
超高速バイオアセンブラ

2305

平成23年度～平成27年度科学研究費助成事業
(科学研究費補助金)(新学術領域研究(研究領域提案
型))研究成果報告書

平成29年6月

領域代表者 新井 健生

大阪大学・基礎工学研究科・教授

<はしがき>

新学術領域バイオアセンブラは2011年7月に発足し、2016年3月に終了しました。ロボット工学、バイオ、医学の異分野の研究者が連携し、体外で人工の3次元組織を構築するという極めて独創的、チャレンジングな研究テーマに取り組んできました。細胞特性計測制御、3次元細胞システム構築、機能解明の3つの研究班が設置され、9つの計画研究を中心に、前半は12の公募研究が参加しました。3年目に行われた中間評価では、研究組織全体がよく構成されており、新学術領域のモデルケースであるとされ、領域内連携が活発に行われていることが高く評価されました。後半では、具体的組織について3次元組織構築から機能発現までを一貫して研究することを目的に新たな9つの公募研究のみからなる班も組織され、既存の班に応募した14の公募研究と合わせ、全体で32研究グループからなる大コンソーシアムが形成されました。これらのグループ間での領域内連携は53以上にも及び、異分野連携により従来研究の枠組みではなされないような新規な研究が数多く実現されました。一例として、ヒトiPS由来肝前駆細胞とHUVECにより肝原基を作成する研究では、細部の硬さ計測により前駆細胞の最適な分化度合を見出し、これらを剣山状モールドで共培養しました。電気化学の原理でHUVECをモールドから外し、HUVECで覆われた管状構造へ培養液を送液しながら共培養すると、内部に管構造を持つ3次元構造体となり、最終的にアルブミンの産生が確認され、体外で肝機能があることを実証しました。超高速な計測手法や分離手法、細胞操作も次々と提案され実証されました。学術論文成果は593件あり、このうち204件が連携による成果でした。このほかに、招待講演や基調講演は243件、受賞は144件となっています。そして何よりも最大の学術成果は、出版社より全3巻の専門書「組織工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合」を発刊したことです。各班の成果を、「細胞の特性計測・操作と応用」、「3次元細胞システム設計論」、「細胞社会学」としてそれぞれの学術成果を体系化することができました。なお、前半2年間の成果については、英文の専門書「Bio Assembler」として海外の出版社より刊行しています。

若手の活躍の場を提供できたことも、このバイオアセンブラの大きな成果と言えます。各研究グループには40歳前の助教や准教授、特任の教員、博士後期課程学生がたくさん参画しました。彼らの活躍によりバイオアセンブラが躍進するとともに、またバイオアセンブラが彼らを後押ししました。若手独自の受賞が27件あり、また41名の方がキャリアアップを果たしています。

プロジェクト開始時には、国外には似たようなプロジェクトは全く見当たりませんでした。国際会議でのOSやワークショップを企画するなど、広報と成果の普及に毎年努力を重ねたことにより、次第にバイオアセンブラの重要性が認識されてまいりました。国際学会においてもバイオアセンブラが重要なキーワードであることが認められることにもなりました。このように諸外国に先立ち、異分野連携の新たなテーマを主導したことの意義は極めて大きいと考えております。これら数々の大きな成果を出すことができたことは、ひとえにご参加いただいた研究者の皆様のお蔭と改めてお礼を申し上げます。

なお、本プロジェクトで得られた成果や人的ネットワークを活用して、さらなる飛躍を目指しています。一つは、生体内で起こっている高次機能発現（バイオエマージェンス）の仕組みをよく理解し、細胞・組織の生体内高次機能を発現する条件が満たされている時空間的に統合された培養環境状態（バイオインテグリティ）を実現する新しい学理です。また、細胞や組織の局所特定部位に多様なモードの刺激を与え、その応答を詳細に計測し、システム論的手法を応用して複雑な生命現象を解明する学理の構築も新たな課題として見出されています。

領域代表 新井 健生
大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究組織 (総括：総括班, 計画：総括班以外の計画研究, 公募：公募研究)

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名	所属機関 部局 職	構成員数
X00 総括	23106001 総括	平成23年度～ 平成27年度	新井 健生	大阪大学・基礎工学研究科・教授	10
A01 計画	23106002 超高速操作による細胞計測と自律誘導モニタリング	平成23年度～ 平成27年度	新井 史人	名古屋大学・工学研究科・教授	3
A01 計画	23106003 超高速細胞システム特性計測	平成23年度～ 平成27年度	金子 真	大阪大学・工学研究科・教授	3
A01 計画	23106004 循環極少数細胞を標的とする閉鎖系高速細胞解析分離装置の開発	平成23年度～ 平成27年度	中内 啓光	東京大学・医科学研究所・教授	2
A02 計画	23106005 超高速微細操作技術を用いた3次元細胞システム構築	平成23年度～ 平成27年度	新井 健生	大阪大学・基礎工学研究科・教授	7
A02 計画	23106006 ナノスケール超高速細胞選別・操作に基づく3次元細胞システムの超高速アセンブリ	平成23年度～ 平成27年度	福田 敏男	名城大学・理工学部・教授	2
A02 計画	23106007 フルイディクスを駆使する高速細胞アセンブリ	平成23年度～ 平成27年度	関 実	千葉大学・工学研究科・教授	2
A02 計画	23106008 MEMSを利用した細胞の3次元組織構築	平成23年度～ 平成27年度	竹内 昌治	東京大学・生産技術研究所・教授	5
A03 計画	23106009 肝臓等複雑化組織の構築と機能解明	平成23年度～ 平成27年度	大和 雅之	東京女子医科大学・先端生命科学研究科・教授	6
A03 計画	23106010 骨ミネラルリゼーションプロセスの解明と硬組織構築	平成23年度～ 平成27年度	鈴木 治	東北大学・歯学研究科・教授	3
計画研究 計 10 件					

A01 公募	24106501 原子間力顕微鏡による 超高速細胞レオロジー 分離技術の子間力開発	平成24年度～ 平成25年度	岡嶋 孝治	北海道大学・情報科学研究科・教授	2
A01 公募	24106509 細胞アクティブセンシ ングのための実時間マ イクロ PIV システム	平成24年度～ 平成25年度	石井 抱	広島大学・工学研究院・教授	1
A01 公募	24106511 超高速細胞配列化と 高スループット細胞分 化スクリーニング	平成24年度～ 平成25年度	安川 智之	兵庫県立大学・物質理学研究科・准 教授	1
A01 公募	26106701 原子間力顕微鏡による 生体組織力学物性のそ の場分離計測技術の開 発	平成26年度～ 平成27年度	岡嶋 孝治	北海道大学・情報科学研究科・教授	2
A01 公募	26106708 ラベルフリー超高速幹 細胞 4D センシング・マ ニピレーションデバ イスの開発	平成26年度～ 平成27年度	武居 昌宏	千葉大学・工学研究科・教授	2
A01 公募	26106715 ニューロン遊走におけ る核レオロジー解析と 脳皮質 3 次元細胞構築 への展開	平成26年度～ 平成27年度	梅嶋 宏樹	京都大学・物質・細胞統合システム拠 点・研究員	4
A01 公募	26106723 細胞膜表面抗原の免疫 ラベルと誘電現象に基 づく稀少細胞の分離回 収	平成26年度～ 平成27年度	安川 智之	兵庫県立大学・物質理学研究科・准 教授	1
A01 公募	26106724 生態環境を模倣するマ イクロカプセル培養技 術と高速カプセルソー ティング技術の開発	平成26年度～ 平成27年度	鈴木 郁郎	東北工業大学・工学研究科・准教授	1
A02 公募	24106503 がん細胞浸潤の 4 次元 解析に関する研究	平成24年度～ 平成25年度	松井 裕史	筑波大学・医学・医療系・講師	1

A02 公募	24106504 血管構造の高速モールドイングによる三次元骨組織の構築	平成24年度～ 平成25年度	福田 淳二	横浜国立大学・工学研究院・准教授	1
A02 公募	24106505 細胞環境の動的制御手法の確立と3次元細胞システム構築への展開	平成24年度～ 平成25年度	吉川 洋史	埼玉大学・理学部・助教	1
A02 公募	24106512 三次元組織光造形法の開発	平成24年度～ 平成25年度	杉浦 慎治	産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員	4
A02 公募	26106702 ゲル基質の軟らかさと粘性を利用した上皮シートの3次元組織構築	平成26年度	芳賀 永	北海道大学・先端生命科学研究院・教授	1
A02 公募	26106703 マルチチャネルカラーゲンゲルを用いた巨大再生組織の高速構築システムの開発	平成26年度～ 平成27年度	古澤 和也	北海道大学・先端生命科学研究院・助教	1
A02 公募	26106705 酸化ストレスによって引き起こされる細胞システムの形態変化解析とその問題解決	平成26年度～ 平成27年度	池田 豊	筑波大学・数理物質科学研究科・研究員	1
A02 公募	26106709 免疫抑制剤の不要な移植を目指した患者由来細胞と臍島の3次元複合体の創製	平成26年度～ 平成27年度	寺村 裕治	東京大学・工学系研究科・特任准教授	1
A02 公募	26106719 磁気細胞操作技術による高速3次元細胞システム構築	平成26年度～ 平成27年度	井藤 彰	九州大学・工学研究院・准教授	1
A03 公募	24106502 3次元形態形成過程における細胞基質間および細胞細胞間の力学場測定	平成24年度～ 平成25年度	水谷 武臣	北海道大学・先端生命科学研究院・助教	1

A03 公募	24106506 Organ-Explant-Chip におけるバイオニック シミュレータ	平成24年度～ 平成25年度	益田 泰輔	名古屋大学・工学研究科・助教	1
A03 公募	24106507 各種石灰化形成におけ る細胞動態の解析と それを利用した生体外 石灰化モデルの構築	平成24年度～ 平成25年度	木原 隆典	大阪大学・基礎工学研究科・助教	1
A03 公募	24106508 三次元腺（せん）組織の i n v i t r o 作製と組織形態形成に おけるメカニクス理解	平成24年度～ 平成25年度	松本 卓也	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授	3
A03 公募	24106510 ヒト臓器構成プロセス のシームレスなライブ 観察	平成24年度～ 平成25年度	武部 貴則	横浜市立大学・医学研究科・助手	3
A03 公募	26106704 細胞アセンブルに向け た力学場計測	平成26年度～ 平成27年度	水谷 武臣	北海道大学・先端生命科学研究院・ 助教	1
A03 公募	26106711 大脳組織修復をめざす ニューロン・グリア・ 血管内皮細胞の生体外 三次元構築	平成26年度～ 平成27年度	味岡 逸樹	東京医科歯科大学・脳統合機能研究 センター・准教授	1
A03 公募	26106720 顎関節の器官構築に向 けた3次元器官培養法 の開発	平成26年度～ 平成27年度	高橋 一郎	九州大学・歯学研究院・教授	1
A03 公募	26106725 マウス皮膚再構成モデ ルにおける上皮-間葉 細胞のクロストークと 組織幹細胞の機能	平成26年度～ 平成27年度	片岡 健	岡山理科大学・理学部臨床生命科学 科・准教授	1
B01 公募	26106710 マイクロメッシュを用 いた層状細胞構造の構 築と機能発現およびそ の計測	平成26年度～ 平成27年度	鷺津 正夫	東京大学・工学系研究科・教授	2

B01 公募	26106712 血管構造の高速モールドイングによるヒトiPS細胞を用いた肝組織構築	平成26年度～ 平成27年度	福田 淳二	横浜国立大学・工学研究院・准教授	1
B01 公募	26106713 心筋組織、人工リンパ節の3次元アセンブリ	平成26年度～ 平成27年度	中村 真人	富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授	1
B01 公募	26106714 繋ぐ技術で拓く弾性型血管の創生とバイオニックシミュレータ	平成26年度～ 平成27年度	益田 泰輔	名古屋大学・工学研究科・助教	2
B01 公募	26106717 インクジェットLbL法による多機能性3次元皮膚モデルの高速構築と複合的機能発現	平成26年度～ 平成27年度	松崎 典弥	大阪大学・工学研究科・准教授	2
B01 公募	26106718 3次元外分泌腺組織のin vitro作製と生体組織度評価システムの構築	平成26年度～ 平成27年度	松本 卓也	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授	3
B01 公募	26106721 ヒトiPS細胞由来機能性臓器の試験管内誘導へ向けた集学的アプローチ	平成26年度～ 平成27年度	武部 貴則	横浜市立大学・医学研究科・准教授 シンシナティール大学小児病院 消化器部門	3
B01 公募	26106722 薬物代謝のリアルタイム評価を可能とするマイクロ構造を備えた肝組織の作製	平成26年度～ 平成27年度	小島 伸彦	横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授	1
B01 公募	26106726 光分解造形法による灌流可能な血管ネットワークを有する3次元組織体の構築	平成26年度～ 平成27年度	杉浦 慎治	産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員	5
公募研究 計 35 件					

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	235,000,000	70,500,000	305,500,000
平成 24 年度	220,700,000	66,210,000	286,910,000
平成 25 年度	213,700,000	64,110,000	277,810,000
平成 26 年度	249,800,000	74,940,000	324,740,000
平成 27 年度	231,200,000	69,360,000	300,560,000
総計	1,150,400,000	345,120,000	1,495,520,000

1. 研究領域の目的及び概要

【我が国の学術水準の向上・強化】

本研究の目的は、「生体から取り出した細胞から目的の細胞を高速に計測分離し、それらを基盤構造（マトリクス）や血管を含む統制された3次元細胞システムに形成し、組織として機能させるための画期的な方法論（バイオアセンブラ）を創出すること、さらに一つの応用として、次世代培養技術を確立し再生医療に役立てること」である。本研究は、in vitro 環境場における3次元細胞システムの創生が世界初であること、その創生をマイクロ・ナノ超高速計測制御の方法論を発展させることにより実現すること、の両面で極めて革新的であり、我が国の理工学、医学の学術水準を大幅に向上・強化させることを目的とする。

このような目的を達成するため、(1)有用な細胞を超高速に選りすぐる「細胞の特性計測・操作と応用（細胞ソート工学）」、(2)選りすぐった細胞から in vitro（体外）で組織を構築する「3次元細胞システム設計論」、(3)細胞集団レベルで個々の細胞機能が協調しい機能を発現するメカニズムを明らかにする「細胞社会学」、という一連の技術開発と創生の学理を提案し、医工学的に有用で再生治療のために移植可能な機能する人工3次元細胞システムを創生する（図1-1）。また、マイクロ・ナノ超高速計測制御では従来速度の10倍以上の高速化を目指す。

本領域研究はこれらを実現するために、マイクロ・ナノロボティクスを活用した（1）細胞の物理的特性に着目した超高速計測分離技術の開発、（2）単一細胞からロール・積層・折り紙成型等を組み合わせて3次元形状を実現する超高速細胞システム構築技術の開発により、（3）in vitro 環境で細胞の自律的機能発現を促しながら達成するという3点においてチャレンジングである。再生医療に役立つ人工3次元細胞システムを構築し、その方法論を発展させることにより、マイクロ・ナノ理工学と生命科学の進展と体系化を図る。

本領域「超高速バイオアセンブラ」の発展により、活性細胞の超高速計測分離技術、機能する3次元細胞システムの組み立て技術の体系的な方法論が確立され、3次元組織として機能発現するための増殖と分化誘導の原理が明らかにされる。ロボット工学では超高速マイクロ・ナノ計測制御という未開の領域への展開、一方、マイクロ・ナノロボティクスが生命・医学研究へ導入されることにより、3次元細胞システムの様々な特徴の理解と構築技術の確立が図られ、再生医療・診断技術が劇的に進展することが期待できる。これにより、ロボット工学・理工学、医学・薬学・生命科学で学術水準の大幅な向上と強化が実現される。

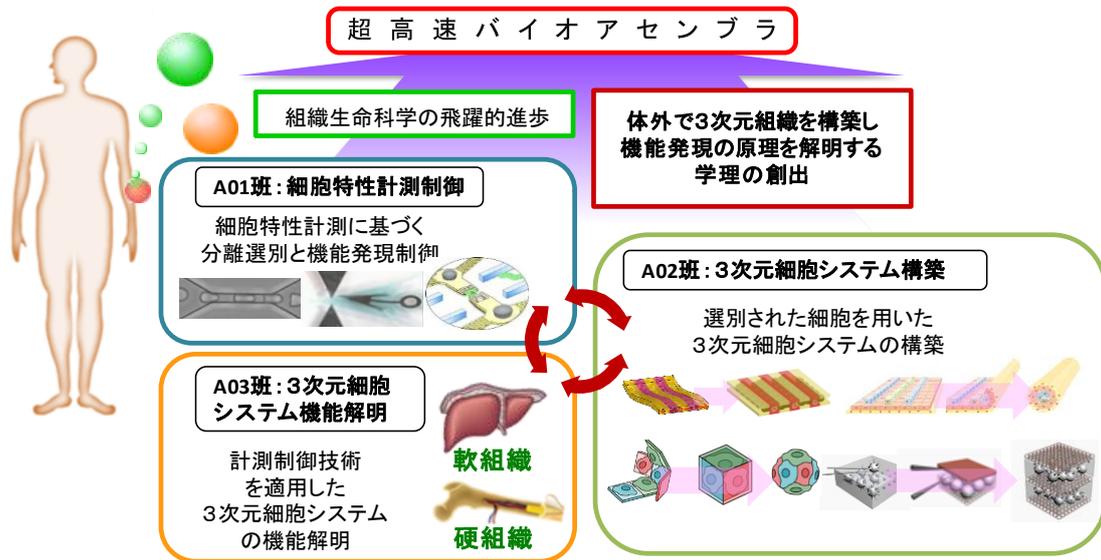


図 1-1 超高速バイオアセンブラの学理の創出

【学術的背景】

近年のロボットエンジニアとバイオ・医学研究者との連携により、細胞への力学刺激と応答観察のための多くの要素技術や装置開発が成功し、細胞と環境との力学的相互作用が細胞の増殖と分化の制御に重要なことが示された。しかし、再生医療応用や生命理工学研究のモデル系として単一細胞では全く不十分であり、機能する3次元細胞システムの構築が不可欠であることが明確に認識された。さらに、*in vivo* 環境における様々な刺激が細胞集団・組織・臓器の形成と機能発現に必須であることが国内外で報告され始め、*in vitro* での細胞システム構築の阻害要因も明らかになりつつある。ロボティクス分野では、マイクロからナノスケールで様々な計測制御を行う技術が進展し、組織から細胞を扱う技術的環境も十分に整っている。このような状況のもと、本提案では、マイクロ・ナノロボティクスの分野で世界をリードする工学研究者、多細胞システムの構築を試み機能する組織を目指す生物化学の世界的研究者、並びに、細胞シートの多面的応用やiPS細胞を再生医療に用いることで世界に先駆けている医学研究者を結集した。これにより、バイオアセンブラの諸課題を解決し、学術的にも応用面でも大きな革新ができる体制が整った。

【研究動向の概観】

機械・制御工学と生物医学分野の融合分野の確立は、世界の目指す方向となっている。特に、サイズマッチングの良さのため、マイクロ・ナノロボティクスと細胞・生体組織制御の融合研究は急速に進みつつある。しかし、具体的医療での成果はまだない。その最も大きな理由は、3次元細胞システムを扱う**工学的的方法論の欠如**である。本提案は、細胞の特性を理解して3次元細胞システムを構築し、組織構築への原理を解明し、再生医療の基盤技術の大幅な底上げを図るという極めて明確なターゲットを持っている。それによって、理工学と生物医学の学術面でも、格段の進展を企図するものである。

【領域の取り組みと発展法】

3次元細胞システム構築と利用に関わるバイオアセンブラの革新的学術研究と開発を推進するため3つの研究グループを設定し、さらに、領域内外での共同研究を活発に推進する。

(1) 超高速マイクロ・ナノロボット技術を用いて細胞特性を計測し、3次元細胞システム形成に有用な活性細胞や希少細胞を超高速に分離する手法を開発するグループ（研究項目A01：細胞特性計測制御）。

(2) 超高速マイクロ・ナノロボット技術を用いて活性細胞を線・面・立体形状に形成し、積層・ロール・

折り紙などの手法を適用して多様な3次元細胞システムに組み立て構築する技術を開発するグループ（研究項目 A02：3次元細胞システム構築）。

(3)再生医療に有用な3次元細胞システムの機能や構造を解明し、作製された3次元細胞システムを動物内の組織に移植して機能化を評価し再生医療を革新するグループ（研究項目 A03：3次元細胞システム機能解明）。

これらの計画研究グループと、方法論やターゲットの多様化を図るための公募研究（若手重視）の充実を図り、相互の連携・融合を促進することにより領域を発展させる。

【研究の対象】

・ **研究対象(2)** 異分野研究者の連携：マイクロ・ナノロボット工学，生物化学工学，組織創生と再生医療関連医学の3分野連携により，細胞システムの挙動を解明して組織構築への活動を誘導する「バイオアセンブラ」という新たな領域の発展を目指す。 **主に領域内の工学，バイオ，医学系の連携。**

・ **研究対象(3)** 多様な研究者による共同研究：工学・理学研究者の共同により細胞システムの3次元構造化・機能化を図るとともに，医学研究者の参加共同により3次元細胞システムの実証実験を実施して再生医療応用の妥当性を検証し，当該領域の飛躍的展開を目指す。 **広く領域外の工学，理学，医学系の連携。**

・ **研究対象(4)** 他研究領域への波及効果：細胞システムの挙動解明と3次元細胞システム構築の成果は，機械工学の底上げと生物化学の精緻化へのフィードバックとともに，再生医療・新薬開発・臨床診断分野への大きな波及効果をもたらす。 **主に産学連携を目指した共同研究。**

2. 研究成果

【領域全体の達成度】

最終目標である「体外で3次元組織を構築し機能発現の原理を解明する学理の創出」に対して，中間評価時までの期間前半では「計測特性制御，3次元細胞システム構築，及び機能解明の3つの項目間の連携を発展させ，それぞれの有望な方法論の確立」を行った。期間後半では，**研究対象(2)に対応する計画研究を中心とした領域内での工学とバイオ/医学の分野連携を図り**，細胞特性計測・分離，細胞システム組立，細胞システム観察と評価の新たな方法論を探索した。公募研究では計画研究を補完するものと同時に，3次元構築から機能発現までを一貫して示す研究も行った。その分野で目立つ超独創的，あるいは超チャレンジングな研究を推進させた。**研究対象(3)に対応して若手研究者を中心に再生医療応用を視野に入れた領域内外の異分野との連携も進展**させるとともに，**製薬や化学，機械など他分野への波及成果も上げる**ことにより**研究対象(4)への対応**を図った。下記表に示す通り，領域内外の多くの連携が実施され新学術領域としての大きな成果が上げられ，あわせて学理の体系化を図ることができ，100%の達成度と自己評価する。なお，各研究対象の連携における位置付けは次の通りである。**研究対象(2)：主に領域内の工学，バイオ，医学系の連携。****研究対象(3)：広く領域外の工学，理学，医学系の連携。****研究対象(4)：主に産学連携を目指した共同研究。**各研究対象に該当する学術論文や特許件数，本領域の達成度の自己評価を次表に示す。

目標	領域内外の異分野・多様な研究者の連携により、バイオアセンブラの学理である「細胞の特性計測・操作と応用」、「3次元細胞システム設計論」、「細胞社会学」の確立					
達成状況	領域内外の連携による成果(連携による論文、特許件数など)					達成度
	対象(2)	対象(3)	対象(4)	連携成果総数	その他	
A01	19	18	9	46	専門書発行	100%
A02	15	12	1	28	専門書発行	100%
A03	19	50	3	72	専門書発行	100%
B01	4	41	4	49	軟・硬組織モデルの実現	100%
領域全体	57	121	17	195		100%

【A01 班：細胞特性計測制御の達成度】

計画班、公募班共にすべてのグループが領域内連携を実施し、細胞特性計測に関する様々な計測方法および、細胞を分離する手法が示され、具体的な成果をもたらした。特に研究対象(2)(3)での成果が多く班全体として当初目標を100%以上達成していると自己評価する。(班長：新井史人)

有用な細胞を超高速に選りすぐる「細胞の特性計測・操作と応用(細胞ソート工学)」の基盤確立のため、未開拓であった細胞の物理的特性の計測と超高速分離技術の開発に着手した。マイクロ・ナノロボティクスを活用し、浮遊細胞や接着細胞などの物理的特性を高速かつ連続的に計測し、特定の細胞を分離する技術基盤を確立した(100%)。

計画研究では、新井史 G が浮遊細胞や細胞凝集体の機械的特性をマイクロ流体チップ内で連続的に計測する手法を確立した。液体中で 2nm の精度で位置を画像計測する技術やガラス・シリコンからなる高剛性チップの加工技術を開発し、サイズの異なる対象に拡張した。気液界面を用いた世界最高速レベルの細胞の高速分離・分注技術を開発し、細胞ソート工学の基盤を構築した(120%)。金子 G は血球細胞のマイクロ流体チップ内での通過時間に基づく硬さ指標を提案し、機械的特性評価方法を確立した(100%)。本手法に基づき、中内 G は金子 G と共同で末梢血中微量細胞選別のコンセプトを示した。チタニウムを使った人工骨髄で造血幹細胞の増殖を明らかにし、造血幹細胞の骨髄ホーミング能を利用したソーティングの有効性を示した。MEMS によるマイクロ流体システムを用いて iPS 細胞からの血小板誘導を促進した(100%)。

公募研究では、岡嶋 G が新しい AFM 計測技術により接着細胞の粘弾性特性の分布計測技術の基盤を確立し、細胞シートや組織・胚の計測を行った(100%)。武居 G は非侵襲かつオンラインで細胞濃度断面計測を行い、電極近傍の細胞移動速度から細胞の生死に依存した電気的特性を明らかにした(100%)。梅嶋 G は神経細胞移動における細胞核ダイナミクスおよび牽引力の定量的評価手法を確立し、神経細胞移動に関する細胞内分子機構の一端を明らかにした(核回転：キネシン、牽引力：アクチン-ミオシン)(100%)。安川 G は誘電泳動を利用し、特定の表面抗原を発現する細胞を迅速、簡便に識別し分離する手法を確立した。細胞-微粒子複合体の作製やウェル内へ導入など超高速分離、一括操作を確立した(100%)。鈴木郁 G は粒子内に細胞を培養した Cell ball を提案し、「細胞特性計測と分離」技術に貢献した(100%)。

対象(2) 領域内の連携の達成度合い：細胞の力学的特性計測のためのオンチッププローブ開発や細胞変形能の計測分解能を向上した。赤血球の疲労試験手法を開発し剛性のみで変形能を評価する手法を確立した(新井史、金子)。画像処理による細胞表面の濡れ性の評価手法を確立した。機構学を基に細胞シートを迅速に移植するデバイスを開発した(金子、大和)。iPS 細胞由来巨核球株からの血小板産生を促進するマイクロデバイスを開発した(新井史、中内、福田敏)。新規のメッシュ培養でヒト iPS 細胞から Trophoblast の誘導に成功した(中内、鷺津)。MSC の自己凝集能により様々な組織の Organ bud 作製に成功した(中内、武部、新井健)など、加工・計測・操作技術を基盤とし、非常に多くの領域内連携成果を上げた。(達成度120%)

対象(3) 領域外の連携の達成度合い：血管内での血管内皮障害無しの血小板凝集の可視化に成功した(中内, 東京大学)。1細胞のレオロジーの分布の定量化とその理論構築に初めて成功した(岡嶋, MIT, ニュルンベルグ大(独))。基板上に抗体固定化領域を作製し, 対応する表面抗原を有する細胞を選択的に捕捉した(安川, 東北大学)など, 数多くの成果をあげた。(達成度 100%)

対象(4) 産学連携の達成度合い: ヒト iPS 細胞から赤芽球株を誘導することに成功した(中内, テルモ(株))。イオンコンダクタンス顕微鏡を用いて神経細胞の形態形成の高分解能観察とその時間発展を明らかにした(岡嶋, NTT 物性基礎研究所)。レドックスサイクルと電荷蓄積法を組み合わせた高感度な電気化学計測システムの開発(安川, パナソニック(株))など, 数多くの成果をあげた。(達成度 100%)

【A02 班：3次元細胞システム構築の達成度】

計画班, 公募班共にすべてのグループが領域内連携を実施し, 超高速のハンドリングや様々な3次元組織構築の方法論が示され, 具体的な成果をもたらした。特に研究対象(2)(3)での成果が多く班全体として当初目標を100%以上達成していると自己評価する。(班長: 新井健生)

計画研究では, 新井健 G が「細胞システムを構成する細胞パーツの自動・高速構築」を目標とし, 細胞の世界最速自動ハンドリング, 任意形状の細胞パーツの作製, 細胞特性計測の自動化による高精度化の実現など世界に先駆ける成果を生み出した(110%)。福田敏 G は「マイクロ・ナノメカトロニクスを応用して細胞組織のアセンブリと細胞間ネットワーク構築」を目標とし, ハイドロゲルファイバーによる細胞アセンブリ, 生分解性材料(Gel-Ma)によるマイクロ構造体, iPS 細胞分化の巨核球からの血小板産生デバイス, 自己組織アセンブリによる管状構造体, 肝小葉状細胞構造体のアセンブリなど連携を中心に多様な成果を出した(100%)。関 G は「マイクロ流路技術を用いマイクロメートルサイズで制御された新規機能性材料の高速作製や複合的・機能的な細胞組織の構築」を目標とし, ゲルを利用した灌流培養による血管組織導入の機能的集積化, 肝細胞の共培養・機能維持, 細胞の伸長制御, マイグレーションアッセイ, ECM 材料(粒子・ファイバー・プレート)の作製と応用, フルイディクスによる細胞選抜など多彩な成果をあげた(100%)。竹内 G は「MEMS を用いてプレートを作製し, その上で細胞を培養し, 細胞の牽引力を利用した3次元組織構築法」を目標とし, 細胞折り紙技術による立体構造構築, 任意の神経様ネットワーク構築, プレートの3次元磁気操作による世界初の高分解能観察などユニークな成果をあげた(100%)。

公募研究では, 古澤 G が細胞足場の構造を分子スケールから足場全体のスケールまで制御, MCCG による広範囲に階層構造を持つ巨大再生組織を構築した(90%)。池田 G は細胞培養環境中の酸化ストレスがミトコンドリアの膜電位に与える影響を解明し, 酸化ストレス消去システムを構築し, 細胞の機能保持を達成した(100%)。寺村 G は細胞表面修飾剤 DNA-PEG 脂質を用いて豚島と異種細胞を組み合わせ, 糖尿病治療の応用可能性を明らかにした(100%)。井藤 G は低酸素センサ細胞の開発と組織構築への応用実証, 交流磁場刺激で遺伝子発現を誘導する遺伝子回路の作製, 磁力による遺伝子導入筋組織の作製を行った(100%)。

対象(2) 領域内の連携の達成度合い：ハイドロゲルファイバーを用いた3次元構築(新井健, 関), 任意形状の細胞培養を可能とする可変デバイス(新井健, 大和), マイクロCTによる骨芽細胞観察(福田敏, 鈴木, 益田, 古澤), ハイドロゲルファイバーによる細胞アセンブリ(福田敏, 関), iPS 細胞分化の巨核球からの血小板産生デバイス(福田敏, 新井史, 中内), ゲルを利用した骨組織再生(関, 鈴木), 光分解性ゼラチンを利用した血管組織作製(関, 杉浦), など非常に多くの領域内連携成果を上げた。(達成度 120%)

対象(3) 領域外の連携の達成度合い：ヒドラの発生過程における形態と発生力との相関解明(新井健, ハイデルベルグ大), 毛細血管の腎臓血管モデルとしての応用展開(福田敏, 名大)などが領域外機関との異分野融合連携による成果となった。(達成度 100%)

対象(4) 産学連携の達成度合い：ハイドロゲルファイバー内部での細胞培養技術(関, 大和)に係る特許を出願した。(達成度 80%)

【B01 班：3次元細胞システム機能解明の達成度】

本班は当初計画にはなく、A01, A02, A03の各班の目標を格段に進展させるとともに、3次元細胞システム構築から機能発現までを一貫して実現することを目標とした。血管構造を有する軟組織モデルの構築や肝臓、腎臓などの原基の自律的生成に成功するなど、当初の目標を上回る成果を達成しており、班全体として100%以上を達成したと自己評価する。(班長：新井健生)

鷲津 G はマイクロメッシュ培養でヒト iPS が栄養芽細胞に分化すること、足場構造により細胞の分化制御が可能なることを明らかにし、継代なしの新しい細胞培養方法を確立した(100~120%)。福田淳二 G はヒト iPS 細胞を用いた肝組織の構築、血管構造を備えた骨組織の構築、毛包原基の大量調製法を開発した(100~120%)。中村 G は転写印刷、Mold 法、ゲル Scaffold 法により人工心筋組織のパーツ作製と組立て、人工リンパ節の3次元構造モデルの構築を達成した(100%)。益田 G は管状組織多層構造体の構築と灌流培養システムとの融合、外部力学刺激による弾性線維形成機実現の成果を挙げた(100%)。松崎 G は In vitro で機能する人工モデル細胞システム実現の学理を構築し、複合的機能発現を示す皮膚モデル・がん浸潤モデル・胎盤バリアモデル・iPS 心筋モデルの応用例を示した(120%)。松本 G は MCSF が唾液腺成長に重要で組織内マクロファージが増えること、骨石灰化は機械的刺激による細胞の破裂が大きく関与していることなど、新たな生物学的発見した(120%)。武部 G は Organ Bud 形成の原理解明とその拡張性を実証し、ヒト器官原基の細胞内外環境の最適化、その粘弾性評価系を確立と Oxy Chip 下で Liver Bud を高機能化する酸素供給条件を明示し、ヒト器官原基の移植という新しい治療概念を実証した(110%)。小島 G は胆管を備えたスフェロイドの構築と薬物代謝のリアルタイム計測で成果をあげた(100%)。杉浦 G は流路構造を自在に設計可能なハイドロゲル包埋培養系の灌流培養システムの構築で成果をあげ、その材料やデバイスは癌細胞分離や創薬デバイスに大きな波及効果をもたらした(100%)。

対象(2) 領域内の連携の達成度合い：メッシュ培養と RT-PCR 分析(鷲津, 中内), 三次元細胞培養デバイス(福田淳, 鈴木治), 管状組織多層構造体の構築(松崎, 新井史, 益田), ヒト器官原基の機能発現解明と評価(武部, 中内, 新井健), 光分解性ゲルの弾性率をマイクロスケールで自在に制御する技術(杉浦, 水谷)など活発な領域内連携により多くの成果を得た。(達成度 110%)

対象(3) 領域外の連携の達成度合い：筋芽細胞の多層構造を作製し、筋肉組織へ分化誘導制御した。筋芽細胞の収縮抑制に効果を示す薬剤を共同で発見した。(松崎, Glenoble-INP(仏))(達成度 90%)

対象(4) 産学連携の達成度合い：LbL 法で肝細胞表面にナノ薄膜を形成し、三次元肝組織を構築して肝機能を評価した。(松崎, 三菱製紙(株))(達成度 100%)

【当該学問分野及び関連学問分野への貢献度】

本領域のような異分野の研究者が密に連携している研究プロジェクトの国際的優位性は高く、2015年の Biofabrication の国際学会でボードメンバが Biofabrication を再定義し、Bioassembly が主要な概念の一つであると認められた。これは Bioassembler が国際的にも新たな学術領域として認められた証である。

研究項目 A01 では、計測対象の力学的特性に応じたマイクロ流体チップの設計論及び加工技術を確立し、位置計測精度の向上を実現した。プローブ顕微鏡を用いて1細胞の動的弾性率を網羅計測する原理や誘電泳動による極めて迅速な「細胞の配列体作製技術」を確立し、細胞診断や細胞材料の選定のための基礎計測の方法論を確立した。細胞の粘弾性の違いから超微量細胞を検出できる原理を示し、胎児診断、ガンの予後の予測などの検査への可能性を拓いた。マイクロ流路により体内血流を in vitro で再現し、iPS 細胞由来巨核球株からの効率的に血小板を産生できるシステムの方法論を示した。以上の成果は、細胞やスフェロイドの特性と力学的及び化学的マルチパラメータの関連を明らかにし、組織構築の効率化、高品質化における重要な基盤技術となる。また、材料疲労試験の考え方をバイオ分野に応用し、細胞ストレス試験という方法論を新たに提唱したことは工学・バイオ分野を融合する観点からその貢献は大きい。

研究項目 A02 では、新たな細胞・細胞集団の操作方法の提案、これまで不可能であった生体内を模倣したモデルシステムとしての評価系の構築、3次元生体組織構築のための新規プロセスの原理を示した。例えば、細胞を1秒未満で把持・配置可能な世界最速のマイクロハンドシステムは、組織工学に有用だけでなくロボティクスを応用した高速微細作業として企業からも注目されている。マイクロプレートを用いた3次元構造体の構築法は、接着細胞の任意形状の組立てや3次元的操作を可能とし、細胞の高分解能観察を実現し、他分野にブレイクスルーをもたらした。また、マイクロ流路内の層流パターンの制御により、ハイドロゲル材料中に複数種の細胞を高密度かつ位置制御して配置する手法を開発し、生体内の微細環境を模倣した培養系を実現した。さらに、コラーゲン分子からミニ再生組織の空間的配置までの広範囲で階層構造をもつ3次元再生組織を構築する新たな方法論も確立した。これらの方法によって構築されたモデルシステムは、構造と機能の相関という生理学の重要課題解明に貢献した。臨床応用へ向けた取り組みとして、患者由来の細胞により臍島との3次元複合体の開発に成功し、当該分野に大きな進展をもたらした。

研究項目 A03 では、次世代型の温度応答性細胞培養表面を開発するとともに、肝・神経等の複雑構造、機能を有する組織構築を *in vitro* で再現するのみならず、長期的にこれを維持させる先駆的な方法論が示された。ロボティクス技術と温度応答性表面、細胞シート工学を融合させることで、生体組織の複雑かつ複数種の細胞外マトリックスパターンを模倣しうる精密なマイクロパターンニング装置の開発や、ヒト臨床現場での細胞シート移植に耐えうる高速細胞シート移植デバイスの開発にも成功し、産業化に向けた共同研究の開始につながった。硬組織の再生においては、3次元細胞システムを *in vitro* で構築することによりはじめて硬組織由来細胞における3次元の相互作用の影響、酸素そして石灰化相が細胞に示す役割を明らかにした。細胞組織体の構築原理と機能の解明は、組織工学、バイオマテリアルサイエンス、また整形外科学分野をはじめとする医療分野を含む広い学問領域への貢献が期待できる。

研究項目 B01 では、立体組織構築に幅広い波及効果のある細胞の分化を制御する技術、厚みのある骨組織および肝組織を作り出すための送液可能な血管網構造を作製する技術を開発した。微細メッシュ上で細胞の継代培養を要せず長期間の大量培養する原理を見出した。メッシュの大きさの適切な選択により、ヒト iPS 細胞がトロフォブラストに分化することを発見し、足場の幾何学が分化に明確な影響を与える初の例となった。新たに開発した生体組織光分解造形法は、流路構造を自在に設計可能であり、様々な細胞システムの構築だけでなく癌細胞分離や創薬など他の研究の発展に大きな波及効果をもたらした。さらには、機能性ペプチドで修飾したハイドロゲルが生体組織の成長を促進することを示し、世界に先駆けて生体外で造った組織の形、成長を自在に調整する試みとなった。また、ヒト iPS 細胞からの器官原基創出の原理が明らかとなり、本発見は2013年に科学雑誌 *Science* により画期的な発見の上位10件に選ばれ大きなインパクトを与えた。さらに、発表論文(T. Takebe ら *Nature* 2013)の引用数は2016年5月で415報(*Google scholar*)となり国際的な波及効果を示す一例となっている。

これらの本新学術領域研究で明らかにした原理や手法、開発した新材料や新デバイスは、工学、生物学、医学とその融合分野の発展に寄与するのみならず、薬学、農学といった他の新たな分野との融合研究領域の発展にも大きな波及効果をもたらすであろう。

3. 主な研究発表

【研究項目 A01：細胞特性計測制御】

高精度オンチップ力計測システムの構築：マイクロ流体チップ内での高精度の細胞の力計測を実現するため、モアレ干渉縞を用いた高精度な位置計測技術を開発した。微細加工技術を用いてマイクロ流体チップのプローブ及びセンサの可動部にモアレ干渉縞のための微細構造を作製し、画像処理を行うことで、位置計測精度を 42 nm に向上させ、精密な力計測を可能とした(図 3-1)。(計画, H.Sugiura ら *Micromachines* 2015[1]) **(領域内連携)**

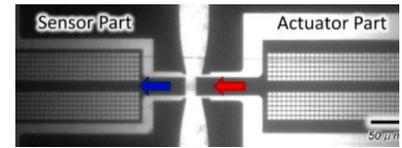


図 3-1. 力計測チップ

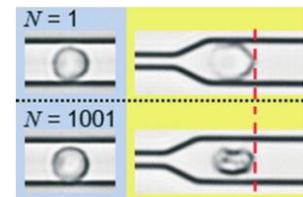


図 3-2. 細胞ストレス試験

超高速細胞マニピュレーションの達成：On-Chip マイクロ流路内の細胞を実時間高速ビジョンで顕微鏡観察し、ピエゾアクチュエータにより補償制御するという方法で、最高周波数 130Hz, 細胞位置決め精度 250μm を実現した。この制御法を用いて世界で初めて細胞ストレス試験に成功した(図 3-2)。(計画, S.Sakuma ら *Lab-on-a-Chip* 2014[5]) **(領域内連携)**

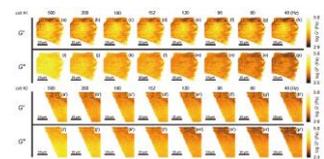


図 3-3. 多重周波数の高速レオロジーマッピング

細胞物性を利用した末梢血中微量細胞検出法の開発：マイクロ流路と超高速カメラ撮影を利用して、細胞の直径とマイクロ流路通過速度の違いによって特定の細胞集団を分離できる可能性を示すことができた。さらに、マウスにおいてヒト有核赤血球を循環させるシステムを構築した。(計画, S.Hirose ら *Stem Cell Reports* 2013[7])

多重周波数を用いた高速細胞レオロジー計測技術の開発：多重周波数ロックイン技術を用いて、高速に細胞レオロジー空間マッピングを行う新技術を開発した(図 3-3)。細胞内部のレオロジー分布の計測が可能になり細胞の力学選別法として利用できる(公募, R. Takahashi ら *Applied Physics Letters* 2015[11])

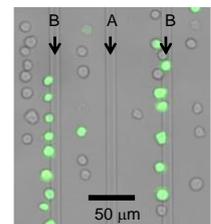


図 3-4. 細胞分離

超高速配列と識別の達成：誘電泳動による細胞の高速配列化技術を開発した。微小流路内でランダムに分散する細胞を 1 秒で配列化した。印加する交流電圧の強度、周波数、位相により配列化位置を制御した。配列位置の変換と免疫反応を融合し、迅速(2分)で簡便(ラベル化不要)な表面抗原発現細胞の識別を達成し、細胞の分化進行度を計測した(図 3-4)。(公募, T.Yasukawa ら *Anal. Chem.* 2012[15])

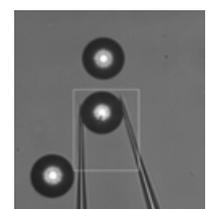


図 3-5. 高速把持

【研究項目 A02：3次元細胞システム構築 計画研究】

超高速マニピュレーションの達成：高速な細胞アセンブリのための二本指マイクロハンドを用いた微小対象物の高速マニピュレーション技術を開発した。40-60μm のガラスビーズを対象に平均で位置決めと把持に 840ms で 100%の成功率、搬送と解放に 670ms で 84%の成功率を達成した(図 3-5)。(計画, E.Avci ら *IEEE Transactions on Industrial Electronics* 2015[21])

細胞包埋型マイクロ構造体の高速自己組織アセンブリデバイス：マイクロ流体チップ中で作製した細胞包埋型マイクロ構造体を、マイクロ流路の流れを利用して、0.5 layer/sec 以上、90%以上の成功率でチューブ状構造体へアセンブリするデバイスを構築した(図 3-6)。またバルブをデバイス中に組み込むことで、アセンブリした構造体の取り出しを可能とした。(計画, T.Yue ら *Lab. on Chip*, 2014 [24])

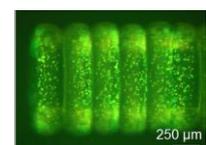


図 3-6. チューブ状細胞構造体

複数種の細胞を配列したハイドロゲル材料の作製：高速かつ正確に複数種の細胞を包埋したハイドロゲル材料を作製するための、マイクロ流体工学システムを開発した。断面異方性のファイバーやシートを作製し、肝細胞共培養系の開発(図3-7)、神経細胞の伸長方向制御、がん細胞の浸潤アッセイデバイスなどの新規細胞培養系を実証し、その有用性を示した。(計画, M.Yamada ら *Biomaterials* 2012[29]) **(領域内連携)**



図3-7. 肝細胞ファイバー

細胞折り紙技術による三次元構造の構築：高速な三次元組織構築のためにヒンジ付きのマイクロプレートを開発した。このマイクロプレート上に細胞を播種することで六面体やチューブなどの三次元構造を構築することに成功した(図3-8)。(計画, K.Kuribayashi-Shigetomi ら *PLOS ONE* 2012[30])

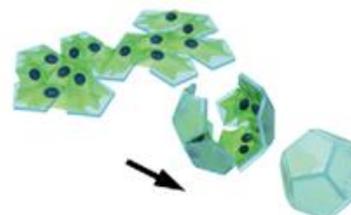


図3-8 細胞折り紙技術

磁力を用いた三次元筋組織の構築：高速三次元細胞システムの構築として、磁性ナノ粒子で筋芽細胞を磁気標識することで、磁力を用いて遺伝子導入筋組織を構築し、機能する(強い収縮力を示す)三次元筋組織を構築した。筋分化を促進する IGF-I 遺伝子と、組織内部の低栄養/低酸素状態でのアポトーシスを阻害する Bcl-2 遺伝子を筋芽細胞に共導入することで、高度な筋分化かつ高い細胞密度の三次元筋組織を作製することに成功した。(公募, K. Ikeda ら *Regenerative Therapy* 2016[38])

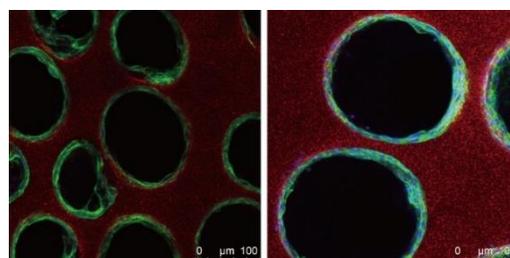


図3-9. MCCG 構造の調製により上皮管腔組織の直径や本数を制御可

MCCG を用いた再生上皮管腔組織の構築技術の確立：コラーゲン水溶液をリン酸緩衝液中に透析することで生体模倣的な多管構造を持つコラーゲンゲル (MCCG) を調製することができる(図3-9)。MCCG の多管構造を血管や尿細管などの上皮管腔組織の鋳型として使い、再生上皮管腔組織を構築することに成功した。さらに、MCCG の多管構造の制御技術を組み合わせることで再生組織管腔組織の形態を制御することにも成功した。(公募, K. Furusawa ら *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015[34]) **(領域内連携)**

DNA-PEG 脂質を用いたバイオ人工膵臓の開発：レシピエント由来の細胞を利用して、生きた細胞により膵ランゲルハンス島(膵島)との3次元複合体を構築して、移植後の免疫拒絶反応を抑制できる生体適合性の高いバイオ人工膵臓を開発した。両親媒性高分子である DNA-ポリエチレングリコール結合脂質 (DNA-PEG 脂質) を利用して、膵島表面に異種細胞である血管内皮細胞、線維芽細胞などの様々細胞との3次元複合化に成功した。特に、異なる細胞同士の細胞接着を詳細に調べ、細胞を自在に接着制御できる DNA-PEG 脂質の開発に成功した。(公募, Y.Teramura *Biomaterials* 2015[37])

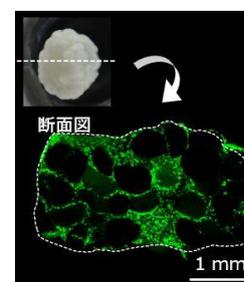


図3-10. 血管を含む骨組織

血管構造を備えた骨組織の構築：ゲルビーズに包埋した間葉系幹細胞の牽引力により自発的に凝集し、高い骨誘導効果のあるゲルビーズの作製法を確立した。そして、ゲル内部で血管内皮細胞の自発的な血管新生と骨芽細胞への分化誘導を行うことで、微小な血管構造を備えた骨組織を作製し、小動物を用いて骨欠損の治療効果が高いことを示した

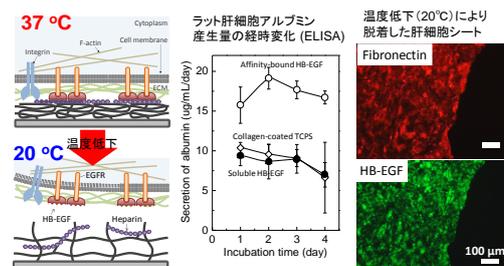


図3-11. ヘパリン固定化型温度応答性細胞培養表面と作製した肝細胞シートの特

(図3-10)。(公募, Y. Kang ら *Acta Biomaterialia* 2015[40])

【研究項目 A03：3次元細胞システム機能解明】

細胞外マトリックス環境を模倣したヘパリン固定化温度応答性細胞培養表面による肝細胞シート・肝組織の作製への応用と評価：増殖因子をアフィニティー結合により表面導入するためのヘパリン修飾温度応答性表面を開発し、ラット由来からの肝細胞を播種することで、従来よりも少ない増殖因子の量で肝細胞シートの作製を実現し、さらにアルブミン等の肝機能を長期的に維持し、皮下移植に耐える肝細胞シートを作製することに成功した(図3-1 1)(計画, J. Kobayashi ら J Biomed Mater Res Part A 2014[43], Regen Ther 2016[44]).

