆われた血管様構造を介して酸素や栄養素が供給されていることが示唆された。

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 13 件) すべて査読あり。

1. C. H. Kwon, I. Wheeldon, N. N. Kachouie, S. H. Lee, H. Bae, S. Sant, J. Fukuda, J. W. Kang, and A. Khademhosseini, Drug-eluting microarrays for

cell-based screening of chemical-induced apoptosis, *Analytical Chemistry*, in press

2. J. Fukuda*, and K. Nakazawa, Hepatocyte spheroid arrays inside microwells connected with microchannels, *Biomicrofluidics*, in press.
3. F. Yanagawa, H. Kaji, Y. H. Jang, H. Bae, D. Yanan, J. Fukuda, H. Qi, A. Khademhosseini, Directed assembly of cell-laden microgels for building porous three-dimensional tissue constructs, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 97A (1), pp. 93-102 (2011)
4. N. Kachouie, Y. Du, H. Bae, M. Khabiry, A. F. Ahari, B. Zamanian, J. Fukuda, and A. Khademhosseini, Directed assembly of cell-laden hydrogels for engineering functional tissues, *Organogenesis*, 6(4), pp. 234-44 (2010)
5. T. Okuyama, H. Yamazoe, N. Mochizuki, A. Khademhosseini, H. Suzuki and J. Fukuda*, Preparation of arrays of cell spheroids and spheroid-monolayer cocultures within a microfluidic device, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, pp. 572-6 (2010)
6. T. Okuyama, H. Yamazoe, Y. Seto, H. Suzuki and J. Fukuda*, Cell Micropatterning inside a Microchannel and Assays under a Stable Concentration Gradient, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 2, pp. 230-7 (2010)
7. T. Anada, T. Masuda, Y. Honda, J. Fukuda, F. Arai, T. Fukuda, and O. Suzuki, Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression, *Sensors and Actuators B*, 147, pp. 376-9 (2010)
8. Y. Seto, R. Inaba, T. Okuyama, F. Sassa, H. Suzuki, J. Fukuda*, Engineering of Capillary-Like Structures in Tissue Constructs by Electrochemical Detachment of Cells, *Biomaterials*, 31, pp. 2209-15 (2010)
9. Y. Sakai, T. Tanaka, J. Fukuda, and K. Nakazawa, Alkoxyresorufin O-dealkylase assay using a rat hepatocyte spheroid microarray, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), pp. 395-399 (2010)

10. H. Yamazoe, T. Okuyama, H. Suzuki, J. Fukuda*, Fabrication of Patterned Cell Co-Cultures on Albumin-Based Substrate, *Acta Biomaterialia*, 6, pp. 526-33 (2010)
11. S. Takahashi, H. Yamazoe, F. Sassa, H. Suzuki, J. Fukuda*, Preparation of Coculture System with Three Extracellular Matrices Using Capillary Force Lithography and Layer-by-layer Deposition, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(6), pp. 544-50 (2009)
12. R. Inaba, A. Khademhosseini, H. Suzuki, J. Fukuda*, Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers for Engineering Cellular Tissues, *Biomaterials*, 30(21), pp. 3573-9 (2009)
13. W. Satoh, S. Takahashi, F. Sassa, J. Fukuda, and H. Suzuki, On-chip Culturing of Hepatocytes and Monitoring their Ammonia Metabolism, *Lab on a Chip*, 9(1), pp. 35-7 (2009)

[学会発表] (計 12 件)

国際学会

1. N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Fabrication of Thick Cell Sheet via Electrochemical Reactions on Porous Membrane Culture Substrate, 2010 MRS Fall meeting, Boston, USA, November 29, 2010
2. T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell Detachment Along with Electrical Cleavage of a Zwitterionic Oligopeptide Layer, TERMIS-AP 2010, Sydney, Australia, September 17, 2010
3. N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Fabrication of Thick Cell Sheet via Electrochemical Reactions on Porous Membrane Culture Substrate, TERMIS-AP 2010, Sydney, Australia, September 17, 2010
4. T. Okuyama, H. Yamazoe, H. Suzuki, J. Fukuda, Microflow system for cell micropatterning and assays under concentration gradients, APCE & APLOC 2009, Shanghai, China, October 29, 2009
5. Y. Kameoka, S. Takahashi, F. Sassa, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell-based Microanalysis System Equipped with the Processing Functions of Nanoliter-scale Liquid Plugs, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul,

