

## 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24年 6月21日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650127

研究課題名（和文） 三次元脳神経組織体を用いたミニブレインデバイスの創成

研究課題名（英文） Construction of nerve cell body on a 3-dimensional culture device

研究代表者

宮本 義孝 (MIYAMOTO YOSHITAKA)

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部 共同研究員

研究者番号：20425705

研究成果の概要（和文）：本課題では、神経様細胞による3D組織を構築するデバイスを創成することを目的とした。開発した細胞パターンングデバイスは、細胞組織体の均一・大量生産が可能であり、一度に多くの培養条件を評価することができた。特に、様々な細胞（初代細胞、組織由来幹細胞、iPS細胞など）に対して、細胞組織体の大きさを制御でき、薬剤応答およびタンパク質レベルでの機能発現が確認できた。また、2D培養による神経回路の構築、及び電気刺激による周期内での応答率の変化も確認できている。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a device for the construction of three dimensional cell assemblies of nerve-like cells. The device for cell patterning has enabled to generate cell assemblies with a controlled size in large numbers and to simultaneously evaluate their functions under various culture conditions. The size of the tissues was controlled for primary cells, tissue-derived stem cells, and induced pluripotent stem (iPS) cells. The cell assemblies on the device had their drug response, and protein level analysis revealed their some functions. The 2D culture of nerve-like cells also showed that a neural-like network was generated on the device and cyclic response to electric nerve stimulation was changed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：脳・神経、マイクロ・ナノデバイス、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) In vivo系で活発に行われているブレイン・マシン・インタフェース(Brain-machine

Interface : BMI)の技術開発に対して、1細胞から数百、数万の細胞（神経様細胞など）をクラスター形成させることで、In vitro系

でも BMI に技術応用できるデバイスを創成する。すなわち、人工的に、三次元脳神経組織体を構築し、ミニブレインとなりうるマイクロチップを創成することを目指す。

(2) ① 本デバイスを作製するにあたり、3次元微細加工技術を用いることで、細胞組織体の均一性、および大量生産の獲得を目指す。②サブテーマ) 様々な細胞(組織由来幹細胞、iPS 細胞など)を用いて、神経様細胞による3D組織を形成できるかを探索する。

(3) In vitro 系で、神経回路を作製して、神経細胞の活動を評価・検証する。

## 2. 研究の目的

(1) 人工的に三次元細胞組織体を作成できる細胞パターンニングデバイスを創成する(池内真志ほか)。

(2) 細胞パターンニングデバイスによる三次元細胞組織体の作製とその機能を評価する(池内真志、加地範匡、宮本義孝ほか)。

(3) 人工的に神経回路を構築して、パターン刺激による応答性を評価する(八木透ほか)。

## 3. 研究の方法

(1) 近年、移植医療における臍島再生、幹細胞研究における胚様体の形成など、細胞を数10~数100 $\mu\text{m}$ の球状塊(クラスタ)に凝集させて培養するプロセスが必要不可欠となっている。従来、クラスタ培養では、ハンギングドロップ法や、超低接着培養皿が用いられてきたが、いずれの手法も、大量生産化に不向きであったり、クラスタ形状が不均一であったりするという課題を有していた。そこで、池内らは、3次元微細加工技術を利用して細胞パターンニングデバイスを創成し、本課題の解決を試みた。

(2) 実際に作製したデバイスを用いて、様々な細胞(初代細胞、組織由来幹細胞、iPS細胞など)に対して、本デバイスが有用かどうかを評価した(宮本、池内ら)。具体的には、①三次元細胞組織体の大きさ等を制御できるか、②作製した細胞組織体は機能を有するかを評価した。

(3) 人工的に神経回路を構築するにあたり、ラット胎児の脳皮質組織片を用い、神経細

胞を分離した。続いて、この分散した神経細胞をあらかじめコーティング処理を行った MEA 基板上に撒き、培養を開始した。培養開始14日目以降に、作製した神経回路に対して、パターン刺激を与え、その応答性を評価した。

実験動物を用いる研究については、各機関の動物実験指針に準拠して研究を実施した。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめた。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなった。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