三次元環境における細胞分化とミネラル成分の関連性の解明：酸素透過性スフェロイド培養デバイスにて MSC 株細胞スフェロイドとミネラル相の複合化に成功した((図3-1 2). OCP が三次元培養細胞を活性化することを明らかにした(計画, T. Anada ら Biomaterials 2012[48]) **(領域内連携)**

細胞の収縮エネルギー評価法の開発：細胞がゲル基質に発生させている収縮エネルギーを評価することに成功した. iPS 細胞から誘導した心筋細胞を蛍光ラベルしたコラーゲンゲル上に培養し(図3-1 3), ゲルに生じた変形を観察することで, 個々の細胞が発生する収縮エネルギーを評価することに成功した. (公募, T. Mizutani ら Regenerative Therapy 2016[49]) **(領域内連携)**

損傷脳再生用バイオマテリアルの開発：基底膜成分を由来とした多孔性マテリアルをニューロンの人工足場として損傷した脳の中心部に移植することで, ニューロンを損傷中心部まで遊走させ, 配置させることに成功した. また, ラミニンを材料にして作製したラミニンスポンジにも同様な活性があったことから, ニューロンの遊走活性にはラミニンが重要であることが示唆された(公募, Ajioka ら Tissue Eng Part A 2015[50]).

ヒト器官原基創出技術の確立：ヒト iPS 細胞から立体的な肝臓原基を自律的に創出する培養手法を確立した. 本肝臓原基をマウス生体内へ移植するとヒト血管網を持つ機能的な肝臓へと成長し, 早期の段階で血液灌流がおこなわれ, 最終的に治療効果が発揮されることを明らかにした(図3-1 4). (公募, T.Takebe ら Nature 2013[57]).

【研究項目 B01：組織構築と機能発現】

メッシュ培養法による分化誘導：メッシュのサイズに依存してヒト iPS 細胞がトロフォブラストに分化することを示した(図3-1 5). (公募, K.Okeyo ら Tissue Eng Part C Methods, 2015[58]) **(領域内連携)**

ヒト iPS 由来肝細胞を用いた血管構造を含む肝組織の構築：電気化学反応を利用した細胞脱離を利用して, 送液可能な血管組織の作製法を確立した. そして, 送液培養において, さらに微小な毛細血管網を血管内皮細胞に形成させ, ヒト iPS 細胞由来肝細胞スフェロイドと相互作用することで肝機能が向上することを示した(図3-1 6). (公募, T.Osaki ら PLoS ONE 2015[59])

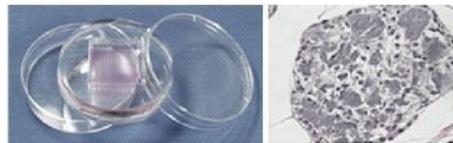


図3-1 2 MSC 細胞塊とミネラル相複合体

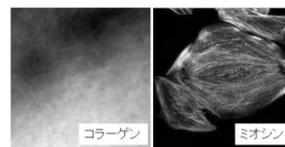


図3-1 3. ゲル上の心筋細胞

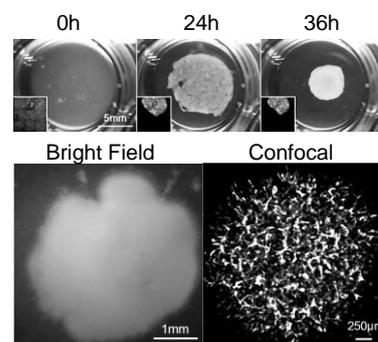


図3-1 4 ヒト iPS 細胞由来肝臓原基

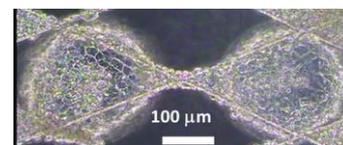


図3-1 5. 形成されたトロフォブラスト

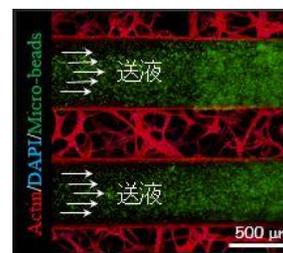


図3-1 6. 血管を含む肝組織

多機能性 3次元皮膚モデルの構築と複合的機能発現：従来の三次元組織構築法の課題であった高速構築を実現するため、5分以内の処理で容易に三次元組織体が構築可能であり、高い収率と低ダメージを特徴とする新しい組織構築法を開発した。本手法は、連続組織化が可能であり、自動化にも適しているため、新しい高速構築のための良い手法となることが期待される。また、皮膚モデルによる免疫原を補足して活性化した樹状細胞の毛細リンパ管への侵入や（図3-17）、血管壁モデルによるナノ粒子の透過と蓄積の最適化など、様々な組織モデルで複合的機能を確認することができた。（公募, P.Chetprayoon ら *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 4461-4466 2016[62]）

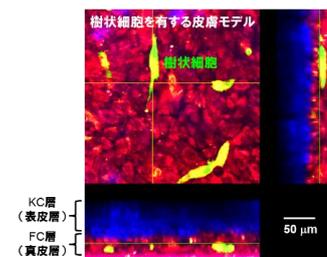


図3-17. 樹状細胞を有する皮膚モデル

iPS 細胞の三次元集合体から骨組織を生成：iPS 細胞の三次元集合塊を作製し、適切な分化誘導をかけることで任意形状、任意サイズの骨組織生成に成功した。また、この組織形成時に血管内皮細胞を介在させることで血管ネットワークを有する骨組織生成にも成功した。（公募, H.Okawa ら *Stem Cells Int*, 2016[63]）

ヒト器官原基の形成原理解明と拡張：ヒト iPS 細胞由来肝臓原基創出には、間葉系細胞と最適な硬さ環境が必須であることを明らかにした。また肝臓以外の臓器から分離した細胞からの器官原基創出に成功し尿産生する腎組織や糖尿病治療効果を有する膵組織を生み出すことに成功した（図3-18）。（公募, T.Takebe ら *Cell Stem Cell* 2015, *J Clin Invest*, 2014[64]） **（領域内連携）**

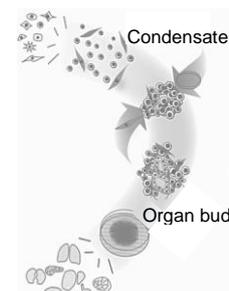


図3-18 自律的な臓器原基創出

【主な雑誌論文:全て査読有】

A01 計画研究 その他含め計 147 件

- [1] On-Chip Method to Measure Mechanical Characteristics of a Single Cell by Using Moiré Fringe, *H. Sugiura, S. Sakuma, M. Kaneko, F. Arai, *Micromachines*, Vol. 6, No. 6, pp. 660-673, 2015. **対象(2) (工学と生物学) (主な研究成果)**
- [2] Microfluidic perfusion culture system for multilayer artery tissue models, Y. Yamagishi, *T. Masuda, M. Matsusaki, M. Akashi, U. Yokoyama, F. Arai, *Biomicrofluidics*, Vol. 8, 064113, 2014. **対象(3) (工学と生物学)**
- [3] On-chip microrobot for investigating the response of aquatic microorganisms to mechanical stimulation, *T. Kawahara, M. Sugita, M. Hagiwara, F. Arai, H. Kawano, I. Ishikawa, A. Miyawaki, *Lab on a Chip*, Vol. 13, Issue 6, pp. 1070-1078, 2013. **対象(3) (工学と生物学)**
- [4] Cell Pinball: Phenomenon and Mechanism of Inertia-Like Cell Motion in a Microfluidic Channel, R. Murakami, *C. Tsai, M. Kaneko, S. Sakuma and F. Arai, *Lab on a Chip*, vol.15, pp.3307-3313, 2015. **対象(2)**
- [5] Red Blood Cell Fatigue Evaluation based on the Close-encountering Point between Extensibility and Recoverability, *S. Sakuma, K. Kuroda, C. Tsai, W. Fukui, F. Arai and M. Kaneko, *Lab on a Chip*, vol.14, no.6, pp.1135-1141, 2014. **対象(2) (主な研究成果)**
- [6] Splitting Culture Medium by Air-Jet and Rewetting for the Assessment of the Wettability of Cultured Epithelial Cell Surfaces, N. Tanaka, M. Kondo, R. Uchida, M. Kaneko, H. Sugiura, M. Yamato, *T. Okano, *Biomaterials*, vol.34, no.36, pp.9082-9025, 2013. **対象(2) (工学と医学)**
- [7] Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. Hirose S, Takayama N, Nakamura S, Nagasawa K, Ochi K, Hirata S, Yamazaki S, Yamaguchi T, Otsu M, Sano S, Takahashi N, Sawaguchi A, Ito M, Kato T, Nakauchi H, *Eto K. *Stem Cell Reports*, Dec 5;1(6):499-508, 2013. **(主な研究成果)**
- [8] Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, Takayama N, Nakauchi H, Arai F, *Fukuda T, *Eto K. *Exp Hematol*, Aug ;41(8):742-8, 2013. **対象(2) (工学と医学)**

[9] Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. Ochi K, Takayama N, Hirose S, Nakahata T, Nakauchi H, *Eto K. *Stem Cells Transl Med*, Jul;3(7):792-800, 2014.

A01 公募研究 その他含め計 51 件

[10] Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells, M. Kajita, K. Sugimura, A. Ohoka, J. Burden, H. Suganuma, M. Ikegawa, T. Shimada, T. Kitamura, M. Shindoh, S. Ishikawa, S. Yamamoto, S. Saitoh, Y. Yako, R. Takahashi, T. Okajima, J. Kikuta, Y. Maijima, M. Ishii, M. Tada, and *Y. Fujita, *Nature Communications*, Vol. 5, pp. 4428, 2014. **対象 (3) (工学と生物学)**

[11] Mapping power-law rheology of living cells using multi-frequency force modulation atomic force microscopy, R. Takahashi, *T. Okajima, *Applied Physics Letters*, Vol. 107, pp.173702, 2015. **(工学と生物学) (主な研究成果)**

[12] Spatial Concentration Distribution Analysis of Cells in Electrode-Multilayered Microchannel by Dielectric Property Measurement, *J. Yao, T. Kodera, H. Obara, M. Sugawara, and M. Takeji, *Biomicrofluidics*, vol.9, pp. 044129, 2015. **(工学と医学)**

[13] Development of Three-dimensional Integrated Microchannel-Electrode System to Understand the Particles Movement with Electrokinetics, J. Yao, *H. Obara, Achyut Sapkota, and Masahiro Takeji, *Biomicrofluidics*, vol. 10, no.2, pp. 024105, 2016.

[14] Cell Pairing Using Microwell Array Electrodes Based on Dielectrophoresis, Y. Yoshimura, M. Tomita, F. Mizutani, *T. Yasukawa, *Anal. Chem.*, vol.86, pp.6818-6822, 2014. **対象 (3)**

[15] Simple detection of surface antigens on living cells by applying distinct cell positioning with negative dielectrophoresis, *Tomoyuki Yasukawa, Hironobu Hatanaka, Fumio Mizutani, *Anal. Chem.*, 2012, 84(20), 8830-8836. DOI: 10.1021/ac302239k **(主な研究成果)**

[16] Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons, Odawara, A., Katoh, H., Matsuda N., and *Suzuki, I. *Biochem Biophys Res Commun.*(2016), 469(4):856-62.

[17] Quantifying Cell-to-Cell Variation in Power-Law Rheology, P.G. Cai, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, J. M. Maloney, B. Fabry, K. J. Van Vliet, *T. Okajima, *Biophysical Journal*, Vol. 105 (2013) 1093-1102. **対象 (3) (工学と生物学)**

[18] Nanoscale fluctuations on epithelial cell surfaces investigated by scanning ion conductance microscopy, Y. Mizutani, M.-H. Choi, S.-J. Cho, *T. Okajima, *Applied Physics Letters*, Vol. 102 (2013) pp.173703 (4pages). **対象 (3) (工学と生物学)**

[19] Self-Projected Light-Section Method for Fast Three-Dimensional Shape Inspection, *International Journal of Optomechatronics*, *Hao Gao, Qingyi Gu, Takeshi Takaki, Idaku Ishii : Vol.6, No.4, pp.289-303 (2012)

[20] Cell Pairing Using Microwell Array Electrodes Based on Dielectrophoresis, Y. Yoshimura, M. Tomita, F. Mizutani, *T. Yasukawa, *Anal. Chem.*, vol.86, pp.6818-6822, 2014. **対象 (3)**

A02 計画研究 その他含め計 116 件

[21] High-Speed Automated Manipulation of Microobjects Using a Two-Fingered Microhand, *E. Avci, K. Ohara, C.N. Nguyen, C. Theeravithayangkura, M. Kojima, T. Tanikawa, Y. Mae, T. Arai, *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, vol.62, no.2, pp.1070-1079, 2015. **(主な研究成果)**

[22] Automated Construction System for 3D Lattice Structure Based on Alginate Gel Fiber Containing Living Cells, *K. Ohara, M. Kojima, A. Fukushima, S. Onozaki, M. Horade, M. Yamada, M. Seki, Y. Mae, T. Arai, *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol.25 No.4, pp.665-672, 2013. **対象 (2)**

[23] Design and Fabrication of Changeable Cell Culture Mold, *P. Chumtong, M. Kojima, K. Ohara, Y. Mae, M. Horade, Y. Akiyama, M. Yamato, T. Arai, *Journal of Robotics and Mechatronics*, vol.25, no.4, pp.657-664, 2013. **対象 (2) (工学と生物学)**

[24] On-chip self-assembly of cell embedded microstructures to vascular-like microtubes, *T. Yue, M. Nakajima, M. Takeuchi, C. Hu, Q. Huang, T. Fukuda, *Lab on a Chip*, Vol. 14, pp. 1151-1161, 2014 **(主な研究成果)**

[25] On-chip Fabrication of Magnetic Alginate Hydrogel Microfibers by Multi-Layered Pneumatic Microvalves, *C. Hu, M. Nakajima, M. Takeuchi, T. Yue, M. Seki, Q. Huang, T. Fukuda, *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol. 17, pp. 457-468, 2014 **対象 (2)**

[26] Nanofork for Single Cells Adhesion Measurement via ESEM-Nanomanipulator System, *M. R.

- Ahmad, M. Nakajima, M. Kojima, S. Kojima, M. Homma, T. Fukuda, IEEE Transactions on Nanobioscience, Vol. 11, pp. 70-78, 2012
- [27] Cell-sized Condensed Collagen Microparticles for Preparing Microengineered Composite Spheroids of Primary Hepatocytes, *M. Yamada, A. Hori, S. Sugaya, Y. Yajima, R. Utoh, M. Yamato, and M. Seki, *Lab on a Chip*, vol. 15, no.19, pp.3941–3951, 2015. **対象(2) (工学と生物学)**
- [28] Patterned Hydrogel Microfibers Prepared by Using Multilayered Microfluidic Devices for Guiding Network Formation of Neural Cells, Y. Kitagawa, Y. Naganuma, Y. Yajima, *M. Yamada, and M. Seki, *Biofabrication*, vol. 6, no. 3, 035011, 2014.
- [29] Controlled Formation of Heterotypic Hepatic Micro-Organoids in Anisotropic Hydrogel Microfibers for Long-Term Preservation of Liver-Specific Functions, M. Yamada, R. Utoh, K. Ohashi, K. Tatsumi, M. Yamato, T. Okano, and *M. Seki, *Biomaterials*, vol. 33, no. 33, pp.8304–8315, 2012. **対象(2) (工学と生物学) (主な研究成果)**
- [30] Cell Origami: Self-folding of Three-Dimensional Cell-Laden Microstructures Driven by Cell Traction Force, K. Kuribayashi-Shigetomi, H. Onoe, *S. Takeuchi, PLoS ONE, vol. 7, no 12, p. e51085, 2012 **(主な研究成果)**
- [31] Parylene mobile microplates integrated with an enzymatic release and handling of single adherent cells, T. Teshima, H. Onoe, K. Kuribayashi-Shigetomi, H. Aonuma, K. Kamiya, H. Ishihara, H. Kanuka, *S. Takeuchi, *Small*, vol. 10, no 5, pp. 912-921, 2014. **対象(3) (工学と医学)**
- [32] High-Resolution Vertical Observation of Intracellular Structure using Magnetically Responsive Microplates, T. Teshima, H. Onoe, S. Tottori, H. Aonuma, T. Mizutani, K. Kamiya, H. Ishihara, H. Kanuka, and *S. Takeuchi, *Small*, accepted **対象(3) (工学と医学)**
- A02 公募研究 その他含め計 60 件
- [33] Epithelial Sheet Folding Induces Lumen Formation by Madin-Darby Canine Kidney Cells in a Collagen Gel, S. Ishida, R. Tanaka, N. Yamaguchi, G. Ogata, T. Mizutani, K. Kawabata, and *H. Haga, PLOS ONE, 9, e99655, 1-11, 2014.
- [34] Application of multichannel collagen gels in construction of epithelial lumen-like engineered tissues, *Kazuya Furusawa, Takemomi Mizutani, Hiromi Machino, Saki Yahata, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2015, 1, 539-548. **対象(2) (工学と生物学) (主な研究成果)**
- [35] Development of the evaluation system for barrier functions of engineered epithelial lumens, *Kazuya Furusawa, Takemomi Mizutani, Naoki Sasaki, *Regenerative Therapy*, 2016, 3, 82-89. **対象(2) (工学と生物学)**
- [36] Design of antioxidative biointerface for separation of hematopoietic stem cells with high maintenance of undifferentiated phenotype, Y. Ikeda, T. Yoshinari, H. Miyoshi, *Y. Nagasaki, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, in press.
- [37] Cell surface modification with ssDNA–PEG–lipid for analysing intercellular interactions between different cells, *Yuji Teramura, *Biomaterials*, Vol.48, pp.119-128, 2015. **対象(3) (工学と生物学) (主な研究成果)**
- [38] Improved Contractile Force Generation of Tissue-Engineered Skeletal Muscle Constructs by IGF-I and Bcl-2 Gene Transfer with Electrical Pulse Stimulation, K. Ikeda, A. Ito, M. Sato, Y. Kawabe, *M. Kamihira, *Regenerative Therapy*, vol.3, pp.38-44, 2016. **(主な研究成果)**
- [39] Salt is an oxidative stressor for gastric epithelial cells, M Tamura, *H Matsui, Yumiko N. Nagano, T Kaneko, H P Indo, H J Majima, I Hyodo, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2013, 64(1). 89–94
- [40] Engineering a vascularized collagen- β -tricalcium phosphate graft using an electrochemical approach, Y. Kang, N. Mochizuki, A. Khademhosseini, J. Fukuda, *Y. Yang, *Acta Biomaterialia*, vol.11, pp.449-458, 2015. **(主な研究成果)**
- [41] Quantitative Evaluation of Adhesion of Osteosarcoma Cells to Hydrophobic Polymer Substrate with Tunable Elasticity, *H. Y. Yoshikawa, J. Cui, K. Kratz, T. Matsuzaki, S. Nakabayashi, A. Marx, U. Engel, A. Lendlein, M. Tanaka, *J. Phys. Chem. B*, 116 (2012) 8024. **対象(3)**
- [42] Optical cell separation from three-dimensional environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques, M. Tamura, F. Yanagawa, *S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru, H. Matsui and T. Kanamori, *Sci. Rep.*, Vol.4, pp.4793, 2014. **対象(2) (工学と医学)**
- A03 計画研究 その他含め計 72 件
- [43] Surface design of antibody-immobilized thermoresponsive cell culture dishes for recovering intact

- cells by low-temperature treatment, *Kobayashi, J.; Hayashi, M.; Ohno, T.; Nishi, M.; Arisaka, Y.; Matsubara, Y.; Kakidachi, H.; Akiyama, Y.; Yamato, M.; Horii, A.; Okano, T., J Biomed Mater Res A 102 (11), 3883-93, 2014. 対象(3) (工学と生物学) (主な研究成果)
- [44] A heparin-modified thermoresponsive surface with heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor for maintaining hepatic functions in vitro and harvesting hepatocyte sheets, *Y. Arisaka, J. Kobayashi, K. Ohashi, K. Tatsumi, K. Kim, Y. Akiyama, M. Yamato, T. Okano, Regenerative Therapy, vol. 3, pp.97-106, 2016. 対象(3) (工学と生物学) (主な研究成果)
- [45] A device for the rapid transfer/transplantation of living cell sheets with the absence of cell damage, *K. Tadakuma, N. Tanaka, Y. Haraguchi, M. Higashimori, M. Kaneko, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, Biomaterials, vol. 34, pp.9018-9025, 2013. 対象(2) (工学と医学)
- [46] Effect of mechanical stress on differentiation of mouse mesenchymal stem cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold. M Yamada, T Anada, T Masuda, T-T Yamamoto, *O Suzuki. Sens Actuator B Chem 220: 125-130, 2015. 対象(2) (工学と生物学)
- [47] The effect of an octacalcium phosphate co-precipitated gelatin composite on the repair of critical-sized rat calvarial defects. T Handa, T Anada, Y Honda, H Yamazaki, K Kobayashi, N Kanda, S Kamakura, S Echigo, *O Suzuki. Acta Biomater 8:1190-1200, 2012. 対象(3) (工学と生物学)
- [48] An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *T Anada, J Fukuda, Y Sai, *O Suzuki. Biomaterials 33: 8430-8441 2012. 対象(2) (工学と生物学) (主な研究成果)
- A03 公募研究 その他含め計 64 件
- [49] Heterogeneous Filament Network Formation by Myosin Light Chain Isoforms Effects on Contractile Energy Output of Single Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, *T. Mizutani, K. Furusawa, H. Haga, Kazushige Kawabata, Regenerative Therapy, Vol.3, pp.90-96, 2016. 対象(2) (工学と生物学) (主な研究成果)
- [50] Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge, *I. Ajioka, H. Jinnou, K. Okada, Ma. Sawada, S. Saitoh, and *K. Sawamoto, Tissue Eng Part A, vol.21, pp.193-201, 2015. 対象(3) (工学と生物学) (主な研究成果)
- [51] Tumor necrosis factor- α down-regulates the tumor suppressor gene REIC/Dkk-3 in normal skin keratinocytes, *Kataoka K, Maehara N, Ayabe Y, Murata H, Huh NH, Sakaguchi M, Molecular Medicine Reports (Accepted).
- [52] Partially photodegradable hybrid hydrogels with elasticity tunable by light irradiation, F. Yanagawa, T. Mizutani, *S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru, T. Kanamori, Colloids Surf B Biointerfaces, Vol. 126, pp. 575-579, 2015. 対象(2) (工学と生物学)
- [53] Modulation of extracellular conditions prevents the multilayering of the simple epithelium, *T. Mizutani, K. Takeda, H. Haga, M. Todo, K. Kawabata, Histochemistry and Cell Biology, Vol. 141 no.5, pp. 459-471, 2014. 対象(2) (工学と生物学)
- [54] A microfabricated platform to form three-dimensional toroidal multicellular aggregate, *T. Masuda, N. Takei, T. Nakano, T. Anada, O. Suzuki, F. Arai, Biomed Microdevices, Vol. 14, 1085-1093, 2012. 対象(2) (工学と生物学)
- [55] Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, Shinohara S, *Kihara T, Sakai S, Matsusaki M, Akashi M, Taya M, Miyake J, J. Biosci. Bioeng. 2013; 116: 231-234 対象(3)
- [56] Early initiation of endochondral ossification of mouse femur cultured in hydrogel with different mechanical stiffness. GA. Sathi, K. Kenmizaki, S. Yamaguchi, H. Nagatsuka, Y. Yoshida, A. Matsugaki, T. Ishimoto, S. Imazato, T. Nakano, *T. Matsumoto. Tissue Eng Part C Methods, vol. 21 pp. 567-575, 2015 対象(3) (工学と生物学)
- [57] Vascularized and Functional Human Liver from an iPSC-derived Organ Bud Transplant, *T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, RR. Zhang, Y. Ueno, YW. Zheng, N. Koike, S. Aoyama, Y. Adachi, *H. Taniguchi, Nature, no.499, pp.481-484, 2013. (主な研究成果)
- B01 公募研究 その他含め計 85 件
- [58] Cell Adhesion Minimization by a Novel Mesh Culture Method Mechanically Directs Trophoblast Differentiation and Self-Assembly Organization of Human Pluripotent Stem Cells, *Okeyo KO, Kurosawa O, Yamazaki S, Hidehiro O, Kotera H, Nakauchi H, Washizu M., Tissue Eng Part C Methods, 21(10), 1105-1115

- (2015) 2015 Apr 27, DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0038 **対象(2) (工学と生物学) (主な研究成果)**
- [59] Acceleration of vascular sprouting from fabricated perfusable vascular-like structures, T. Osaki, T. Kakegawa, T. Kageyama, J. Enomoto, T. Nittami, *J. Fukuda, PLoS ONE, vol.10, no.4, e0123735, 2015. **(主な研究成果)**
- [60] Bioprinting with pre-cultured cellular constructs towards tissue engineering of hierarchical tissues. *Nakamura M, Mir T A, Arai K, Ito S, Yoshida T, Iwanaga S, Kitano H, Obara C, Nikaido T. International Journal of Bioprinting, Vol.1, no.1, PP.39–48, 2015. **対象(3) (工学と医学)**
- [61] Microfluidic perfusion culture system for multilayer artery tissue models, Y. Yamagishi, *T. Masuda, M. Matsusaki, M. Akashi, U. Yokoyama, F. Arai, Biomicrofluidics, Vol.8, 064113:1-10, 2014. **対象(2) (工学と生物学)**
- [62] P. Chetprayoon, M. Matsusaki, U. Yokoyama, T. Tejima, *Y. Ishikawa, *M. Akashi, Use of Three-dimensional Arterial Models To Predict the In Vivo Behavior of Nanoparticles for Drug Delivery, Angew. Chem. Int. Ed. 55, 4461-4466 (2016). **対象(3) (主な研究成果)**
- [63] Scaffold free fabrication of osteoinductive cellular constructs using mouse gingiva-derived induced pluripotent stem cells. H. Okawa, H. Kayashima, J. Sasaki, J. Miura, Y. Kamano, Y. Kosaka, S. Imazato, H. Yatani, T. Matsumoto, *H. Egusa. Stem Cells Int, 2016 (2016) ID 6240794. doi:10.1155/2016/6240794 **(主な研究成果)**
- [64] Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation, *T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa, M. Kimura, H. Koike, Y. Ueno, T. Matsuzaki, T. Yamazaki, T. Toyohara, K. Osafune, H. Nakauchi, H-Y. Yoshikawa, H. Taniguchi, Cell Stem Cell, vol.16, no.5, pp556-565, 2015. (Selected as Cover Work) **対象(2) (工学と医学) (主な研究成果)**
- [65] Induction of hepatic tissues in multicellular spheroids composed of murine fetal hepatic cells and embedded hydrogel beads, *W. Motoyama, K. Sayo, H. Mihara, S. Aoki, N. Kojima, Regenerative Therapy, vol.3, pp.7-10, 2016. **対象(3) (工学と生物学と医学)**
- [66] A pneumatic pressure-driven multi-throughput microfluidic circulation culture system, *T. Satoh, G. Narazaki, R. Sugita, H. Kobayashi, *S. Sugiura and T. Kanamori, Lab Chip, in press, 2016. **対象(4)**

【書籍(専門)】(その他を含め, 5件)

- Eds. Tatsuo Arai, Fumihito Arai, Masayuki Yamato, "Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems," *Springer*, July 2015.
- 編者: 新井健生, 「3次元細胞システム設計論」, 組織工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合ー, 第2巻, コロナ社, B5判, 228頁, 2016年8月26日発行.
- 編者: 大和雅之, 「細胞社会学」, 組織工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合ー, 第3巻, コロナ社, B5判, 196頁, 2016年9月16日発行.
- 編者: 新井史人, 「細胞の特性計測・操作と応用」, 組織工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合ー, 第1巻, コロナ社, B5判, 270頁, 2016年12月12日発行.

【シンポジウム, 学会活動など】

領域主催のシンポジウム (その他を含め, 合計21件)

- バイオアセンブラ第10回シンポジウム(2016年3月22日)(東京:参加者68名, 外部企業6社)
- バイオアセンブラ第4回若手シンポジウム(2015年7月3日)(大阪:参加者103名, うち学生55名)
- バイオアセンブラ第5回国際シンポジウムをMHS2015と共同開催(2015年11月23-25日)(名古屋)

会議でのオーガナイズドセッション(OS)の開催 (その他を含め, 合計22件)

- 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2015にてOS:バイオアセンブラ(京都:京都市勧業館「みやこめっせ」), オーガナイザ:新井健生(大阪大学), 2015年5月18日

会議でのワークショップ(WS)の開催 (その他を含め, 合計7件)

- IROS2015(9月28~10月3日, Hamburg, Germany)にて, WS: Hyper Bio Assembler for 3D Cellular System Innovation, T. Arai, T. Fukuda, F. Arai, M. Kaneko, M. Yamato, 2015年9月28日
- 学術雑誌でのバイオアセンブラ特集号の発行 (その他を含め, 合計2件)

- Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.25, No.4, Special Issue of "BioAssembler" Aug. 2013.

【アウトリーチ活動】

一般向け講演会やイベント参加・出展など(その他を含め, 合計 149 件)

1. F. Arai, “未来の医療ロボットを創る！ーバイオニックな視点からみた最先端技術の紹介ー”, Special Lecture, 名大カフェ, 2013 年 11 月 21 日
2. 新井健生, “超高速バイオアセンブラー マイクロロボティクスとバイオの融合による再生医療への貢献ー”, 基礎工学部談話会ー再生医療と基礎工学ーにて講演, 2013 年 3 月 18 日
3. 大和雅之, “最新お科学・技術を青少年にアピールする科学・技術フェスタ”, 2013 年 3 月 16-17 日

新聞・雑誌・テレビ報道など (その他を含め, 147 件)

1. 福田淳二, 読売新聞(朝刊)13 面, 「工学が担う再生医療や人工臓器の開発」2015. 12. 26

【国際学会における招待講演・基調講演】(その他を含め, 合計 244 件)

1. T. Arai, “Hyper Bio Assembler for 3D Cellular System Innovation”, E-MRS 2015 Spring Meeting, Invited Special ONE DAY Session, Lille, France, May 12, 2015 (Invited Keynote Lecture)
2. F. Arai, “Microrobots in Spotlight for Evolution of Biomedicine”, MEMS: 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Paris, France, Jan. 2012. (Plenary)
3. Masayuki Yamato, "Current status of clinical applications of cell sheet engineering for regenerative medicine: Cornea, Heart, Esophagus, and Teeth", The 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, June. 5 2012. (Invited)

各計画研究・公募研究の研究成果

総括

課題番号：23106001

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：総括

1. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 健生 (ARAI, Tatsuo) 大阪大学・基礎工学研究科・教授

(2) 研究分担者

新井 史人 (ARAI, Fumihito) 名古屋大学・工学(系)研究科・教授

大和 雅之 (Yamato, Masayuki) 東京女子医科大学・医学部・教授

金子 真 (KANEKO, Makoto) 大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 平成23年度

中内啓光 (NAKAUCHI, Hiromitsu) 東京大学・医科学研究所・教授 平成23年度

福田敏男 (FUKUDA, Toshio) 名城大学・理工学部・教授 平成23年度

関 実 (SEKI, Minoru) 千葉大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 平成23年度

竹内昌治 (TAKEUCHI, Syouji) 東京大学・生産技術研究所・教授

鈴木 治 (SUZUKI, Osamu) 東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

前 泰志 (MAE, Yasushi) 大阪大学・基礎工学研究科・准教授 平成23年度

(3) 連携研究者

金子 真 (KANEKO, Makoto) 大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 平成24年度～平成27年度

中内啓光 (NAKAUCHI, Hiromitsu) 東京大学・医科学研究所・教授 平成24年度～平成27年度

福田敏男 (FUKUDA, Toshio) 名城大学・理工学部・教授 平成24年度～平成27年度

関 実 (SEKI, Minoru) 千葉大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 平成24年度～平成27年度

前 泰志 (MAE, Yasushi) 大阪大学・基礎工学研究科・准教授 平成24年度～平成27年度

2. 交付決定額(配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
平成24年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
平成25年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
平成26年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
平成27年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
総計	69,300,000	20,790,000	90,090,000

3. 研究成果

研究成果の概要

各研究グループを有機的に連携し、領域全体の研究が活発になるように領域運営を行い、新たな研究成果

を総括班で組織化された学会活動，広報活動によって広く国内外に発信した．定期的に総括班会議，領域の関係者全員が集まる全体会議を開催することにより，領域全体の情報交換を密にし，研究推進，連携を図った．各研究項目については，班長が中心となり班会議を開催し，各班内の情報交換・討論を行い，研究の円滑な推進を図った．

3-1. 研究開始当初の背景

近年のロボットエンジニアとバイオ・医学研究者との連携により，細胞への力学刺激と応答観察のための多くの要素技術や装置開発が成功し，細胞と環境との力学的相互作用が細胞の増殖と分化の制御に重要なことが示された．しかし，再生医療応用や生命理工学研究のモデル系として単一細胞では全く不十分であり，機能する3次元細胞システムの構築が不可欠であることが明確に認識された．さらに，in vivo 環境における様々な刺激が細胞集団・組織・臓器の形成と機能発現に必須であることが内外で報告され始め，in vitro での細胞システム構築の阻害要因も明らかになりつつある．ロボティクス分野では，マイクロからナノスケールで様々な計測制御を行う技術が進展し，組織から細胞を扱う技術的環境も十分に整っている．

このような状況のもと，本提案では，マイクロ・ナノロボティクスの分野で世界をリードする工学研究者，多細胞システムの構築を試み機能する組織を目指す生物化学の世界的研究者，並びに，細胞シートの多面的応用や胚性幹細胞を再生医療に用いることで世界に先駆けている医学研究者を結集した．これにより，バイオアセンブラの諸課題を解決し，学術的にも応用面でも大きな革新ができる体制が整った．

3-2. 研究の目的

本研究の目的は，「生体から取り出した細胞から活性細胞を高速に計測分離し，それらを基盤構造（マトリクス）や血管を含む統制された3次元細胞システムに形成し，組織として機能させるための画期的な方法論（バイオアセンブラ）を創出すること，さらに一つの応用として，次世代培養技術を確立し再生医療に役立てること」である．in vitro 環境場における3次元細胞システムの創生は世界初であり，その創生をマイクロ・ナノ超高速計測制御の方法論を発展させることにより実現する両面で極めて革新的であり，我が国の理工学，医学の学術水準を大幅に向上・強化させたい．

研究の進め方としては，まず(1)有用な活性細胞を選りすぐる超高速計測分離手法と，(2)その細胞から3次元細胞システムを超高速に組み立てる手法を確立し，(3)それらを応用して，医工学的に有用で再生治療のために移植可能な機能する人工3次元細胞システムを創生する，という一連の技術開発と創生の原理説明を提案する．超高速では従来速度の2桁以上の高速化を目指す．

本領域研究はこれらを実現するために，マイクロ・ナノロボティクスを活用した(1)細胞の物理的特性に着目した超高速計測分離技術の開発，(2)単一細胞からロール・積層・折り紙成型等を組み合わせて3次元形状を実現する超高速細胞システム構築技術の開発により，(3)「in vitro 環境で細胞の自律的機能発現を促しながら」達成するという3点においてチャレンジングである．再生医療に役立つ人工3次元細胞システムを構築し，その方法論を発展させることにより，マイクロ・ナノ理工学と生命科学の進展と体系化を図る．

3-3. 研究の方法

本領域の研究を推進するため，3つの研究グループ(A01班：細胞特性計測制御，A02班：3次元細胞システム構築，A03班：3次元細胞システム機能解明)に分け，これらの研究グループが有機的に連携することにより，新たな研究を創造する．総括班は，本領域の推進を円滑に進めるために助言，評価，事務作業を行う．領域代表を含む各班のリーダーが中心となって，研究項目間，計画研究間，計画研究と公募研究間の

調整を行い、協力関係を柔軟かつ円滑に保ち、相互情報交換を通じて円滑な運営を行うための管理監督を行う。また、評価メンバは研究全般の方向性、進捗、成果に対して評価及び助言を与える。

具体的には次の活動を行う。(1) 領域内研究の有機的な結合を推進するための領域会議、項目会議、総括班会議の開催、(2) 全体シンポジウム、若手シンポジウムの開催、(3) 優れた成果の海外発表の推奨による若手研究者の成長支援ならびに若手WGの構成、(4) 領域内の有機的な連携を促進するための共同研究プラットフォームの整備、(5) 研究成果を広く国内外へ発信するための領域ホームページの管理・運営、広報パンフレットの作成・配布、(6) 研究成果の国内外の研究者への発信ならびに他研究者との交流を促し当該領域を活性化させるための主要関連国際会議でのWS, OSの企画、(7) 本領域の研究の質を維持・向上させるための評価委員による適宜の助言、評価、(8) 研究成果を国内外の研究者に発信するための学術論文誌における特集号の作成、(9) 項目研究の加速支援及び当該領域の研究を促進する公募研究と各研究との連携調整や支援。総括班においてこれらの活動を円滑に推進することにより研究目的を達成する。

本目的を達成するため次の体制とした。本領域の推進を円滑に進めるために助言、評価、事務作業を行う。領域代表を含む各班のリーダーが中心となって、研究項目間、計画研究間、計画研究と公募研究間の調整を行い、協力関係を柔軟かつ円滑に保ち、相互情報交換を通じて円滑な運営を行うための管理監督を行う。評価メンバは研究全般の方向性、進捗、成果に対して評価及び助言を与える。

総括班は研究代表者(新井健生)のほか、研究分担者、研究協力者、事務担当者、研究評価担当者から以下のように構成する。

新井健生(代表・ロボット工学・領域代表およびA02班責任者)

新井史人(分担・マイクロ・ナノシステム工学・A01班責任者)

大和雅之(分担・再生医療、幹細胞生物学・A03班責任者)

金子 真(分担・ロボット工学)

中内啓光(分担・幹細胞生物学)

福田敏男(分担・マイクロ・ナノシステム工学)

関 実(分担・生物化学工学)

竹内昌治(分担・マイクロ流体デバイス)

鈴木 治(分担・石灰化と骨再生)

前 泰志(分担・ロボット工学・事務担当)

各種助言と評価は研究協力者である次の4名の評価委員が行う。

助言と評価：藤江正克(早稲田大学・大学院創造理工学研究科・教授・医療福祉ロボット工学)

助言と評価：片岡一則(東京大学・大学院工学研究科・教授・バイオマテリアル)

助言と評価：佐藤正明(東北大学・大学院医工学研究科・教授・バイオメカニクス)

助言と評価：松田武久(金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所・教授・バイオマテリアル)

3-4. 研究成果

【活動状況】 総括班では各研究グループを有機的に連携し、領域全体の研究が活発になるように領域運営を行い、新たな研究成果を総括班で組織化された学会活動、広報活動によって広く国内外に発信した。

(1) 領域内研究の有機的な結合を推進：領域代表を中心とした班長会議において領域運営の諸案の検討や重要事項案の策定を行っている。領域内の研究の有機的な結合を推進するため、総括班のメンバが集まる総括班会議において領域運営の重要事項の審議と決定を行っている。定期的に総括班会議、領域の関係者全員が集まる全体会議を開催することにより、領域全体の情報交換を密にし、研究推進、連携を図った。研究項目については、A01班、A02班、A03班、B01班ごとに班長が中心となり班会議を開催し、各班内の情報交換、討論を行った。

(2)全体シンポジウム,若手シンポジウムの開催:外部からの意見を積極的に取り入れるため領域のテーマ全体に関わる公開シンポジウムを年3回開催した.内1回は国際シンポジウムとして,国際会議 MHS と共催し,国際的な情報交換,討論の場とした.