Korea, September 1, 2009

6. T. Okuyama, H. Yamazoe, H. Suzuki, J. Fukuda, Microfluidic Cell Culture System for Cytotoxicity and Migration Assays, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Korea, September 1, 2009
7. Y. Seto, H. Suzuki, J. Fukuda, Microfabrication of Capillary-like Structures Using Electrochemical Desorption of an RGD-Containing Peptide, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Korea, September 1, 2009
8. J. Fukuda, R. Inaba, H. Suzuki, Engineering Cell Sheets and Spheroids Using Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers, TERMIS 2nd World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium, September 1, 2009
9. R. Inaba, H. Suzuki, J. Fukuda, Engineering Two- and Three-dimensional Cellular Aggregates by Electrochemical Reaction, Boston, USA, December 1, 2008
10. T. Okuyama, H. Yamazoe, H. Suzuki, J. Fukuda, Microfluidic Channel for Cellular Micropatterning and Assay of concentration-Gradient-Induces Migration, The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, Tokyo, Japan, November 30, 2008
11. S. Takahashi, R. inaba, H. Yamazoe, H. Suzuki, J. Fukuda, Micropatterned cell co-cultures on three extracellular matrix components, The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, Tokyo, Japan, November 30, 2008
12. Y. Seto, R. Inaba, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrochemical Cell Detachment and Its Application for Engineering Tissue Constructs with Capillary Structure, TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, November 7, 2008

国内学会

1. 福田 淳二, 掛川 貴弘, 望月 直人, 大崎 達哉, 鈴木 博章, 自己組織化単分子膜の還元脱離を利用した細胞組織体の構築、電気化学会第 78 回大会、横浜国立大学、2011. 3. 31

2. 福田淳二、電気化学細胞脱離を利用したティッシュエンジニアリング、日本動物実験代替法学会第23回大会、北里大学、2010.12.5
3. 福田淳二、大崎達哉、掛川貴弘、望月直人、鈴木博章、電気化学細胞脱離を利用した血管様構築の作製技術、第10回日本再生医療学会総会、京王プラザホテル(新宿)、2011.3.2
4. 福田淳二、瀬戸祐希、鈴木博章、電気化学的原理に基づくティッシュ・エンジニアリング、第9回日本再生医療学会総会、広島国際会議場、2010.3.18
5. 福田淳二、瀬戸祐希、鈴木博章、電気化学的細胞脱離を利用した血管網構築の試み、第9回日本再生医療学会総会、広島国際会議場、2010.3.18
6. 福田淳二、佐藤航、鈴木博章、電気化学アンモニアセンサを搭載した細胞チップデバイス、第61回日本生物工学会大会、名古屋大学、2009.9.24
7. 福田淳二、稲葉里奈、瀬戸祐希、鈴木博章、電気化学的な細胞脱離を利用した細胞組織の構築、化学工学会第74年会、横浜国立大学、2009.3.19

[図書] (計1件)

1. Sun Min Kim, J. Fukuda, A. Khademhosseini, Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment, Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironme, Artech House, pp. 53-70, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：細胞接着領域のマイクロパターンを有する細胞固定化基板の製造方法

発明者：藤田聡史、長崎玲子、栗田僚二、福田淳二、榎本詢子

権利者：産総研、筑波大学

種類：出願

番号：特願 2011-055010

出願年月日：2011年3月14日

国内外の別：国内

名称：薬剤感受性試験用バイオチップ

発明者：山添泰宗、福田淳二

権利者：産総研、筑波大学

種類：出願

番号：特願 2010-062025

出願年月日：2010年3月18日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~szk_fkd_1ab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 淳二 (FUKUDA JUNJI)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号：80431675