## 4. 研究成果

(1) 3次元微細加工技術を利用し、一度の細胞播種操作で、均一かつ大量のクラスタを形成できる、新規培養デバイス”TASCL”を開発した(図1)。

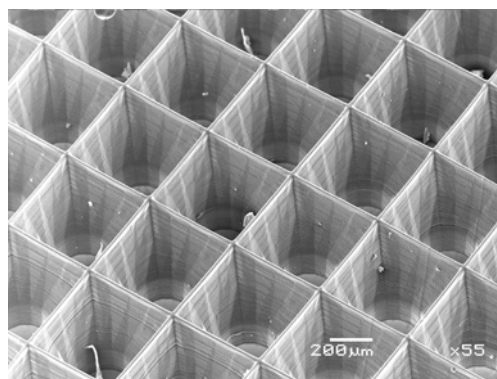
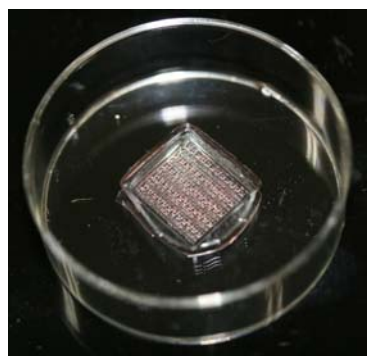


図1. 細胞パターンニングデバイス”TASCL”

本デバイスは、PDMSシート上に所定形状の貫通孔を多数配置し、貫通孔の壁面は上部から下部に向かうテーパーとしている。デバイス裏面はPDMS素材であるため、任意の培養基材上に接着剤を用いることなく、貼付して用いることができる。また、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、細胞を播種すると、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各貫通孔の形

状で物理的に決まるため、一度の播種操作で、任意の培養基材上で、制御された細胞数及び密度条件下でのクラスタ培養を大量に行うことができる。さらに、貫通孔の形状を複数組み合わせ、1枚のデバイス上に配置することにより、細胞の播種条件の多数の組み合わせを一括して解析することも可能である。

(2) 実際には本デバイスを用いて、初代細胞、マウス臍幹由来幹細胞、マウス脂肪由来幹細胞、及びiPS細胞の培養を行い、クラスタの均一・大量生産が可能であること、クラスタ培養条件のコンビナトリアル解析が可能であることを実証した。特に、一度の操作で、クラスタの大きさを制御することができ(図2. 例. 初代細胞)、薬剤応答およびタンパク質レベルでの機能発現が確認できた。さらに、本デバイスを用いて、神経細胞によるクラスタの作成を試みた結果、その大きさを均一に制御することに成功した。

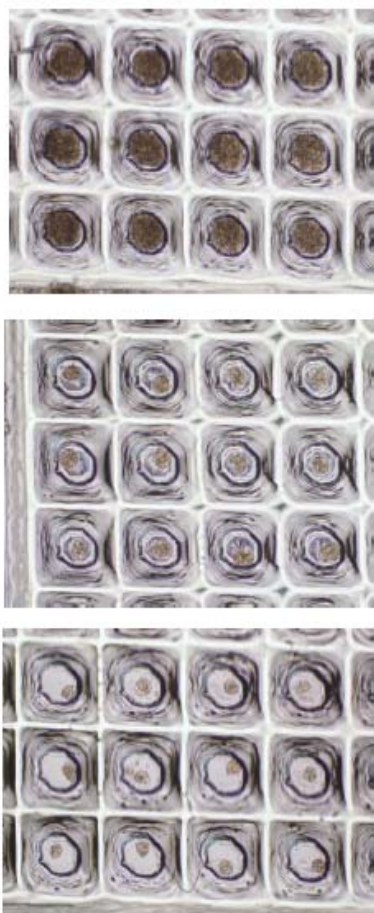


図2. 初代細胞クラスタの大きさの制御

サブテーマとして、幹細胞によるクラスタ作製から神経様細胞への分化誘導実験を行った。結果、神経様細胞への誘導効率が低かった。今後、さらなる培養条件等の検証が

必要である。

また、マウス iPS 細胞でも上記と同様の検証を行った。本実験を行うにあたり、使用する細胞の品質も考慮する必要があるため、iPS 細胞の凍結保存液における影響を確認した。結果、iPS 細胞の凍結保存液として、市販のセルバンカー3 (日本全薬工業) が有効であった。良質な細胞を用いて神経様細胞への分化誘導実験を行ったが、幹細胞と同様の結果が得られた。