- ① バイオアセンブラ第1回シンポジウム(2011年10月12日)(東京:参加者40名)
- ② バイオアセンブラ第1回国際シンポジウムをMHS2011と共同開催(2011年11月6-9日)(名古屋)
- ③ バイオアセンブラ第2回シンポジウム(2012年3月8日)(仙台:参加者43名)
- ④ バイオアセンブラ第3回シンポジウム(2012年7月5日)(京都:参加者66名,外部企業4社)
- ⑤ バイオアセンブラ第2回国際シンポジウムをMHS2012と共同開催(2012年11月4-7日)(名古屋)
- ⑥ バイオアセンブラ第4回シンポジウム(2013年3月10日)(神戸:参加者61名,外部企業9社)
- ⑦ バイオアセンブラ第5回シンポジウム(2013年7月18日)(東大:参加者53名,外部企業7社)
- ⑧ バイオアセンブラ第3回国際シンポジウムをMHS2013と共同開催(2013年11月10-13日)(名古屋)
- ⑨ バイオアセンブラ第6回シンポジウム(2014年3月17日)(仙台:参加者70名,外部企業5社)
- ⑩ バイオアセンブラ第7回シンポジウム(2014年7月4日)(東京:参加者100名,外部企業11社)
- ⑪ バイオアセンブラ第4回国際シンポジウムをMHS2014と共同開催(2014年11月9-12日)(名古屋)
- ⑫ バイオアセンブラ第8回シンポジウム(2015年3月24日)(箱根:参加者104名,外部企業22社)
- ⑬ バイオアセンブラ第9回シンポジウム(2015年7月2日)(大阪:参加者75名,外部企業5社)
- ⑭ バイオアセンブラ第5回国際シンポジウムをMHS2015と共同開催(2015年11月23-25日)(名古屋)
- ⑮ バイオアセンブラ第10回シンポジウム(2016年3月22日)(東京:参加者68名,外部企業6社)
- ⑯ 他領域への波及や本領域の活性化を図るため,他の新学術領域と合同で次の研究会を開催した.

・第1回新学術領域ジョイント研究会-超高速バイオアセンブラ・少数性生物学,東京(2012年11月19日)

・新学術領域合同公開シンポジウム(ナノメディシン分子科学・超高速バイオアセンブラを含む4つの新学術領域による合同開催)にてA03班長大和が講演,東京大学小柴ホール(2012年7月10日)

(3)優れた成果の海外発表の推奨による若手研究者の成長支援ならびに若手WGの構成:若手研究者の成長支援として,若手WGを組織し,学生を含む若手研究者のシンポジウムや全体会議への参加を促し,領域内の研究グループ間の密な情報交換を行った.若手WG主催による若手シンポジウムを開催した.

- ① バイオアセンブラ第1回若手シンポジウム 2012年7月4日(京都:参加者72名,うち学生30名)
- ② バイオアセンブラ第2回若手シンポジウム 2013年6月12日(東京:参加者82名,うち学生45名)
- ③ バイオアセンブラ第3回若手シンポジウム 2014年7月3日(東京:参加者81名,うち学生44名)
- ④ バイオアセンブラ第4回若手シンポジウム 2015年7月3日(東京:参加者103名,うち学生45名)

(4)領域内の有機的な連携を促進するための共同研究プラットフォームの整備:領域内の連携推進の中心となるための研究拠点となる共同研究プラットフォームとしてシステム統合化拠点(大阪),オンチップロボティクス拠点(名古屋),軟組織モデル拠点(東京),硬組織モデル拠点(仙台)を設置した.

(5)領域ホームページの管理・運営,広報パンフレットの作成・配布:広報活動として,ホームページ(<http://bio-asm.jp/>)を開設した.日本語パンフレット,英語パンフレットを作成し,これらに関連学会の開催会場において配布した.ニューズレターを作成し,関連学会の開催会場において配布した.

(6)主要関連会議でのOS,WSの企画・開催:研究成果の国内への発信,情報交換,研究の活性化を図るため,毎年開催される当該分野の主要国内会議RSJやROBOMECHなどでOSを開催している.また,主要国際会議ICRA, IROSなどでWSを主導的に企画・開催し,本領域のプレゼンスを示し研究成果を世界へ発信している.

(7)評価委員による適宜の助言,評価:本領域の研究の質を維持・向上させるための評価委員に総括班会議,全体会議,シンポジウムに出席いただき適宜,助言,評価をいただいた.

(8) 学術雑誌でのバイオアセンブラ特集号の発行：

①Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.25, No.4, Special Issue of “BioAssembler,” Fuji Technology Press Ltd. 2013年8月発行

②Regenerative Therapy, Vol.3, Japanese Society for Regenerative Medicine, 2016年3月発行

(9) 研究の加速支援及び連携調整や支援:若手の連携研究を促進, エンカレッジした.

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計0 件)

(2) 学会発表 (計0 件)

(3) 図書 (計1 件)

Eds. Tatsuo Arai, Fumihito Arai, Masayuki Yamato, “Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems,” *Springer*, 2015.

[その他]

ホームページ等

<http://bio-asm.jp/>

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

計画研究 A01

課題番号：23106002

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：超高速操作による細胞計測と自律誘導モニタリング

1. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 史人 (Arai, Fumihito) 名古屋大学・工学研究科・教授

(2) 研究分担者

川原 知洋 (Kawahara, Tomohiro) 九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授

丸山 央峰 (Maruyama, Hisataka) 名古屋大学・工学研究科・准教授

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	21,100,000	6,330,000	27,430,000
平成24年度	27,600,000	8,280,000	35,880,000
平成25年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
平成26年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
平成27年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
総計	94,400,000	28,320,000	122,720,000

3. 研究成果

研究成果の概要

マイクロ流体チップによる細胞のマルチパラメータ計測を目的として、対象の力学的特性に応じたチップ内の可動部等の設計論及び加工技術の確立、モアレを用いた光学顕微鏡の解像度の限界を超えた位置計測精度を実現した。複数の生理環境を計測するセンサのチップ内構築及び計測技術を確立した。そしてこれらを用いた細胞やスフェロイドの硬さ指標や細胞-環境間相互作用計測を提案した。また細胞システムの調整制御として、血管組織の灌流培養システムを構築し、長期的な機械刺激が弾性線維形成に有効なことを示した。以上の成果は、細胞特性と力学的及び化学的マルチパラメータの関連の解明と組織構築の効率化等の重要な基盤技術となると考える。

3-1. 研究開始当初の背景

生体内で行われている細胞の分化，増殖，組織形成の過程はいまだ十分に理解されていない。このため，In vitro 系で行える実験は，シャーレ上の培養に代表されるような組織構築のためのごく初期のプロセスに過ぎず，再生医療や医薬品の研究開発の現場では，In vivo 系での組織培養や，動物実験が前提となっている。今後，再生医療や創薬開発をより広く社会に普及していくためには，実験条件を調整しやすい In vitro 系での組織構築技術を確立することが重要となる。

しかし，従来の In vitro 系の実験系は以下のような問題点があった。

1. 単一細胞レベルの実験が困難で、細胞ごとの特異性を解析できないこと、
2. 細胞培養における細胞選別は一部の熟練者のスキルに依存しており、定量化されていないこと、
3. 細胞固有のパラメータ計測は細胞のサイズや表面マーカーなどに限られており、データベースとしては不十分であること、
4. 細胞の電氣的、力学的計測の研究がなされているが、大量の細胞を高速に計測できないため、全体像がつかみにくいこと、
5. 細胞のマルチパラメータ計測に基づいた環境条件との相互作用が解析できず、データベースの活用が困難であること

このため、*In vitro* 系での実験では効率的に組織構築を行うことが困難である。一方、微細加工技術が進歩したことで、*Lab-on-a-chip* 技術によって細胞をマイクロ流体回路の中で個別に操作し、その周りの環境を制御しながら細胞の応答を計測・評価することが可能となってきた。この技術を発展し、利用することで、従来の *In vitro* 系での実験系で問題となっていた上記課題を解決できると考えられる。

3-2. 研究の目的

本研究では細胞特性と細胞システムの活動を自律誘導するための最適な環境場とダイナミック刺激との関連を明らかにすることを目的として、これに必要な基盤技術に関する研究を進める。上記課題に対しては以下のアプローチをとる。

1. 単一細胞レベルでの実験を基本とし、オンチップで細胞を操作、観察しながら細胞ごとの特異性を解析する。
2. 細胞培養における細胞選別には細胞固有のマルチパラメータ計測を基盤とし、これまで未知となっている力学的、電氣的パラメータを計測する。また、熟練者のスキルとの比較を行うことで、パラメータの重要性を評価する。
3. 細胞固有の力学的、電氣的パラメータや細胞の表面マーカー、細胞周期、イオン濃度などを計測し、データベース化する。
4. 細胞のマルチパラメータを高速に計測し、大量のサンプルを短時間で計測できるシステム技術を確立する。
5. 細胞のマルチパラメータ計測データを参照しながら環境条件との相互作用を解析するシステム技術を確立する。

個々の細胞の特性や状態を把握するために、マイクロ流体回路の中でナノ・マイクロロボットを利用するオンチップロボティクスを基盤技術とする。これまで、*Lab-on-a-chip* 技術は流体の混合を前提とした化学的な操作が主流であるが、本研究ではオンチップで物理的操作技術を導入することで、計測センサの空間分解能および局所環境条件の制御性を向上することを特色とする。これまでほとんど計測されていない細胞固有の力学的、電氣的パラメータをフロー方式で高速に計測する技術を確立することで、大量の細胞のデータベースを構築し、環境条件との相互作用を調査することで、これまで未知となっている細胞固有の特性を明らかにし、この知見をもとに新しい *In vitro* 系培養技術を確立する。

3-3. 研究の方法

本研究では、大きく A、B の 2 つのテーマに分割し、(1)～(7)の研究項目に関して合計 7 名で研究を行った。

A. 細胞のマルチパラメータ計測と評価

可動部を有するマイクロ流体チップを製作し、可動部を動かして細胞を変形させることで細胞の硬さを計測する。このとき、2,000Hz オンライン高速ビジョンを用いて高速化する。また、マイクロ流体チップ

を製作し、フロー方式で連続的に電気特性を計測する機能を組み込む。

下記の項目について研究を実施する。

- (1) フロー式細胞マルチパラメータ計測
- (2) フロー式細胞マルチパラメータ計測のための校正用マイクロビーズの作成と評価
- (3) 培養細胞の特性評価と分離
- (4) データベース構築

B. 細胞と環境の相互作用の解析

細胞アッセイと自律誘導制御のためのマイクロ流体チップを製作し細胞と環境の相互作用を解析する。

下記の項目について研究を実施する。

- (5) 特定細胞の高速分離
- (6) 細胞の培養環境制御
- (7) 細胞システムの調整制御

3-4. 研究成果

(1) モアレ干渉縞による高精度細胞計測フロー式細胞マルチパラメータ計測

細胞の力学的特性計測のための、細胞の押し込み時の反力を計測するシステムを図1に示す。このシステムは、マイクロ流体チップ、外部駆動源としてのピエゾアクチュエータ、光学顕微鏡で構成されている。マイクロ流体チップ上で、細胞はインレットから投入され計測点まで流体圧によって搬送される。計測点に達した細胞は、流路に配置されたプローブにより変形を受け、その変形量と反力が計測される。一方、細胞が変形を受けた際の細胞から受ける反力は、流路の反対側の壁面に配置された力センサによって計測する。この力センサは、プローブとばね定数が既知の梁の構造で構成されている。これより、細胞から受ける力を、プローブの初期位置からの変位を利用して計測できる。

計測精度を決定づける要素は、梁構造のばね定数と、プローブの変位を観測する際の分解能となる。従来手法では、プローブ先端を画像処理により検出してきた。分解能は投影光の波長 500 nm 程度であるから、10 nN 付近の計測レンジを想定し、梁のばね定数を 1 nN/μm に設定した。しかしこの方法では、

- ・梁構造が加工限界に近く、非常に脆い
- ・共振点が低く、動的な入力に対応できない
- ・精度が不十分であり、向上を望めない

などの問題点がある。

本研究では、センサの計測分解能の問題を解決する手段として、モアレ干渉縞いた手法を提案した。サンプリングモアレ法を応用し、プローブの後段に形成した格子構造と、観測用のイメージセンサの素子を利用することで、干渉縞を発生させ、さらに位相解析を行うことで、干渉縞を発生させる機構に、高度な加工精度や複雑さを要求されず、簡単かつ高精度な計測分解能を実現できる。

1. 図3に、本稿で用いたマイクロ流体チップを示す。チップは、Silicon-on-Insulator (SOI) ウェハに設計したデバイスが、2枚のガラス基板でパッケージングされた構造になっている。従来のマイクロ流体チップと比較し剛性を10倍程度高く設計した。
2. 計測対象として、動物系細胞である MDCK (Madin-Darby canine kidney)細胞を利用して計測した結果を図4に示す。計測の空間分解能は 65 nm で反力換算で 0.45nN に相当する。これは従来手法と比較して、約10倍高精度である。変形率15%以下の範囲で Hertz の接触理論を用いて算出した弾性定数は、およそ 450 Pa であった。
3. 以上に示したように、フロー系において細胞の力学的特性を高精度に計測可能なシステムを実現した。今後は計測精度の向上と共に、より多くの細胞を計測することで、生体機能の解明、利用に貢献

できると考えられる。

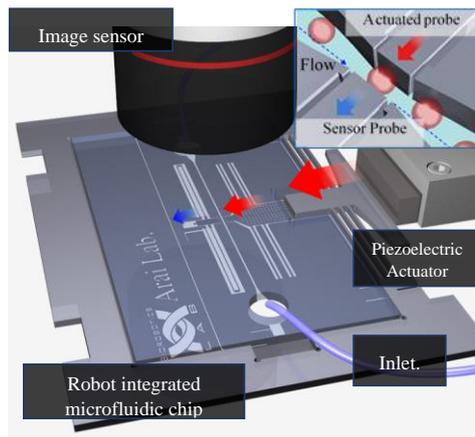


図 1 システムのコンセプト図

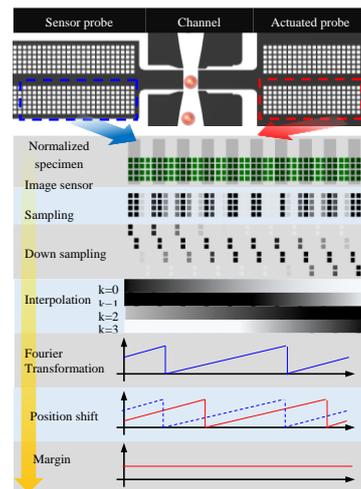
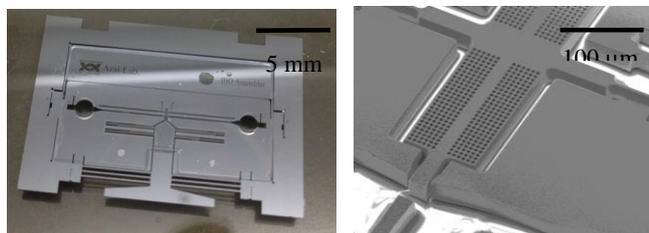


図 2 モアレ計測の概念図



(a) Entire image of the microfluidic chip

(b) Grating structure for moiré fringe

図 3 計測用マイクロ流体チップ

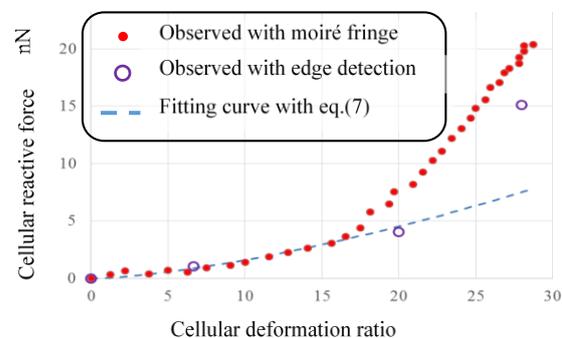


図 4 細胞の力学的特性計測結果

(2) 高速駆動型磁気駆動マイクロロボットによる高速細胞操作・分離

図 5 に、外部磁場で高速駆動する磁気マイクロロボットによる細胞操作・分離のコンセプト図を示す。磁気駆動マイクロロボットは微細加工技術で成形した本体の一部に強磁性体のニッケル(Ni)を電鍍で堆積させたものである。ツール先端の形状は任意の形状に加工できるため、細胞操作や分離に適した形状のものを利用可能である。駆動用の磁気回路は図 1(b)に示すように永久磁石の磁極が水平になるように配置したものであり、これによりマイクロロボットが下向きに引っ張られがタス基板との摩擦が増えることが抑制され、高速駆動及びデッドバンドの抑制が実現できている。

本研究では、磁気マイクロロボットの底面をリブレット形状に加工することで、よりガラス面との摩擦を低減し、高速・高精度に駆動可能とした。図 6 に作製した磁気駆動マイクロロボットを示す。図 6(a)はマイクロロボット底面のリブレット表面の走査型電子顕微鏡(SEM)写真である。リブレットの深さは $8 \mu\text{m}$ 、深さは約 $5.7 \mu\text{m}$ である。マイクロロボットの厚さは $200 \mu\text{m}$ である。

図 7 に磁気駆動マイクロロボットの周波数応答特性を評価した結果を示す。評価は一軸の駆動で行い、 $\pm 0.5 \text{ mm}$ のストローク、 $0.1 \sim 100 \text{ Hz}$ の周波数帯域でステージを駆動させることで行った。マイクロロボットの位置は高速度カメラで 1000 frames/s で計測した。結果として、駆動方向に水平にリブレットを加工したマイクロロボットは 90 Hz (最高速度: 282.6 mm/s) までのステージの駆動に追従し、駆動方向に垂直にリブレット加工したマイクロロボットは 70 Hz まで追従した。一方、リブレットを加工しなかったマイクロロボットは 10 Hz までしか追従できず、リブレットの加工により、磁気駆動マイクロロボットの追従特性を大きく改善したことを確認した。

この磁気駆動マイクロロボットを用いた細胞のソーティングを行った実験結果を図 8 に示す。図 8(a)に

示すように一番下の流路から細胞を導入し先端を加工したマイクロロボットで捕捉後、目的の流路まで搬送し流体力でリリースするものである。用いた細胞はウシ卵子で、流路に流れる流体の速度は 20 mm/s とした。図 8(b)に示すように、導入されたウシ卵子をマイクロロボットで捕捉し、目的の流路にソーティングすること成功した。

以上のように、高速に駆動可能で単一細胞単位での操作・分離なオンチップ細胞操作システムを実現した。本システムを用いることで、特性計測した細胞を迅速に分離し培養観察することが可能となる。

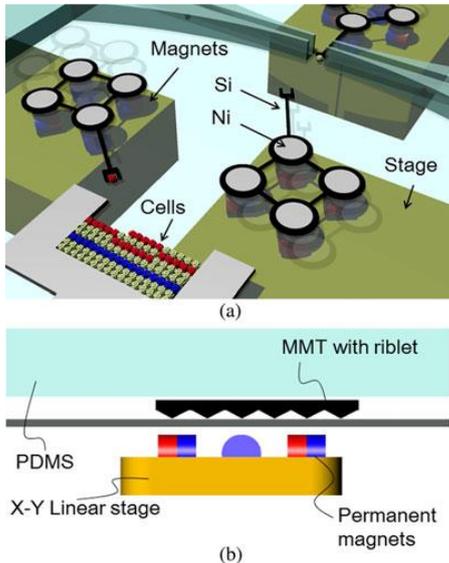


図 5 高速駆動磁気マイクロロボットの概念図

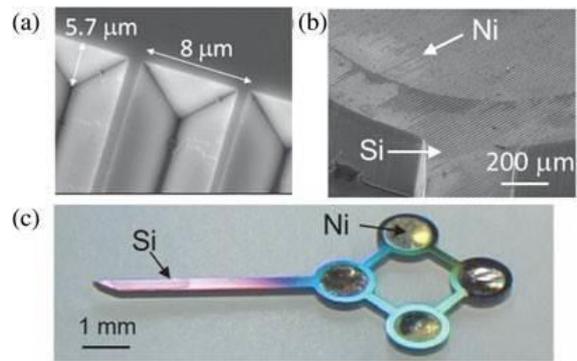


図 6 磁気駆動マイクロロボットの形状

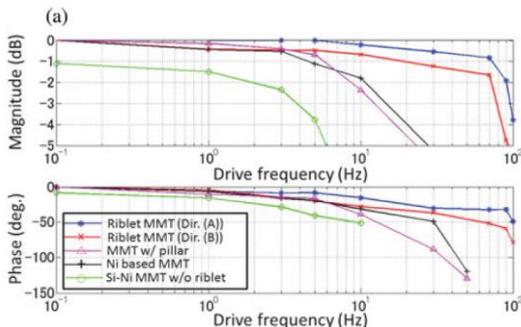


図 7 マイクロロボットの周波数応答特性

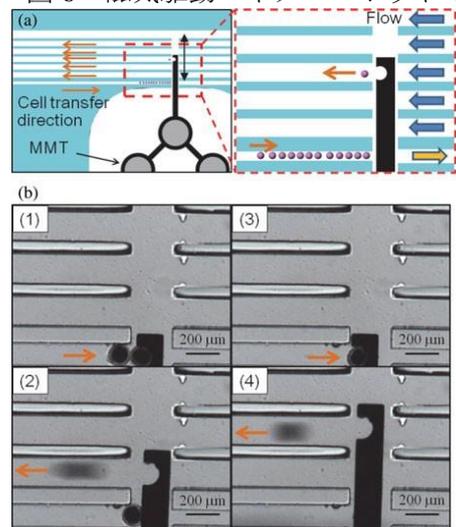


図 8 細胞の高速ソーティング実験結果

(3) マルチ蛍光センサピラーによる細胞環境計測用マイクロ流体チップ

マイクロ流体チップ内の複数の生理環境条件の分布及び変化を同時に計測可能なセンサの作製を行った。本研究では、骨芽細胞の分化と、リン酸オクタカルシウム(OCP)のハイドロキシアパタイトへの転換にともなうカルシウムイオンの吸収及びリン酸イオンの放出との相互作用解析を対象とした。

図 9 に pH, 温度, カルシウムイオンを同時に計測可能なセンサピラーが配置されたマイクロ流体チップの概念図を示す。OCP と細胞はマイクロ流体チップ内において壁で隔離されており、壁の隙間から拡散でチップ中を移動する各種イオンやチップ中の温度分布を中央の流路の蛍光センサ群で計測する。

カルシウムイオン濃度の計測には Fluo-3 を、リン酸イオン濃度の変化は pH で間接的に計測するため FITC を、温度の計測には量子ドット (CdSe/ZnS) を用いた。センサは液透過を有するため、培地中のイ

オン濃度等を計測できる。蛍光色素の励起波長は全て 488 nm である。センサの形状を計測対象ごとに変えることで、一つの励起光で複数の環境を同時に計測できる。従来の蛍光マルチ計測では、対象毎に異なる励起波長を用いたが、計測対象数が励起波長数に制限される課題があったが、本手法では微細加工技術で形状の異なるセンサの集積化が可能な利点がある。

図 10 にマイクロ流体チップ及び蛍光センサピラーの透過光画像及び蛍光画像を示す。カルシウムイオンセンサ、pH センサ、温度センサの直径は、それぞれ 20 μm 、15 μm 、10 μm とした。チップに OCP を導入し、OCP の転換を促進するフッ化物イオンを 100 ppm 含んだ生理緩衝水溶液の導入後のチップ中のカルシウムイオン濃度、pH、温度変化を計測した結果を図 11 に示す。溶液中のカルシウムイオン濃度の低下、リン酸イオン増加による pH の低下、温度変化がないことが計測された。また、図 12 に示すように本チップ中に細胞を導入し培養できることを確認した。今後は骨芽細胞の分化と OCP の相互作用の解析を行い、分化に適した生理環境や力学的刺激等の各種データベース構築に用いる。

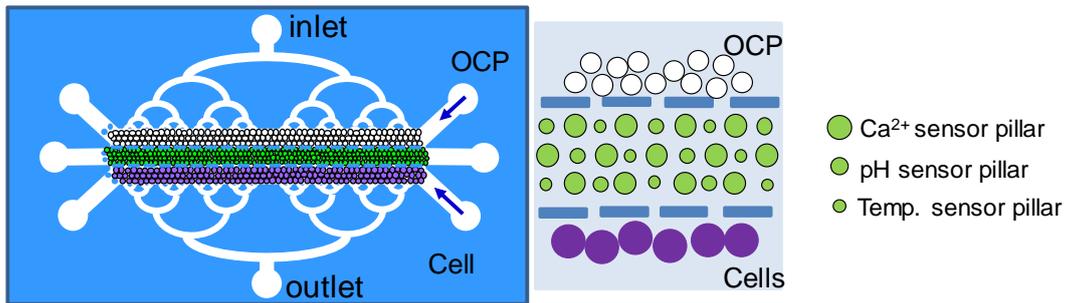


図 9 蛍光センサピラー集積マイクロ流体チップの概念図

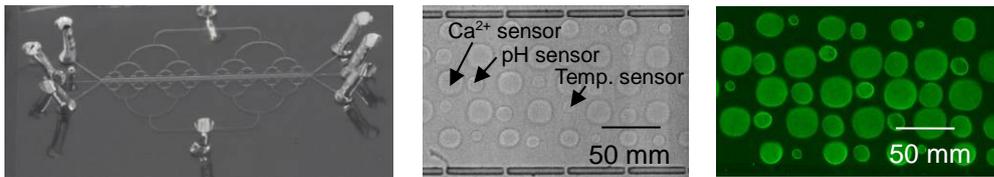


図 10 チップ及び蛍光センサピラーの画像

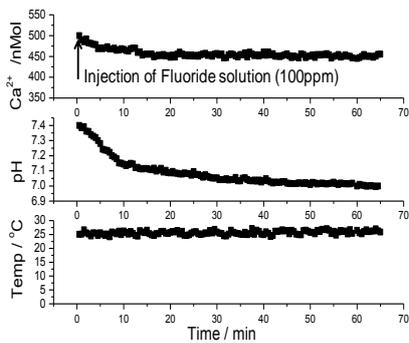


図 11 F⁻を 100 ppm 添加後のチップ内環境の経時変化の計測結果

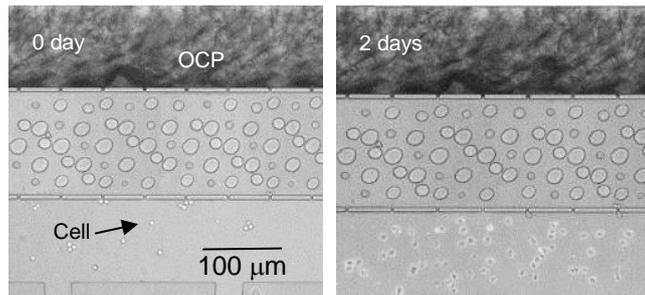


図 12 チップへの細胞導入と培養

(4) 血管組織の構築と機械的刺激による細胞システムの調整制御
細胞システムの調整制御として、円筒状かつ多層の血管組織の構築手法の実現、灌流培養システムの構築を行い、これらを用いて、体内を模倣した周期的な力学刺激を通じた弾性繊維の組織形成機序の評価を行った。血管組織の作製方法として展開積層バイオアセンブリ (BEL) を提案し、従来の平面培養では困難であった多層の円筒状組織の構築に成功した。作製した血管組織と灌流培養システムを用いて、長期的な拍動刺激を印加したところ、弾性繊維の発現を示すマーカーの発現が顕著に増加したことを確認した。

3-5. 今後の展望

本研究期間において構築した、細胞特性と力学的及び化学的マルチパラメータの相関解析および組織構築の効率化の基盤技術を発展させ、細胞と環境の相互作用解析に基づく、細胞・組織の高次機能発現に適した培養環境の設計や構築の学理構築に向けて研究を進めていく。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計14 件)

- [1] Hirotooshi. Sugiura, Shinya Sakuma, Makoto Kaneko, Fumihito Arai, On-Chip Method to Measure Mechanical Characteristics of a Single Cell by Using Moiré Fringe, Micromachines 査読有, Vol. 6, No. 6, 2015, pp. 660-673.
- [2] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Utako Yokoyama, Fumihito Arai, Microfluidic perfusion culture system for multilayer artery tissue models, Biomicrofluidics, 査読有, Vol. 8, 2014, 064113.
- [3] Masaya Hagiwara, Tomohiro Kawahara, Toru Iijima, Fumihito Arai, High-Speed Magnetic Microrobot Actuation in a Microfluidic Chip by a Fine V-Groove Surface, IEEE Transactions on Robotics, 査読有, Vol. 29, Issue 2, 2013, pp. 363-372.
- [4] Tomohiro Kawahara, Masakuni Sugita, Masaya Hagiwara, Fumihito Arai, Hiroyuki Kawano, Ikuko Shihira- Ishikawa, Atsushi Miyawaki, On-chip microrobot for investigating the response of aquatic microorganisms to mechanical stimulation, Lab on a Chip, 査読有, Vol. 13, Issue 6, 2017, pp. 1070-1078.

などその他含め計14件

(2) 学会発表 (計79 件)

- [1] Hiroataka Sugiura, Shinya Sakuma, Makoto Kaneko, Fumihito Arai, On-chip Measurement of Cellular Mechanical Properties Using Moiré Fringe, 2015 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2015年05月28日, シアトル, アメリカ
- [2] Keitaro Ito, Shinya Sakuma, Masaki Kimura, Takanori Takebe, Makoto Kaneko, Fumihito Arai, Stiffness-Index Map Based on Single Cell-Spheroid Analysis Using Robot Integrated Microfluidic Chip, 29th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2016年01月27日, 上海, 中国

などその他含め計79件

(3) 図書 (計1 件)

- [1] Micro-Nanorobotic Manipulation Systems and Their Applications, Toshio Fukuda, Fumihito Arai, Masahiro Nakajima, Springer, 2013, 334.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

計画研究 A01

課題番号：23106003

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：超高速細胞システム特性計測

1. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 真 (Kaneko, Makoto) 大阪大学・工学研究科・教授

(2) 研究分担者

東森 充 (Higashimori, Mitsuru) 大阪大学・工学研究科・准教授

多田隈 建二郎 (Tadakuma, Kenjiro) 大阪大学・基礎工学研究科・助教 平成23年度～平成26年度

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	39,000,000	11,700,000	50,700,000
平成24年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
平成25年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
平成26年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
平成27年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
総計	92,800,000	27,840,000	120,640,000

3. 研究成果

研究成果の概要

高速アクチュエータと実時間高速ビジョンを用いてマイクロ流体チップ内の細胞を拘束かつ正確に操作する方法について研究し、最高130Hzの動特性を実現した。またチップの弾性効果を用いることにより、最高位置決め分解能250ナノメートルを実現した。さらに高速かつ高分解能を実現する方法として、制御系のサンプリング周波数を上げる方法を示した。この高速・高分解能細胞操作システムを用いて、細胞ストレス試験というこれまでにない新しいバイオ試験方法提案した。ここで細胞ストレス試験とは、マイクロ流路内に狭窄部を導入し、狭窄部出入り口間で往復運動させることにより、細胞の疲労限界を評価するものである。

3-1. 研究開始当初の背景

細胞変形能と疾患との間に密接な相関がある。例えば万能細胞から2D細胞シート、3D組織、さらには生体組織構築を目指す再生医療では初期の細胞選択の段階で細胞の高速変形能評価が強く望まれている。細胞の変形能評価は一般に細胞群として取り扱われるため、個体差の影響を押さえるため、通常統計的処理が行われる。そのためには少なくとも数百個というオーダーの細胞変形能計測を行う必要がある。そのため速やかに計測を完了する必要がある。高速細胞マニピュレーションに対する強いニーズがあるのはこのような背景による。

細胞を培養液中から出してしまふとたちどころに機能が低下してしまふため、通常は培養液中でのマニピュレーションが前提となる。培養液中でのマニピュレーションに着目した場合、ロボット指を用いる方法、光ピンセットを用いる方法、マイクロ流路内の流れを制御する方法がある。ここでは、ハイスループットが期待できるマイクロ流路内の流れを制御する方法に着目する。マイクロ流路内の細胞マニピュレーションに限定したとしても、大きく二通りの方法がある。一つはマイクロ流路出入り口間で一定差圧を与えた状態で細胞を駆動する受動的な方法で、もう一つはアクチュエータを導入して細胞を操る能動的な方法である。能動的な方法の場合は、マイクロ流路、高速カメラ、高速アクチュエータから構成されたシステムであり、受動的な方法の場合には単純にアクチュエータを取りはずしたシステムと理解すればよい。能動的な方法として、マイクロ流路の一部に狭窄部を配置し、狭窄部出入り口間で細胞をアクチュエータで往復運動させて、細胞に強制的にストレスを加えて、細胞のストレス限界を計測するシステムを構築した。マイクロ流路を用いた従来の細胞変形能試験のほとんどは受動的な方法であり、制御技術を駆使して細胞に積極的に動きを与えながら細胞変形能試験を行うという方法はほとんど行われていなかった。筆者らはここに大きな学術的新規性を見出した。

3-2. 研究の目的

高速かつ高精度細胞マニピュレーションを実現するため、細胞の運動自由度を幾何学的に一次元 に拘束する。これにより、細胞マニピュレーションが容易になり、処理速度の飛躍的な向上が期待できる。以上の点を踏まえ、本研究では、操作対象の細胞の動きをマイクロ流路によって一次元 に拘束する方法を前提とした上で、高速かつ高精度細胞マニピュレーションを実現するためのシステム構成の提案、および処理アルゴリズムの構築を目的としている。高速・高分解能細胞マニピュレーションシステムを構築する上で重要なキーワードが二つ、すなわち高速・高分解能アクチュエータと高速・高分解能センサである。そのいずれか一方が欠けても、高速・高精度細胞マニピュレーションシステムの構築はむつかしいことを付記しておきたい。

3-3. 研究の方法

高速・高分解能アクチュエータについて考えてみよう。マイクロ流路との組み合わせを考えた場合、アクチュエータの選択肢として大きく二通りの方式がある。一つはマイクロ流路内への組み込みを想定したマイクロアクチュエータ方式、もう一つはマイクロ流路外への設置を想定するマクロアクチュエータ方式である。両者とも一長一短ある。マイクロアクチュエータ方式は、マイクロ流路に組み込むため、アクチュエータの分解能がそのまま細胞の位置決め分解能に対応する。そのため細胞の位置決め分解能という切り口で考えると、高分解能を維持しやすい。これに対し、マクロアクチュエータを用いると、アクチュエータ断面積とマイクロ流路断面積比 A_1/A_2 分細胞の位置決め分解能は低下する。ここで A_1 、 A_2 はそれぞれアクチュエータ側の断面積およびマイクロ流路側の断面積である。このようにマクロアクチュエータ方式には分解能という切り口ではハンディキャップを背負っているにも関わらず、筆者らは、マクロアクチュエータ方式を採用した。その一番の理由は、経済性、すなわちアクチュエータのリユース機能を重視したかったからである。例えば、細胞がマイクロ流路内で詰まってしまった場合、アクチュエータをチップ内に組み込むマイクロアクチュエータ方式の場合、アクチュエータも同時に不良品になってしまう。しかもアクチュエータを組み込んだチップの製作には多大な時間と費用がかかってしまう。これに対して、マクロアクチュエータ方式の場合、マイクロ流路内に細胞が詰まった場合、アクチュエータと切り離して、マイクロチップのみを不良品として新品にとりかえればよい。このため製作時間、コストを考えると圧倒的に経済的になる。しかもマクロアクチュエータはマイクロアクチュエータと違って、市場で入手しやすいだけでなく信頼性も高い。つまり、位置決め分解能さえクリアできれば、マクロアクチュエータとマイクロ

流路の組み合わせの方が圧倒的にメリット大である。ただし断面積比 A_1/A_2 は通常 10^6 のオーダーとなり、マクロアクチュエータの分解能が 1nm としても、マイクロ流路内の細胞の位置決め分解能は 1mm オーダーとなり、位置決め精度を向上させる上での大きな障害になる。ところが PDMS (ある種のプラスチック) 製マイクロ流路は、内圧変動によってチップ内体積が変動する弾性特性を有しているにもかかわらず、応答性は kHz オーダーときわめて高い。つまりマイクロ流路内に細胞の動きを遅くする“仮想減速器”が存在していると考えられる。筆者らは、この点に着目し、マクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせであるにも関わらず、細胞の高分解位置決めを目指す。

次に高速センサに目を向けてみよう。高速センサとして使用できる候補として、電気インピーダンスセンサ、高速ビジョンセンサ等が考えられるが、ここでは高速ビジョン方式を採用した。高速ビジョンを採用した一番の理由は必要に応じて細胞の動きがモニターできることを利用したかったからである。つまりマイクロ流路内で細胞がどのような振る舞いをしているのかデータログとして残せる利点に魅かれた。

細胞の位置は倒立型位相差顕微鏡 (OLYMPUS : IX71) を通して高速ビジョン (Photron : FASTCAMMH4-10K) を用いて $3000 [\text{frames/s}]$ で撮影し、高速画像処理ボード (i-i-lab.) を用いてリアルタイムに画像処理し、制御用 PC に送られる。画像の空間分解能は $0.24 [\mu\text{m}/\text{pixel}]$ 。

3-4. 研究成果

一定圧力差を維持しておけば、赤血球を操る特別なアクチュエータは不要である。筆者らはオンライン高速ビジョンで $400 \text{個}/\text{sec}$ の赤血球の硬さ評価を行うことに成功した。つまりわずか数秒で4桁の赤血球の硬さ評価が行える勘定になり、臨床応用が一気に現実味を帯びてくる。

極細流路の中に幅 $3 \mu\text{m}$ の狭窄部を設け、一回通過する際のストレスレベルをあげてみた。基本的には極細流路内での赤血球の伸展能と極細流路からでた後の回復能を同時計測し、さらにストレス試験の回数によって両指標がどのように変化していくのかストレス回数毎に追跡するという方法である。重要な点は、ストレス回数毎に赤血球の伸長特性も回復特性も悪くなり、結果的に両者が一致する疲労限界回数 N が必ず存在し、その回数をその赤血球の変形能限界と見なす。6種類の赤血球に対して、疲労限界回数を実験的に評価した。これまで伸展能と回復能はそれぞれ個別に実験が行われていたが、それらを同時に調べることによって、個体差や実験時間からくるブラックボックスを排除しようとしている。疲労限界回数 N と赤血球の大きさには相関があり、一回目に大きな差がでる赤血球は変形能が高く、疲労限界回数 N も大きくなっていることがわかった。このことは、ストレス回数を増やさなくても、一回の細胞伸長特性を測るだけで、細胞の疲労特性を見積もることができることを意味している。なお、マイクロ流体チップを使った細胞マニピュレーションに対して、以下の知見を得た。

高速化：マイクロ流体チップを硬くする。

高分解能化：マイクロ流体チップを柔らかくする。

高速かつ高分解能化：マイクロ流体チップを適度に硬くし、かつ制御系ループのサンプリング周波数を上げる。

3-5. 今後の展望

本プロジェクトでは細胞マニピュレーションを高速アクチュエータと高速ビジョンを用いて最大 130Hz 、分解能 250nm を実現し、細胞ストレス試験や Cell Pinball 現象といった新たな知見の獲得に貢献してきた。これらの研究成果の延長線上で考えられる素朴な疑問は、細胞マニピュレーションをさらに高速にした場合、細胞はどんな振る舞いをするのだろうか、というのが自然な問いかけであろう。この疑問に立ち向かっていくためには、細胞マニピュレーションのさらなる高速化に向けてのアクチュエータ及びセンサ系のさらなる高速化が不可欠となろう。今後の発展を期待したいところである。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計21 件)

- [1] 田中 信行, 東森 充, 金子 真、対象物変形に伴う流体力変動を考慮した非接触剛性センシング、計測自動制御学会論文集、査読有、48巻、2012、295-301 DOI: 10.9746/sicetr.48.295
- [2] 福井航, 金子 真, 川原知洋, 山西陽子, 新井史人、幾何学的運動拘束を利用した拘束・高精度細胞マニピュレーション、日本ロボット学会誌、査読有、30巻、2012、655-661 DOI: 10.7210/jrsj.30.655K. Tadakuma, N. Tanaka, Y. Haraguchi, M. Higashimori, M. Kaneko, T. Shimizu, M. Yamato and T. Okano, A Device for the Rapid Transfer/Transplantation of Living Cell Sheets with the Absence of Cell Damage, Biomaterials, 査読有, 34巻, 2013, 9018-9025 DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.08.006
- [3] N. Tanaka, M. Kondo, R. Uchida, M. Kaneko, H. Sugiyama, M. Yamato and T. Okano, Splitting Culture Medium by Air-Jet and Rewetting for the Assessment of the Wettability of Cultured Epithelial Cell Surfaces, Biomaterials, 査読有, 34巻, 2013, 9082-9088 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.029
- [4] S. Sakuma, K. Kuroda, C. Tsai, W. Fukui, F. Arai and M. Kaneko, Red Blood Cell Fatigue Evaluation Based on the Close-encountering Point between Extensibility and Recoverability, Lab Chip, 査読有, 14巻, 2014, 1135-1141 DOI: 10.1039/c3lc51003d
- [5] C. Tsai, S. Sakuma, F. Arai and M. Kaneko, A New Dimensionless Index for Evaluating Cell Stiffness-based Deformability in Microchannel, IEEE Trans. on Biomedical Engineering, 査読有, 61巻, 2014, 1187-1195 DOI: 10.1109/TBME.2013.2296624
- [6] R. Murakami, C. Tsai, M. Kaneko, S. Sakuma, and F. Arai, Cell Pinball: Phenomenon and mechanism of inertia-like cell motion in a microfluidic channel, Lab Chip, 査読有, 15巻, 2015, 3307-3313 DOI: 10.1039/C5LC00535C
- [7] T. Monzawa, M. Kaneko, C. Tsai, S. Sakuma and F. Arai, On-chip actuation transmitter for enhancing the dynamic response of cell manipulation using a macro-scale pump, Biomicrofluidics, 査読有, 9巻, 2015, 014114 DOI: 10.1063/1.4907757

などその他含め計21件

(2) 学会発表 (計26 件)

- [1] C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, Enhanced Cell Stiffness Evaluation by Two-Phase Decomposition, MicroTAS, Okinawa, Japan, 2012, 査読有, pp1009-1011.
- [2] C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, Evaluation of Cell Impedance Using a μ -channel, IEEE EMBC, San Diego, USA, 2012, 査読有, pp 5518-5521.
- [3] C. Tsai, M. Kaneko, S. Sakuma and F. Arai, Distinct Patterns of Cell Motion inside a Micro-Channel under Different Osmotic Conditions, EMBC, Osaka, Japan, 2013, 査読有, pp5525-5528.
- [4] C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, Image-Based Screening for Erythrocyte Characteristics of Patients Receiving Dialysis Service, ASN Kidney Week, Atlanta, USA, 2013, 査読有, 128A.
- [5] T. Monzawa, S. Sakuma, F. Arai and M. Kaneko, Red blood cell deformability checker with water/plasma pressure transmitter, MicroTAS, San Antonio, USA, 2014, 査読有, pp1181-1183.
- [6] C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, What is the Difference of Cell Deformation between PUSH and PULL?, MicroTAS, San Antonio, USA, 2014, 査読有, pp793-795.
- [7] T. Monzawa, S. Sakuma, F. Arai and M. Kaneko, Fluid separated volumetric flow converter (FSVFC)

for high speed and precise cell position control, IEEE MEMS, Estoril, Portugal, 2015, 査読有, pp1055-1058.

[8] R. Murakami, M. Kaneko, S. Sakuma, and F. Arai, “Cell pinball” : what is the physics?, IEEE MEMS, Estoril, Portugal, 2015, 査読有, pp431-434.

[9] C. Tsai and M. Kaneko, On-Chip Pressure Sensing by Visualizing PDMS Deformation using Microbeads, IEEE MEMS, Estoril, Portugal, 2015, 査読有, pp722-725. Ebubekir Avci, Chanh-Nghiem Nguyen, Kenichi Ohara, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Towards High-Speed Automated Micromanipulation, The 2013 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2013), Germany, 2013

などその他含め計26件

(3) 図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

計画研究 A01

課題番号：23106004

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：循環極少数細胞を標的とする閉鎖系高速細胞解析分離装置の開発

1. 研究組織

(1) 研究代表者

中内 啓光 (Nakauchi, Hiromitsu) 東京大学・医科学研究所・教授

(2) 研究分担者

江藤 浩之 (Eto, Koji) 京都大学・iPS細胞研究所・教授 (平成23～24年度)

金子 新 (Kaneko, Shin) 京都大学・iPS細胞研究所・准教授 (平成23～24年度)

(4) 協力研究者

江藤 浩之 (Eto, Koji) 京都大学・iPS細胞研究所・教授 (平成25～27年度)

金子 新 (Kaneko, Shin) 京都大学・iPS細胞研究所・准教授 (平成25～27年度)

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	32,100,000	9,630,000	41,730,000
平成24年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
平成25年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
平成26年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
平成27年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
総計	91,900,000	27,570,000	119,470,000

3. 研究成果

研究成果の概要

血液中に超低頻度にしか存在しない細胞を確実に同定、分離する閉鎖系デバイスの開発を目指し、細胞の粘弾性の違い（マイクロ流路通過速度の違い）で超微量細胞を検出できる可能性を示した。このシステムが実用化されれば、血液を体外循環させながら血液中の有核赤血球や、循環ガン細胞を高速でかいせきすることが可能になり、胎児診断、ガンの予後の予測などの検査がより簡便かつ正確におこなうことが可能になる。さらに、本研究ではマイクロ流路により体内骨髓血流を *in vitro* で再現し、iPS細胞由来巨核球株からの血小板産生高率を向上させることに成功した。

3-1. 研究開始当初の背景

個体形成の根幹である各組織、臓器の細胞は固有の特徴を有している。その代表的なものが細胞表面分子（抗原）であり、フローサイトメトリーの進化は高い精度をもって細胞の特異性解析や単離を可能とした。実際、我々は3万個の骨髓細胞中に一個存在する造血幹細胞の分離同定により細胞一個レベルの移植によ

る骨髓再構築、及び妊婦末梢血中の胎児由来有核赤芽球細胞（数十万個に一個の頻度）を分離することで性別判定を可能として実績を有する。本技術の先には、血液中を流れる癌細胞の同定分離等、さらに頻度の低い細胞を検出・分離することが想定できる。一方、100 万個に一個以下の頻度でしか存在しない細胞を血液中で確実に同定するには数百 ml 以上の血液を必要とし、フローサイトメトリーで解析、分離するのは現実的ではない。

3-2. 研究の目的

本研究では、体外循環方式の閉鎖系高速細胞解析分離装置の開発によって血液を体外循環させながら個々の細胞を高速で解析することを開発目標に据えた。また、輸血システムに必須な各種デバイス開発ではヒト多能性幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞）由来巨核球細胞から高効率に血小板を産生できるシステムの開発を目指した。

3-3. 研究の方法

最終目標である血液を体外循環させながら個々の細胞を高速で解析・分離するシステム（対外循環方式の閉鎖系高速細胞解析分離装置）では、フローサイトメーター解析で用いられるような生体外に取り出した細胞を抗体染色するといった方法を適応できない。そこで、マイクロ流路と超高速画像取得システムを利用した細胞物性計測装置を作製し、複数の細胞種類がマイクロ流路を通過する間の画像を取得することで、1 細胞の粘弾性を取得し、細胞種ごとに比較した。また、MEMS システムを応用したマイクロ流路デバイスのプロトタイプを複数作製し、最終的に最適化したデバイスでの有効性を検証した。具体的にはヒト ES 細胞、および iPS 細胞から誘導した培養巨核球細胞を MEMS 流路培養スリットに設置し、生体内骨髓の血流と近似する shear stress が生じる条件下での血小板産生を検証した。コントロールには同じ培養巨核球細胞を使用した static 静置培養下での血小板を用いて比較を行った。

3-4. 研究成果

C57BL/6 マウスの大腿骨中の骨髓細胞、健常人ボランティアからの末梢血液、ヒト慢性好酸球性白血病細胞株（EOL-1）、マウス乳がん細胞株（4T1）そして iPS 細胞から分化誘導した赤芽球株を 3% ウシ胎児血清含有 PBS もしくは生理食塩水を用いて 1×10^7 cells/ml の濃度に調整し、2.5ml シリンジに取り付けたポリビニル製のチューブを用いて細胞懸濁液を吸引した後に、マイクロ流路のインレットに装着した。細胞はシリンジピストンによる圧力で流路へと導入した。画像取得範囲における細胞の流速が安定した事を確認した後、一分間画像取得を行い、計測は $6 \sim 10 \mu\text{m}$ 径の異なる流路を使用して数回行った。細胞の直径と通過時間は自作のプログラムによって取得した画像から自動的に外挿し、結果は Excel のスプレッドシート形式で通過時間対細胞直径の 2 次元プロットとして出力された。マウス骨髓細胞を用いた測定結果から、通過時間と細胞直径に明らかな直線相関性が見られた。一方でヒト赤血球を用いた実験ではそのような相関関係は得られなかった。さらに、プロット上にて回帰曲線に乗らない細胞集団が存在した。この事はこれらの細胞集団は流路内にて他の細胞と違った挙動を取っていることを示唆している。画像解析よりこのような細胞集団中の幾つかの細胞は形態的に死細胞であると判断した。予想外に、クローン細胞であるはずのがん細胞株を使用した実験では流路内での挙動が不均一であったが、ヒト末梢血単核球とがん細胞を混合したサンプルにて通過時間と細胞直径を計測した所、プロット上にて 2 つの細胞種類を判別可能であることが分かった。以上の結果は、本システムと細胞物性が血液中の希少細胞を分離する際の新しい指標の有用性を示唆していると考えられる。さらに、多能性幹細胞由来赤芽球株の測定結果から、核の大きさと通過時間との間に正の相関性が見られることが分かった。成熟赤血球の高い変形能は成熟過程に生じる脱核に起因し、循環中に血管を通るのに重要である事を考慮すると、これらの結果は代替輸血ソースとして

使用する際には、脱核した成熟赤血球を使用することの必要性を改めて示唆しているものと思われる。以上より、本システムは多能性幹細胞由来赤血球を臨床応用する際の品質管理においても有用であることを示唆している。2方向性の流路の shear rate を流路スピードと形状によってコントロールし、巨核球細胞がメイン流路の刺激に伴って、プロプレイトレット (proplatelet) とよばれる血小板産生形態、引き継ぎ細胞質の断片化 (fragmentation) が観察され、血小板が培養液の流れ刺激に伴って促進される事が示唆された。産生された血小板量は、2方向角度が 90° 差で設計された MEMS 流路では有為な増加を観察できなかった。一方、2方向流路を 60° に改変した結果、血小板産生がコントロール (静置培養条件下) に比し、3倍以上に上昇した。デバイスを介して産生された血小板の活性化 (PAC-1, 活性型インテグリン α IIb β 3 の量を定量) は、コントロールと差を認めず、こうした MEMS システムの高いポテンシャルを認識できた。

3-5. 今後の展望

本研究により、細胞種によりその粘弾性に違いがあることが分かった。今後は、さらに詳細に細胞を区別するために、閉鎖系でも使用することが可能な細胞膜上の病態特異的なタンパクや特殊構造糖鎖を認識する RNA アプタマー、レクチン等をスクリーニングする。さらに細胞の forward scatter, side scatter、静電特性等の計測による細胞の大きさ、スペクトラム解析による自家蛍光パターン、細胞の硬さ、表面の性状 (凹凸) 等の物理化学的性質についても解析する手法の開発を目指す。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(すべて査読有) (計44 件)

- [1] Takebe, T., Enomura, M., Yoshizawa, E., Kimura, M., Koike, H., Ueno, Y., Matsuzaki, T., Yamazaki, T., Toyohara, T., Osafune, K., Nakauchi, H., Yoshikawa, H. Y. and Taniguchi, H. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell Driven Condensation. *Cell Stem Cell*. 16(5):2015;55665. doi:10.1016/j.stem.2015.03.004.
- [2] Rashid T, Takebe T, Nakauchi H. Novel strategies for liver therapy using stem cells. *Gut*. 64(1):2015;1-4. doi:10.1136/gutjnl-2014-307480.
- [3] Okeyo, K. O., Kurosawa, O., Yamazaki, S., Oana, H., Kotera, H., Nakauchi, H. and Washizu, M. Cell Adhesion Minimization by a Novel Mesh Culture Method Mechanically Directs Trophoblast Differentiation and Self Assembly Organization of Human Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 21(10):2015;1105-15. doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0038.
- [4] Iriguchi, S., Kikuchi, N., Kaneko, S., Noguchi, E., Morishima, Y., Matsuyama, M., Yoh, K., Takahashi, S., Nakauchi, H. and Ishii, Y. T- cell- restricted T- bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of macrophages in the lung *Blood* 125:2015;370- 82. doi:10.1182/ blood- 2014- 05- 575225
- [5] Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K., Koike, T., Harimoto, K., Dohda, T., Watanabe, A., Okita, K., Takahashi, N., Sawaguchi, A., Yamanaka, S., Nakauchi, H., Nishimura, S. and Eto, K. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14:2014;53-548. doi:10.1016/ j.stem.2014.01.011
- [6] Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Tomioka, M., Kondo, T., Kuo, T. F., Endo, H., Inoue, H., Sato, S., Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata,

- K., Kawase, E., Chang, Y. T., Suemori, H., Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., Ueda, K. and Uesugi, M. A chemical probe that labels human pluripotent stem cells. *Cell reports* 6:2014;1165– 74. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.006
- [7] Hirose, S., Takayama, N., Nakamura, S., Nagasawa, K., Ochi, K., Hirata, S., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Otsu, M., Sano, S., Takahashi, N., Sawaguchi, A., Ito, M., Kato, T., Nakauchi, H. and Eto, K. Immortalization of Erythroblasts by c- MYC and BCL- XL Enables Large- Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 1:2013;499–508. doi:10.1016/j.stemcr.2013.10.010.
- [8] Nakagawa, Y., Nakamura, S., Nakajima, M., Endo, H., Dohda, T., Takayama, N., Nakauchi, H., Arai, F., Fukuda, T. and Eto, K. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell- derived megakaryocytes. *Exp Hematology*. 41:2013;742– 8. doi:10.1016/ j.exphem.2013.04.007. Epub 2013 Apr 22.
- [9] Takayama N, Eto K. Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and provide a source of platelets for clinical application. *Cell Mol Life Sci* 69:2012;3419– 28. doi: 10.1007/ s00018- 012- 0995- 4.
- [10] Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Kakuta, S., Iwakura, Y., Takayama, N., Oehara, J., Otsu, M., Kamiya, A., Petrich, B. G., Urano, T., Kadono, T., Sato, S., Aiba, A., Yamashita, H., Sugiura, S., Kadowaki, T., Nakauchi, H., Eto, K. and Nagai, R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood* 119:2012;e45–56.

などその他含め計44件

(2)学会発表 (計18 件)

- [1] Hiromitsu Nakauchi, Dietary created niche for non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. International Society for Experimental Hematology (ISEH) 44th Annual Scientific Meeting (招待講演) (国際学会) 2015年09月 18日京都国際会館 (京都府京都市)
- [2] 中内啓光, Exploring heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment 日本分子生物学会シンポジウム(招待講演)2013年12月04日兵庫
- [3] Hiromitsu Nakauchi, " Novel non- stepwise early differentiation pathways of HSCs revealed by 5- lineage in vivo tracing" Gordon Research Conference "Stem Cells & Cancer" (招待講演)2013年04月
- [4] Hiromitsu Nakauchi, Isolation, Clonal Characterization and Hibernation of Hematopoietic Stem Cells. Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge(招待講演) 2012年05月24日~ 2012年05月24日 Cambridge, England
- [5] Hiromitsu Nakauchi, Stem cell biology and its potentials for future medicine. University of Zurich(招待講演) 2012年08月16日~ 2012年08月16日 Zurich, Switzerland
- [6] Hiromitsu Nakauchi, Hibernation of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche The University of Edinburgh(招待講演)2012年09月05日 ~ 2012年09月05日Edinburgh, England
- [7] Hiromitsu Nakauchi, In Vivo Clonal Analysis of Hematopoietic Stem Cells Unveils Novel Myeloid Bypass Differentiation Pathways. 2013 USA- Japan Science Conference(招待講演)2013年03月 24日~ 2013年03月27日 Hawaii, USA
- [8] 江藤浩之, まれな血液型およびHLAタイプ患者のための iPS細胞技術を用いた新しい輸血システム開発

第18回日本血液代替物学会年 2011/10/27 札幌

[9] Eto K, Potential application of human iPS cell derived blood cells and evaluation system in mouse xenogeneic transplantation models. The Third International Workshop on Humanized Mice (Invited) 2011/10/28-31 Pittsburgh, USA

[10] Eto K, PRODUCTION OF PLATELETS FROM STEM CELLS The XXIInd Regional Congress of the ISBT (Invited) 2011/11/20-23 Taipei, Taiwan

などその他含め計18件

(3) 図書 (計2 件)

1. 中内啓光(編集) 南山堂 幹細胞研究と再生医療2013:238

2. 中内啓光(監修)清田純(編集) 羊土社 直伝!フローサイトメトリー2013:278

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計3 件)

名称：多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法

発明者：佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内 啓光

権利者：東京大学, テルモ株式会社

種類：PCT

番号：JP2011/070563

出願年月日：2011/9/9 国内外の別：外国

名称：血小板の機能を維持するための組成物

発明者：江藤浩之

権利者：東京大学

種類：PCT

番号：JP2011/071190

出願年月日：2011/9/16 国内外の別：国内

名称：多能性幹細胞からの巨血球及び／又は血小板の製造方法物

発明者：江藤浩之

権利者：東京大学

番号：2011-219545

出願年月日：2011/10/3 国内外の別：国内

○取得状況 (計3 件)

名称：多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法

発明者：佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内啓光

権利者：東京大学, テルモ株式会社

種類：PCT 番号：JP2011/070563

国内外の別：国内／国外

取得年月日：2014/8/22 日本、2014/7/14 米国

名称：血小板の機能を維持するための組成物

発明者：江藤浩之, 大西椋子, 中内啓光, 村田隆彦

権利者：東京大学, 科研製薬株式会社

種類：PCT

番号：JP2011/071190

国内外の別：国内／国外

取得年月日：2015/4/22 中国、2016/1/29 日本、2014/12/4 オーストラリア、2013/11/15 シンガポール、
2015/5/19 米国

名称：i P S細胞からの血小板の調製方法

発明者：江藤 浩之, 中内 啓光, 辻 嘉代子, 西野 泰斗, 中村 隆典, 岩本 俊介

権利者：東京大学、日産化学工業株式会社

番号：PCT/JP2012/075705

国内外の別：国内／国外

取得年月日：2016/1/29 日本

計画研究 A02

課題番号：23106005

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：超高速微細操作技術を用いた3次元細胞システム構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 健生 (Arai, Tatsuo) 大阪大学・基礎工学研究科・教授

(2) 研究分担者

前 泰志 (Mae, Yasushi) 大阪大学・基礎工学研究科・准教授

小嶋 勝 (Kojima, Masaru) 大阪大学・基礎工学研究科・助教

谷川 民生 (Tanikawa, Tamio) 独立行政法人産業技術総合研究所・

知能システム研究部門統合知能研究グループ・研究グループ長

大原 賢一 (Ohara, Kenichi) 名城大学・理工学部・准教授

吉川 洋史 (Yoshikawa, Hiroshi) 埼玉大学・理工学研究科：准教授 平成26年度～平成27年度

松井 裕史 (Matsui, Hirofumi) 筑波大学・医学医療系・講師 平成26年度～平成27年度

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	12,400,000	9,120,000	16,120,000
平成24年度	16,700,000	5,460,000	21,710,000
平成25年度	17,700,000	5,310,000	23,010,000
平成26年度	18,200,000	5,010,000	23,660,000
平成27年度	30,400,000	3,720,000	39,520,000
総計	95,400,000	28,620,000	124,020,000

3. 研究成果

研究成果の概要

本研究では、in vitroにおいて活性化した3次元細胞システムの構築プロトコルの確立を目指し、大きく以下の課題を設定した。1. ロール方式による管状細胞パーツの生成, 2. マイクロ流体チップを用いた管状細胞パーツの生成, 3. 可変モールド・ロボットアームを用いた任意形状3次元細胞パーツの生成, 4. マニピュレータを用いた細胞システムの高速度構築技術の開発。以上を推進し、細胞を含有した任意形状の「管状パーツ」や「格子形状パーツ」等の細胞システムパーツの新たな構築プロセスの確立や、2本指マイクロハンドを用いたマイクロマニピュレーション技術をベースにした世界最速の微小物体操作を実現した。

3-1. 研究開始当初の背景

ロボティクス分野では国内外において、マイクロマニピュレーション技術を活用した細胞のハンドリングや計測応用などの研究開発が急速に進展している。一方、生体・組織制御の研究開発では機械化が浸透しているものの、スキルを要する部分については依然としてヒトの手により行われており、生産性の低い点が課題である。当研究グループでは、 $1\mu\text{m}$ から $150\mu\text{m}$ の微小対象物を器用に操る 2 本指マイクロハンドの開発に長年携わっており、全焦点顕微鏡による 3 次元マイクロ環境可視化技術と融合して繊維芽細胞や牛卵子の自動ハンドリング、さらに細胞把持時の剛性計測などに成功した。このような研究の成果は大きな評価を得ている。本領域研究の「A02: 3 次元細胞システム構築」においては、細胞システムの 3 次元化を超高速度で実現するため、「管状パーツ」や「格子形状パーツ」等の細胞システムパーツの新たな構築プロセス、並びにマイクロマニピュレーション技術をベースにした 3 次元細胞システム組立の手法を提案する。各種パーツ形成にはハイドロゲルを基盤とし、MEMS 技術を統合したシステムの構築を行う。これらは培養と 3 次元成形を並列に行うプロセスの超高速度化を目指すと同時に、ロボティクスを駆使した自動化・高精度化を行う点で独創的である。さらに、マイクロハンドの超高速度制御による組立操作を確立することにより、上記および領域内他班提案手法に基づいて形成された細胞システムパーツの任意 3 次元形状への創成を達成する。マイクロロボティクスを基盤とする特色を活かし、細胞システムパーツのアセンブリに関する方法論の確立にも踏み込む。以上により、領域の目指す *in-vitro* での超高速度 3 次元細胞システム構築に貢献する。

3-2. 研究の目的

本研究では、2 本指マイクロハンドによる微細操作技術および実時間全焦点顕微鏡システムによる微細環境の可視化技術、さらには微小流路内での細胞操作技術を基盤として、活性化する 3 次元細胞システムの *in vitro* 環境での構築プロトコルの確立を目的とする。また、マイクロハンドおよび実時間全焦点顕微鏡技術の改良により、高速での細胞システムパーツ自動組立技術を開発する。*in vitro* 環境で 3 次元細胞システムを構築するためには、3 次元細胞システム内への酸素供給は重要な課題である。本研究では、高速での組立技術により、早期の血管導入による 3 次元細胞システムへの酸素供給経路を確保し、有用なサイズの 3 次元細胞システムの短期間での生成を行う。3 次元細胞システムパーツから 3 次元細胞システムの構築まで一貫した構築プロトコルを確立し、*in vitro* における活性化する 3 次元細胞システム構築原理を解明する。

3-3. 研究の方法

in vitro において活性化した 3 次元細胞システムの構築プロトコルの確立を目指し、本研究では、大きく次の課題を設定して研究を推進する。1. ロール方式による管状細胞パーツの生成、2. マイクロ流体チップを用いた管状細胞パーツの生成、3. 可変モールド・ロボットアームを用いた任意形状 3 次元細胞パーツの生成、4. マニピュレータを用いた細胞システムの高速度構築技術の開発。

【ロール方式による血管の生成】管状細胞パーツ構築を目的とし、細胞シートを利用した管状細胞パーツ構築プロトコルを開発する。細胞シートを積層化することにより、細胞が積層化された管状細胞パーツ構築を試みる。自動的に管状細胞パーツを生成するためのシステム設計を行う。

【マイクロ流体チップを用いた管状細胞パーツの生成】管状細胞パーツ構築を目的とし、自動的に管状細胞パーツを生成するためのシステム設計を行う。マイクロ流体チップを用いたトロイダル形状スフェロイドの生成プロトコルについて、試作チップから得られた研究結果に基づいて再設計を行う。このマイクロ流体チップに関して、生成したパーツの評価を行う。

【可変モールド・ロボットアームを用いた任意形状 3 次元細胞パーツの生成】新規可変モールドシステム

を構築し、細胞シート形成技術と組み合わせることで、任意形状の3次元細胞パーツの生成を行う。微小流路内でハイドロゲルを生成し、その中に細胞を内包する手法を用い、これらの配置をロボットアームで自動化することで、任意形状の細胞を内包したパーツの構築法を開発・パーツの評価を行う。

【マニピュレータを用いた細胞システムの高速度構築技術の開発】in vitro 環境で活性化する3次元細胞システムの構築において、高速な3次元細胞パーツの組立のため、マイクロハンドの高速化および実時間全焦点顕微鏡システムの高速度化を行う。マイクロハンドの高速動作時の振動抑制手法、3次元細胞パーツと3次元細胞システムの高速度検出アルゴリズム、顕微鏡システムのユーザインタフェースを開発し、検証する。

3-4. 研究成果

(1) ロール方式による管状細胞パーツの生成

ロール方式では血管などの管状細胞システムパーツの構築を目的とする。本手法では、2枚の細胞シート間にアガロースによるチューブを複数設置し、このチューブを足場とするロール化による管状3次元細胞の構築を行った。本手法の試行から、管状細胞パーツの生成における課題が明らかとなった。一方、他班から優れた管状細胞パーツの生成手法が新たに提案されたのを受けて、これらの提案技術を基盤とした、多方面に応用可能な基礎技術となりうる、管状構造の自動形成に取り組んだ。

(2) マイクロ流体チップを用いた管状細胞パーツの生成

細胞の投入・トロイダル形状の形成、細胞の培養の一連の作業を1つの流路で完結することを目指し、3次元形状の流路を設計し、流体シミュレーション結果を通じて、手法の有用性の基礎検証を行った後、本自動形成システムの試作版を用いて細胞培養実験を行った。流体シミュレーション結果から、細胞が流出する問題点が明らかとなった。この細胞が流出する問題点は電気化学的手法を組み合わせることによって解決し、連続的に培養可能な灌流系と組み合わせることでトロイダル形状を形成する手法を提案した。

(3) 任意形状3次元細胞パーツの生成

PDMSを用いた微小整形技術による任意形状細胞シート形成が可能な可変モールドデバイスを開発した。細胞シート形成においては他班の支援を受け、試作版の作成および基礎的な機能の評価を行い、任意形状の構造体形成が可能であることを示した。更に、本デバイスを発展させ、小型化、並列アレイ化を行い、PDMSアクチュエータを利用した任意形状細胞パーツ形成システムを構築した。また、他班との連携で導入したハイドロゲルファイバを用いて、3次元細胞システム構築を目指し、3自由度ロボットアームを用いた格子形状3次元細胞システム構築装置の開発を行った。本装置は、シリンジポンプと3自由度ロボットアームから構成されており、すべての機器がPCからの制御が可能である。本装置により、任意形状の3次元細胞システムの構築が可能となる。基礎検証として、細胞への酸素や栄養分供給に有効と考えられる格子形状に注目し、その構築を行った。格子形状の構築、および積層化が可能であることを確認し、実際に細胞の培養に成功した。さらに、本ロボットシステムにフルイディクスに基づくゲルファイバ形成マイクロチップを組み合わせることで、層流を用いた高速かつ複雑な形状を作製可能なシステムを構築し、細胞で構成された任意形状パーツ形成に適用した。

(4) 3次元細胞システムの高速度構築技術の開発

2本指マイクロハンドを用いて高速な組み立てを実現するためには、安定した物体把持が不可欠である。マイクロハンドの動作が高速化により、低速動作時には顕著な問題として現れてこなかった、振動の問題が安定把持に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。そこで、安定把持実現に向けた振動抑制制御の開発を行った。本制御では、ハイスピードカメラによる振動解析に基づく、振動のモード解析と、解析結果に基づくフィードフォワード制御の適用により、振動抑制を実現し、高速把持時の安定性が向上していることを確認した。本手法とマイクロハンドの剛性の向上により、1秒以内の自動把持・搬送を実現した。

また、作業高速化においては、把持した対象物をいかに精度良く・高速にエンドエフェクタからリリースするかが課題となっており、この問題解決には MEMS 技術に基づいて開発した新規エンドエフェクタを用いた。表面形状を加工した物や、電界発生装置を備えたマイクロハンド用高機能エンドエフェクタを構築することにより、対象物の高速リリースを実現した。また、振動を利用した細胞のリリースにも取り組み、特殊な加工を行わないエンドエフェクタを用いた高速なリリースを実現した。

また、高速カメラ及びピエゾアクチュエータを組み合わせ、高さ方向の情報を含めた 3 次元環境を提示するシステム、直感的に操作可能なインターフェースを構築し、細胞操作におけるマイクロハンドのユーザビリティを改善した。

以上に挙げた高機能エンドエフェクタを搭載した高機能マイクロハンドシステムを構築することにより、作業の高速化・自動化を図り、本提案および領域内他班提案手法に基づいて形成された細胞システムパーツの操作に応用した。

3-5. 今後の展望

細胞や組織の特性計測手法については、剛性計測を中心に大変進展し、ヒドラ発生時の形態変化と内部発生力の変化との関連に関して国際共同研究で大きな成果が得られた。また、東北大学加齢研究所からは、細胞への外部刺激と病態との関連を解明する共同研究の申し出があり、平成 28 年度より科学研究費基盤研究「細胞核の力学刺激応答計測を実現するバイオプラットフォーム」(16H02321, 新井健生代表)により新たな方向へ発展している。今後は、様々な外部刺激と細胞や組織の分化、増殖、病態変異との関連を詳細に解明するツールの開発と生理学的解析を進める予定である。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計23 件)

- [1] 奥田一郎, 田窪朋仁, 前泰志, 大原賢一, 新井史人, 新井健生, マルチファイバアレイセンサによる微小流路を移動する粒子計測, 電気学会論文誌E, Vol.132 No.7 p.203-211, 2012
- [2] Chanh-Nghiem Nguyen, Kenichi Ohara, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, High-Speed Focusing and Tracking of Multisized Microbiological Objects, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.25 NO.1 pp.115-124, 2013
- [3] Ebubekir Avci, Kenichi Ohara, Tomohito Takubo, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Development of Multi-Scalable Microhand System with Precise Motion Ability, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol. 25 No.1 .183-191, 2013
- [4] Ebubekir Avci, Chanh-Nghiem Nguyen, Kenichi Ohara, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Analysis and Suppression of Residual Vibration in Microhand for High-Speed Single-Cell Manipulation, International Journal of Mechatronics and Automation, Vol.3 No.2 p.110-117, 2013
- [5] Puwanan Chumtong, Masaru Kojima, Kenichi Ohara, Yasushi Mae, Mitsuhiro Horade, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato Tatsuo Arai, Design and fabrication of changeable cell culture mold, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.25 No.4 p.657-664, 2013
- [6] Kenichi Ohara, Masaru Kojima, Akira Fukushima, Shun Onozaki, Mitsuhiro Horade, Masumi Yamada, Minoru Seki, Yasushi Mae Tatsuo Arai, Automated Construction System for 3D Lattice Structure Based on Alginate Gel Fiber Containing Living Cells, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.25 No.4 p.665-672, 2013

- [7] Puwanan Chumtong, Masaru Kojima, Mitsuhiro Horade, Kenichi Ohara, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato Tatsuo Arai, Flexible micro scaffold facilitating the in vitro construction of different cellular constructs, ROBOMECH Journal, Vol.1 No.9, 2014
- [8] Ebubekir Avci, Kenichi Ohara, Chanh-Nghiem Nguyen, Chayooth Theeravithayangkura, Masaru Kojima, Tamio Tanikawa, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, High-Speed Automated Manipulation of Microobjects Using A Two-Fingered Microhand, IEEE Transactions on Industrial Electronics, Vol.62 No.2 pp1070-1079, 2015
- [9] M Horade, M Kojima, K Kamiyama, T Kurata, Y Mae, T Arai, Development of an optimum end-effector with a nano-scale uneven surface for non-adhesion cell manipulation using a micro-manipulator, Vol.25 No.11 p115002, 2015
- [10] M. Veschgini, F. Gebert, N. Khangai, H. Ito, R. Suzuki, T. W. Holstein, Y. Mae, T. Arai, M. Tanaka, Tracking mechanical and morphological dynamics of regenerating Hydra tissue fragments using a two fingered micro-robotic hand, Applied Physics Letters, Vol.108, p. 103702 1-4, 2016

などその他含め計23件

(2) 学会発表 (計84 件)

- [1] Ebubekir Avci, Chanh-Nghiem Nguyen, Kenichi Ohara, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Towards High-Speed Automated Micromanipulation, The 2013 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2013), Germany, 2013
- [2] Hiroyuki Yabugaki, Kenichi Ohara, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Tamio Tanikawa, Tatsuo Arai, Automated Stable Grasping with Two-Fingered Microhand using Micro Force Sensor, The 2013 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2013), Germany, 2013
- [3] Ebubekir Avci, Hiroyuki Yabugaki, Takayuki Hattori, Kazuto Kamiyama, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Dynamic releasing of biological cells at high speed using parallel mechanism to control adhesion forces, 2014 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2014), Hong Kong, 2014
- [4] Masaru Kojima, Takahiro Motoyoshi, Kenichi Ohara, Mitsuhiro Horade, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Control of Flagellar Motor Using a Real-time Local Environment Chemical Stimulation System, 2014 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2014), Hong Kong, 2014
- [5] M. Kojima, M. Horade, K. Kamiyama, Y. Mae, T. Fukuda, T. Arai, MOVEMENT OF ASYMMETRIC SHAPE MICRO STRUCTURE ON BACTERIAL SHEET, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2014), USA, 2014
- [6] M. Horade, M. Kojima, K. Kamiyama, Y. Mae, T. Arai, DEVELOPMENT OF MICRO-HEATER ARRAY DEVICE WITH REGIONAL SELECTIVE HEATING FOR BIOCHEMICAL APPLICATIONS, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2014), USA, 2014
- [7] Puwanan Chumtong, Masaru Kojima, Mitsuhiro Horade, Kenichi Ohara, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Tatsuo Arai, On-chip Flexible Scaffold for Construction of Multishaped Tissues, 2014 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS 2014), USA, 2014
- [8] Takahiro Motoyoshi, Masaru Kojima, Kenichi Ohara, Mitsuhiro Horade, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Development of a Real-time Local Environment Stimulation System with Visual

Feedback Control, 2015 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2015), USA, 2015

[9] Takayuki Hattori, Kazuto Kamiyama, Masaru Kojima, Mitsuhiro Horade, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Generation of Swirl Flow by Needle Vibration for Micro Manipulation, IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS 2015), Germany, 2015

[10] Eunhye Kim, Masaru Kojima, Kazuto Kamiyama, Mitsuhiro Horade, Yasushi Mae, Tatsuo Arai, Releasing and Accurate Placing of Adhered Micro-Objects using High Speed motion of End Effector, 2015 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS 2015), Germany, 2015

などその他含め計84件

(3) 図書 (計1 件)

[1] Masaru Kojima, Yasushi Mae, Kenichi Ohara, Mitsuhiro Horade, Kazuto Kamiyama, Tatsuo Arai, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems (Chapter7), Springer, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計3 件)

名称：画像生成法、画像生成装置、及び画像生成装置を備えた内視鏡検査装置

発明者：新井健生，前泰志，小嶋勝，大原賢一，松井裕史

権利者：学校法人名城大学、国立大学法人筑波大学、国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願2014-098076

出願年月日：2014 年5 月9 日

国内外の別：国内

名称：ヒーターアレイ、デバイス、ヒーターアレイの製造方法

発明者：洞出光洋，小嶋勝，神山和人，前泰志，新井健生

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願2014-178616

出願年月日：2014 年6 月4 日

国内外の別：国内

名称：表面ナノ凹凸構造を有するマイクロマニピュレーション用エンドエフェクタ、及び表面ナノ凹凸構造の製造方法

発明者：洞出光洋，小嶋勝，神山和人，前泰志，新井健生

権利者：洞出光洋，小嶋勝，神山和人，前泰志，新井健生

種類：特許

番号：特願2015-081466

出願年月日：2015 年4 月13 日

国内外の別：国内

計画研究 A02

課題番号：23106006

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：ナノスケール超高速細胞選別・操作に基づく3次元細胞システムの超高速アセンブリ

1. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 敏男 (FUKUDA TOSHIO) 名城大学・理工学部・教授

(2) 研究分担者

中島 正博 (NAKAJIMA MASAHIRO) 名古屋大学・工学研究科・助教

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
平成24年度	20,100,000	6,030,000	26,130,000
平成25年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
平成26年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
平成27年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
総計	90,800,000	27,240,000	118,040,000

3. 研究成果

研究成果の概要

マイクロチップ内での細胞操作技術を発展させ、細胞をハイドロゲルなどのマイクロ構造体中に閉じ込めることで、連続的に細胞をアセンブリする技術を提案した。また、磁性などを利用することで、マイクロ構造体中に閉じ込めた細胞を一括してアセンブリすることで、3次元細胞システムの超高速アセンブリ技術を提案した。さらに、局所環境計測・制御用デバイス技術を応用し、環境制御型電子顕微鏡内でのナノマニピュレーション技術を発展させ、3次元かつ局所的な細胞操作システムを構築した。

3-1. 研究開始当初の背景

近年、生命システムの最小機能単位である細胞における局所環境の解析や制御について研究が活発であり、再生医療などを目指し3次元組織構築に対して注目が集まっている。

我々はこれまでマイクロチップやマイクロ・ナノピペットによる局所環境計測・制御技術や、ナノツールを用いて単一細胞の物理化学特性を低侵襲に計測・操作するといった新規バイオ環境制御システムを世界に先駆けて構築してきた。特に、ナノマニピュレーション技術によりナノツールをマイクロメートルサイズの細胞に対して応用し、これまで不可能であった局所的な細胞計測を行ってきた。また、マイクロメートル精度で患者の血管構造を模擬した血管内手術シミュレータ“EVE (Endovascular Evaluator)”を提案し、血管内治療に関わる医療技術の評価やテーラーメイド人工血管足場への応用について取り組んでき

た。

3-2. 研究の目的

本研究では、マイクロチップ内での細胞操作技術を発展させ、細胞をハイドロゲルなどのマイクロ構造体中に閉じ込めることで、連続的に細胞をアセンブリする技術を実現する。また、磁性などを利用することで、マイクロ構造体中に閉じ込めた細胞を一括してアセンブリすることで、3次元細胞システムの超高速アセンブリ技術の確立を目指す。さらに、局所環境計測・制御用デバイス技術を応用し、環境制御型電子顕微鏡内でのナノマニピュレーション技術を発展させ、3次元細胞システムの機能解明のための局所細胞操作システムを構築する。

3-3. 研究の方法

本研究で提案した主な研究方法について述べる。

1) マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップによる細胞アセンブリ

マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップを提案し、3次元の細胞構造体作製へ応用した。主に、下記の4つの課題に取り組んだ。

第1に、細胞を操作する手法が必要である。このため、オンチップで光硬化性樹脂を任意形状に加工する技術を応用しマイクロ流体チップ中にマイクロツールを導入した。このマイクロツールは、光ピンセットなどの方法により駆動することができ、細胞と同等の非常に小型のマイクロツールを実現した。

第2に、細胞を一括して操作するために、マイクロ構造体に固定する手法が必要である。細胞は、生体組織を構成するにあたり、微細かつ複雑なパターンを有している。我々は、誘電泳動力(Dielectrophoresis, DEP)を用いて、細胞をパターンニングする技術を応用した。また、パターンニングした細胞の形状を保つために、光硬化性樹脂中に包埋する方法を提案した。これにより、様々な形状のマイクロ細胞構造体を作製した。

第3に、作製したマイクロ細胞構造体を3次元構造体に組み立てる手法が必要である。我々は、オンチップで流体力を用いて、作製した2次元細胞構造体を自己組織的に組み立てる手法を提案した。これにより、管状の3次元細胞構造体の組み立てへ応用した。

第4に、組み立てた3次元細胞構造体をマイクロチップから取り出す手法である。我々は、マイクロバルブを組み込んだマイクロ流体チップにより、3次元細胞構造体を取り出す手法を提案した。

2) 磁場操作に基づいた細胞アセンブリ

ハイドロゲルファイバを用いることで、各種細胞を閉じ込めて、3次元的に組み上げる手法を提案した。この際、ゲルファイバ中に磁性微粒子を包埋することで、外部磁場によりゲルファイバを操作した。我々は、磁気ピンセットを用いて、磁性微粒子を含むゲルファイバを3次元的に操作するシステムを構築した。ゲルファイバ中の細胞の濃度及び磁性微粒子の濃度を調整することにより、磁気操作時に十分な磁力が得られるとともに、細胞の成長を阻害しないゲルファイバを得る必要がある。このため、オンチップで細胞と磁性微粒子を含むゲルファイバを作製した。また予め磁石を配置しておくことで、磁力を利用して磁性ゲルファイバを容易に3次元空間に固定する手法を提案した。固定したゲルファイバを溶解し、細胞培養することで、3次元細胞構造体を得ることが出来る。

3) ツールフィーディングシステムによるナノマニピュレーションの効率化

微細な作業を実現するマイクロ・ナノマニピュレーションは、生体物質や細胞を扱うバイオ分野を中心として応用が進んでいる。我々は、環境制御型電子顕微鏡(Environmental Scanning Electron Microscope, E-SEM)内でのナノマニピュレーションシステムにより、湿潤状態の生物試料に対して、複数のナノツールを用いたナノサージェリーシステムを提案してきた。この際、各ナノツールを手作業で交換すると交換作

業に手間と時間を要することが問題であった（試料室を大気開放し、再度、減圧するために15分～2時間程度が必要である。）

そこで本研究では複数のマイクロ・ナノツールを連続的に使用可能とし、ナノマニピュレーションを効率化するためのツールフィーディングシステムを提案した。回転テーブル式ツールフィーディングシステム（Rotary Tool Feeding System, RTFS）は①回転テーブル②アーム③モータ取り付け部④回転バーの4つの部品から構成される。まず予め複数のナノツールを回転テーブルに取り付けておく。回転テーブルが回転することで使用するマイクロ・ナノツールを交換する。電子顕微鏡内に組み込むため、コンパクトな機構が必要であるので、ウォームギヤを先端部に用いることで、モータの回転をテーブルの回転に変換する機構とした。

3-4. 研究成果

本研究で提案した主な研究成果について述べる。

1) マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップによる細胞アセンブリ

我々が提案した、オンチップ加工法により、マスク形状に基づいた様々な形状のマイクロ構造体中に、細胞を包埋することが出来た。例えば、ドーナツ形状の細胞構造体を作製した。このマイクロ細胞構造体は、マイクロ流体チップ中で流体力により搬送が可能である。そこで、マイクロ細胞構造体がマイクロウェルと呼ぶマイクロチップ中の空間に入る際、流れ方向に沿って90度回転するように流体デバイスを設計した。これにより、マイクロ構造体を順次マイクロウェルへ配列し、積層化する手法を提案した。

この手法を実現するため、4層からなるPDMSマイクロ流体デバイスを作製した。第1層目はマイクロ構造体をオンチップ作製するためのスペースである。第2層目はマイクロ構造体を組み立てるためのマイクロウェルである。第3層目は薄いPMDS薄膜と、マイクロウェルに流れてきたマイクロ構造体を堰き止めるためのストッパーである。ストッパーには細い溝があり、流体は流れるがマイクロ構造体は堰き止めることができる。第4層目は負圧によって第3層目の薄膜を変形させ、ストッパーを第4層目へと落ち込ませることで、マイクロウェルで組み立てたマイクロチューブをデバイス外部に取り出すことができる。この機構は常閉型バルブと呼び、負圧を印加しない際は、ストッパーが作動する機構である。

提案したマイクロ流体デバイスを用いて、マイクロ構造体の自己組織的組み立てを行った。マイクロ構造体をオンチップ作製手法により作製し、流路出口からシリンジポンプを用いて流体を吸引することで、マイクロ構造体をマイクロウェルへと運び、自己組織的に配列し組み立てた。この場合、18秒間で9個のドーナツ型マイクロ構造体を積層し、マイクロチューブに組み立てた。そして、先に述べた常閉型バルブを開放することにより、組み立てたマイクロチューブ構造体をデバイスから取り出すことに成功した。以上により、細胞が生存した状態で、マイクロチューブ細胞構造体を作製することに成功した。

2) 磁場操作に基づいた細胞アセンブリ

小口径細胞構造体の作製技術として、ゲルファイバ巻き取りシステム(Gel-Fiber Reeling System, Gel-FRS)を提案した。本装置は、小口径の人工血管形状を有する生分解性(poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), PLCL)足場に、細胞を包埋したゲルファイバを巻き取ることで細胞を播種するために用いた。作製したハイドロゲルファイバ中の細胞の生存率を確認するために、Live/Dead染色により細胞を蛍光染色し、倒立顕微鏡で生細胞と死細胞を蛍光観察した結果、細胞の生存率は90%以上であった。