(3) 本実験結果より、神経回路の応答を各周期で平均した場合、応答率の減少率は刺激数  $N$  の増加とともに小さくなることが確認された。しかし、 $N=1, 10$  以外のパターン刺激を入力した場合は各周期の1刺激に対する応答とそれ以降の刺激に対する応答の間に有意な差が確認された。先行研究では、刺激間隔が長い刺激の方が応答の減少率が小さいという点が明らかになっているので、「第1刺激に対する応答は第2刺激以降の応答より大きく、刺激数  $N$  の増加に伴い応答率が減少する」という今回の実験結果は妥当であるといえる。なお各周期の第1刺激に対する応答とそれ以降の応答はそれぞれ違う要素から影響を受けていると考えられる(例えば、第1刺激に対する応答は周期内の無刺激区間から影響を受けていると考えられる)。今後、これらの点を精査するために刺激数  $N$ ・刺激間隔・周期を独立させた対照実験を行うとともに、本デバイスによる検証を行う予定である。

## 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13件)

- ① Koichi Oishi, Hirofumi Noguchi, Hiroaki Saito, Hiroshi Yukawa, Yoshitaka Miyamoto, Kenji Ono, Katsutoshi Murase, Makoto Sawada, Shuji Hayashi, Novel positive-charged nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging of islet transplantation, Cell Medicine、査読有、2012、Accepted、DOI:<http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639397>
- ② Yoshitaka Miyamoto, Hirofumi Noguchi, Hiroshi Yukawa, Koichi Oishi, Kenji Matsushita, Hisashi Iwata, Shuji Hayashi, Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells, Cell Medicine、査読有、2012、Accepted、DOI:<http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639405>
- ③ M. Ikeuchi, T. Nishijima, K. Ikuta、