提案した手法により、PLCL材の人工血管足場に繊維芽細胞及び平滑筋細胞を播種した。細胞を含んだゲルファイバを足場に巻きつけた後、ゲルを溶解させ細胞を足場上に播種した。この際、足場上下面に均一に細胞を付着させるため、足場を一定時間間隔で回転させた。回転条件によって、足場の上面の細胞の剥がれが異なることが確認され、回転条件を1時間に設定することで、足場の上面と下面の全体を細胞で覆う

ことが出来た。

また、磁性微粒子を含むゲルファイバを、マイクロ流体チップにより作製した。マイクロ流体チップを用いることで、ゲルファイバ中での磁性微粒子の位置・濃度を高精度に調整することが可能となる。磁性微粒子は、マイクロ液滴としてゲルファイバ中に包埋した。作製した磁性微粒子を含むゲルファイバを組み立て操作するため、磁気ピンセットを用いた。磁気ピンセットは、電磁石を用いて、磁性ゲルファイバに対する外力を調整することが可能である。磁気ピンセットは、3次元の電動駆動ステージに取り付けられ、さらに磁気ピンセット先端部の角度を調整するためのクランプ機構と駆動用モータにより、磁気ピンセット先端の位置及び角度を調整可能である。磁場を集中させるために鋭端形状とした。実験の結果、0.2 Aの電流を印加することで、30 mTの磁場が発生し、液中で磁性ゲルファイバを操作するために十分な磁力が得られた。

実際に磁性ゲルファイバをマイクロピラーに巻き付けることでアセンブリした。マイクロピラーは、直径が0.7 mmであり、3 mm間隔に配置した。0.035 Tのネオジウム磁石をピラーの下側に配置することで、アセンブリした磁性ゲルファイバの位置決めを行った。3本のマイクロピラーやアレイ状にパターンニングしたマイクロピラー上の所望の位置にゲルファイバを巻き付け、位置を固定できることを示した。

3) ツールフィーディングシステムによるナノマニピュレーションの効率化

はじめに、RTFSの動作評価を行った。RTFSのアクチュエータに単一パルスを与えることで、回転角度を 0.002° 、テーブルの端を約200 nmで位置決めできた。また、RTFSの回転速度は、最大で約1.15 rpmであり、約13秒で 90° 間隔で設置したマイクロ・ナノツールを交換することが出来た。さらに我々は、E-SEM内にSEM-CT装置(Scanning Electron Microscope-Computed Tomography, SEM-CT)を組み込むことで、3次元的な試料観察を実現した。SEM-CT装置は、電子顕微鏡の電子線を用いてX線を発生させ、X線透過像から試料の断層像を400 nm以下の高分解能かつ非破壊で観察することが可能である。

本装置を用いて、線虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)を対象としたナノインジェクション操作を行った。集束イオンビーム加工装置によりマイクロ・ナノインジェクタを作製した。先端部をインジェクションのために鋭利な形状に加工し、その根元部を細くする形状とした。RTFSによりツールを交換することで、このインジェクション操作を3回連続で行い、SEM-CT断層像によりナノツールを確認することが出来た。

3-5. 今後の展望

これまでの成果に基づいて、以下に示す点に関して、研究を発展させている。

1. 3次元の細胞構造体をより効率的に作製するために、0次元または1次元にの細胞構造体を作製する技術を2次元に発展させることで向上させるための研究を推進している。例えば、エレクトロデポジション法を用いて、高密度の細胞シート(2次元)を作製し、3次元構造体に組み上げる研究を行っている。
2. 非接触な操作技術、例えば磁力など、を応用することで、より複雑かつ高度な3次元の細胞構造体を作製する技術の研究を行っている。
3. 作製した3次元細胞構造体の機能的評価を検証し、これまで提案してきた手法の有効性を検証している。例えば、ラットの肝細胞を用いて3次元細胞構造体を作製し、アルブミンの産生能を評価した研究を行っている。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (全て査読有, 計48 件, 代表的な論文として, 4件のみ記載)

- [1] T. Yue, M. Nakajima, M. Takeuchi, C. Hu, Q. Huang, T. Fukuda, Lab on a Chip, Vol. 14, pp. 1151-1161, 2014. 査読有
- [2] C. Hu, M. Nakajima, M. Takeuchi, T. Yue, M. Seki, Q. Huang, T. Fukuda, Vol. 17, pp. 457-468, 2014. 査読有
- [3] M. Takeuchi, M. Nakajima, M. Kojima, T. Fukuda, J. of Micro-Bio Robotics, Vol. 8, pp 53-64, 2013. 査読有
- [4] M. R. Ahmad, M. Nakajima, M. Kojima, S. Kojima, M. Homma, T. Fukuda, IEEE Transactions on Nanobioscience, Vol. 11, pp. 70-78, 2012. 査読有

(2) 国際学会発表 (計125 件)

(3) 図書発表 (計0 件)

(4) その他

[受賞] (計17 件)

- [1] 福田敏男, 紫綬褒章 (2015年秋) , 内閣府
- [2] T. Fukuda, IROS Distinguished Service Award, 2015 IEEE/RSJ Int. Conf. on Intelligent Robots and Systems (IROS2015), (2015)
- [3] 福田敏男, 日本機械学会技術功績賞, (2015)
- [4] H. Wang, Q. Shi, Q. Huang, T. Sun, M. Nakajima, M. Takeuchi, T. Fukuda, Best Student Paper Award, The 12th IEEE Int. Conf. on Information and Automation (ICIA2015), (2015)
- [5] T. Fukuda, Friendship Award of State Administration of Foreign Experts affairs of the P.R.C. (2014)
- [6] 竹内大, 市川 明彦, 中島正博, 福田敏男, 長谷川泰久, ベストプレゼンテーション賞, 第15回システムインテグレーション部門講演会(SI2014), (2014)
- [7] 福田敏男, 産学官連携功労者表彰文部科学大臣賞, 文部科学大臣下村博文 (2013)
- [8] 福田敏男, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門25周年部門功労表彰 (2013)
- [9] 福田敏男, 日本知能情報ファジィ学会功績賞(2013)
- [10] M. Nakajima, Early Career Award in Nanotechnology, The IEEE Nanotechnology Council, 2013
- [11] T. Yue, M. Nakajima, C. Hu, M. Takeuchi, T. Fukuda, Best Paper Award in 2013 Int. Symp. on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2013), (2013)
- [12] M. Nakajima, N. Nakanishi, N. Hisamoto, H. Tajima, M. Homma, T. Fukuda, Best Paper Award in 2012 Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2012), (2012)
- [13] S. Ikeda, T. Fukuda, Best Poster Award in 2012 Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2012), (2012)
- [14] T. Fukuda, Friendship Award of Liaoning Province, Liaoning Provincial People's Government, PR China (2012)
- [15] T. Fukuda, IROS Harashima Award for Innovative Technologies (2011)
- [16] Y. Shen, M. Nakajima, S. Kojima, M. Homma, T. Fukuda, ICRA2011 Best Manipulation Paper Award,

(2011)

[17]福田敏男, 池田誠一, 日本機械学会技術賞, (2011)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計 6 件)

名称: ナノツールエクステンジャーシステム

発明者: 福田敏男, 中島正博, 小嶋勝

種類: 特許

番号: 特願2011-122711

出願年月日: 平成23年5月16日

国内外の別: 国内

名称: リーリング・ファイバ・システム

発明者: 福田敏男, 中島正博, 竹内大

種類: 特許

番号: 特願2013-170761

出願年月日: 平成25年8月4日

国内外の別: 国内

名称: 微小部品の流路内での自己組織的組立装置及び方法

発明者: 福田敏男, 中島正博, 竹内大

種類: 特許

番号: 特願2013-170760

出願年月日: 平成25年8月4日

国内外の別: 国内

名称: 走査型電子顕微鏡による含水試料の試料及び試料基板のコーティング処理による観察方法

発明者: 福田敏男, 中島正博, 竹内大

種類: 特許

番号: 特願2013-170762

出願年月日: 平成25年8月4日

国内外の別: 国内

名称: ハイドロゲル構造体中への混合物のセグメント状の混合構造体と作製

発明者: 福田敏男, 中島正博, 竹内大

種類: 特許

番号: 特願2013-170763

出願年月日: 平成25年8月4日

国内外の別: 国内

名称：感熱応答性ポリマーのヒステリシス特性を利用したゲルシートの作製

発明者：福田敏男，中島正博，竹内大

種類：特許

番号：特願2013-170759

出願年月日：平成25年8月4日

国内外の別：国内

計画研究 A02

課題番号：23106007

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：フルイディクスを駆使する高速細胞アセンブリ

1. 研究組織

(1) 研究代表者

関 実 (Seki, Minoru) 千葉大学・工学研究科・教授

(2) 研究分担者

山田 真澄 (Yamada, Masumi) 千葉大学・工学研究科・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	23,100,000	6,930,000,	30,030,000
平成24年度	21,500,000	6,450,000	27,950,000
平成25年度	19,700,000	5,910,000	25,610,000
平成26年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
平成27年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
総計	82,100,000	24,630,000	106,730,000

3. 研究成果

研究成果の概要

複数種の細胞を配列したハイドロゲル材料の作製として、高速かつ正確に複数種の細胞を包埋したハイドロゲル材料を作製するための、マイクロ流体工学システムを開発した。断面異方性のファイバーやシートを作製し、肝細胞共培養系の開発、神経細胞の伸長方向制御、がん細胞の浸潤アッセイデバイスなどの新規細胞培養系を実証し、その有用性を示した。さらに、細胞外マトリックスからなる微小材料の作製と応用を行った。コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分からなる細胞サイズの微粒子や繊維を作製する手法を開発し、細胞の3次元培養系に導入することで、細胞機能の向上や組織形状の安定化などを実現した。このほかにも、マイクロ流路技術を用い、細胞の高効率選抜システムや、細胞の化学的プロセッシングシステムなど、3次元組織構築に資する種々の技術開発を行った。

3-1. 研究開始当初の背景

iPS細胞に代表されるような幹細胞生物学・幹細胞工学の発展とともに、生体外において3次元的な組織・臓器を構築し、それらを再生医療や創薬に応用する研究が活発に行われるようになってきた。生体外において細胞を培養する際に、通常は培養皿やフラスコが用いられている。しかしそのような平面的な環境は3次元的で複雑な生体内環境とは大きく異なるため、細胞の機能を最大限に発現させることは困難である。そのため3次元的に細胞を培養するための手法が近年着目されており、たとえばスフェロイド(球形集塊)形成などの手法は広く利用されていると言えよう。集塊を形成することで、3次元的環境において細胞-

細胞間の相互作用を形成することができるため、たとえば幹細胞の分化制御や肝細胞の機能発現において有用であることが示されてきた。さらに、細胞シートの積層化や、ハイドロゲルへの包埋培養法などの様々な3次元培養法も提案されている。しかしながらこれらの3次元細胞培養系において、生体組織において観察されるような、「複数種の細胞が適切な位置に規則的に配列した」組織を再現することは非常に困難であると言える。複数種類の細胞が規則正しくパターン化された複雑な3次元組織を生体外で高速に作製するためには、高密度・正確・高速・立体的に複数種の細胞を配置した上で、細胞の3次元的な微細環境（物理・化学的な環境）をマイクロメートルの精度で制御する必要があると言える。また、3次元細胞培養系において、生体内の細胞外マトリックス（ECM）環境を再現することも重要な課題である。

さらにまた、3次元組織体のサイズが大きくなると、内部への酸素や栄養分の供給が不足するため、細胞が壊死するという問題がある。そのため、3次元組織に対して血管網を導入し、血流の循環と同様の灌流培養を行う必要があると言えよう。しかしながら、これまでの3次元細胞培養手法において、内部に管腔構造を形成することは通常困難であった。

一方で、本プロジェクトが開始した2010~2011年頃までには、マイクロ流体工学技術を利用することで、マイクロメートルサイズの微小材料を合成する、あるいはマイクロメートルサイズの細胞を正確に計測・操作・評価する研究例が多数報告されていた。我々の研究グループにおいても、細胞を連続的かつ正確に評価・培養・選抜・処理するためのマイクロ流路システムや、サイズの揃った微粒子を合成する手法などを報告している。マイクロ流体工学技術の特長の一つとして、流路内部において安定に形成される層流系を利用することで、たとえば異方的・複合的な材料を正確に作製できる、ということが挙げられよう。そのため我々も、断面異方性を有するハイドロゲルファイバーの作製が可能であることも実証してきた。これらの先行研究から想定されたことは、マイクロ流路を用いて内部に複数種の細胞が正確に配列した複合的・異方的なハイドロゲル材料を作製し、それらを何らかの手法によってアセンブリすることができれば、サイズの大きな3次元組織体を高速に作製することができるのではないかと、ということである。そのような手法は、組織工学における有用な基礎技術となるものと期待される。さらに、細胞アセンブリに対する上流操作である細胞の選抜や、作製した組織体の機能評価を行うことによって、それらを統合したより機能的な組織構築プロセスが実現するものと考えられる。

3-2. 研究の目的

本研究では、生体外で3次元かつ機能的な細胞組織を構築するための基盤技術として、マイクロfluidicsを駆使した高速細胞アセンブリ手法を開発することを目的とした。そのために具体的には、まず（1）平面型、多層型、あるいはアレイ状の新型マイクロ流体デバイスを設計・作製し、マイクロメートルスケールの異方的なパターンを有する、微粒子状やシート状などの、複合型ハイドロゲル素材の作製を行う。そして、それらのハイドロゲル素材の内部に細胞を包埋し培養する手法を開発しつつ、周辺技術として、アセンブリ前の細胞選抜手法と、組織形成後の細胞機能評価手法についても統合的に開発することで、ユニットとなる微小组織の形成と評価を迅速に行うシステムの開発を目的とした。特に、作製対象とする3次元生体組織として、肝小葉模倣組織体、血管構造モデル、神経ネットワーク、筋肉組織・心筋組織などの構築を目指した。

さらに、（2）各ユニットを複合化するための手法として、機械工学系の研究者と連携を行い、細胞ファイバーのマニピュレーション技術の開発を行い、また個別組織を単純に複合化するのみならず、血管内皮細胞を用いて複合化・機能化し、灌流培養を行うことによって、3次元組織における細胞機能の向上や生存率の上昇を目指した。

一方で、生体組織工学の構築においては、細胞のアセンブリだけではなく、上流の操作である細胞選抜手法や、下流の操作としての細胞機能評価とのスムーズな連携を行うことで、より機能性の高いシステム

が実現されるものと考えられる。そのため、(3) これまでに我々の研究グループにおいて開発を行ってきた細胞選抜手法を機能化・高処理量化し、細胞アセンブリにおいて有用な手法となりうることを実証するほか、(4) 特に肝細胞組織や骨芽細胞組織をターゲットとして、その機能評価を行うとともに、さらなる機能向上を可能とするための新規手法の開発を目指した。

3-3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスを用いた異方的・複合型ハイドロゲル材料の作製

PMMA あるいは PDMS 製の微細加工基板を作製し、積層化することでマイクロ流体デバイスを作製した。そしてそれらを利用して、ハイドロゲル材料を用い、種々の断面異方性を有する複合ファイバーや複合シートを作製する新規手法を開発した。具体的には、断面が 2 あるいは 3 つの部分からなる異方的ハイドロゲルファイバーについては、リソグラフィとモールドイングによって作製した平面的な流路構造を利用し、複合ファイバーに関しては、NC 機械加工によって作製した 3 次元的な垂直型ノズルアレイ構造を有する多層流路構造を利用した。ハイドロゲル材料としては主としてアルギン酸を用い、マイクロ流路層流系を駆使することによって、任意の断面形状を有する微小ゲル材料の形成を行った。これらのハイドロゲル構造に対し、各種培養細胞や初代細胞を導入し、神経モデルの作製、肝細胞+繊維芽細胞共培養系の構築、筋肉様線形組織の作製、などを行った。また、特に癌細胞への薬物投与効果の評価を目指し、複合ハイドロゲルファイバーにおける癌細胞の浸潤評価系の構築を行った。なお、筑波大・池田 G より提供を受けた活性酸素種除去機能を有するアルギン酸誘導体を用いたハイドロゲルファイバーの作製についても検討を行った。

さらに、毛糸玉状ゲル粒子、細胞と同サイズの極微小粒子、微細加工ハイドロゲル流路構造、などの複合材料の作製を試みた。毛糸玉状微粒子については、油水 2 相フルイディクスを利用し、部分的ゲル化ファイバーを自発的に切断し折りたたむ、という新規手法を提案した。極微小粒子については、ある種の極性有機溶媒中でゾル水溶液の非平衡液滴を形成し、溶媒中に水を抽出し滴径を縮小した後にゲル化を行う新規手法を開発し、細胞培養時に添加することでマトリックス制御型の細胞集塊の形成を目指した。微細加工ハイドロゲル材料をモールドイングすることにより各種形状のウェルを構築し、この中で細胞を培養することで非球形の細胞集塊を形成するほか、血管組織の形成を試みた。

(2) 単位組織ユニットを複合化しアセンブリする手法の開発

機械工学の研究者（阪大・新井 G および名大・福田 G）と連携し、ファイバーの複合化・アセンブリのための磁気操作可能なファイバーの作製や、格子状にハイドロゲルを加工する手法の開発を行った。また、細胞を内包したハイドロゲルファイバーの周囲に対し血管内皮細胞を接着させ、それらを束にすることによって自動的にアセンブルする手法を提案し、束ねたファイバーを灌流培養用チャンバー構造に導入し灌流培養を行うことによって、個別のファイバーを複合化したミリメートルスケールの組織体を形成する手法を提案した。さらに、産総研・杉浦 G より提供を受けた、分解性かつ細胞接着性を有するハイドロゲル材料によって形成された構造を用いることで、内部に管腔構造を有する集塊の作製を試みたほか、サイズの大きい 3 次元組織構築において不可欠な、血管組織を作製する手法についても開発を行った。

(3) 細胞選抜手法の高機能化

主に、マイクロ流体デバイスを利用したサイズに基づく細胞選抜手法である「水力学的濾過法 (HDF)」について、その選抜精度や処理量向上を目指した応用展開を行った。まず、細胞をサイズおよび表面マーカーの 2 因子によって分離・選抜するために、水力学的濾過法と磁気泳動を直列に接続した流路システムを作製し、その評価を行った。また、マイクロ流路構造を複数個 (50~100 個程度) 並列化することによ

って、細胞選抜の処理量を大幅に向上させたシステムの開発を目指した。さらに、流路を格子状に配置した新規デバイスを開発し、高処理量で高精度な細胞選抜を目指した。

(4) 細胞機能の評価

マイクロ流路を用いて肝細胞および線維芽細胞を内包する微小オルガノイドを作製し、東京女子医大・大和 G との連携によって、長期培養後の肝細胞機能の評価を行った。特に、最大 90 日の長期間培養を行い、アルブミン産生・尿素合成能・薬物代謝遺伝子の発現を評価した。また東北大・鈴木 G との連携によって、アルギン酸ハイドロゲル内に骨芽細胞を導入し、培養中の細胞機能の評価と分化制御を行った。

(5) ECM 成分によって構成される微粒子・繊維状材料の作製と細胞機能の評価

当初の目的に加え、マイクロ流路を利用して微小な ECM 材料（粒子およびファイバー）を作製する手法の開発を行った。マイクロ流路内に ECM 水溶液およびある種の水溶性有機溶媒を導入し、形成した ECM 水溶液の液滴が収縮していく現象を利用することで、ECM 分子が濃縮された、細胞サイズの微粒子を作製した。さらに、アルギン酸ハイドロゲルファイバーの作製手法を応用し、アルギン酸を犠牲層として用いる ECM ファイバーの作製を行ったほか、コラーゲン酸性水溶液を流路内で中和することによって非架橋性のコラーゲンマイクロファイバーを作製する手法を開発した（北大・古澤 G との共同研究）。これらの ECM 粒子・繊維については、それぞれ肝細胞集塊・ハイドロゲル培養系に導入することによって、細胞機能の向上や細胞増殖の促進に寄与するかどうか検討を行った。

3-4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスを用いた異方的・複合型ハイドロゲル材料の作製

①異方的ハイドロゲルファイバーの作製と応用

リソグラフィーあるいは機械加工によって微細加工を施した PDMS あるいは PMMA 基板を積層化することによってマイクロ流体デバイスを作製し、主にアルギン酸 Na 水溶液を導入して、断面異方性を有するハイドロゲルマイクロファイバーの作製を行った。図 1 に示す平面的なマイクロ流路構造に対し、複数の入口から組成や細胞種の異なる溶液を導入し、また外側からゲル化剤水溶液（例：CaCl₂ 水溶液）を導入したところ、断面異方性を有する直径数 10 マイクロメートル程度のハイドロゲルファイバーを作製することが可能であった（論文 30 など）。さらに、ゲルの前駆体溶液にアルギン酸誘導体（アルギン酸プロピレングリコール）を添加することによって、ファイバーの一部分の物理的強度を大幅に低下させることができることを見出した。柔軟部に導入した細胞は、柔軟部に沿って線形かつ立体的な、ユニークな形状のコロニーを形成する様子が見いだされた。また複数種の細胞を高密度かつマイクロメートルオーダーの正確性で包埋することが可能であった。さらに、活性酸素種の除去能を有するアルギン酸誘導体を用いた場合にも、同様にマイクロファイバーの作製が可能であった。

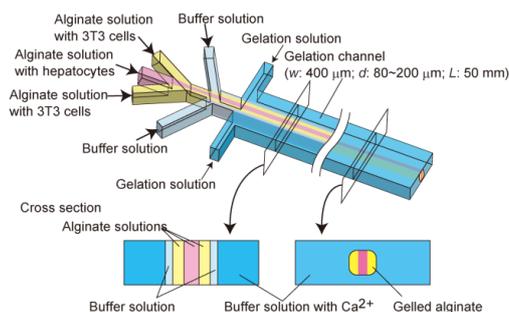


図 1 断面異方性アルギン酸ハイドロゲルファイバー作製のためのマイクロ流体システム。

さらに、より複雑な任意の断面形状を有するファイバーを作製するために、微細加工によって形成したマイクロノズルアレイ構造を有するマイクロ流体デバイスを作製した(図2, 論文9など)。ノズルの配置を調節することによって、たとえば、周縁部に8本の柔軟部を並行で有するファイバーの作製が可能であった。その柔軟部に神経様細胞(PC12細胞)を包埋し、神経増殖因子の添加のもと培養を行ったところ、細胞同士が一行に配置した線形の細胞ネットワーク構造体が形成されることを明らかとした(図3左)。またC2C12細胞を用いた筋肉様組織の形成についても検討を行った。このような構造は、神経細胞のような線形の組織を3次元空間において形成するための新規手法として有用であると考えられる。

また応用として、ハイドロゲルの断面における任意の位置に細胞を包埋できる点を利用して、がん細胞の浸潤挙動の評価を簡便かつ正確に定量化できるシステムの開発を行った(論文23など)。図3右に示すように、中心部に癌細胞、周縁部に正常細胞(繊維芽細胞)を導入し、周縁部の一部のみを柔軟性の高いハイドロゲルによって作製したところ、癌細胞は柔軟部に沿って外部へと浸潤し、最終的にはファイバーの外部にコロニーを形成する様子が確認できた。このシステムを用いると、外部に浸潤したコロニー数をカウントするだけで、癌細胞の浸潤挙動を定量評価することができることを見出した。抗癌剤の種類と濃度を変化させてこの培養系に加えたところ、共培養の場合には、癌脚棒に与える抗がん剤の影響が低下することが確認され、このような3次元かつ複数種の細胞が存在する培養系を用いることで、培養細胞に対する薬物の影響をより正確に評価できることが示唆された。

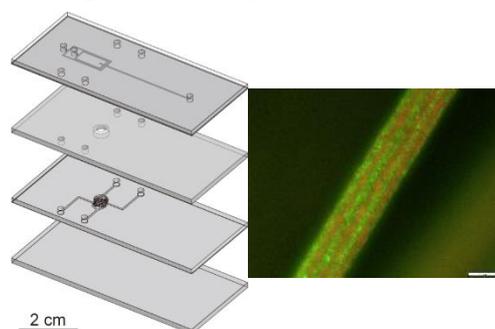


図2 (左) 複雑な断面形状を有するファイバー作製のための多層マイクロ流体デバイスの模式図, (右) 周縁部に8カ所の柔軟部を形成したファイバー。スケールバー: 50 マイクロメートル。

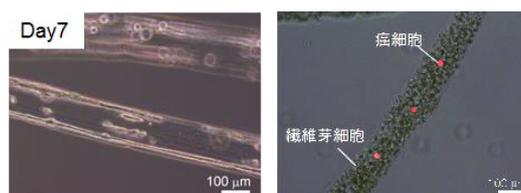


図3 (左) 周縁部に8本の柔軟部を有するファイバー内部での、神経様細胞のネットワーク構造形成の様子, (右) 癌細胞と繊維芽細胞を共培養する3次元癌細胞浸潤アッセイ用マイクロファイバー。

②異方的ハイドロゲルシートの作製と応用

次に、ハイドロゲルファイバーをある意味並列化した構造であるとも言える、複合型ハイドロゲルシートを作製し、肝細胞の共培養を行った(論文17など)。複数に分岐し合流する2つあるいは3つの入口流路に対し、それぞれ異なる種類・組成のアルギン酸Na水溶液を導入し、互い違いに合流させ、扁平なノズル出口を介して外部のゲル化剤(CaCl₂)水溶液中に押し出すことによって、異方的(ストライプ状・積層状)なゲルシートの作製が可能であった(図4)。肝細胞のモデルとしてHepG2細胞, 正常細胞として3T3細胞を高密度(1~3×10⁷ cells/mL)で導入し共培養したところ、これら2種類の組織からなる組織体の配列を構築することが可能であった。このような組織体は、肝臓組織中に観察される線形組織を模倣した構造であると言えよう。また共培養の系において、HepG2単独培養と比較して肝細胞機能が向上する

ことが確認された。

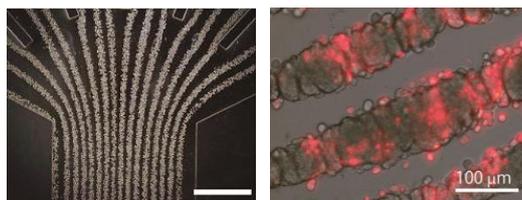


図4 (左) 交互合流型マイクロ流体デバイス中における、細胞の流れの様子。スケールバー: 1 mm。(右) HepG2 細胞および 3T3 細胞を包埋したストライプ状ハイドロゲルシート。

③非球形ハイドロゲル粒子・極微小ハイドロゲル粒子の作製

マイクロ流路構造を用いることで、ファイバーやシート状以外にも、様々な形態を有するハイドロゲル材料を作製することが可能となる。そこでまず、内部に対して栄養や酸素を効率的に供給可能な、毛糸球状ハイドロゲル粒子の作製を行った(論文 21 など)。ハイドロゲルファイバーの作製時と同様の流路構造を利用するが、一番外側に形成した入口流路から油相を連続的に供給することで、ファイバーが完全にゲル化する直前の状態において液滴が形成されるため、ファイバーが断片化され織田為れることで毛糸玉状の粒子を作製することができた(図 5 左)。ハイドロゲルのマトリックス中に高密度で細胞を播種し培養したところ、均一な球形あるいはサイズの大きい直線状のファイバーと比較して、毛糸球状粒子の場合に細胞の増殖速度が増加することが確認された。さらに、極微小ハイドロゲル粒子の作製については、非平衡状態の液滴が収縮する現象を利用し、アルギン酸やキトサンなどの多糖類を材料として用いた粒子形成プロセスの構築を行った(論文 16 など)ほか、コラーゲンなどの ECM 成分からなる微粒子を得ることができ(文献 4 など)、その直径を数~20 マイクロメートル程度の範囲で制御できることを実証した(図 5 右)。このようなユニークな微小材料は、3次元組織構築におけるツールとして利用可能であると期待される。なお、これらの材料についても、マイクロ流路構造を利用して初めて形成可能であったものと言えよう。

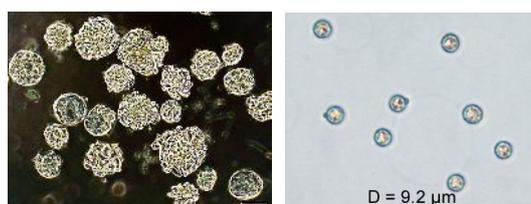


図5 (左) マイクロ流路構造を用いて作製した毛糸玉状ハイドロゲル粒子。スケールバー: 200 マイクロメートル。(右) マイクロ流路内非平衡液滴を用いて作製した直径 9 マイクロメートル程度のア
ルギン酸微粒子。

(2) 各ユニットを複合化する手法の開発

①ハイドロゲルによって形成された微細流路構造の形成と血管組織作製への応用

マイクロ流路構造を用いて作製した個別のハイドロゲル材料を複合化し、サイズの大きい組織体を作る上で、その内部に灌流培養可能な血管構造を導入することは不可欠であると考えられる。そこでまず、アガロース・アルギン酸・ゼラチンといったハイドロゲル材質によって構成された流路構造を作製する新規手法を開発した。特に、酵素架橋ゼラチンや細胞接着性 RGD アルギン酸を用いて作製した流路構造については、灌流培養を行うことで、内部に血管内皮細胞が接着すること、流量に応じて内皮細胞の配向が揃うこと、などの知見を得ることができた(図 6, 論文 10 など)。

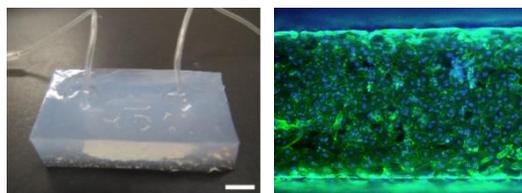


図6 (左) アガロースハイドロゲル製マイクロ流体デバイスの写真。スケールバー：10 mm, 500 μm 。
(右) 内部に形成した血管内皮細胞層。

さらに流路構造の内面に血管平滑筋細胞および内皮細胞を段階的に積層化する手法を開発し、血管組織モデルの作製を行った(図7, 論文8, 33など)。実験では、 Ca^{2+} を含むアガロースゲル, あるいは BaCl_2 粉末を含むPDMSを用いてマイクロ流路を作製した。アルギン酸水溶液を流路へ導入すると、流路を構成する基材から供給される Ca^{2+} あるいは Ba^{2+} によってアルギン酸が架橋され、流路内壁に多層状のゲルが形成されることが確認された。なお、送液時間および流速を変化させることでアルギン酸ゲル層の厚みを制御することが可能であった。また、平滑筋細胞層を形成した後に血管内皮細胞を懸濁させた培養液を導入したところ、流路形状に依存した多層状の血管組織を形成することが可能であった。さらに、流路構造を分解することで、形成した血管組織を回収することも可能であった。本手法は、流路形状および送液時間を制御することで様々な形状の血管組織構築を可能とするため、血管組織工学における一つのアプローチとして有用であると言える。

またこれらの他にも、複数種類の細胞接着性あるいは非接着性ハイドロゲルを用い、それらの一方を犠牲層として用い溶解させることで、管腔構造を有する組織体を形成する新規手法を開発したほか、細胞非接着性のハイドロゲル製マイクロウェル構造と、細胞接着性マイクロファイバーを利用することで、管腔構造を内包するスフェロイドの形成を行うことができた(論文25など)。さらに、微細構造を利用した細胞集塊の形態制御についても詳細に検討を行った(文献13, 20など)。

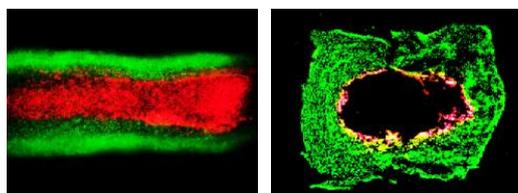


図7 マイクロ流路内部に堆積させた血管平滑筋細胞および血管内皮細胞からなる組織体の蛍光顕微鏡写真。(左) 上から見た写真, (右) 断面写真。

②ファイバー状材料の組織化によるミリメートルサイズの肝臓組織構築

さらに、ファイバー状のゲル材料の周囲に血管内皮細胞を播種し、それらを束ねて灌流培養を行うことによって、よりサイズの大きい組織構造を構築する新規手法の構築を試みた。より具体的には、肝細胞を内包し、血管内皮細胞を表面に接着させたハイドロゲルファイバーを集積化するプロセスを提案した(論文14など)。平均直径が80 μm 程度の、肝細胞を高密度に内包したファイバー状組織を血管内皮細胞とともに振とう培養した結果、血管内皮細胞がファイバー表面に接着する様子が観察された。次に、この2種の細胞を担持したファイバーをチャンバー内へ充填し、培地を導入した結果、チャンバーから培地が漏出することなく、長期間安定に送液することが可能であった(図8)。さらに、3日間の灌流培養を行った細胞内包ファイバーの束を灌流用チャンバーから回収したところ、ファイバー束が血管内皮細胞によって一体化した、ミリメートルサイズの組織体を形成していることが確認された。また、酸素濃度センサーを用いて灌流用チャンバーの入口および出口付近における酸素濃度を測定したところ、培地の供給量によってチャンバー内の酸素濃度勾配が変化することが確認された。さらに、細胞の生存率および肝特異的機能の

評価を行ったところ、低流速条件（1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）と比較して、高流速条件（15 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）では、肝細胞の生存率および肝特異的機能が上昇する傾向が確認された。以上の結果から、本プロセスは肝組織の微小環境を生体外において再構築できる手法として有用であると考えられる。そして、この手法によって作製した肝細胞組織は、灌流培養を行うことによって、効率的な栄養供給や生体内環境に類似した酸素濃度勾配の制御を可能とするため、ミリメートルスケールの肝小葉を形態的に模倣していると言え、革新的であると言えよう。

なおこの他にも、連携研究によって、磁場を用いたハイドロゲルファイバーの操作（論文3など）やファイバーを複合化した格子状構造の作製（論文19など）についても、連携研究によって開発を行った。

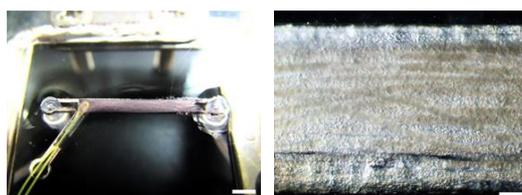


図8 (左) 肝細胞ファイバー担持用チャンバー構造, (右) 内部にパッキングされたハイドロゲルファイバー。

(3) 細胞選抜手法の高機能化

①2 因子細胞分離システムの開発

細胞の効率的な選抜は、細胞生物学研究や診断医療のみならず、3次元組織構築においても重要である。そこでまず、これまでに開発を行ってきた水力学的濾過法に対し、磁気泳動を組み合わせた2因子（大きさ+表面マーカー）細胞分離システムを開発し、その分離性能の詳細な評価および血液等の実サンプルの分離を行った（論文18など）。

6本の分離レーンおよび6×4個の回収口を有する、ガラス-PDMS製マイクロデバイスを作製した(図9)。まず、直径10 μm および15 μm の粒子、あるいはJM細胞（平均直径: 12.9 μm ）を導入口1から導入し、サイズ分離の評価を行った。細胞を導入し各レーンから回収された細胞のサイズを計測した結果、サイズに基づいた正確な分離が行われることが確認された。また、JM細胞とHeLa細胞のうち、JM細胞を特異的に磁気抗体標識し、磁場を印加することによってこれらを混合し分離した結果、磁場を印加した際のHeLa細胞の回収率には変化はなかったが、回収口3および4から回収されるJM細胞の割合は、非印加時の11%から43%へと大きく増加し、二因子による分離が可能であることが確認された。本手法は、複雑な装置や操作を必要とせず、シンプルかつ高効率に二因子による細胞分離を実現するため、FACSによる細胞分離のための前処理システムや、組織構築におけるツールとして有用であると考えられる。

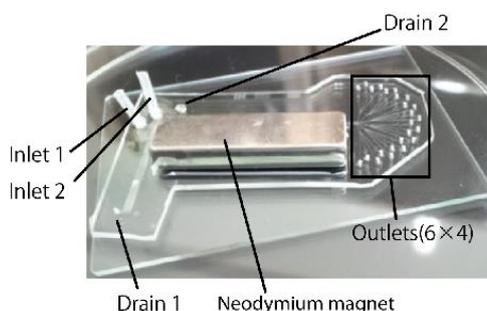


図9 2因子細胞分離装置の外観。

②大量処理のための並列化マイクロ流体デバイス・格子状流路構造

マイクロ流路を用いた既存の細胞分離手法では、流路構造よりも大きな粒子によって流路が部分的に閉

塞してしまうと、その分離精度が大きく低下してしまう、という問題点があった。また、処理量が数 10 マイクロリットル毎分であることが多く、用途が限られてしまう、という課題があった。そこで、格子状に配置したマイクロ流路構造、あるいは基本的な HDF による分離構造を並列化したシステムの開発を行い、処理量の向上を目指した（論文 6, 26 など）。

図 10 には、格子状マイクロ流路構造の概念図と、実際のデバイスの写真を示した。この流路構造に対し、細胞懸濁液および粒子を含まないバッファ溶液をそれぞれ連続的に導入すると、ある一定の大きさより大きな細胞は分離流路に入る事ができないため、右下方向に傾斜する流路に沿って流れる。一方で、小さな細胞は一定の頻度で左下方向の流路に流入し、格子状流路をジグザグに流れ、全体として真下方向に流れる。結果として、これらの細胞は大きさによって横方向に分離され、各出口流路から個別に回収する事が可能となる。

結果として、粒子の各種パラメータ（流路傾斜、格子状流路の密度比など）を変更した流路を作製し実験を行ったところ、これらの要因が分離に大きな影響を与えることが実証された。また、単一の流路を複数個（8~24 個）並列化した流路を用いた場合、毎分数ミリリットルの比較的高い処理量を実現することが可能であった（図 10 右）。また、細胞分離への応用として血球の分離を行ったところ、高効率な白血球の選抜・クラス分けなどを実証することができた。

また通常の HDF 並列化システムについても開発を行ってきた。最大 128 の分離ユニットを並列化することで、希釈血液の毎分 10 ミリリットル程度の処理量を達成することができた。さらにこれらの他にも、形状を利用した細胞分離手法の構築の開発などを行ってきた。これらの細胞選抜手法を、流路を用いた細胞アセンブリ手法と組み合わせることによって、より効率的かつ高速な組織形成が可能となると期待される。

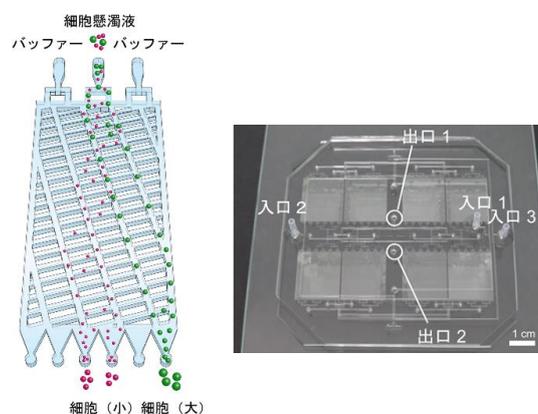


図 10 (左) 格子状流路構造を用いた細胞のサイズ分離の概略図、(右) 8つの格子状ユニットを並列化したマイクロ流体デバイス。

(4) 細胞機能の評価

まず、ラット由来初代肝細胞を用いて作製した組織体の機能評価を行った。初代肝細胞は創薬や再生医療において重要な細胞であるが、生体外に単離するとその機能は急速に失われることが知られている。そこで、マイクロ流路を用いて、初代肝細胞と繊維芽細胞を包埋したマイクロファイバーを作製し、微小オルガノイドの形成を行った（図 11 左）。そして大和 G との連携によって、得られた組織体の詳細な機能評価を行った（論文 28 など）。凍結切片を作製し、抗アルブミン抗体を用いて免疫染色を行ったところ、複合型組織体の内部では 2~3 個の肝細胞が列をなし、その周囲を 3T3 細胞が取り囲んでいる様子が観察された（図 11 右）。また、培養上清をサンプリングし、尿素およびアルブミン産生量の測定を行った。コントロールとして、コラーゲンコートプレート上での単層培養および、3T3 細胞を埋包しないハイドロゲル

ファイバーと比較したところ、これらのコントロール実験系では、いずれも培養1か月程度で機能が大幅に低下するとともに、生存率も低下したが、ハイドロゲルファイバー内で3T3細胞と共培養を行った系では、これらの産生能および生存率が60日以上に渡り高く維持されることが確認された(図12)。本研究で作製した複合型組織体は、*in vitro*において肝細胞機能の長期維持を可能とする新たな培養手法として有用であることが示唆された。さらに、ハイドロゲル培養による骨芽細胞の分化誘導について検討を行い、3次元培養の有効性を実証することができた(論文2など)。

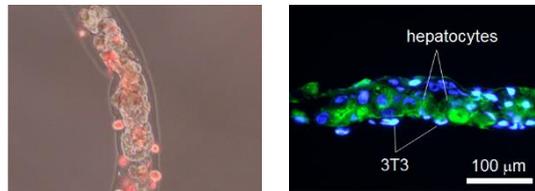


図11 (左) ハイドロゲルファイバー内で形成した肝細胞・繊維芽細胞の複合型微小オルガノイド、(右) 細胞を染色した様子。

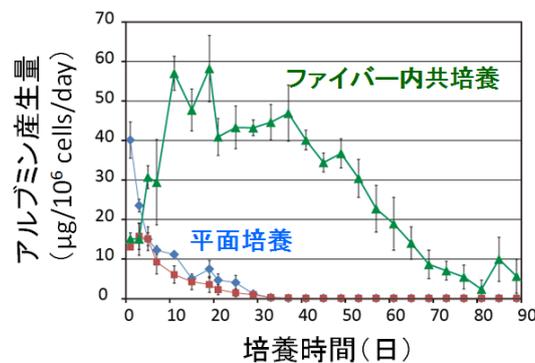


図12 ハイドロゲル内共培養による複合型肝細胞の機能発現評価の例。

(5) ECM成分によって構成される微粒子・繊維状材料の作製と細胞機能の評価

①ECM微粒子の作製と応用

マイクロ流路構造を用いて作製した細胞サイズのECM微粒子は、3次元細胞培養系の内部に均一に導入することが可能である。そして、適切な細胞-ECM間の相互作用を形成することで、細胞の機能発現を補助する役割を担うと期待されるほか、3次元組織の形態維持という役割を果たすものと考えられる。そこで、マイクロメートルサイズのコラーゲン微粒子を作製し、肝細胞スフェロイド形成などにおける細胞接着性粒子の役割について、初代肝細胞を用いた詳細な機能評価を行うことで、肝細胞機能維持において適切な粒子・細胞比率が存在するかどうかを確認した(論文4など)。

マイクロ流路、あるいは多孔質膜を用いてコラーゲン粒子を作製した(図13左)ところ、膜乳化法の場合には最大で平均直径約10μmの粒子を、1時間で約 3×10^7 個作製できることが確認された。多孔質膜の細孔径や溶液の組成などを調節することにより、粒子の形状や大きさを制御することが可能であった。得られたコラーゲン粒子と、ラット初代肝細胞を一定の割合で混合し、アガロースゲルを材料とした細胞非接着性ウェル内に播種し数日間培養したところ、コラーゲン粒子を含むヘテロ細胞集塊が得られた(図14右)。細胞集塊を回収し、Real-time RT-PCRを用いて遺伝子発現の定量分析を行ったところ、ほぼ同数のコラーゲン粒子と細胞を含む細胞集塊では、粒子を含まない細胞集塊と比較して、肝機能特有の遺伝子の発現量が増加すること、また、細胞とコラーゲン粒子の混合割合を変化させることにより、肝機能特有の遺伝子の発現量が増加することが確認され、マイクロメートルサイズのECM微粒子の有用性を実証することができた。

また肝細胞組織の作製のほかに、直径数マイクロメートルの架橋コラーゲン微粒子を用いた組織構築として、微粒子を足場とする毛細血管網の形成、膵β細胞集塊の形成、平面状の肉厚組織の形成、についてもそれぞれ細胞機能評価の検討を行った。さらに、これらの粒子作製における基盤技術として、タンパク質からなる粒子の形状制御およびそのメカニズム解明を行うとともに（論文15など）、応用としてリン脂質など多様な素材からなる微粒子の形成を行った（論文5, 11など）。

このように、*in vitro*における3次元組織構築において、複合型のハイドロゲル製微小材料の持つ有用性を実証することができた。特にコラーゲン等のタンパク質材料を用いて微小な粒子を作製し培養に用いる、という新規基盤技術を開発したこと、また、当技術を他の機能性粒子状材料の作製へと応用したことは、当初想定していた以上の成果であったと言える。

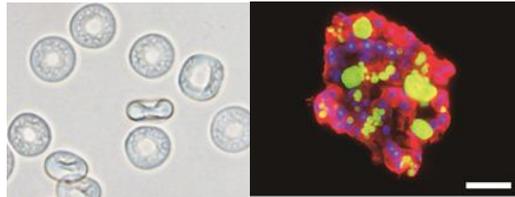


図13 (左) マイクロ流路を用いて作製したコラーゲン微粒子、(右) コラーゲン微粒子を含むヘテロ肝細胞集塊の断面の様子。

②ECM ファイバーの作製と応用

また、繊維状ECM材料を作製する手法として、アルギン酸を犠牲層として用いる手法（論文12など）と、pH調節によるコラーゲンの組織化を利用する手法の2つを提案し、3次元細胞培養における有用性を検証した。

アルギン酸を犠牲層とする手法では、ECMタンパク質を含むアルギン酸Caハイドロゲルファイバーを作製した後に、得られたファイバーを1mm程度の長さに切断し、ECM成分を架橋した後、アルギン酸分解酵素を用いてアルギン酸を選択的に除去することで、ECM繊維を作製した。ECMタンパク質としてゼラチン、エラスチンを使用したところ、共に直径10~20μm程度の繊維状足場材料の作製が可能であった。次に、作製した足場材料を高密度に含むアルギン酸ハイドロゲル内でNIH-3T3細胞を培養したところ、細胞が足場材料に接着し効率的に増殖する様子が確認された。

また、リン酸緩衝液によりコラーゲンをゲル化させる手法を利用することで、架橋剤を用いずにマイクロ流路内でコラーゲンマイクロファイバーを簡便かつ正確に作製する新規手法を開発した。マイクロ流路を用い、酸性のコラーゲン水溶液を中和することでゲルの形成を行ったところ、高強度かつ径の均一なコラーゲンファイバー（直径10~30μm）を連続的に作製し回収することが可能であった（図14）。回収されたコラーゲンファイバーにHepG2細胞を播種した結果、細胞がファイバー表面に接着し、増殖する様子が観察され、細胞培養のための足場材料としての応用可能性を確認した。これらの手法で得られたECMマイクロファイバーは、ECM微粒子と同様に、種々の3次元生体組織構築手法における広い応用が期待される。



図14 マイクロ流路を用いて作製した非架橋性コラーゲンマイクロファイバー。

3-5. 今後の展望

マイクロ流体工学技術を駆使することで、「複数種の細胞が適切な位置に規則的に配列した」微小ハイドロゲルを作製する手法のみならず、細胞選抜手法や灌流培養による個別の材料の複合化技術、あるいは微小な ECM 材料を作製する手法を開発することができた。これらの手法を組み合わせることによって、生体外において迅速に 3 次元組織体を構築する、という課題に対して有効性のあるアプローチが可能になると考えられる。今後は個別材料の更なる機能化を目指すとともに、生体内に存在しない成分の除去プロセスの開発や、*in vivo* における細胞機能の評価を行うことで、これらの手法の有用性をより詳細に検証したい。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計36 件)

- [1] N. Nakajima, M. Seki, S. Kakegawa, and M. Seki, A Microfluidic System Enabling Multistep Tuning of Extraction Time Periods for Kinetic Analysis of Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction, *Anal. Chem.*, in press (2016). 査読有
- [2] K. Endo, T. Anada, M. Yamada, M. Seki, K. Sasaki, and O. Suzuki, Enhancement of Osteoblastic Differentiation in Alginate Gel Beads with Bioactive Octacalcium Phosphate Particles, *Biomed. Mater.*, 10 (6), 065019 (2015). 査読有
- [3] T. Sun, C. Z. Hu, M. Nakajima, M. Takeuchi, M. Seki, T. Yue, Q. Shi, T. Fukuda, and Q. Huang, On-chip Fabrication and Magnetic Force Estimation of Peapod like Hybrid Microfibers Using a Microfluidic Device, *Microfluid. Nanofluid.*, 18 (5), 1177-1187 (2015). 査読有
- [4] M. Yamada, A. Hori, S. Sugaya, Y. Yajima, R. Utoh, M. Yamato, and M. Seki, Cell-sized Condensed Collagen Microparticles for Preparing Microengineered Composite Spheroids of Primary Hepatocytes, *Lab Chip*, 15 (19), 3941-3951 (2015). 査読有
- [5] M. Mizuno, T. Toyota, M. Konishi, Y. Kageyama, M. Yamada, and M. Seki, Formation of Monodisperse Hierarchical Lipid Particles Utilizing Microfluidic Droplets in a Non-equilibrium State, *Langmuir*, 31 (8), 2334-2341 (2015). 査読有
- [6] T. Yanai, M. Seki, W. Seko, and M. Seki, Lattice-shaped Dual-depth Microchannel Systems for Continuous Separation of Microparticles, *Proc. MicroTAS 2015*, 2065-2067 (2015). 査読有
- [7] Y. Watabe, Y. Yajima, M. Seki, and M. Seki, Patterning of Multilayered Micro Hydrogels on PDMS Substrates Partially Embedding CaSO₄ Powders, *Proc. MicroTAS 2015*, 1434-1436 (2015). 査読有
- [8] K. Kinoshita, M. Yamada, and M. Seki, Fabrication of Vascular Tissue Models by Depositing Alginate Hydrogel Layer on PDMS Channels Embedding Barium Salt Powders, *Proc. MicroTAS 2015*, 135-137 (2015). 査読有
- [9] Y. Kitagawa, Y. Naganuma, Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, Patterned Hydrogel Microfibers Prepared by Using Multilayered Microfluidic Devices for Guiding Network Formation of Neural Cells, *Biofabrication*, 6 (3), 035011 (2014). 査読有
- [10] Y. Yajima, M. Yamada, E. Yamada, M. Iwase, and M. Seki, Facile Fabrication Processes for Hydrogel-based Microfluidic Devices Made of Natural Biopolymers, *Biomicrofluidics*, 8 (2), 024115 (2014). 査読有
- [11] T. Ono, M. Yamada, Y. Suzuki, T. Taniguchi, and M. Seki, One-step Synthesis of Spherical/nonspherical Polymeric Microparticles Using Non-equilibrium Microfluidic Droplets,

- RSC Adv., 4 (24), 13557-13564 (2014). 査読有
- [12]A. Hori, Y. Hirai, Y. Yajima, Y. Kitagawa, M. Yamada, and M. Seki, Microfluidic Production of Fibrous Scaffolds Composed of ECM Proteins for 3D Cell Cultivation, Proc. MicroTAS 2014, 1885-1887 (2014). 査読有
- [13]N. Nakajima, K. Yamakoshi, Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, Formation of Non-spherical Hydrogel Microstructures Using Non-equilibrium Aqueous Two-phase Systems, Proc. MicroTAS 2014, 1125-1127 (2014). 査読有
- [14]Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, Construction of Hepatic Lobule-like 3D Tissues Utilizing Cell Embedding Hydrogel Microfibers, Proc. MicroTAS 2014, 153-155 (2014). 査読有
- [15]K. Takahashi, S. Sugaya, M. Yamada, and M. Seki, Production of Non-spherical Protein Microparticles by Controlling Droplet Dissolution in Microfluidic Devices, Proc. MicroTAS 2014, 73-75 (2014). 査読有
- [16]S. Sugaya, M. Yamada, A. Hori, and M. Seki, Microfluidic Production of Single Micrometer-sized Hydrogel Beads Utilizing Droplet Dissolution in a Polar Solvent, Biomicrofluidics, 7 (5), 054120 (2013). 査読有
- [17]A. Kobayashi, K. Yamakoshi, Y. Yajima, R. Utoh, M. Yamada, and M. Seki, Preparation of Stripe-patterned Heterogeneous Hydrogel Sheets Using Microfluidic Devices for High-density Coculture of Hepatocytes and Fibroblasts, J. Biosci. Bioeng., 116 (6), 761-767 (2013). 査読有
- [18]M. Mizuno, M. Yamada, R. Mitamura, K. Ike, K. Toyama, and M. Seki, Magnetophoresis-integrated Hydrodynamic Filtration System for Size- and Surface marker-based Two-dimensional Cell Sorting, Anal. Chem., 85 (16), 7666-7673 (2013). 査読有
- [19]K. Ohara, M. Kojima, A. Fukushima, S. Onozaki, M. Horade, M. Yamada, M. Seki, Y. Mae, and T. Arai, Automated Construction System for 3D Lattice Structure Based on Alginate Gel Fiber Containing Living Cells, J Robot. Mechatron., 25 (4), 665-672 (2013). 査読有
- [20]M. Iwase, M. Yamada, E. Yamada, and M. Seki, Formation of Cell Aggregates Using Microfabricated Hydrogel Chambers for Assembly into Large Tissues, J. Robot. Mechatron., 25 (4), 682-689 (2013). 査読有
- [21]A. Miyama, M. Yamada, S. Sugaya, and M. Seki, A Droplet-based Microfluidic Process to Produce Yarn-ball-shaped Hydrogel Microbeads, RSC Adv., 3 (30), 12299-12306 (2013). 査読有
- [22]T. Morijiri, M. Yamada, Toshikatsu Hikida, and M. Seki, Microfluidic Counterflow Centrifugal Elutriation System for Sedimentation-based Cell Separation, Microfluid. Nanofluid., 14 (6), 1049-1057 (2013). 査読有
- [23]Y. Kitagawa, M. Yamada, and M. Seki, Microengineered Hydrogel Fibers for Evaluating Cancer Cell Invasion under 3D Coculture Conditions, Proc. MicroTAS 2013, 1950-1952 (2013). 査読有
- [24]Y. Yajima, E. Yamada, C. Y. ta, M. Iwase, M. Yamada, and M. Seki, Enzymatic Reaction-based Fabrication Processes of Multilayer Microfluidic Devices Made of Gelatin Hydrogel, Proc. MicroTAS 2013, 778-780 (2013). 査読有
- [25]K. Yamakoshi, M. Yamada, and M. Seki, Formation of Vascular Structures inside Cell Spheroids by Employing Hydrogel Microchambers and Sacrificial Fibers, Proc. MicroTAS 2013, 530-532 (2013). 査読有
- [26]W. Seko, M. Yamada, and M. Seki, Slanted Lattice-shaped Microchannel Networks for Continuous

- Sorting of Microparticles and Cells, Proc. MicroTAS 2013, 353-355 (2013). 査読有
- [27] S. Sugaya, S. Kakegawa, S. Fukushima, M. Yamada, and M. Seki, Micropatterning of Hydrogels on Locally Hydrophilized Regions on PDMS by Stepwise Solution Dipping and in situ Gelation, Langmuir, 28 (39), 14073-14080 (2012). 査読有
- [28] M. Yamada, R. Utoh, K. Ohashi, K. Tatsumi, M. Yamato, T. Okano, and M. Seki, Controlled Formation of Heterotypic Hepatic Micro-Organoids in Anisotropic Hydrogel Microfibers for Long-Term Preservation of Liver-Specific Functions, Biomaterials, 33 (33), 8304-8315 (2012). 査読有
- [29] K. Toyama, M. Yamada, and M. Seki, Isolation of Cell Nuclei in Microchannels by Short-term Chemical Treatment via Two-Step Carrier Medium Exchange, Biomed. Microdev., 14 (4), 751-757 (2012). 査読有
- [30] M. Yamada, S. Sugaya, Y. Naganuma, and M. Seki, Microfluidic Synthesis of Chemically and Physically Anisotropic Hydrogel Microfibers for Guided Cell Growth and Networking, Soft Matter, 8 (11), 3122-3130 (2012). 査読有
- [31] Y. Naganuma, M. Yamada, S. Sugaya, and M. Seki, Fluidic Preparation of Patterned Hydrogel Fibers Using Micronozzle-array Devices for Neural Cell Guidance, Proc. MEMS2012, 953-956 (2012). 査読有
- [32] S. Sugaya, M. Yamada, and M. Seki, Microfluidic Synthesis of Micrometer-size Collagen Hydrogel Particles for Cell Manipulation Applications, Proc. MicroTAS2012, 944-946 (2012). 査読有
- [33] M. Iwase, M. Yamada, and M. Seki, Construction of Vascular Tissues via Multilayer Cell Deposition inside Hydrogel Microchannels, Proc. MicroTAS2012, 572-574 (2012). 査読有
- [34] A. Kobayashi, K. Yamakoshi, Y. Yajima, M. Yamada, and M. Seki, Microfluidics-based Formation of Heterogeneous Hydrogel Sheets for High-density Coculture of Multiple Cell Types, Proc. MicroTAS2012, 557-559 (2012). 査読有
- [35] M. Mizuno, M. Konishi, M. Yamada, T. Toyota, and M. Seki, Production of Lipid-core/Multilamellar-shell Hybrid Liposomes Utilizing Non-equilibrium Microfluidic Droplets, Proc. MicroTAS2012, 1501-1503 (2012). 査読有
- [36] M. Masubuchi, T. Toyota, M. Yamada, and M. Seki, Fluidic Shear-Assisted Formation of Actuating Multilamellar Lipid Tubes Using Microfabricated Nozzle Array Device, Chem. Commun., 47 (29), 8433-8435 (2011). 査読有

(2) 学会発表 (計142 件)

- [1] コラーゲン微粒子を導入した複合型3次元肝組織の作製と機能評価, 矢嶋祐也, 山田真澄, 堀綾香, 菅谷紗里, 鶴頭理恵, 関 実, 第15回日本再生医療学会総会 大阪国際会議場 2016年3月17~19日
- [2] マイクロフレイディクスを利用する微粒子合成・分級操作の新展開, 山田真澄, 関 実, エビスビルAAホール本館 3階会議室 大阪 2016年3月16日
- [3] マイクロステンシルプレートを利用したコラーゲン薄膜の作製と応用, 橋本里奈, 木下敬太, 水落雅人, 矢嶋祐也, 山田真澄, 関 実, 化学工学会 第81年会 関西大学千里山キャンパス 2016年3月13~15日
- [4] Development of Microfluidic Lattices for High-Performance Cell/Particle Separations, M. Yamada and M. Seki, PITTCON Conference and Expo, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, Mar. 6-10, 2016.

- [5] コラーゲン粒子を用いたシート状3次元組織の作製, 矢嶋祐也, 山田真澄, 堀綾香, 関 実, シンポジウム:細胞アッセイ技術の現状と将来 東京大学生産技術研究所 2016年1月19日
- [6] 血圧の再現を可能とする小口径多層血管モデルの作製と機能評価, 木下敬太, 山田真澄, 関 実, シンポジウム:細胞アッセイ技術の現状と将来 東京大学生産技術研究所 2016年1月19日
- [7] コラーゲンマイクロ粒子を用いた細胞の立体的シート培養法の開発, 矢嶋祐也, 山田真澄, 堀綾香, 関実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第32回研究会 福岡県北九州国際会議場 2015年11月26日~27日
- [8] マイクロfluidicsを駆使したバイオマテリアルの微細加工, 矢嶋祐也, 山田真澄, 関 実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第32回研究会 福岡県北九州国際会議場 2015年11月26日~27日 (若手シンポジウム)
- [9] 無機塩を包埋したシリコーン樹脂製流路を利用した血管組織の作製, 木下敬太, 岩瀬優輝, 山田真澄, 関 実, 化学工学会 群馬大会2015 群馬県桐生市民会館 2015年11月27~28日
- [10] Morphology Control of Protein Microparticles Produced Using Microfluidic Droplets in a Non-equilibrium State, M. Yamada, K. Takahashi, A. Hori, S. Sugaya and M. Seki, 26th 2015 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS 2015), Nagoya University, Nov. 23-25, 2015.

などその他含め計146件

(3) 図書 (計3 件)

- [1] 微細加工アルギン酸ヒドロゲルを用いた細胞培養・組織工学, 山田 真澄, 関 実, ゲルテクノロジーハンドブック 第4章第11節 エヌ・ティー・エス出版 2014年10月
- [2] 管腔構造を有するスフェロイド・非球形細胞集塊の作製, 山田真澄, 関 実, 3次元ティッシュエンジニアリング 第2章 第3節 エヌ・ティー・エス出版 2015年3月
- [3] High-throughput Cell Assembly Featuring Heterogeneous Hydrogels Produced by Using Microfluidic Devices, M. Yamada and M. Seki, in Hyper Bio Assembler for 3D cellular Systems, Springer, pp. 129-150, 2015.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計4 件)

名称:細胞培養方法

発明者: 山田, 関, 堀, 矢嶋

権利者: 国立大学法人 千葉大学

種類: 特許出願

番号: 2014-184700

出願年月日: 平成26年9月10日

国内外の別: 国内

名称: 繊維状タンパク質材料の作製方法、および細胞培養方法

発明者: 山田, 関, 堀, 平井, 矢嶋, 北川

権利者: 国立大学法人 千葉大学

種類：特許出願

番号：2014-158604

出願年月日：平成26年8月4日

国内外の別：国内

名称：細胞評価用ハイドロゲル基材および細胞評価手法

発明者：関，山田，北川

権利者：国立大学法人 千葉大学

種類：特許出願

番号：2013-028485

出願年月日：平成25年2月16日

国内外の別：国内

名称：血管組織およびその作製方法

発明者：関，山田，岩瀬

権利者：国立大学法人 千葉大学

種類：特許出願

番号：2012-181261

出願年月日：平成24年8月18日

国内外の別：国内

計画研究 A02

課題番号：23106008

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：MEMSを利用した細胞の3次元組織構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 昌治 (Takeuchi, Shoji) 東京大学・生産技術研究所・教授

(2) 研究分担者

尾上 弘晃 (Onoe, Hiroaki) 慶応義塾大学・理工学部機械工学科・准教授 平成23年度～平成25年度

(3) 連携研究者

繁富 (栗林) 香織 (SHIGETOMI-KURIBAYASHI, Kaori) 北海道大学・高等教育推進機構・特任准教授

友池 史明 (Tomoike, Fumiaki) 名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教 平成25年度～平成27年度

森本 雄矢 (Morimoto, Yuya) 東京大学・生産技術研究所・助教 平成26年度～平成27年度

尾上 弘晃 (Onoe, Hiroaki) 慶応義塾大学・理工学部機械工学科・准教授 平成26年度～平成27年度

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
平成24年度	18,200,000	5,460,000	23,660,000
平成25年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
平成26年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
平成27年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
総計	86,800,000	26,040,000	112,840,000

3. 研究成果

研究成果の概要

本研究では、マイクロサイズの構造を形成する微細加工技術を利用することによって、細胞レベルのプレートを作製し、その上に接着細胞を播種し、培養した。このマイクロプレートをハンドリングすることにより、接着細胞を3次元的に操作した。具体的には、マイクロプレートにヒンジをつけることにより、細胞による折り紙を行い、3次元構造を構築した。また、マイクロプレート内に磁場応答性の合金であるパーマロイを導入することで非接触に細胞を3次元的に操作し、細胞表面で起こる現象を高分解能観察することに成功した。これらの成果は細胞の3次元組織の構築や細胞間の情報伝達解析や細胞の高分解能観察の発展に貢献すると期待される。

3-1. 研究開始当初の背景

生体内での組織はチューブ構造など、3 次元的の構造であるにも関わらず、培養される細胞は平面の 2 次元構造であった。そのため、細胞を立体的に培養し、3 次元的な組織を人工的に構築することは、再生医療の発展や新薬の開発、また、生命理工学の基礎研究において必要不可欠であった。とくに、再生医療においては、3 次元的な組織を高速に構築することが必要不可欠である。しかし、本研究計画が開始した時には、微小な細胞組織のユニットを作製し、それらを集めて組み立てることで立体構造を構築するボトムアップアプローチや立体的な足場に細胞を播種するトップダウンアプローチが提案されていた。しかし、3 次元的に細胞を操作することは難しく、また、3 次元の足場から組織を作るには数日から数週間の時間がかかっていた。そのため、高速で細胞を操作する技術および 3 次元的に組織を構築する技術が渴望されていた。

3-2. 研究の目的

本研究計画の目的は、細胞の足場となるマイクロプレートを微細加工技術により作製し、これらのプレートを利用することで、細胞のハンドリング、および 3 次元的な組立を可能にする技術を開発することを目的としている。

また、本研究計画が複数の研究グループが参画する新学術領域であることを活かし、ハンドリング技術を得意とする大阪大学・新井グループ、力場測定を得意とする北海道大学・水谷グループ、細胞シート技術を得意とする大和グループなどと連携をすることで、ハンドリング技術の開発、細胞のハンドリング・組立への応用を促進する。

本研究領域成果を実用発展させるため、細胞シートを立体的な平面に転写するデバイスを開発した。具体的には中耳炎手術時にあける人工的な切削穴表面への転写を目的とした。重篤な中耳炎の際にあける人工的な穴は術後に細胞シートを転写すれば、中耳炎の再発防止効果も確認されている。しかし、細胞シートはハンドリングが難しく、人工穴壁面への転写に時間がかかっていることが現状である。そこで、容易かつ高速に転写するデバイスを開発した。

3-3. 研究の方法

本研究は、当研究室が得意とする微細加工技術を利用することで、様々なマイクロプレートを作製した。具体的には、ガラス基板上に犠牲層としてゼラチン、またはアルギン酸の層をつくり、化学蒸着法によって、パリレン層を形成させた。これをフォトリソグラフィによって任意の形状でエッチングすることにより、パリレン製マイクロプレートを作製した。このパリレンによる基本構造の内部に微細加工技術を利用して光硬化性樹脂である SU8 を組み込み、厚さが部分によって異なるマイクロプレート、すなわち、ヒンジ付きのマイクロプレートを作製した。同様にパリレンの内部に磁場応答性の合金であるパーマロイを導入した。磁場によって 3 次元的に操作できるマイクロプレートを作製した。

作製したマイクロプレート上に接着細胞を培養するため、マイクロプレート外の部分に MPC ポリマー層を、マイクロプレート上の部分に細胞接着層を形成した。この上に NIH 3T3、PC12 等の接着細胞を播種することで、マイクロプレート上で細胞を培養した。培養後、犠牲層を溶解させることで、マイクロプレートをガラス基板からかい離させた。

ヒンジ構造を利用した 3 次元的組織構築では、細胞の牽引力を利用して、自発的にヒンジ部分で折れ曲がらせることで、3 次元的組織を構築した。ハンドリングについては、マイクロピンセットを利用して、マイクロプレートを操作することで、細胞を任意の位置に動かした。磁場応答性合金を組み込んだマイクロプレートでは、外部から磁場をかけることにより、細胞を非接触で三次元的に操作した。

3-4. 研究成果

・マイクロプレートのハンドリングによる神経細胞ネットワークの構築

微細加工技術を用いて、バリレン製マイクロプレートをガラス基板上にアレイ化した状態で作製した。マイクロプレート上には、細胞接着性のコラーゲンをパターンニングすることにより、選択的に細胞が接着できるようにデザインした。このマイクロプレート上で神経様細胞である PC12 を培養することにより、デザインした通りに成長させた単一細胞を得ることに成功した。また、電圧印加により開閉が可能なマイクロピンセットを用いて、単一神経細胞が培養されたマイクロプレートを培養液中で 3 次元的に操作した。その操作後も、神経様細胞が生存していることも確認した。これにより、従来は接着状態で制御困難な培養神経細胞を一細胞単位で形態・位置制御することが可能になった。また、神経細胞が任意の形状に成長したマイクロプレートを接近させることにより、マイクロプレート間の神経細胞が物理的に接着することが確認された。

また、ラットのプライマリー細胞に対しても同様の実験を行った。プライマリー細胞においても、マイクロプレートの形状にそって成長することが観察され、マイクロプレートのデザインによって細胞体と軸索に分化することも観察された。さらにプライマリーセルが接着したマイクロプレートのハンドリングにも成功した。

・磁場応答性マイクロプレートによる細胞表面の高分解能観察

マイクロプレートに磁場応答性金属であるパーマロイを内包することにより、磁場応答性のマイクロプレートを作製した。このマイクロプレートに接着細胞を培養し、外部から磁場をかけることで物理的な接触なく細胞の 3 次元的操作を実現した。また、プレートの細胞接着面積を最適化することで、単一細胞と多細胞の両方を用途に応じてマイクロプレート上にパターンニングすることに成功した。この結果を利用し、多細胞体ハンドリングマイクロフラップ、単一細胞ハンドリング用マイクロプレートの 2 種類を開発した。このマイクロプレートを用いることにより、細胞の高解像度 3 次元光学計測が可能になった。共焦点顕微鏡は 3 次元の構造情報を得る強力なツールであるが、従来の観察方法では、XY 軸方向に比べて Z 軸方向では 3 倍低い分解能の情報しか得ることができなかった。しかし、磁場応答性マイクロプレートを用いることによって、試料を垂直に傾けた上での観測が可能になるため、実質、全方向でも XY 軸方向と同等の高い分解能で観察することが可能になった。これにより、細胞の膜構造体の鮮明な画像を取得やリアルタイムでの寄生虫の侵入の観察に成功した。本研究成果は国内外の学会で高い評価を得ており、国内では科学とマイクロナノシステム学会及び寄生虫学会という工学と生物の両分野の学会からポスター賞を、国外では International Joint Symposium on Single-Cell Analysis からポスター賞を授与されている。

・細胞折り紙による 3 次元組織構築

細胞の足場となるマイクロプレートの使い、細胞の牽引力を用いることで、高速に中空な 3 次元組織を構築する手法を確立した。プレート上に細胞を培養すると細胞は隣り合ったプレートにまたがって増殖する。その後、プレートをガラス基板から剥がすと、細胞の牽引力によって、プレートが引き寄せられて立ち上がり、細胞の立体構造が折り畳まれることがわかった。この原理を利用し、プレートの形を変えることにより、簡単に様々な立体組織構造を高速に作製することに成功した。立体構造を構築してから 7 日後に Live/Dead アッセイを行った結果、細胞は立体構造内でも増殖していることがわかった。さらに、プレート上に細胞マトリックス(フィブロネクチン-FN)をパターンし、細胞骨格(アクチン)の向きを折り畳む方向に揃えることで、短時間で折り畳まれるようになった。よって、プレート上の FN のパターンを変えることで折り畳む順番を制御することに成功した。この方法を用いることにより、同一のマイクロプレートの 2 次平面展開図を用いても異なる形の立体構造を同時に作製することが可能になった。マイクロプレート

のデザインをかえることで、谷折りだけでなく、山折りを細胞牽引力で実現することに成功した。

また、パリレン以外の材料からのマイクロプレート作製も検証した。大和グループとの連携により、細胞接着層として温度応答性樹脂を導入し、温度応答性樹脂とマイクロプレート上の細胞接着の相関関係を調べた。また、バクテリアセルロースによるマイクロプレートも構築し、バクテリアセルロース上でも細胞を接着・培養することに成功した。これらの知見を発展させることで、細胞折り紙によって形成された 3 次元組織からマイクロプレートをかき離させ、細胞のみからなる 3 次元組織を構築できることが期待できる。

・任意形状のチューブ形状形成

A02 班公募班 (2014 年度まで) の芳賀グループにより、シート状に培養した細胞上にゲルを載せることで、筒状の構造体を作られることが報告されている。さらに形成される形状を観察し、細胞の運動を解析するためには、精度よく任意のパターン状に細胞を培養する必要がある。そこで、当グループが得意とするマイクロ加工技術を用いることで、任意のパターンで細胞が培養できる基盤を作製し、芳賀研究室に提供した。このパターン上に細胞を培養することで、設計したパターン通りに細胞が培養され、ゲルを載せることで細胞の折り返しも観察された。

3-5. 今後の展望

本研究によって、細胞を生きたまま三次元的に操作することが可能なマイクロサイズのプレートを作製することに成功している。すでにこのマイクロプレートによって任意の位置に細胞を配置し、細胞間の物理的接触を生じさせ、多細胞モデルが構築可能であることも示唆されている。今後は、このマイクロプレートを利用して細胞を配置させて多細胞による機能を発現させ、細胞組織の機能解明および利用への発展が期待される。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計12件)

- [1] K. Kuribayashi-Shigetomi, H. Onoe, S. Takeuchi: Cell Origami: Self-folding of Three-Dimensional Cell-Laden Microstructures Driven by Cell Traction Force, PLoS ONE, vol. 7(12), p. e51085, 2012
- [2] T. Teshima, H. Onoe, H. Aonuma, K. Kuribayashi-Shigetomi, K. Kamiya, T. Tonooka, H. Kanuka, S. Takeuchi: Magnetically Responsive Microflaps Reveal Cell Membrane Boundaries from Multiple Angles, Advanced Materials, vol. 26(18), pp. 2850-2856, 2014
- [3] S. Yoshida, T. Teshima, Kaori K., S. Takeuchi: Mobile microplates for morphological control and assembly of individual neural cells, Advanced Healthcare Materials, vol. 5(4), pp. 415-420, 2016
- [4] Tetsuhiko Teshima, H. Onoe, S. Tottori, H. Aonuma, T. Mizutani, K. Kamiya, H. Ishihara, H. Kanuka, S. Takeuchi: High-Resolution Vertical Observation of Intracellular Structure using Magnetically Responsive Microplates, Small, online

などその他含め計12件

(2) 学会発表 (計59件)

- [1] S. Takeuchi, “Cell-Laden Hydrogel Beads, Fibers and Plates for 3D Tissue Construction”, Transducers 2013, Barcelona, Spain, 18. Jun. (2013)
- [2] T. Teshima, H. Onoe, H. Aonuma, H. Kanuka, S. Takeuchi, “MULTI-ANGLE CONFOCAL ANALYSIS OF

SINGLE” , Frontiers of Single Cell Analysis meeting, Stanford University, California, USA, 6. Sep.

[3] S. Yoshida, T. Teshima, K. Kuribayashi-Shigetomi, S. Takeuchi, “Mobile Microplates for Handling Morphologically Controlled Single Neural Cells” , MicroTAS2013, Freiburg, Germany, 31. Oct.

などその他含め計59件

(3) 図書 (計2 件)

[1] S. Yoshida, D. Serien, F. Tomoike, H. Onoe, S. Takeuchi, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Springer, 2015年

他 1 件

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (0 件)

計画研究 A03

課題番号：23106009

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：肝臓等複雑化組織の構築と機能解明

1. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 雅之 (Yamato, Masayuki) 東京女子医科大学・医学部・教授

(2) 研究分担者

秋山 義勝 (Akiyama, Yoshikatsu) 東京女子医科大学・医学部・講師

中山 正道 (Nakayama, Masamichi) 東京女子医科大学・医学部・講師

小林 純 (Kobayashi, Jun) 東京女子医科大学・医学部・講師

長瀬 健一 (Nagase, Kenichi) 東京女子医科大学・医学部・講師 平成26年度～平成27年度

高橋 宏信 (Takahashi, Hironobu) 東京女子医科大学・医学部・助教 平成25年度～平成27年度

(3) 連携研究者

清水 達也 (Shimizu, Tatsuya) 東京女子医科大学・医学部・教授 平成26年度

坂口 勝久 (Sakaguchi, Katsuhisa) 早稲田大学・理工学術院・講師 平成26年度

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
平成24年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
平成25年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
平成26年度	20,200,000	6,060,000	26,260,000
平成27年度	18,500,000	5,550,000	24,050,000
総計	93,300,000	27,990,000	121,290,000

3. 研究成果

研究成果の概要

肝臓や神経組織など複雑な構造の生体組織の機能評価を行う目的で、細胞シート工学や新規温度応答性培養表面の設計、ロボット工学技術を駆使して、細胞のみから成る機能的な細胞シート組織を作製した。具体的には、成長因子を固定化可能なヘパリン固定化温度応答性培養表面を新たに開発し、肝細胞シート組織の作製に応用した。ヘパリン固定化温度応答性培養表面を用いて作製した肝細胞シート組織の肝特異的な機能は、従来の温度応答性表面よりもより少量の成長因子で、高く長期的に維持された。また、パターン化温度応答性培養表面と細胞シート積層化技術を用いた、三次元神経組織構築ための基盤技術を確立した。光照射重合を利用した新規かつ簡便な温度応答性細胞培養表面技術の開発にも成功した。さらに、ロボット工学技術を取り入れることで、共培養細胞シート作製のためのマイクロコンタクトプリンティング

や積層化を精密に行う装置開発、および柔らかな細胞シート組織を簡便かつ高速に移植する手法を実現した。

3-1. 研究開始当初の背景

組織・臓器に近い機能を細胞から人工的に再構築する再生医療が世界的に注目されている。我々は、生体組織があたかも細胞でできたシートを積層したような構造であることに着目し、細胞シートの積層化によって組織構造を再構築する「細胞シート工学」に取り組んできた。温度応答性高分子であるポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）(PIPAAm)を20ナノメートルの厚みで均一に固定した温度応答性培養皿表面には、相転移温度（32℃）以上の37℃ではPIPAAmが疎水性を示すため細胞が接着・伸展する。また、温度応答性培養皿上で細胞を単層になるまで培養した後、温度を20℃に低下すると、PIPAAmが水和して細胞底面の細胞外マトリックスと培養皿表面との相互作用が減少し、細胞-細胞間接着を維持したまま細胞シートを回収することができる。さらに、細胞シート底面に細胞外マトリックス（ECM）を保持しているため、別の培養皿や別の細胞シート、生体組織に対して再接着させることができる。加えて、細胞シートを重ねることで3次元の細胞シートを構築することが可能となる。細胞シートを用いた再生治療は、角膜上皮再生の試験が欧州で始まっており、皮膚、食道、心筋、歯根膜、軟骨、中耳ではすでにヒト臨床応用され、それ以外にも肺、肝臓、血管、膀胱など様々な組織を対象とした新しい再生治療実現のための技術開発が進んでいる。

高い細胞密度の組織を再構築する上で、細胞シート工学は大変有効な手法である一方、心筋や腎臓、肝臓等の組織・器官は複雑な構造をしており、異なる機能をもつ細胞がパターン状に配列して形成されている。よって、高度な細胞組織の再構成のためには、生体組織構造を模倣した多種類の細胞から成るマイクロメートルスケールの組織化技術が必要不可欠である。近年、フォトリソグラフィをはじめとする微細加工技術を利用し、マイクロスケールで精密に配列された細胞からなる組織・器官の再構築が検討されている。例えば、異種細胞同士がパターン状にマイクロスケールで近接・共培養することで、異種細胞間に働く液性因子などの影響により細胞機能が向上する（Bhatia *et al.*, *FASEB J.*, 1999）。また、10 μm の線状マイクロパターン上で培養した血管内皮細胞は、毛細血管様の中空構造体を形成する（Dike *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1999）。しかし、生体に生着するような組織・臓器再構成の実現には至っていない。

そこで我々は相転移温度の異なる2種類の温度応答性高分子を、マイクロパターン状に表面固定化した培養皿で温度を変えながら細胞を播種すると、肝実質細胞と血管内皮細胞がお互いに接しながらパターン状に共培養できることをあきらかにした（Tsuda *et al.*, *Biomaterials*, 2007）。さらに、温度をそれぞれの相転移温度以下に低下することで、細胞-細胞間の接着を維持したまま肝-内皮パターン構造を有する細胞シートを剥離、回収することができる。さらに、ポリジメチルシロキサン（PDMS）製マイクロスタンプを使って代表的ECMであるフィブロネクチンを温度応答性培養皿にマイクロパターン転写すると、より高精度かつ迅速に肝-内皮細胞シートの作製および回収することに成功している（Elloumi-Hannachi *et al.*, *Biomaterials*, 2009）。

このような異種細胞同士のパターン化共培養を行うことで、パターン形状を維持したまま長期にわたって培養することができる（異種細胞間に働く液性因子などの影響により細胞機能が向上するため）。今後、パターン形状、サイズ、細胞の組み合わせなどを検討し、生体臓器に近い機能を発現する共培養細胞シートや *in vitro* 重層化組織の構築が期待される。さらに、細胞シートを基にして構築した *in vitro* 重層化組織は、生体内環境に近いと考えられるため、*in vitro*における細胞機能評価システムとしての応用と同時に、移植が容易なことから *in vivo* 組織評価としても有効な手法であることが期待される。

3-2. 研究の目的

本研究では細胞シートから成るマイクロパターン化細胞シート、重層化細胞組織、および A02 班が開発する組織構築技術を用いて作製された肝臓等の複雑化組織の機能評価をおこない、複数種の細胞からなる組織が示す高度な機能発現の分子機構を解明する。たとえば肝臓は、きわめて複雑な生合成系を発現する肝実質細胞が 90%を占めるが、その機能維持には共存する様々な非実質細胞が重要な役割を担っている。肝実質細胞単独の培養では長期維持が困難であり、上述の生体分子の生合成能はきわめて低い。評価にあたっては、培養系では次世代シーケンサーなどの新規技術を活用して機能分子等の遺伝子発現を定量的に評価する他、共焦点レーザー走査顕微鏡やライブイメージング装置を用いた免疫組織学的検討により、再構築した組織の生体組織との類似性や機能発現を定量的に評価する。さらに、免疫不全マウスないしラットへの移植により、生体内での再構成組織の成熟化、ホスト血管系との接続等を経時的に観察すると共に、再構成組織の機能発現を定量的に評価する。これらの検討から、複数種の細胞からなり、細胞集団が協調して高度な機能を発現するメカニズムを明らかにする細胞社会学とでも呼ぶべき新学問を創成する。

3-3. 研究の方法

(1) 機能的肝細胞シート組織の作製と *in vitro* 評価

細胞外マトリックスや細胞膜表面に存在するプロテオグリカンは、ヘパラン硫酸鎖が増殖因子とアフィニティー結合し、増殖因子の安定性や活性を向上させる。特に、ヘパラン硫酸の一種であるヘパリンは、さまざまなヘパリン結合性増殖因子と複合体を形成することによってその活性が維持される。このことに着目し、増殖因子をアフィニティー結合により表面導入するためのヘパリン修飾温度応答性表面を開発した。具体的には、電子線照射重合法を用いて作製したカルボキシル基を有する温度応答性表面にヘパリンを共有結合的に固定化したのち、ヘパリンとのアフィニティー結合を利用してヘパリン結合性上皮増殖因子(HB-EGF)を表面に導入した。また、HB-EGF を導入した温度応答性培養表面を用いて、ラット由来肝細胞の培養および肝特異的機能の評価を行った。

また、生体外での肝細胞シート組織評価方法として、肝細胞シートの灌流培養システムの構築を行った。具体的には、多孔質の PET 膜上部に肝細胞シートを置き、PET 膜下部が培地を灌流可能なシリコーン製マイクロ流路システムを作製した。

(2) 配向構造を有する三次元神経組織の創生

まず、細胞パターンニングのための温度応答性基材を作製した。PIPAAm が表面にグラフトされた培養基材表面にポリアクリルアミドをパターンニングすることで細胞非接着領域を作製した。光重合開始剤水溶性カンファーキノンを含む混合したアクリルアミド溶液を温度応答性培養基材に塗布し、フィルムマスクを用いて選択的に可視光を照射した。これにより、光照射領域のみでアクリルアミドを重合させ、基材表面にグラフトした。作製したパターン化基材にアストロサイトを播種し、細胞パターンを形成させた。さらに、この細胞パターン状に神経細胞を播種した。これらを共培養状態で 3 日間培養した後、共培養細胞パターン上にさらにアストロサイトを播種した。この状態で長期間培養を行った後、ニューロフィラメント・GFAP (glial fibrillary acidic protein) などの神経細胞およびアストロサイトに特異的なタンパク質を蛍光染色し、共培養細胞パターンの構造を確認した。

また、パターン化細胞の回収および転写を検討した。細胞パターンを 20°C で培養することにより、基材から細胞チューブを剥離させた。回収した細胞チューブを蛍光染色し、組織内部の構造を観察した。さらに、ゼラチンゲルスタンプを用いて細胞チューブをパターンニングした状態のまま転写できることを確認した。基材に接着した状態の細胞チューブ上にゼラチンゲルスタンプを置き、28°C で 30 分培養した。その後、20°C 30 分で低温培養を行った後にゼラチンゲルに接着した状態の細胞チューブを回収した。さらにスタンプごと別の培養皿上に移して 28°C で 30 分培養し、細胞チューブを培養皿に接着させた。その後、ゼ

ラチンゲルを 37°C で溶解させ、転写した細胞チューブの形状を確認した。

さらに、細胞チューブを転写する手法を応用して細胞シート積層組織への導入を試みた。まず、アストロサイトシートを通常の温度応答性培養基材にて作製し、ゼラチンスタンプを用いて回収した。次に、アストロサイトシートをパターン化温度応答性基材で作製した細胞チューブ上に転写し、細胞シートと細胞チューブを十分に接着させた後に低温培養により回収した。最後に、これらを別のアストロサイトシート上に転写することにより、パターン化した神経細胞をアストロサイトシートで挟む状態で組織を作製した。

(3) 可視光による新規温度応答性培養表面の作製

チオサリチル酸を 20 mM の濃度で濃硫酸に溶解させ、市販のポリスチレン製ペトリディッシュおよび、T フラスコへ反応溶液を添加し、室温で 1 時間静置した後、65°C で 3 時間加温した。反応後のサンプルは室温で一晩静置して温度を下げ、洗浄・乾燥した。次に光重合開始剤が導入されたポリスチレン表面に、100 mM *N*-methyl-diethanolamine を添加した IPAAm 水溶液を 2 mL 滴下し、低温チャンバー内で 405 nm LED からの可視光を照射して光開始重合を行った。FT-IR/ATR 法による測定から、固定化した PIPAAm 量を算出した。ウシ血管内皮細胞 (BAEC)、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)、マウス筋芽細胞 (C2C12) を播種し、コンフルエントまで培養後、低温処理を行い、温度応答性細胞培養表面としての細胞シート回収能について評価した。さらに、本手法で作製した温度応答性細胞培養表面上に、polyacrylamide (PAAm) のパターン化表面の作製も試みた。

3-4. 研究成果

(1) 機能的肝細胞シート組織の作製と *in vitro* 評価

肝細胞を用いた細胞治療・組織工学は、血友病など肝疾患の治療のみならず、薬物スクリーニングのための生体組織モデルとしての応用が期待される。しかし、いったん生体内の肝臓から肝細胞を取り出すと、培養時間の経過にともなってその生存率や機能が著しく低下する。肝機能維持のためには、細胞外マトリックスや細胞間接着、増殖因子などの生体内細胞周囲環境を培養系で再現することが必要と考えられる。そこで、肝細胞機能維持された肝細胞シート組織を作製するための次世代型温度応答性培養基材を設計した。本報告では、*in vitro* で機能維持された細胞シート作製および回収を達成するために、HB-EGF を導入した温度応答性培養表面を用いて、ラット由来肝細胞の培養をおこなった。EGF や HB-EGF など増殖因子が培地中に含まれない場合、肝細胞は機能維持できず培養時間の経過にともなって肝細胞の接着細胞数が減少した。一方、HB-EGF 結合ヘパリン温度応答性培養表面を用いると、播種したほぼすべての肝細胞が接着し、培養 4 日後でも接着が維持された。また、肝細胞の代表的な機能であるアルブミン産生能は、HB-EGF 結合ヘパリン温度応答性培養表面上で有意に亢進した。このことから、HB-EGF 結合ヘパリン固定化温度応答性培養表面を用いることによって、肝細胞シートの機能維持を促すことが期待される。