- PNEUMATICALLY ACTUATED SPHEROID CULTURING LAB-ON-A-CHIP FOR COMBINATORIAL ANALYSIS OF EMBRYONIC BODY, Proc. IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 査読有、2012、92-95、DOI:10.1109/MEMSYS.2012.6170101
- ④ M. Ikeuchi, R. Tane, K. Ikuta、Electrospray deposition and direct patterning of polylactic acid nanofibrous microcapsules for tissue engineering, BIOMEDICAL MICRODEVICES、査読有、Vol.14、2012、35-43、DOI:10.1007/s10544-011-9583-x
- ⑤ 中島健治、八木透、菅原路子、画像処理による細胞運動の解析、電気学会医用・生体工学研究会資料、査読無、MBE-11-31、2011、29-33
- ⑥ Yoshikazu Ishii、Tohru Yagi、Michiko Sugawara、Evaluation Method for Ion Transport via Nanopores: Toward a Neural Stimulation Electrode Using Membrane Protein、Proc. of 2011 Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON 2011)、査読有、2011、CD-ROM
- ⑦ 菅原路子、崔源焄、中西淳、山口和夫、横田秀夫、八木透、高精細な細胞運動制御および観察に向けた培養基板へのマイクロパターン形成手法の確立、電気学会論文誌電子・情報・システム部門誌、査読有、Vol.131、2011、833-839
- ⑧ 八木透、失われた視覚を取り戻す-人工視覚、応用物理、Vol.80、2011、116-119
- ⑨ 中島健治、Benjamin Knecht、八木透、菅原路子、画像処理による細胞運動の解析、電子情報通信学会技術研究報NC、査読無、52-65、2010、19-22
- ⑩ B. Knecht, W. Choi, G. Szekely, T. Yagi, M. Sugawara、Study on cell motility in confocal microscopy images、Proc. of 2010 Biomedical Engineering International Conference、査読有、2010、CD-ROM
- ⑪ Choi Wonjun、八木透、中西淳、山口和夫、横田秀夫、菅原路子、ケージド培養基板へのマイクロパターン形成手法の確立、電気学会医用・生体工学研究会資料、査読無、MBE-10-30、2010、27-32
- ⑫ 菅原路子、八木透、横田秀夫、アクチン関連タンパク質がアクチンネットワーク形状に及ぼす影響に関する数理解析、電気学会医用・生体工学研究会資料、査読無、MBE-10-30、2010、33-48
- ⑬ 八木透、糖尿病網膜症に適用可能な人工視覚システム、日本臨牀、Vol. 68、2010、345-348
- ⑭ 杉浦佳奈子、加地範匡、岡本行広、渡慶次学、馬場嘉信、培養チップとアッセイチップを組み合わせた簡便なハイスループット細胞アッセイシステムの開発、電学論E、査読有、130巻10号、2010、471-475
- [学会発表] (計11件)
- ① Tohru Yagi、Evaluation Method for Ion Transport via Nanopores: Toward a Neural Stimulation Electrode Using Membrane Protein、2011 Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON 2011)、2012年1月30日、(Chaingmai, Thailand)
- ② 宮本義孝、肝細胞スフェロイドによるカチオン性多糖磁性粒子複合体の評価、第37回日本臓器保存生物医学会学術集会、2011年11月26日、江陽グランドホテル(仙台市)
- ③ 池内真志、3次元微細加工を利用した幹細胞クラスター培養デバイスTASCLの開発、第49回日本人工臓器学会大会、2011年11月26日、都市センターホテル(東京)
- ④ Masashi Ikeuchi、3D CULTURE OF PANCREATIC STEM CELLS USING TAPERED STENCIL FOR CLUSTER CULTURE (TASCL)、The 6th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology、2011年5月5日、Hotel Seeburg Lucerne (Switzerland)
- ⑤ 池内真志、幹細胞クラスター大量形成用培養デバイス" TASCL "の開発、第50回日本生体医工学会大会、2011年5月1日、東京電機大学神田キャンパス(東京)
- ⑥ 中島健治、画像処理による細胞運動の解析、電気学会医用・生体工学研究会、2011年3月22日、東京
- ⑦ Yoshitaka Miyamoto、Toxicity and functional assessment using polysaccharide-based magnetic iron oxide nanoparticles for cell labeling in cell array system、2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010): New Aspects of Chemical Glycobiology toward Development of new Diagnostics and Therapeutics Symposium、2010年12月15-20日、Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, USA)
- ⑧ 宮本義孝、パターンニングデバイスを用いた肝細胞クラスターの創成、第37回日本臓器保存生物医学会学術集会、2011年11月19-20日、新潟グランドホテル(新潟市)

- ⑨ 宮本義孝、iPS 細胞(誘導多能性幹細胞)の凍結保存液の検討、第37回日本臓器保存生物医学会学術集会、2010年11月19-20日、新潟グランドホテル(新潟市)
- ⑩ 宮本義孝、磁性ナノ粒子を用いた肝細胞の毒性評価、第37回日本臓器保存生物医学会学術集会、2010年11月19-20日、新潟グランドホテル(新潟市)
- ⑪ Choi Wonjun、Control of Single Cell Migration Using Caged Cell-Culturing Substrates、第49回日本生体医工学会大会、2010年6月25日、大阪国際交流センター(大阪市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮本 義孝 (MIYAMOTO YOSHITAKA)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・共同研究員  
研究者番号：20425705

### (2) 研究分担者

池内 真志 (IKEUCHI MASASHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：90377820

加地 範匡 (KAJI NORITADA)

名古屋大学・工学系研究科・准教授

研究者番号：90402479

八木 透 (YAGI TOHRU)

東京工業大学・情報理工学研究科・准教授

研究者番号：90291096

林 衆治 (HAYASHI SHUJI)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：30218573

(H23→H24：研究協力者)

### (3) 連携研究者

なし