さらに、温度を 45 分間 20°C に低下させると、肝細胞が表面から脱着し、HB-EGF と細胞外マトリックスのフィブロネクチンとともにシート状に回収できる。これは、温度を PIPAAm の相転移温度以下の 20°C に低下すると、PIPAAm 分子鎖が膨潤、伸展するのにともない、ヘパリン/ヘパリン結合性タンパク質間アフィニティー相互作用が減弱し、脱着する培養細胞ととも

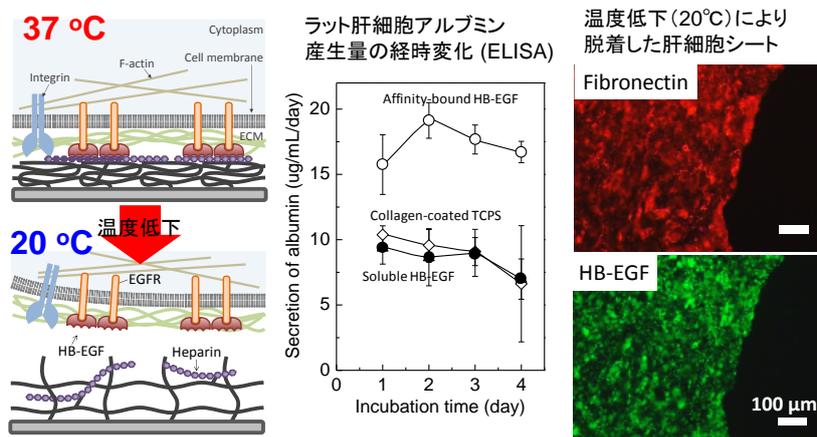


図 1 ヘパリン修飾温度応答性培養皿を用いた培養肝細胞シートの肝特異的機能維持

にヘパリン結合性増殖因子も脱着するためである。回収した肝細胞シートはラット皮下に移植し、*in vivo*での肝組織機能評価を可能とした。以上のことから、ヘパリン修飾温度応答性表面は、肝細胞の機能維持したまま、低温処理による移植可能な肝細胞シート作製を実現した。機能維持された肝細胞シートを用いることで、より機能的な生体内での肝組織構築が期待される。

生体外での肝細胞シート組織評価方法として、肝細胞シートの灌流培養システムの構築を行った。具体的には、多孔質のPET膜上部に肝細胞シートを置き、PET膜下部が培地を灌流可能なシリコン製マイクロ流路システムを作製した。肝細胞シートを灌流培養システムで培養すると、1週間に肝細胞の形態を維持していたのに対し、静置培養では細胞数の減少と形態変化が観察された。また、培地中に分泌された産生アルブミンは、灌流培養前後で比較すると、灌流培養後で増加した。これは、灌流培養による肝細胞シートへの酸素・栄養素の供給および老廃物の除去により、肝細胞機能を維持・促進したものと考えられる。上記の肝細胞シート組織の灌流培養システムを用いることにより、薬物応答評価のための生体組織モデルへの応用展開が期待される。

(2) 配向構造を有する三次元神経組織の創生

光重合法により表面修飾した培養皿上でアストロサイトは任意の幅を持つストライプ状にパターンニングされた。さらに、50~200 μm 幅のストライプパターンを形成するアストロサイトは長軸方向に配向していることもわかった。この細胞パターン上に接着した神経細胞は長軸方向に沿ってパターン内に樹状突起を伸長させており、さらにアストロサイトを追加して播種することで神経細胞をアストロサイトが囲んだ状態を形成させることに成功した。さらに、この共培養状態で細胞チューブを1ヵ月程度培養することにより、網目状のネットワーク構造を形成していた神経細胞がより密な束になったバンドル構造に変化していることがわかった。また、この神経細胞が synaptophysin を発現している様子が確認されたことから、この神経細胞はシナプスを形成していることが示唆された。

細胞チューブを形成しているパターン化培養基材は温度応答性を有していることから、低温培養(20°C)のみで基材から容易に剥離する様子が確認された。これにより、足場を失うためチューブの幅は若干小さくなる傾向にあるものの、チューブ形状は維持した状態で剥離させることができる。また、蛍光顕微鏡観察から、アストロサイトが神経細胞の周辺を3次元的に覆っている構造が剥離後も維持されていることも確認された。そのため、ビンセット等で容易にハンドリングできる程度の強度を持った神経組織になっており、バンドル状の神経細胞を容易に操作できるという重要な特長を持つと言える。

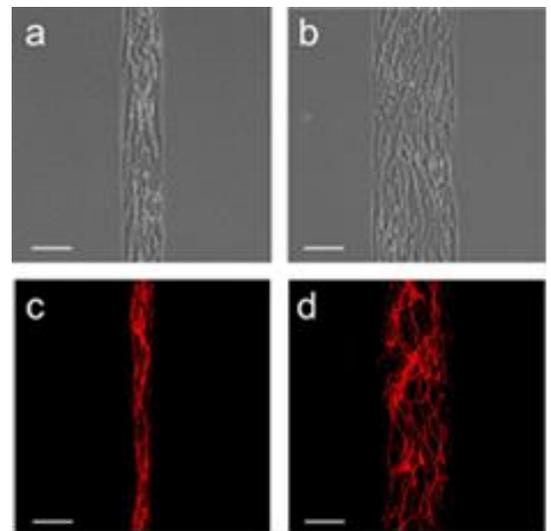


図 2 パターン化基材上に形成したアストロサイトパターン(a: 100 μm , b: 200 μm)とそのパターン上で伸展する神経細胞 (c: 100 μm , d:200 μm)

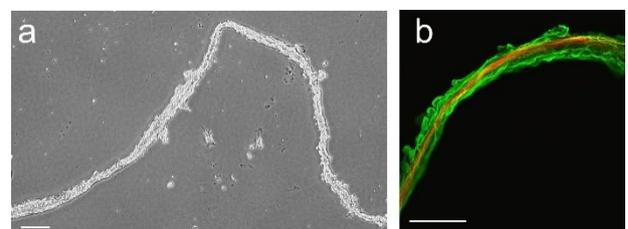


図 3 温度変化によりパターン化温度応答性基材から剥離する神経細胞チューブ(a: 位相差顕微鏡像、b: 蛍光顕微鏡像) (緑: アストロサイト、赤: 神経細胞) スケールバー: 100 μm

本研究において作製された細胞チューブは温度変化に伴い容易に基板から剥離できることから、この技術を応用した3次元組織の作製を試みた。この組織構築技術はパターン化表面で細胞チューブの配置（幅、間隔）を制御できる。したがって、3次元組織内に神経組織を自在に配置できると考えた。まず、スタンプデバイスによって回収した細胞チューブのみを別の培養皿に転写したところ、パターンの配置を維持した状態で基板上に接着させることに成功した。通常の培養基材に転写した後も神経細胞とアストロサイトの構造に変化がないことも確認できた。

次に、この手法によりアストロサイトシート間に細胞チューブを挟んだ状態で培養したところ、基板のパターン配置を維持した状態の神経細胞を細胞シート積層組織内に導入することに成功した。

細胞シート技術と細胞パターンニング技術を組み合わせることにより、スキャホールドフリーな状態で精密に神経バンドルを配置した組織を構築することに成功した。これまでスキャホールドを使用せずに脆弱な神経細胞を操作するのは困難であったが、パターン化アストロサイトと共培養することで神経組織に配向性と強度を与えることができ、さらに任意に3次元組織内に配置することを可能にした。組織内部において神経細胞とアストロサイトはスキャホールドに物理的障害を与えられることなく相互作用できると期待されるため、より生体に近い3次元環境での神経細胞の挙動を確認することができる。このような立体組織作製技術は優れた組織モデルを作製するうえで有効であると期待される。

(3) 可視光による新規温度応答性培養表面の作製

チオキサントン系光重合開始剤をポリスチレン (PSt) 表面に導入後、X線光電子分光による表面元素分析を行ったところ、チオキサントン基とスルホン基が導入されていることを確認した。IPAAmモノマー存在下でチオキサントン系重合開始剤固定化表面に可視光を照射すると、光重合反応により直鎖状のPIPAAmポリマーが固定化された温度応答性培養表面 (PIPAAm-PSt) が構築されることが期待される。そこで、IPAAmモノマー濃度を1.0 wt%から9.0 wt%に増加させると、固定化PIPAAm量は $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ から $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ に増加することを確認した。このことから、IPAAmモノマー濃度を変えることで固定化ポリマー量を制御できることをあきらかにした。

BAECを用いた細胞接着および細胞シート剥離評価から、7.0 wt%で作製した温度応答性培養表面が最も良い細胞接着性および剥離能を示した。このときのPIPAAm固定化量は約 $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。市販の温度応答性培養皿 (UpCell, CellSeed社製) のPIPAAm固定化量は $1.5\sim 2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、本手法で作製した温度応答性培養表面は、通常の温度応答性細胞培養表面よりも多いPIPAAm固定化量であった。UpCellなど電子線照射重合法で作製した従来の温度応答性培養皿は、PIPAAm層は3次元架橋されたゲル構造で固定化される。一方、本手法で作製したPIPAAmは線状ポリマーとして固定化されている。このPIPAAm層の構造の違いが、細胞接着性とPIPAAm固定化量の関係性の違いに影響を与えると推測された。また、作製した温度応答性表面上で、BAEC、NHDF、C2C12の細胞シート作製および低温処理による回収可能であることも確認した。

作製した温度応答性培養表面とフォトマスクを用いて、光照射によりPAAmパターン化温度応答性培養表面の作製を試みた (PAAm-PIPAAm-PSt)。細胞接着および蛍光標識したタンパク質の吸着挙動の観察から、PAAm鎖が温度応答性培養表面に固定化され、細胞非接着領域として機能することが示唆された (図5)。従来の論文で報告されているように、これはPAAmの高い親水性に起因すると考えられる。パターン化温度応

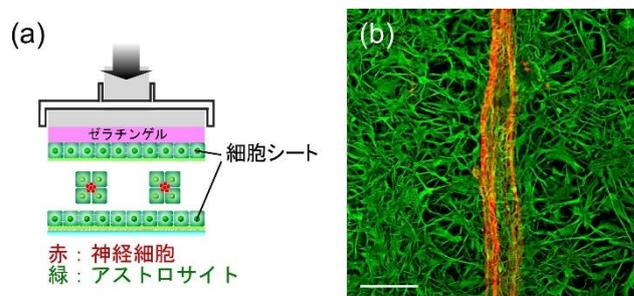


図4 (a)細胞シート積層組織への神経細胞チューブの導入、(b)3次元組織内に配置されたバンドル構造の神経細胞

培養表面上に細胞を播種、培養した後、低温処理を行うことで、パターン形状や大きさを制御したマイクロメートルサイズの細胞シートを作製することができた (図 5)。

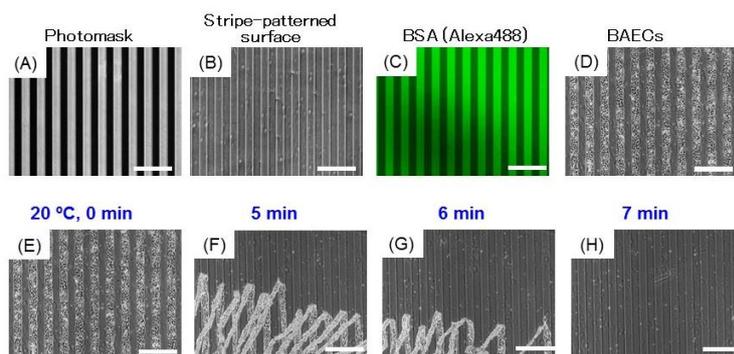


図 5 PIPAAm-PSi 表面上で作製したパターン化 PAAm 表面における位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡イメージ。(A) フォトマスク、(B) 作製後のパターン化 PAAm-PIPAAm-PSi 表面、(C) Alexa488 で標識された BSA 分子の吸着、(D) パターン化 PAAm-PIPAAm-PSi 表面への細胞接着挙動 (37°C、細胞播種 24 時間後)、(E)-(H) パターン化 PAAm-PIPAAm-PSi 表面における細胞剥離挙動 (細胞播種後 24 時間後に温度を 20°C に変化させた)。スケールバー : 500 μ m。

(4) ロボット工学技術を用いた細胞シート操作技術の開発

ロボット工学による精密かつ迅速な制御を利用して、精密な細胞パターンニング手法の開発を行った。具体的には、スタンプ位置合わせおよびスタンプにかかる力を制御したマイクロコンタクトプリンティング (μ CP) 法により、培養表面上に細胞接着性タンパク質を精密に転写する装置の開発に成功した。本装置を利用した μ CP 法は、3 種類以上の細胞接着性タンパク質の転写を可能にした。また、A01 班阪大金子グループとの共同研究で、柔らかな細胞シートのための移植デバイス開発にも成功し、手作業に比べてきわめて迅速に細胞シートを患部に移植することができた。

3-5. 今後の展望

本研究を通して、細胞シート工学とロボット工学を組み合わせた迅速な細胞シート操作および三次元組織構築の基盤技術が確立され、肝臓組織や神経組織等の複雑組織・臓器の作製が実現されてきた。今後は、これらの三次元組織を生体内に移植し、如何に安定に生着させるかが注目される。そのためには、厚い三次元組織内部に毛細血管を導入することや、生体と移植組織・臓器との間の安定な界面形成を実現していくことが重要である。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (全て査読有) (計33 件)

- [1] Takahashi H, Shimizu T, Nakayama M, Yamato M, Okano T, Anisotropic cellular network formation in engineered muscle tissue through the self-organization of neurons and endothelial cells. *Advanced Healthcare Materials*, vol. 4, pp. 356-360, 2015. (Selected as a back cover)
- [2] Takahashi H and Okano T, Cell sheet-based tissue engineering for organizing anisotropic tissue constructs produced using microfabricated thermoresponsive substrates. *Advanced Healthcare*

Materials, vol. 4, pp. 2388-2407, 2015.

- [3] Okada F, Akiyama Y, Kobayashi J, Ninomiya H, Kanazawa H, Yamato M, Okano T, Measurement of the dynamic behavior of thin poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels and their phase transition temperatures measured using reflectometric interference spectroscopy. Journal of Nanoparticle Research, vol. 17, pp. 148-154, 2015.
- [4] Nagase K., Hatakeyama Y., Shimizu T., Matsuura K., Yamato M., Takeda N., Okano T. Thermoresponsive Cationic Copolymer Brushes for Mesenchymal Stem Cell Separation. Biomacromolecules, 532-540 2015.
- [5] Iwase Y, Nakayama M, Yamato M, and Okano T. A Biomimicking Tumor Tissue Model Using Hepatocellular Carcinoma Cell Sheet in a Collagen Sandwich System. Anticancer Res. vol. 35, pp. 6481-6486, 2015.
- [6] Arisaka Y, Kobayashi J, Ohashi K, Tatsumi K, Kim K, Akiyama Y, Yamato M, Okano T, A heparin-modified thermoresponsive surface with heparin-binding epidermal growth factor like growth factor for maintaining hepatic functions in vitro and harvesting hepatocyte sheets. Regen Ther, vol. 3, pp. 97-106, 2016.
- [7] Fukumori K, AKIYAMA Y, Yamato M, Okano T, A Facile Method for Preparing Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces by Using a Thioxanthone Photoinitiator Immobilized on a Polystyrene Surface, ChemNanoBio 2016 2(5), pp. 454-460.

などその他含め計33件

(2) 学会発表 (一般講演19件、招待講演14件) (計33 件)

- [1] Kobayashi J, Arisaka Y, Ohashi K, Tatsumi K, Kim K, Akiyama Y, Yamato M, Okano T. Surface design of heparin-functionalized thermoresponsive cell culture substrates for maintaining hepatic functions and harvesting cultured hepatocyte sheets. Society For Biomaterials 2015 Annual Meeting and Exposition, Charlotte, USA, Apr. 17, 2015.
- [2] Akiyama Y, Matsuyama M, Yamato M, Takeda N, Okano T. Alternation of PIPAAm Modified PDMS Surface Properties Induced by Mechanical Stretching Stress, Riva del Garda, Italy, Jul. 9, 2015.
- [3] Kobayashi J, Arisaka Y, Ohashi K, Tatsumi K, Kim K, Akiyama Y, Yamato M, Okano T. Heparin-functionalized thermoresponsive cell culture surfaces for creation of functional hepatic tissues. 11th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Riva del Garda, Italy, Jul. 9, 2015.
- [4] Kobayashi J, Arisaka Y, Ohashi K, Tatsumi K, Kim K, Akiyama Y, Yamato M, Okano T. Creation of functional hepatocyte sheet tissues by using heparinized thermoresponsive surfaces. 2015 4th TERMIS World Congress, Boston, USA, Sep. 9, 2015.
- [5] Kobayashi J, Akiyama Y, Yamato M, Okano T. Fabrication of functional liver tissues by cell sheet-based bioassembler technologies. 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), Nagoya, JAPAN, Nov. 13, 2015.
- [6] Nagase K, Hatakeyama Y, Shimizu T, Matsuura K., Yamato M., Takeda N., Okano T.. Stem Cell Separation using Thermoresponsive Copolymer Brushes having Cationic Charge. 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), pp. 172-173, Nagoya, JAPAN, Nov. 11th. 2015.
- [7] Nakayama M, Kanno T, Kikuchi A, and Okano T. Light-sensitive Fluoropolymer Coated Surface for Control of Cell Adhesion Behavior. Society for Biomaterials 2015 Annual Meeting & Exposition

(SFB2015), Charlotte, USA, Apr. 16-18th. 2015. 4. 16-18

- [8] Nakayama M, Kanno T, Kikuchi A, and Okano T. Visible-light induced cell recovery system using intelligent fluoropolymer-coated surface. 17th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, USA, June 15-17th. 2015.

などその他含め計19件

招待講演 (計14件)

- [1] Kobayashi J. Creation of functional liver tissues by cell-sheet technologies. IEEE Robotics and Automaton Society (ICRA) 2015 Workshop “Hyper Bio Assembler for 3D Cellular System Innovation”, Seattle, USA, May 30, 2015.
- [2] Akiyama Y. Recent development of poly(N-isopropylacrylamide) based temperature-responsive cell culture surface, 2015 E-MRS Spring Meeting, Lille, France, May 12, 2015.
- [3] Akiyama Y. Efficient fabrication of hepatocyte cells sheet with heparin-immobilized temperature-responsive cell culture surfaces, 2015 E-MRS Spring Meeting, Lille, France, May 12, 2015.

などその他含め計14件

(3) 図書 (計3件)

- [1] Kobayashi. J, Okano. T. Thermoresponsive cell culture surfaces designed for cell-sheet-based tissue engineering and regenerative medicine in *Biomaterials and Science* (Wiley-VHC), 2013, pp. 491-510
- [2] Akiyama. Y, Yamato. M and Okano. T., Chapter 9. Temperature-responsive polymers for cell culture and tissue engineering applications in *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications* (Elsevier), 2015, pp. 203-223.
- [3] Fukumori. K, Takahashi. H, Kobayashi. J, Nakayama. M, Akiyama. Y, Yamato. M., Chapter 22. Sociocytology Illuminated by Reconstructing Functional Tissue with Cell Sheet Based Technology in *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems* (Springer), 2015, pp. 327-345.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

計画研究 A03

課題番号：23106010

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題名：骨ミネラルリゼーションプロセスの解明と硬組織構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu) 東北大学・大学院歯学研究科・教授

(2) 研究分担者

穴田 貴久 (Anada, Takahisa) 東北大学・大学院歯学研究科・准教授

塩飽 由香利 (Shiwaku, Yukari) 東北大学・大学院歯学研究科・助教 平成27年度～平成27年度

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	21,500,000	6,450,000	27,950,000
平成24年度	17,900,000	5,370,000	23,270,000
平成25年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
平成26年度	17,100,000	5,130,000	22,230,000
平成27年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
総計	89,800,000	26,940,000	116,740,000

3. 研究成果

研究成果の概要

本研究ではミネラル結晶とその三次元的な配置が細胞の分化に及ぼす影響を調べ石灰化組織形成におけるミネラル成分の役割を検討した。骨芽細胞の分化はリン酸カルシウムが誘導する化学的環境に左右されること、三次元的な培養環境下ではリン酸カルシウムの結晶相および細胞が接着するマトリクス材料のひずみ量に依存すること、また、骨および骨関連組織の再生はマトリクス材料への結晶の分散性と関係することから石灰化組織ではミネラル結晶が組織形成に重要な役割を持つことを解明した。

3-1. 研究開始当初の背景

骨をはじめとする石灰化組織において無機リン酸カルシウムミネラル成分が組織の形成や再生の過程にどのように関わっているか、ミネラル成分の配置やマトリクス材料の構成、また細胞の三次元培養の視点で検討する試みはなされていなかった。また、工学的に制御された細胞に対する化学的・物理的な刺激の影響は十分に明らかになっていなかった。

3-2. 研究の目的

本研究では生体の硬組織形成関連細胞と人工合成のミネラル成分との相互作用を生体外で三次元的に培養し

て生体を模倣するモデルを構築し、これにより細胞のミネラル成分が細胞の活性に与える影響を検討することを目的とした。その上でミネラル成分の生体内における役割解明を目的とし、人工合成のミネラル成分とマトリクス材料を工学的に制御して作製し、生体内に埋入した場合の組織応答性を解析して硬組織および硬組織関連細胞の再生に及ぼす影響を検討した。

3-3. 研究の方法

(1) 2次元（平面）で人工合成ミネラルと相互作用する細胞の機能解明

人工合成のリン酸八カルシウム (OCP) を培地内に浸漬した際に達する平衡濃度を培地のカルシウムおよびリン酸の濃度を調節して模倣する調整培地を作製した。この培地内でマウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 を用いて骨芽細胞の分化に及ぼすカルシウムとリン酸の影響を検討した。また OCP コーティング上での ST-2 細胞の分化も調べた。さらに、硬組織関連細胞としてラット歯髄由来細胞およびマウス軟骨芽細胞株 ATDC5 の OCP コーティング上での分化も同様に解析した。コーティング方法は先に骨髄由来間質細胞株の骨芽細胞分化研究で確立した方法 (Suzuki O et al. Biomaterials 27:2671-2681, 2006) を用いた。

(2) 3次元細胞塊（スフェロイド）培養デバイスの開発

より生体内に近い状態を再現するためにスフェロイド形成デバイスを開発した (Anada T et al. Biomaterials 33:8430-8441, 2012)。このデバイスはポリジメチルシロキサン (PDMS) 薄膜を用いるため酸素透過性を有する培養デバイスである。また約 500 個のディンプル状のスフェロイド形成部位 (直径 1.0 mm, 深さ 1.0 mm) を有し、ディンプル上の細胞懸濁液からディンプル内で細胞が凝集して比較的均一なスフェロイドが形成できるよう設計した。酸素透過性デバイスの有効性について酸素要求性の肝癌細胞株 HepG2 を培養して検討した。

(3) スフェロイドを用いた人工合成ミネラルと相互作用する細胞の機能解明

マウス骨髄由来未分化間葉系細胞株 D1 細胞のスフェロイドと人工合成ミネラルとの複合体を作製し、三次元的な細胞組織体中の細胞の分化に及ぼす人工合成ミネラルの影響を調べた。セラミックス材料であるハイドロキシアパタイト (HA) および β -TCP (β -TCP), また OCP の 200 メッシュ顆粒を D1 細胞 (1×10^6 個) と混合しスフェロイド培養デバイスにて分化培地中で 7 日間培養した後、光学顕微鏡でスフェロイドサイズを観察、また細胞の DNA 当たりのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を比色法にて評価した。

(4) 水和ゲル内に配置した人工合成ミネラルと細胞の複合体における細胞機能解明

マウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 および OCP をアルギン酸のゲルビーズに封入し、ST-2 細胞の分化に及ぼす影響を解析した。0wt%から 3wt%となるように OCP の 200 メッシュ顆粒および ST-2 細胞 (1×10^6 個/ml) を 0.7wt%アルギン酸ナトリウムゲルと混合し塩化カルシウム溶液に滴化してビーズを作製した。ビーズを 14 日間まで培養し ST-2 細胞の骨芽細胞への分化を調べた。

(5) 人工合成ミネラル・マトリクス複合体の変形が及ぼす播種細胞への影響の評価

マウス骨髄由来未分化間葉系細胞株 D1 細胞を 40wt%の OCP 顆粒を分散させ架橋により成形したゼラチンスポンジの円筒状ディスク (外径 9mm, 厚さ 5mm) にディスク当たり 1×10^6 個の密度で播種した。0.75Hz 周期で一軸に上下運動するクロスヘッドを有するひずみ負荷装置を作製して 20, 40, 60%の変位を 1 日当たり 4 時間, 7 日間与える環境で培養した。その後、骨芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR で分析した。実際に細胞に負荷されるひずみ量を推定するためにディスクの力学的性質を基に finite element method (FEM) による変形解析も行った。

(6) 人工合成ミネラル・マトリクス複合体による骨および骨関連組織の修復能の評価

ミネラル成分をマトリクス中に均一分散した骨欠損補填材を作製し、ミネラル成分のマトリクス材料中における配置の影響を調べた。ゼラチン水溶液中でリン酸カルシウムを析出させて 24wt% から 40wt% の OCP を含有する共沈 OCP/ゼラチン複合体を得た。複合体中の結晶の性状を X 線回折 (XRD), フーリエ変換赤外分光法 (FTIR), 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察, 制限視野電子線回折 (SAED) にて解析した。複合体の気孔サイズおよび気孔率を水銀圧入法により評価した。また, 直径 9mm, 厚さ 1mm の複合体ディスクを架橋によって成形し, Wistar 系ラット頭蓋冠に作製した 9mm 径の臨界径骨欠損に最長 16 週まで埋入して脱灰標本を作製し, 組織形態計測学的に骨再生率を調べた。さらに, 40wt% OCP 含有ゼラチン複合体を家兔の肩腱断裂部に 8 週間埋入し, 脱灰標本にてシャーピー線維の存在比率を指標として再生能を調べた。また, マウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 の細胞接着性を調べた。

3-4. 研究成果

(1) 平面培養された細胞分化に及ぼす人工ミネラルの化学環境の影響

ST-2 細胞は OCP 上で p38 シグナル伝達経路を介して分化が促進されること, また, この活性化には OCP が誘導するカルシウムイオンの濃度変化が関与することが明らかとなり, ミネラル結晶の化学的要因が細胞機能に影響を及ぼすことを明らかにした (Nishikawa R et al. Dent Mater J 33:242, 2014)。ラット歯髄由来細胞では対照材料である HA と比較して ALP, dentine sialophosphoprotein (DSPP), dentine matrix protein-1 (DMP-1) の mRNA 発現の増大が確認され, 象牙芽細胞への分化促進が認められた (Wang X al. J Tissue Eng Regen Med 9:1310, 2015)。一方, マウス軟骨芽細胞株 ATDC5 は OCP との直接接触により Col2a1 および Sox6 の mRNA 発現が抑制されることから, ミネラル相は軟骨細胞への分化に抑制的に作用することが明らかとなった (Shibuya I et al. Cell Tissue Res 352:401, 2013)。

(2) 三次元的な培養環境における細胞分化に及ぼす人工合成ミネラル相の影響

作製した酸素透過性スフェロイド培養デバイスによる HepG2 細胞の培養検討からスフェロイド中心部の低酸素状態を回避でき, より大きなスフェロイド形成が可能となることがわかった (Anada T et al. Biomaterials 33:8430, 2012)。この培養デバイスにてスフェロイドとリン酸カルシウムの複合体形成が可能となり, また, HA, β -TCP, OCP のうち, OCP が最も骨芽細胞分化の指標となる ALP 活性を促進することがわかった (Anada T et al. Regen Therapy 3:58, 2016)。アルギン酸ゲルビーズで ST-2 細胞が維持されるだけでなく, 3wt% の OCP を含むことで ALP 活性の増大が認められた。細胞の三次元的環境におけるミネラル相が与える影響が確認できた (Endo K et al. Biomed Mater 10:065019, 2015)。

(3) 人工合成ミネラル/マトリクス材料の変形が細胞分化に及ぼす影響

OCP/ゼラチン複合体は多孔構造であり 500 μ m 程度の気孔を含んでいた。FEM による変形解析では変形負荷量依存的に上面と側面により大きな圧縮力が負荷され, 複合体のディスク内で不均一に応力が分布していた。接着細胞に均一な力学的刺激は負荷されないことになるが, 生体内への埋入では過去の研究からこのような力学的刺激が想定された (Suzuki Y et al. J Dent Res 88:1107, 2009)。マウス骨髄由来未分化間葉系細胞株 D1 細胞の増殖は変形量によらず 3 日および 7 日間までの培養で同等であった。一方, 3 日における ALP 活性はひずみ量依存的に低下した。しかしながら, 骨芽細胞の分化を示すオステオポンチンおよびオステオカルシンにはひずみ量による分化の違いが見られ, ミネラル相が有する分化促進には適度な力学刺激が関係する可能性が示唆された (Yamada M et al. Sens Actuators B Chem, 220:125, 2015)。

(4) 人工合成ミネラルのマトリクス材料への分散状態が骨および骨間連組織の修復に及ぼす影響

作製した共沈 OCP/ゼラチン複合体は多孔構造を有しており、OCP の含有量によらず 90%以上の気孔率を有していた。また、500 μ m 程度の気孔とそれよりも小さい気孔を含んでいた。共沈による結晶は板状の形態を有しており、XRD, FTIR, TEM, および SAED による分析からゼラチン中の結晶含有量によらず OCP 結晶相が検出された。ラット頭蓋冠骨欠損埋入あるいは家兎肩断裂腱部位への埋入による骨再生の検討では、複合体の吸収に関連すると考えられる新生骨の再生あるいは 3 型コラーゲンの再生が認められた (Itoigawa Y et al. J Shoulder Elbow Surg 24:e175, 2015 ; Handa T et al. Acta Biomater 8:1190, 2012)。ST-2 細胞の 1 日までの培養では OCP の含有量によらず播種細胞の 60-70%程度の接着が確認された (Handa T et al. Acta Biomater 8:1190, 2012)。以上より、結晶の分散性が及ぼす効果が示唆された。

3-5. 今後の展望

本研究において人工合成ミネラル存在下における硬組織由来細胞の三次元的な培養環境の影響が明らかとなった。平面培養においてもミネラル成分が硬組織由来細胞の活性に影響を与えるが、三次元的に培養された場合、リン酸カルシウムが存在することでその活性はさらに高くなること、また、リン酸カルシウム周囲のマトリクス材料の変形量が細胞の分化に影響を及ぼし、適度な力学刺激が必要であることが示唆された。本研究で得られたミネラル成分を含有する三次元的な硬組織由来細胞の組織体を用いて、今後細胞の硬さといった物理的な因子も検討していくことで生体組織との関連性がより詳細に明らかにされると考えられる。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計20 件)

- [1] Kamoya T, Anada T, Shiwaku Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O. An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. Sens Actuators B : Chem 232:75-83, 2016. 査読有.
DOI:10.1016/j.snb.2016.03.107
- [2] Anada T, Sato T, Kamoya T, Shiwaku Y, Tsuchiya K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Suzuki O. Evaluation of bioactivity of octacalcium phosphate using osteoblastic cell aggregates in a spheroid culture device. Regenerative Therapy 3:58-62, 2016. 査読有.
DOI:10.1016/j.reth.2016.02.004
- [3] Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y. Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM-EDX spectroscopy, XRD, and FTIR spectroscopy. J Bone Miner Metab 34:41-50, 2016. 査読有.
DOI:10.1007/s00774-014-0647-x
- [4] Endo K, Anada T, Yamada M, Seki M, Sasaki K, Suzuki O. Enhancement of osteoblastic differentiation in alginate gel beads with bioactive octacalcium phosphate particles. Biomed Mater 10:65019, 2015. 査読有.
DOI:10.1088/1748-6041/10/6/065019
- [5] Yamada M, Anada T, Masuda T, Takano-Yamamoto T, Suzuki O. Effect of mechanical stress on differentiation of mouse mesenchymal stem cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold. Sens Actuators B Chem 220:125-130, 2015. 査読有.

DOI:10.1016/j.snb.2015.05.073

- [6] Itoigawa Y, Suzuki O, Sano H, Anada T, Handa T, Hatta T, Kuwahara Y, Takahashi A, Ezoe Y, Kaneko K, Itoi E. The role of an octacalcium phosphate in the re-formation of infraspinatus tendon insertion. *J Shoulder Elbow Surg* 24:e175-e184, 2015. 査読有.
DOI:10.1016/j.jse.2015.01.011
- [7] Miyazaki T, Miyauchi S, Anada T, Tawada A, Suzuki O. Chondroitin sulfate-E binds to both osteoactivin and integrin $\alpha V \beta 3$ and inhibits osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 116:2247-2257, 2015. 査読有
DOI:10.1002/jcb.25175
- [8] Hoshi K, Kawaki H, Takahashi I, Takeshita N, Seiryu M, Murshid SA, Masuda T, Anada T, Kato R, Kitaura H, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway. *J Bone Miner Res* 29:1244-1257, 2014. 査読有.
DOI:10.1002/jbmr.2115
- [9] Suzuki K, Anada T, Miyazaki T, Miyatake N, Honda Y, Kishimoto K N, Hosaka M, Imaizumi H, Itoi E, Suzuki O. Effect of addition of hyaluronic acids on osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate. *Acta Biomater* 10:531-543, 2014. 査読有.
DOI:10.1016/j.actbio.2013.09.005
- [10] Kobayashi K, Anada T, Handa T, Kanda N, Yoshinari M, Takahashi T, Suzuki O. Osteoconductive property of a mechanical mixture of octacalcium phosphate and amorphous calcium phosphate. *ACS Appl Mater Interfaces* 6:22602-22611, 2014. 査読有.
DOI:10.1021/am5067139
- [11] Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Hiura F, Anada T, Suzuki O, Kamiyo R. Octacalcium phosphate suppresses chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Cell Tissue Res* 352:401-412, 2013. 査読有.
DOI: 10.1007/s00441-012-1548-8.
- [12] Anada T, Suzuki O. Size Regulation of Chondrocyte Spheroids Using a PDMS-based Cell Culture Chip. *J Robot Mechatron* 25:644-649, 2013. 査読有.
DOI:10.20965/jrm.2013.p0644
- [13] Wang X, Suzawa T, Miyauchi T, Zhao B, Yasuhara R, Anada T, Nakamura N, Suzuki O, Kamiyo R. Synthetic octacalcium phosphate enhanced reparative dentin formation via induction of odontoblast differentiation. *J Tissue Eng Regen Med* 9:1310-1320, 2013. 査読有.
DOI:10.1002/term.1669.
- [14] Tanuma Y, Anada T, Honda Y, Kawai T, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. Granule size-dependent bone regenerative capacity of octacalcium phosphate in collagen matrix. *Tissue Eng Part A* 18:546-557, 2012. 査読有.
DOI:10.1089/ten.TEA.2011.0349
- [15] Handa T, Anada T, Honda Y, Yamazaki H, Kobayashi K, Kanda N, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. The effect of an octacalcium phosphate co-precipitated gelatin composite. *Acta Biomater* 8:1190-1200, 2012. 査読有.
DOI:10.1016/j.actbio.2011.12.002
- [16] Anada T, Fukuda J, Sai Y, Suzuki O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* 33:8430-8441, 2012. 査読有.

DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.08.040

- [17] Masuda T, Takei N, Nakano T, Anada T, Suzuki O, Arai F. A microfabricated platform to form three-dimensional toroidal multicellular aggregate. *Biomed Microdevices* 14:1085-1093, 2012. 査読有.
DOI:10.1007/s10544-012-9713-0
- [18] Morimoto S, Anada T, Honda Y, Suzuki O. Comparative study on in vitro biocompatibility of synthetic octacalcium phosphate and calcium phosphate ceramics used clinically. *Biomed Mater* 7:024020(1-8), 2012. 査読有
DOI:10.1088/1748-6041/7/4/045020
- [19] Kawai T, Anada T, Masuda T, Honda Y, Sakai Y, Kato Y, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. The effect of synthetic octacalcium phosphate in a collagen scaffold on the osteogenicity of mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 22: 124-136, 2011. 査読有.
<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol022/vol022a10.php>
- [20] Honda Y, Anada T, Morimoto S, Shiwaku Y, Suzuki O. Effect of Zn²⁺ on the physicochemical characteristics of octacalcium phosphate and its hydrolysis into apatitic phases. *Cryst Growth Des* 11: 1462-1468, 2011. 査読有.
DOI:10.1021/cg1009835

(2) 学会発表 (計18 件)

- [1] 佐藤智哉、穴田貴久、加茂谷拓央、塩飽由香利、山本照子、佐々木啓一、鈴木治. マウス間葉系幹細胞による三次元細胞組織体形成に及ぼすリン酸カルシウムの影響. 第15回日本再生医療学会総会. 2016年3月17日～19日. 大阪
- [2] 只木麻衣、穴田貴久、塩飽由香利、福本敏、鈴木治. 三次元培養の歯原性上皮細胞分化への効果. 第15回日本再生医療学会総会. 2016年3月17日～19日. 大阪
- [3] Yamada M, Anada T, Masuda T, Takano-Yamamoto T, Suzuki O. Regulatory effect of cyclic mechanical loading on osteoblast-like cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold. *PFAM24*. Dec 19, 2015, Osaka
- [4] Masuda T, Maruyama H, Anada T, Arai F, Fukuda T, Suzuki O. Local pH measurements for calcium phosphate biomaterials. *PFAM24*. Dec19, 2015, Osaka,
- [5] 加茂谷拓央、穴田貴久、塩飽由香利、山本照子、鈴木治. MSCスフェロイドの三次元培養における酸素供給の影響. 第37回日本バイオマテリアル学会. 2015年11月9日～10日. 京都
- [6] 加茂谷拓央、穴田貴久、山本照子、鈴木治. 酸素供給型スフェロイドデバイスによるMSCの分化制御. 超高速バイオアセンブラ第4回若手シンポジウム. 2015年7月3日. 大阪
- [7] Suzuki O, Anada T. Role of calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. *E-MRS Spring Meeting Lille 2015*. May 12 2015, France
- [8] 石河理紗、穴田貴久、佐々木啓一、鈴木治. リン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体による骨再生能と再生骨の骨質に関する検討. 第14回日本再生医療学会総会. 2015年3月19日～21日, 横浜
- [9] Endo K, Anada T, Yamada M, Seki M, Sasaki K, Suzuki O. In vitro assessment of osteoblastic differentiation of encapsulated stromal cells in alginate/octacalcium phosphate. *25th International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2014)*. 2014年11月9日～12日, Nagoya.
- [10] 穴田貴久, 加茂谷拓央, 山本照子, 鈴木治. 細胞組織体の低酸素化を抑制する酸素供給型培養デバイスの開発. 第64回日本歯科理工学会学術講演会. 2014年10月4日～5日, 広島

- [11] 穴田貴久, 加茂谷拓央, 鈴木治. 培養装置開発と三次元化細胞の解析. 日本機械学会 第26回バイオエンジニアリング講演会 (招待講演). 2014年1月11日～12日, 仙台
- [12] 穴田貴久, 鈴木治. 細胞組織体の内部低酸化を抑制する培養デバイスの開発. 第11回がんとハイポキシア研究会. 2013年12月13日～14日, 仙台
- [13] Endo K, Anada T, Yamada M, Seki M, Sasaki K, Suzuki O. Cell encapsulation into alginate/octacalcium phosphate hydrogel beads for bone regenerative therapy. 24th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. 2013年11月11日～13日, Nagoya
- [14] Suzuki O, Anada T. Synthetic octacalcium phosphate: A possible carrier for mesenchymal stem cells in bone regeneration. IEEE-EMBC (EMBC' 13). 2013年7月4日, Osaka.
- [15] 穴田貴久, 鈴木治. 細胞アセンブリとバイオマテリアル. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012—シンポジウム“超高速バイオアセンブラ”—. 2012年11月26日, 仙台
- [16] Nishikawa R, Anada T, Suzuki O. Signal passway analysis with differentiation markers in osteoblasts stimulated by synthetic analog to bone mineral. The 23rd Annual Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS). 2012年11月6日～7日, Nagoya
- [17] 益田泰輔, 佐藤康平, 大脇浩史, 穴田貴久, 鈴木治, 新井史人. 骨形成材料固定化培養チップを用いたバイオミネラルリゼーション制御. 第30回日本ロボット学会学術講演会. 2012年9月17日～20日, 札幌
- [18] 鈴木治. 硬組織形成細胞の活性を制御するミネラル結晶. 第2回バイオアセンブラ公開シンポジウム. 2012年3月8日, 仙台

(3) 図書 (計6 件)

- [1] Suzuki O, Anada T. Springer. Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems. Chapter 16: Bone related cell-stimulating scaffold materials and a 3D cellular construct for hard tissue regeneration. 2015. 349 (261-273)
- [2] 鈴木治. 日本金属学会 (編). バイオマテリアル研究の最前線 「OCP析出ゼラチン複合体によるラット頭蓋冠臨界径 骨欠損の修復—OCP析出ゼラチン複合体による骨欠損の修復法—」. 2014. 250 (127-128)
- [3] 穴田貴久, 福田淳二, 鈴木治. エヌ・ティー・エス. 酸素透過性三次元細胞培養デバイスの開発「三次元ティッシュエンジニアリング—細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで」. 2014. 346 (213-218)
- [4] 鈴木治 ほか. 日本医学館. 溶解性医療用セラミックス材料—リン酸八カルシウム—「未来型人工関節を目指して」. 2013. 416 (233-237)
- [5] 鈴木治. 日本医学館. バイオマテリアル—生体材料 30-4, 「アパタイト前駆体の結晶化プロセスと生体反応: 化学研究の進歩とバイオマテリアルへの応用」 2012. 222-225
- [6] Suzuki O, Anada T. Springer, Tokyo. Interface Oral Health Science 2011. Edits: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N. Highly biodegradable bone substitute materials with OCP. 2012. 321-326.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計3 件)

名称：骨再生材料

発明者：鈴木治、佐々木啓一、穴田貴久、石河理沙

権利者：東北大学

種類：特許

番号：特願2013-249675

出願年月日：2013年12月2日

国内外の別：国内

名称：骨再生材料

発明者：鈴木治、井樋栄二、鈴木堅太郎、穴田貴久、今泉秀樹、宮武尚央

権利者：東北大学

種類：特許

番号：特願2013-188769

出願年月日：2013年9月11日

国内外の別：国内

名称：骨接合部再生材料

発明者：鈴木治、井樋栄二、糸魚川善昭、佐野博高、高橋敦、穴田貴久

権利者：東北大学

種類：特許

番号：特願2013-188775

出願年月日：2013年9月11日

国内外の別：国内

名称：骨再生材料

発明者：鈴木治、穴田貴久、塩飽由香利、本田義知、佐々木啓一、森元慎二

権利者：東北大学、ニプロ（株）

種類：特許

番号：特願2012-186995

出願年月日：2012年8月27日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：骨再生材料

発明者：鈴木治、穴田貴久、本田義知、三浦桂一郎、森元慎二

権利者：東北大学、ニプロ（株）

種類：特許

番号：特許第5881206

取得年月日：2016年2月12日

国内外の別：国内

公募研究 A01

課題番号：24106501

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：原子間力顕微鏡による超高速細胞レオロジー分離技術の開発

1. 研究組織

(1) 研究代表者

岡嶋孝治 (Okajima, Takaharu) 北海道大学・情報科学研究科・教授

(2) 連携研究者

末岡和久 (Sueoka, Kazuhisa) 北海道大学・情報科学研究科・教授 平成26年度～平成27年度

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

細胞システムを構築するためには、細胞システム構築に有用な膨大な数の細胞素単位を計測し、評価する必要がある。本研究では、そのような細胞素単位を力学的・統計的に分離する超高速 AFM 細胞粘弾性（レオロジー）計測技術を開発した。倒立型光学顕微鏡および正立型光学顕微鏡に搭載した原子間力顕微鏡および FPGA 用いた計測システムのプロトタイプを作製し、細胞種の異なる細胞レオロジーの差異を精密に計測するために、異なる種類の細胞マイクロパターン基板を作製した。そして、細胞レオロジーの細胞数分布の定量化を実現した。そして、細胞レオロジー測定的高速化を実現し、細胞レオロジーと細胞内骨格構造との関係を調べた。イオンコンダクタンス顕微鏡は、AFM よりもさらに低侵襲なナノ計測が可能である。イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた細胞表面ダイナミクス測定の新手法を提案した。本手法は、細胞力学物性選別用の力学マーカーとして使用できる可能性がある。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計3件)

[1] P.G. Cai, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, J. M. Maloney, B. Fabry, K. J. Van Vliet, T. Okajima*, Quantifying Cell-to-Cell Variation in Power-Law Rheology, Biophysical Journal 105 (2013) 1093-1102.

- [2] Y. Mizutani, M.-H. Choi, S.-J. Cho, T. Okajima*, Nanoscale fluctuations on epithelial cell surfaces investigated by scanning ion conductance microscopy, Applied Physics Letters 102 (2013) 173703 (4pages)
- [3] R. Takahashi, S. Ichikawa, A. Subagyo, K. Sueoka, and T. Okajima*, Atomic force microscopy measurements of mechanical properties of single cells patterned by microcontact printing, Advanced Robotics 28, 449-455 (2014)
- (2) 学会発表 (計16 件)
- [1] 岡嶋孝治, 単一細胞・細胞集団のメカニクス, 第10回バイオオプティクス研究会 (2013. 12. 6-7, 東京) (招待講演)
- [2] 岡嶋孝治, 走査プローブ顕微鏡による細胞力学物性解析, 日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム (2013. 11. 15-16, 名古屋) (招待講演)
- [3] Takaharu Okajima*, Quantifying spatial and temporal variation in cell mechanics by scanning probe microscopy (Invited), 12th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-12)/21st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM21) (2013. 11. 4-8, Tsukuba) (招待講演)
- [4] Y. Mizutani, Z. Ishikura, K. Shigetomi-Kuribayashi, M.H. Choi, S.J. Cho, T. Okajima*, Apical cell shape fluctuations quantified by scanning ion conductance microscopy (Invited), International Symposium on Morphological Sciences (XXIII ISMS 2013) (2013. 9. 10-13, Niigata)
- [5] Z. Ishikura*, K. Kuribayashi-Shigetomi, Y. Mizutani, Y. Fujii, M.-H. Choi, S.-J. Cho, T. Okajima, Spatial dependence of membrane fluctuations of cells on micro-patterned substrates measured by scanning ion conductance microscopy, 12th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-12)/21st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM21) (2013. 11. 4-8, Tsukuba)
- [6] Yuki Ochi*, Masahiro Tsuchiya, Yuki Saito, Takaharu Okajima, Development of an atomic force microscope for measuring mechanical properties of cell population, 24th 2013 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (2013. 11. 11-13, Nagoya)
- [7] Ryosuke Takahashi*, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Masahiro Tsuchiya, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka, Takaharu Okajima, High-throughput Measurements of Cell Mechanics Using Atomic Force Microscopy with Micro-patterned Substrates, 24th 2013 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (2013. 11. 11-13, Nagoya)
- [8] 市川諭、高橋亮輔、岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による単細胞レオロジーの定量マッピング測定, (第60回応用物理学会春季学術講演会、神奈川, 2013. 3. 27-30)
- [9] 水谷祐輔、石倉禪、Myung-Hoon Choi、Sang-Joon Cho、岡嶋孝治, イオンコンダクタンス顕微鏡による細胞膜揺らぎの定量評価, (第60回応用物理学会春季学術講演会、神奈川, 2013. 3. 27-30)
- [10] Y. Mizutani, Z. Ishikura, M.-H. Choi, S.-J. Cho, T. Okajima, Nanoscale cell membrane fluctuations measured by scanning ion conductance microscopy, (Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013. 2. 1-7, Philadelphia)
- [11] R. Mizuto, Y. Sakai, R. Takahashi, T. Okajima, Cell cycle dependence of cell mechanics investigated by traction force microscopy, (25th Annual and International Meeting of the

Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), 2012.11.27-30)

- [12]水谷祐輔、市川諭、石倉禪、岡嶋孝治、イオンコンダクタンス顕微鏡による細胞膜揺らぎの測定、第50回日本生物物理学会年会 (2012.9.22-24、名古屋)
- [13]土屋雅博、水谷祐輔、岡嶋孝治、細胞シート1軸延伸測定法による時間依存力学測定、第50回日本生物物理学会年会 (2012.9.22-24、名古屋)
- [14]高橋亮輔、市川諭、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡を用いた単一細胞レオロジーの高速・精密測定法の開発、第50回日本生物物理学会年会 (2012.9.22-24、名古屋)
- [15]岡嶋孝治、”原子間力顕微鏡を用いた細胞力学計測” (招待講演)、日本ロボット学会第30回記念学術講演会、バイオマニピュレーション (2012) .
- [16]T. Okajima, “Fluctuations of single cells measured by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy” (招待講演), 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop (2012)

(3) 図書 (計2 件)

- [1] 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡による細胞力学の定量計測 (解説)、検査技術 4, 2-6(2014)
- [2] 岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による細胞レオロジー測定、膜、38、(2013)76-81

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A01

課題番号：24106509

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：細胞アクティブセンシングのための実時間マイクロPIVシステム

1. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 抱 (Ishii, Idaku) 広島大学・工学研究院・教授

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	2,900,000	870,000	3,770,000
平成25年度	2,900,000	870,000	3,770,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	5,800,000	1,740,000	7,540,000

3. 研究成果

A) 可変フレームストラドリング時間制御に基づくオプティカルフローアルゴリズム

1) オフライン高速度カメラを用いて、マイクロ流路チップ上の様々な流速のマイクロ粒子の高フレームレート動画を撮影した。2) Lucas-Kapade 法を用いた速度解析を行い、オプティカルフローにおけるフレーム間隔と速度精度の関係を定量解析した。3) フレーム間隔を高速流れには小さく、低速流れには大きくする可変フレームストラドリング型オプティカルフロー法を提案した。

B) デュアルカメラ高速ビジョンハードウェア

1) 2台のカメラ乳よ r 丸を持つ高速ビジョンハードウェアに対し、フレームストラドリング時間をマイクロ秒以下で制御可能となるように回路改良を行った。2) 高速ビジョンと GPU コンピュータと運動させ、2台のカメラ入力に対し 512×512 画像に対し 1000fps 実時間処理を可能とした。3) オプティカルフロー法を高速ビジョンに実装し、マイクロ秒以下のフレームストラドリング時間を持つ画像対に対する実時間計算が可能なことを確認した

C) オプティカルフロー法を実装した実時間マイクロ PIV システム

1) 2台の小型高速カメラヘッドを導入し、光学式顕微鏡のカメラポートに接続し、基本的動作を確認した。2) 2台のカメラ入力が同一視野及び輝度となるように、アフィンワーピング補間による幾何補正及び輝度 LUT による輝度補正を行った。3) マイクロ流量チップ上の流れに対し、実時間で高速な流れ分布が計測可能なことを確認した。4) 流路径(100um 前後)と同レベルのトレーサ粒子や細胞を流し、粒子位置・形状が実時間計測できることを確認した。

D) 細胞アクティブセンシングのための実時間マイクロ流量制御

1) 流量制御用アクチュエータのフィードフォワード制御時における制御目標値と実時間マイクロ PIV

システムにより計測された流路内の流れ分布を比較した。2) 計測された流れ分布に基づき、実時間流量フィードバック制御を行った場合の流れの計測精度及び時間応答性を評価した。

E) 高速搬送される細胞に対するマイクロ流路ベースドアクティブセンシング

1) 径 100 μ m 前後のウニ卵細胞をマイクロ流路に流した場合に流れ分布と細胞位置・形状が同時計測できることを流速 1m/s を超える場合でも確認した。2) ブラン固定したウニ卵細胞と通常のウニ卵細胞をマイクロ流路内に流した場合、細胞の硬さにより、流速に比例した形で円形度に基づく画像特徴量に違いがあり、これらの情報を実時間判別できることを確認した。3) 産卵後の時間経過とともに細胞の硬さが徐々に柔らかくなることを定量的に計測できることを確認した。

F) 高速搬送される細胞に対する瞬時細胞プロブ解析

1) B) のシステムに細胞の大きさ、透明度、円形度を瞬時に計算可能とする画像処理機能をハードウェア実装した。2) 受精しウニ卵細胞の成長の時間遷移を統計的かつ実時間解析できることを確認し、セルソーティングに向けた瞬時細胞プロブ解析を 2000fps 以上の速度で実現した。3) 構築したシステムの最終的な性能評価を行い、バイオアセンブリのハイスループット化に向けた細胞アクティブセンシングの応用展開について検討した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計5 件)

- [1] Lei Chen, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii, Accuracy of Gradient-Based Optical Flow Estimation in High-Frame-Rate Video Analysis, IEICE Transactions on Information and Systems Vol.E95-D, No. 4, pp.1130-1141 (2012)
- [2] Lei Chen, Hua Yang, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii, Real-Time Optical Flow Estimation Using Multiple Frame-Straddling Intervals, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.24, No.4, pp.686-698 (2012)
- [3] Qingyi Gu, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii: Fast FPGA-Based Multi-Object Feature Extraction, IEEE Transactions on Circuits and Systems for Video Technology, Vol.23, No.1, pp.30-45 (2013)
- [4] Motofumi Kobatake, Tadayoshi Aoyama, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii, A Real-Time Microscopic PIV System Using Frame Straddling High-Frame-Rate Vision, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.25, No. 4, pp.586-595 (2013)
- [5] Qingyi Gu, Tadayoshi Aoyama, Takeshi Takaki, Idaku Ishii, Simultaneous Vision-Based Shape and Motion Analysis of Cells Fast-Flowing in a Microchannel, IEEE Transactions on Automation Science and Engineering, Vol.12, No. 1, pp.204-215 (2015)

(2) 学会発表 (計5 件)

- [1] Qingyi Gu, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii, 2000-fps Multi-Object Tracking Based on Color Histogram, SPIE Photonics Europe / Real-Time Image and Video Processing, Belgique, 2012.5.3.
- [2] Motofumi Kobatake, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii, A Real-Time Micro-PIV System Using Frame-Straddling High-Speed Vision, IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation, USA, 2012.5.15.
- [3] 小島基文, 高木健, 石井抱, V字マイクロ流路における流れ分布の実時間計測, 日本機械学会 ROBOMECH 講演会, 浜松, 2012.5.28.
- [4] Qingyi Gu, Tadayoshi Aoyama, Takeshi Takaki, and Idaku Ishii, Fast Tracking System for

Multi-colored Pie-Shaped Markers, Int. Symp. Optomechatronic Technologies, France, 2012. 10. 30.

- [5] 小島基文, 中村尚喜, 青山忠義, 高木健, 石井抱, フルピクセルマイクロ PIV システムを用いた毛細血管レベルマイクロチャンネルの実時間流れ解析, 第 19 回ロボティクスシンポジウム, 2013. 3. 13.

(3) 図書 (計1 件)

- [1] Idaku Ishii and Tadayoshi Aoyama, Real-time Capillary-level Microchannel Flow Analysis Using a Full-pixel Frame-straddling Micro-PIV System, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems (T. Arai, F. Arai and M. Yamato eds.), pp.43-55, Springer (2015)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A01

課題番号：24106511

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題名：超高速細胞配列化と高スループット細胞分化スクリーニング

1. 研究組織

(1) 研究代表者

安川 智之 (Yasukawa, Tomoyuki) 兵庫県立大学・物質理学研究科・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

本研究では、抗体を固定化したITO製の交互くし型マイクロバンドアレイ (IDA) 電極とITO電極を組み合わせたマイクロ流路型の誘電泳動デバイスを作製し、極めて迅速 (90秒) で簡便 (蛍光ラベル化が不要でスイッチを押すだけ) な細胞膜表面に発現する抗原の表現型 (フェノタイプ) の解析手法の開発を行った。

上下基板のITO電極に負の誘電泳動 (n-DEP) の作用する周波数領域 (100kHz) の交流電圧を印加すると、細胞は瞬時 (数秒) にIDA電極のバンド電極間ギャップへと移動し配列した。ここで、下面バンド電極の片側 (バンドB) の電圧をゼロにすると、ギャップ間に集積されていた細胞はバンドB上へと移動する。これは、マイクロ流路内に形成される電場強度パターンが変換されるためである。電極間ギャップに抗CD33抗体を固定化した場合には、HL-60細胞に発現したCD33抗原との免疫反応により不可逆に捕捉されるため、バンドB上へと移動する細胞数が減少した。これにより、表面に特定の抗原を発現した細胞の識別が可能となった。また、発現細胞と非発現細胞の混合懸濁液を用いると、発現細胞の存在比率の向上に伴って、細胞捕捉率が直線的に増加することを示した。すなわち、細胞母集団の中の特定抗原発現細胞の存在比を迅速で簡便に調査可能であった。さらに、捕捉細胞の免疫反応時に細胞をスウィングさせる手法を組み込むと表面抗原と固定化抗体の接触確率の増加により、細胞の捕捉率が88%と格段に向上した。

この手法を細胞の分化進行度の調査に応用した。レチノイン酸による処理で分化が誘発されるHL-60細胞のCD13抗原のダウンレギュレーションおよびCD11b抗原のアップレギュレーションについて調査を行ったところ、レチノイン酸処理日数に伴って、CD13発現細胞の減少とCD11b発現細胞の増加が観測された。これは、蛍光染色法により得られた発現細胞評価と同様の結果が得られており、本手法の簡便性と迅速性を立証した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計12 件)

- [1] Tomoyuki Yasukawa, Junko Yamada, Hitoshi Shiku, Fumio Mizutani, Tomokazu Matsue, Negative Dielectrophoretic particle positioning in a fluidic flow, *Intelligent Automation and Soft Computing*, Vol. 18 pp. 201-211, 2012.
- [2] Tomoyuki Yasukawa, Yoshimi Yoshimoto, Takuya Goto, Fumio Mizutani, Highly-sensitive electrochemical immunosensing method based on dual amplification systems, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 37, pp. 19-23, 2012.
- [3] Masashi Yamamoto, Tomoyuki Yasukawa, Masato Suzuki, Satoshi Kosuge, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Fumio Mizutani, Patterning with Particles Using Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes with Negative Dielectrophoresis and Its Application to Simple Immunosensing, *Electrochim. Acta*, Vol. 82, pp. 35-42, 2012.
- [4] Yuya Kiba, Yukako Otani, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Electrochemical detection of redox species flowing in a nitrocellulose membrane and application to quantitative immunochromatography, *Electrochim. Acta*, Vol. 81, pp. 14-19, 2012.
- [5] Tomoyuki Yasukawa, Hironobu Hatanaka, Fumio Mizutani, Simple detection of surface antigens on living cells by applying distinct cell positioning with negative dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, Vol. 84 No. 20, pp. 8830-8836, 2012.
- [6] Tomoyuki Yasukawa, Junko Yamada, Hitoshi Shiku, Fumio Mizutani, Tomokazu Matsue, Positioning of cells flowing in a fluidic channel by negative dielectrophoresis, *Sens., Actuator. B*, Vol. 186, pp. 9-16, 2013.
- [7] Tomoyuki Yasukawa, Yusuke Yoshida, Hironobu Hatanaka, Fumio Mizutani, Line patterning with microparticles at different positions in a single device based on negative dielectrophoresis, *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol. 25 No. 4, pp. 650-656, 2013.
- [8] Satoshi Arimoto, Akihito Kamei, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Toshihiko Yoshioka, Development of highly sensitive electrochemical measurement on dry chemistry measuring electrode potential shift, *Electrochim. Acta*, Vol. 108, pp. 776- 780, 2013.
- [9] Tomoyuki Yasukawa, Masahiro Koide, Norihisa Tatarazako, Ryoko Abe, Hitoshi Shiku, Fumio Mizutani, Tomokazu Matsue, Detection of the oxygen consumption rate of migrating zebrafish by electrochemical equalization systems, *Anal. Chem.*, Vol. 86 No. 1, pp. 304-307, 2014.

などその他含め計12件

(2) 学会発表 (計46 件)

- [1] Tomoyuki Yasukawa, Yuya Yamashita, Daichi Nakayama, Seiichiro Iijima, Fumio Mizutani, Detection of DNA Sequence Based on Proton Reduction Catalyzed by Deposition of Platinum-Complexes, 14th International Meeting on Chemical Sensors, 2.2 Biosensors II (DNA, SPR), Germany, 2012.
- [2] 古谷美紗, 安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動を利用した迅速な免疫アッセイの初期微粒子濃度依存性, 第25回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 熊本, 2012.
- [3] Tomoyuki Yasukawa, Takuya Goyo, Yoshimi Yoshimoto, Fumio Mizutani, Highly-Sensitive Immunosensing Method Based on Dual Amplification Systems, 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Symposium, Czech Republic, 2012.

- [4] T. Yasukawa, H. Hatanaka, F. Mizutani, Rapid and simple discrimination of cell surface antigen based on dielectrophoretic manipulation, IUMRS-International Conference on Electronic Materials (IUMRS-ICEM 2012), Yokohama, Japan, 2012.
- [5] Misa Furutani, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Development of rapid and simple biosensing system based on dielectrophoretic particle manipulation, RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference, Chiba, Japan, 2012.
- [6] Tomoyuki Yasukawa, Hironobu Hatanaka, Fumio Mizutani, Rapid and Simple Discrimination of Cells with Specific Surface Antigen with Dielectrophoresis, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Okinawa, 2012.
- [7] T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, F. Mizutani, Rapid and Simple Immunoassay Based on Negative Dielectrophoresis with Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes, 222nd ECS Meeting, The electrochemical Society of Japan - 2012 Fall Meeting, USA, 2012.
- [8] T. Yasukawa, H. Hatanaka, F. Mizutani, Rapid pattern switching of cellular arrays with dielectrophoresis to discriminate surface antigen, MHS2012, Nagoya, Japan, 2012.
- [9] 守島麻, 安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動による迅速な細胞配列化法の開発, 第2回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 東京都, 2013.
- [10] 水口悠暉, 安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動による表面抗原発現細胞の捕捉技術を利用した細胞分化の評価, 第2回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 東京都, 2013.
- [11] 北東俊輝, 安川智之, 水谷文雄, 電気化学多点計測システムを用いた固定化酵素活性イメージング, 第2回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 東京都, 2013.
- [12] Yuki Yoshimura, Tomoyuki Yasukawa, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Development of microhole array with two different cells based on dielectrophoresis, JAIMA Discussion on Analytical Science and Technology, Chiba, 2013.
- [13] 安川智之, 迅速, 簡便, 高感度なバイオセンシングシステムの構築, 2013年電気化学秋季大会, 東京都, 2013.
- [14] Takuma Horii, Tomoyuki yasukawa, Fumio Mizutani, Dielectrophoretic formation of cell-particle complexes based on immunoreactions, MHS2013, Nagoya, Japan, 2013.
- [15] Tomoyuki Yasukawa, Manipulation of particles and cells with dielectrophoresis for simple and rapid analysis, 10th Asian Conference on Chemical Sectors (ACCS2013), Thailand, 2013.
- [16] Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Biosensors based on the manipulation of particles and cells with dielectrophoresis, International Conference on Surface Engineering (ICSE2013), Korea, 2013.
- [17] Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Rapid and simple discrimination of cells with specific surface antigen based on dielectrophoresis, C&FC 2013 Pre-Symposium in Himeji, Himeji, Japan, 2013.
- [18] Tomoyuki Yasukawa, Yuki Minakuchi, Hironobu Hatanaka, Fumio Mizutani, Discrimination of Cells with Specific Surface Antigens Based on Negative Dielectrophoretic Cell Positioning, 15th International Meeting on Chemical Sensors, Argentina, 2014.
- [19] Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Simple and rapid sensing of surface antigen based on dielectrophoresis, 日本化学会第94春季年会, 愛知県, 2014.
- [20] 安川智之, 誘電泳動による細胞パターンニングとセンシングへの応用, 電気化学会第81回大会, 大阪府, 2014.

などその他含め計46件

(3) 図書 (計1 件)

[1] Javier Ramón-Azcón, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Biosensors and Environment Health, Detection of Pesticide Residues using Biosensors, CRC press, 21-40 (2012).

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計1 件)

名称：誘電泳動を利用する細胞識別方法

発明者：安川智之，畠中啓伸，水谷文雄

権利者：兵庫県

種類：特許

番号：特願2012-111134

出願年月日：2012年5月15日

国内外の別：国内

公募研究 A01

課題番号：26106701

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：原子間力顕微鏡による生体組織力学物性のその場分離計測技術の開発

2. 研究組織

(1) 研究代表者

岡嶋孝治 (Okajima, Takaharu) 北海道大学・情報科学研究科・教授

(2) 連携研究者

末岡和久 (Sueoka, Kazuhisa) 北海道大学・情報科学研究科・教授 平成26年度～平成27年度

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

バイオアセンブラにおいて、細胞システム構築に有用な細胞を分離するためには、生体組織の力学物性をダイレクトに計測する細胞分離技術が強く望まれる。本研究期間において、原子間力顕微鏡やイオンコンダクタンス顕微鏡を用いて、生体組織の力学物性とダイナミクスを低侵襲で計測することに成功した。上皮細胞シートは、アンジャミングからジャミングの構造転移を起こすことが知られており、ジャミング状態の力学特性の空間分布を決定した。この力学物性の理解は再生医療用細胞シートの評価に重要である。また、細胞分裂が著しく起こる発生過程の組織の直接計測、およびマウス胎児から摘出した培養組織の力学物性のマッピング測定に成功した。これらの結果は、バイオアセンブルした組織の力学物性評価に利用できる。さらに、単一細胞レオロジー計測法に関して、計測精度の評価を行った。また、原子間力顕微鏡による細胞レオロジー測定の高速計測法を開発した。これらの結果は、バイオアセンブル用の個々の細胞の力学的細胞選別技術として利用できる。

3. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計4 件)

- [1] R. Takahashi, T. Okajima*, Comparison between power-law rheological parameters of living cells in frequency and time domains measured by atomic force microscopy. Japanese Journal of Applied Physics 55, 08NB22 (2016)
- [2] R. Takahashi, T. Okajima*, Mapping power-law rheology of living cells using multi-frequency force modulation atomic force microscopy, Applied Physics Letters 107, 173702 (2015).
- [3] P.G. Cai, T. Okajima*, Precision of cell-to-cell variation in power-law rheology characterized by atomic force microscopy, Japanese Journal of Applied Physics 54, 037001(2015)
- [4] M. Kajita, K. Sugimura, A. Ohoka, J. Burden, H. Suganuma, M. Ikegawa, T. Shimada, T. Kitamura, M. Shindoh, S. Ishikawa, S. Yamamoto, S. Saitoh, Y. Yako, R. Takahashi, T. Okajima, J. Kikuta, Y. Maijima, M. Ishii, M. Tada, and Y. Fujita*, Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells, Nature Communications 5, 4428 (2014)

(2) 学会発表 (計14 件)

- [1] 岡嶋孝治、原子間力顕微鏡：細胞力学特性の個性を測る（第53回生物物理学会（細胞を診て操作する生物物理的アプローチ）、2015年9月15日、金沢（招待講演）
- [2] Y. Fujii*, W. Koizumi, K. Hotta, K. Oka, T. Okajima, Quantifying local elastic modulus of living embryo by atomic force microscopy(23rd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM23), Dec. 10-12, 2015, Niseko)
- [3] R. Takahashi*, T. Okajima, Multi-frequency force modulation atomic force microscopy: Simultaneous measurements of living cells in frequency and time domains (23rd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM23), Dec. 10-12, 2015, Niseko)
- [4] Ryosuke Tanaka*, Takaharu Okajima, Mechanical Measurements of in vitro Tissue by Atomic Force Microscopy (26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nov. 23-25, 2015 Nagoya)
- [5] 田中良昌*, 秋山義勝、小林純、大和雅之、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による肝細胞共培養系の力学特性解析（第53回生物物理学会、2015年9月13日～9月15日、金沢）
- [6] 藤井裕紀*、小泉航、堀田耕司、岡浩太郎、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡によるホヤ初期発生胚の弾性率の時空間測定（第53回生物物理学会、2015年9月13日～9月15日、金沢）
- [7] 澤野麻紀*、繁富（栗林）香織、朱鑫峰、高橋亮輔、スバギョ・アグス、末岡和久、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による力学的単一細胞診断：細胞力学量のばらつきの空間依存性（第53回生物物理学会、2015年9月13日～9月15日、金沢）
- [8] 中島優*、中村光宏、武田宏明、松本卓也、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡によるマウス顎下腺組織の弾性率マッピング（第53回生物物理学会、2015年9月13日～9月15日、金沢）
- [9] 何 倩*、岡嶋 孝治、繁富（栗林）香織、細胞折紙：3次元共培養システムの構築（第53回生物物理学会、2015年9月13日～9月15日、金沢）
- [10] Yuki Fujii*, Wataru Koizumi, Koji Hotta and Takaharu Okajima, Spatial-Temporal Oscillation in Elastic Modulus of Embryo during the Early Development, International Symposium on Fluctuation and Structure Out of Equilibrium 2015 (SFS2015) (H25.8.21-23, Kyoto)

- [11]大西恒太*, 土屋雅博, 岡嶋孝治、細胞シートの延伸による細胞核の形状変化 (第 67 回細胞生物学会、2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日、船堀)
- [12]藤井裕紀*, 越智勇貴, 梶田美穂子, 藤田恭之, 岡嶋孝治、単層上皮細胞における細胞弾性率の空間不均一構造 (第 67 回細胞生物学会、2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日、船堀)
- [13]澤野麻紀*, 繁富香織, 朱キン峰, 高橋亮輔, スバギョアグス, 末岡和久, 田中良昌, 岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による力学的単一細胞診断法の開発：細胞力学と細胞骨格構造の相関 (第 67 回細胞生物学会、2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日、船堀)
- [14]中島優*, 中村光宏, 武田宏明, 松本卓也, 岡嶋孝治、原子間力顕微鏡によるマウス顎下腺の弾性率測定 (第 67 回細胞生物学会、2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日、船堀)

(3) 図書 (計6 件)

- [1] 岡嶋孝治, 細胞の物理学：S PMによる定量計測、表面科学 35, 544-544(2014)
- [2] T. Okajima, Atomic Force Microscopy: Imaging and Rheology of Living Cells (Nano/Micro Science and Technology in Biorheology: Principles, Methods, and Applications Chapter 15 (387-414), Springer, 2015)
- [3] K. Kuribayashi-Shigetomi, R. Takahashi, A. Subagyo, K. Sueoka, T. Okajima, High-throughput measurements of single cell rheology by atomic force microscopy (Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Chapter 4 (57-67), Springer, 2015)
- [4] 岡嶋孝治, 原子間力顕微鏡を用いた細胞レオロジー特性の計測 (第 1 章・第 3 節)、三次元ティッシュエンジニアリング～細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで～(株式会社 NTS) (2015)
- [5] 水谷祐輔, 田中良昌, 田中あや, 住友弘二, 岡嶋孝治, イオンコンダクタンス顕微鏡：細胞膜表面の揺らぎを計測する、光学-細胞機能に迫る非染色非破壊イメージング技術、44, (6 月号) (2015)
- [6] 高橋亮輔、岡嶋孝治、原子間力顕微鏡による超高速細胞メカニクス計測技術、ケミカルエンジニアリング (先端計測技術開発の展望:9 月号) (2015)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計1 件)

名称：細胞の複素弾性率の計測方法および計測システム

発明者：岡嶋孝治、高橋亮輔

権利者：国立大学法人北海道大学

種類：特許

番号：特願2014-136721

出願年月日：2014 年7 月2 日

国内外の別：国内

公募研究 A01

課題番号：26106708

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：ラベルフリー超高速幹細胞 4D センシング・マニピレーションデバイスの開発

1. 研究組織

(1) 研究代表者

武居 昌宏 (Takei, Masahiro) 千葉大学・工学研究科・教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度			
平成 24 年度			
平成 25 年度			
平成 26 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成 27 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計			

3. 研究成果

ラベルフリーで細胞 3D センシング操作を実現するために、ひとつの断面に 16 電極を 5 断面合計 80 電極を内層させた菱形のマイクロ流路を作製した。(1)細胞と流体との固液二相流状態で流路内部のインピーダンスをリアルタイムで計測することにより、細胞の電気的特性のセンシングを行った。具体的には、EIS 法を用いて、異なる体積濃度を持つ細胞懸濁液の誘電特性を計測し、Maxwell-Wagner 分散理論と細胞分極モデルを用いて、計測した誘電特性を解析した。さらに、マイクロ流路内における誘電特性を用いた細胞の空間的濃度分布計測について検討した。EIT 法を用いてマイクロ流路内における細胞濃度分布の画像化を行なった。EIS 法と EIT 法との結果を比較し、細胞の空間的濃度分布計測について検討した。この結果により、EIT 法を用いて非侵襲かつオンラインでの細胞濃度断面 3D 可視化計測が可能となった。(2)流路内部の電極に比較的周波数の高い電流を流し、誘電泳動力などによる細胞挙動の PIV 計測を行った。具体的には、3 種類の電気的特性が異なる MRC-5 Wild type、細胞核内に正電荷を有する GFP-histone 2B を大量に発現させた MRC-5 GFP-histone 2B expressing type、細胞質内に負電荷を有する GFP が発現した MRC-5 GFP expressing type を用意した。それらの 3 種類の細胞を D-PBS に懸濁し、それぞれの細胞懸濁液をマイクロ流路内に充填させ、マイクロ流路内電極へ交流電圧を印加したときの細胞挙動の PIV 計測を行った。その結果、電極近傍で 3 種類細胞の移動速度関係が明らかとなり、細胞膜内部および細胞核内部に存在する電荷を有する物質の量の違いを利用した細胞の分離技術の確立に対して可能性を見出した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計 6 件)

- [1] T. Zhao, J. Yao, K. Liu, and M. Takei, Investigation of particle inertial migration in high particle concentration suspension flow by multi-electrodes sensing (MES) and Eulerian-Lagrangian simulation in a square microchannel, *Biomicrofluidics*, AIP, Vol. 10, pp.204120 [DOI:10.1063/1.4946012] (2016)
- [2] J. Yao, H. Obara, A. Sapkota, and M. Takei, Development of Three-dimensional Integrated Microchannel-Electrode System to Understand the Particles Movement with Electrokinetics, *Biomicrofluidics*, AIP, Vol.10(2), pp.024105 (2016)
- [3] J. Yao, T. Kodera, H. Obara, M. Sugawara, and M. Takei, Spatial Concentration Distribution Analysis of Cells in Electrode-Multilayered Microchannel by Dielectric Property Measurement, *Biomicrofluidics*, AIP, Vol. 9, pp. 044129 [DOI:10.1063/1.4929824] (2015)
- [4] J. Yao, A. Sapkota, H. Konno, H. Obara, M. Sugawara, and M. Takei, Non-invasive On-line Measurement of Particle Size and Concentration in Liquid-Particle Mixture by Estimating Equivalent Circuit of Electrical Double Layer, *Particulate Science and Technology*, Taylor & Francis [DOI:10.1080/02726351.2015.1089345] (2015)
- [5] Y. Hirose, A. Sapkota, M. Sugawara and M. Takei, Noninvasive real-time 2D imaging of temperature distribution during the plastic pellet cooling process by using electrical capacitance tomography *Measurement Science and Technology*, Institute of Physics, Vol. 27, No.1 pp.015403 (2015)
- [6] Y. Hirose, K. Hata, M. Sugawara and M. Takei, Sensing Performance of Dielectric Sensor in Mixed Melting Polymer Pellets for Waste Plastic Separation, *Advanced Powder Technology*, Elsevier, Vol. 26, No. 6 pp. 1687-1695 [DOI:10.1016/j.apt.2015.10.006] (2015)

(2) 学会発表 (計5 件)

- [1] A. Sapkota, T. Fuse, O. Maruyama and M. Takei, Electrical properties of blood and their applicability in thrombosis sensing, 15th International Congress of Bioreology and 8th International Conference on Clinical Hemorheology (ISB-ISCH 2015), May 24-28, 2015, Korea University, Seoul, Korea
- [2] Jiafeng Yao, Tatsuya Kodera, Achyut Sapkota, Hiromichi Obara, Michiko Sugawara, Masahiro Takei, 3D Sensing of Dielectric Properties of Biological Cells in Multilayered Microchannel by Impedance Spectroscopy, 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2015), June 8-10, 2015, Kyoto University Japan
- [3] Ryosuke Yuichi, Jiafeng Yao, Takeomi Mizutani, Hiromichi Obara, Michiko Sugawara, Masahiro Takei, Analysis of Dynamic Cell Movement under AC Electric Field in 3D Multi-layered Microchannel, 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2015), Nov. 23 - 25, 2015, Nagoya, Japan
- [4] R. Yuchi, J. Yao, T. Mizutani, H. Obara, M. Sugawara, M. Takei, 電極積層型マイクロ流路内の交流電圧印加時における電極近傍の細胞挙動, 32th Cheminas 化学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会, 北九州国際会議場, 11月26日~27日, 2015
- [5] Y. Kishikawa, T. Takahashi, T. Zhao, J. Yao, M. Takei, EIS法を用いた攪拌条件がスラリーの混合状態に及ぼす影響の評価, 第21回流動化・粒子プロセッシングシンポジウム, 九州工業大学, 12月10日

～11日, 2015

(3) 図書 (計1 件)

- [1] 姚佳烽, 武居昌宏, (組織工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合ー 1) 『細胞の特性計測・操作と応用』, 第4章: 浮遊細胞の電気的特徴量の計測, 株式会社コロナ社, 2016

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A01

課題番号：26106715

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：ニューロン遊走における核レオロジー解析と脳皮質3次元細胞構築への展開

1. 研究組織

(1) 研究代表者

梅嶋 宏樹 (Umeshima, Hiroki) 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

(2) 連携研究者

見学 見根子 (Kengaku, Mineko) 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

金子 真 (Kaneko, Makoto) 大阪大学・工学研究科・教授

佐久間 臣耶 (Sakuma, Shinya) 名古屋大学・工学研究科・特任助教

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

脳組織の形成過程においては、神経細胞が自律的に細胞核移動を行ない機能部位に規則正しく配列することが重要であると考えられている。本研究は、移動中神経細胞の細胞核を細管内を通過する粘弾性体とみなし、その動態を詳細に解析することで核移動を駆動する力学的メカニズムおよび細胞内分子機構を明らかにすることを目的として行なった。

ニューロン遊走における核レオロジー解析：遊走中の神経細胞における細胞核ダイナミクスを高速共焦点顕微鏡を用いて高い時間・空間分解能で定量解析することに成功した。その結果から核が移動と共役する方向に回転していることを見出した。さらに分子生物学的手法と組み合わせることで核回転に関与する力が核移動にも関与する微小管モータータンパク質によるものであることを明らかにした(論文投稿中)。また、牽引力顕微鏡法により細胞が基質に及ぼす牽引力と核ダイナミクスを同時に計測することに成功し、そこから核の移動・変形と相関するアクチン骨格依存的な牽引力の存在を見出した(投稿準備中)。

in vitro 下での脳皮質神経回路再構築：前述の研究で用いた神経細胞培養系を利用して、整列したナノファイバー上を神経細胞に遊走させることで一方向に配向した神経線維を形成し、その上で別種の神経細胞を共培養することで生体組織内と類似した直交する神経線維網の再現に成功した(投稿準備中)。今後はさらにこの培養系を積層することで三次元神経回路網を in vitro 下で再現することを目指す。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計0 件)

(2) 学会発表 (計6 件)

- [1] Hiroki Umeshima, Mechanical approaches to nuclear migration of neurons during brain formation, 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「超高速バイオアセンブラ」 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 合同シンポジウム, 2014年05月16日, 京都大学 (京都市)
- [2] Hiroki Umeshima, Yuu Kure, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Quantitative Image Analysis of Nuclear Dynamics in Migrating Neurons, 2014 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2014年11月11日, 名古屋大学 (名古屋市)
- [3] Hiroki Umeshima, You Kure Woo, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Cell mechanics underlying nuclear translocation of migrating neurons, The 14th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT, 2015年06月13日, 京都大学 (京都市)
- [4] You Kure Woo, Hiroki Umeshima, Mineko Kengaku, Nuclear rotation during neuronal migration, The 14th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT, 2015年06月13日, 京都大学 (京都市)
- [5] Hiroki Umeshima, Yuu Kure, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Cell mechanics underlying nuclear translocation of migrating neurons, iCeMS International Symposium Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter, 2015年09月23日~26日, 京都大学 (京都市)
- [6] Hiroki Umeshima, You Kure Wu, Kenichi Nomura, Shuhei Yoshikawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Makoto Kaneko, Mineko Kengaku, Cell mechanics underlying nuclear translocation of migrating neurons, Neuroscience2015, 2015年10月17日~21日, Chicago (USA)

(3) 図書 (計1 件)

- [1] 梅嶋 宏樹, 細胞の特性計測・操作と応用 (1.4節, 13ページ), コロナ社, 2016

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A01

課題番号：26106723

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題名：細胞膜表面抗原の免疫ラベルと誘電現象に基づく稀少細胞の分離回収

1. 研究組織

(1) 研究代表者

安川 智之 (Yasukawa, Tomoyuki) 兵庫県立大学・物質理学研究科・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

本研究は、「四重極電極を組み込んだマイクロ流路デバイス」を用い、「誘電泳動による細胞の流路内流れ速度の制御を利用した免疫ラベル」と「細胞表面抗原の発現量に応じた分離・回収システムの構築」を目的とした。この技術を基盤として細胞膜表面に発現する抗原の表現型（フェノタイプ）を迅速で簡便に解析し、さらに、発現量に応じた分離・回収へとシステムを拡張した。

四重極電極を用いた誘電泳動により、細胞および微粒子の海島状パターンを作製した。標的の表面抗原に対する抗体を固定化した微粒子および CD33 陽性の HL-60 細胞を、負の誘電泳動 (n-DEP) により四重極電極の格子点に集積化した。この状態を3分間保持すると、免疫反応により細胞-微粒子の複合体を形成できた。異なる抗体を微粒子に固定化した場合および CD33 陰性の細胞を用いた場合、電圧印加を停止すると集積化した細胞と微粒子は再分散状態に戻った。よって、迅速で簡便に細胞群に発現する抗原を識別できることが示せた。

集積用電極および分離用電極から構成される流路デバイスを作製した。細胞分離用電極にはバンドアレイ電極および四重極電極を用いた。細胞集積用電極を用いて細胞を流路の片端側に流すことができた。さらに、分離用電極により細胞のサイズ別に流れる位置を制御して分離できた。サイズの大きな細胞は n-DEP の反発力により流路の側面側へと移動しながら下流へと流れ、サイズの小さな細胞は電極間ギャップを通過して下流へと流れた。また、分離時の電圧強度依存性を評価し最適化を行った。

マイクロ電極をプローブとした電気化学顕微鏡を用いて細胞に発現する抗原量を測定した。細胞を酵素（グルコース酸化酵素）修飾微粒子でラベルし、誘電泳動により表面抗原発現細胞をマイクロウェルアレイ内に捕捉した。グルコース酸化酵素の基質であるグルコースの存在下において生成される過酸化水素の酸化電流をマイクロ電極で検出することができた。

マイクロ電極を用いた誘電泳動により、単一細胞の捕捉、任意移動、再配置が可能な誘電泳動ピン

セットを開発した。細胞群の中から目的細胞に電極を近接させ、正の誘電泳動により電極先端に捕捉した。また、n-DEPを用いると電極に捕捉された細胞をその位置に再配置できた。この操作を繰り返し細胞の配列体を作製できた。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計13 件)

- [1] Toshiki Hokuto, Tomoyuki Yasukawa, Ryota Kunikata, Atsushi Suda, Kumi Y. Inoue, Tomokazu Matsue, Fumio Mizutani, Electrochemical Activity Imaging of Enzymes Immobilized on Substrates Based on a Bio-LSI System, *Chem. Lett.*, Vol. 43 No. 6, pp. 758-759, 2014.
- [2] Yuki Yoshimura, Chiaki Fujii, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Array of single-cell pairs on a microwell array based on positive dielectrophoresis, *Chem. Lett.*, Vol. 43 No. 7, 980-981, 2014.
- [3] Takuma Horii, Masashi Yamamoto, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Rapid Formation of Cell-Particle Complexes via Dielectrophoretic Manipulation for the Detection of Surface Antigens, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 61, pp. 215-221, 2014.
- [4] Yuki Yoshimura, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Cell Pairing Using Microwell Array Electrodes Based on Dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, Vol. 86, pp. 6818-6822, 2014.
- [5] Tomoyuki Yasukawa, Yuya Yamashita, Riku Moede, Daichi Nakayama, Seiichiro Iijima, Fumio Mizutani, A DNA hybridization sensor based on catalytic response by platinum deposition, *Analyst*, Vol. 140, pp. 1014-1018, 2015.
- [6] Tomoyuki Yasukawa, Yuya Kiba, Fumio Mizutani, A Dual Electrochemical Sensor Based on a Test-Strip Assay for the Quantitative Determination of Albumin and Creatinine, *Anal. Sci.*, Vol. 31, pp. 583-589, 2015.
- [7] Yuki Igaki, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Oxygen consumption of contractile C2C12 myotubes investigated by scanning electrochemical microscopy, *Chem. Lett.*, Vol. 44 No. 7, pp. 1031-1032, 2015.

などその他含め計 13 件

(2) 学会発表 (計69 件)

- [1] Tomoyuki Yasukawa, Discrimination of cells with specific antigen expressed on membrane based on the dielectrophoresis, 2014 19th Annual Conference of Chemical Sensors, Taiwan, 2014.
- [2] 守島 麻, 安川智之, 吉本敬太郎, 水谷文雄, 直交型四重極電極を用いた誘電泳動による迅速な細胞凝集体の作製, 第74回分析化学討論会, 福島県, 2014.
- [3] 吉村友希, 富田昌弘, 水谷文雄, 安川智之, マイクロウェルアレイ電極を用いたミエローマ細胞とB細胞の一括ペアリング, バイオアセンブラ第7回公開シンポジウム, 東京都, 2014.
- [4] Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Separation of cells expressed specific antigen on the surface based on dielectrophoresis, WAC2014, USA, 2014.
- [5] Tomoyuki Yasukawa, Yuya Kiba, Yukako Otani, Fumio Mizutani, Quantitative immunochromatography

- by detection redox species flowing in a membrane, 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Switzerland, 2014.
- [6] Yuki Yoshimura, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Rapid fabrication of pairs of different types of cells on a microwell array based on dielectrophoresis, 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Switzerland, 2014.
- [7] Tomoyuki Yasukawa, Yuki Yoshimura, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Rapid Formation of Single-Cell Pairs on a Microwell Array with Dielectrophoresis, The 18th Internatinal Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and life Science, USA, 2014.
- [8] T. Yasukawa, Y. Yoshimura, F. Mizutani, Cell pairing on a microwell array electrode by positive dielectrophoresis, 25th 2014 International Symposium, on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, 2014.
- [9] T. Yasukawa, Y. Yoshimura, M. Tomita, F. Mizutani, Vertical pairing of different types of cells in microwells by positive dielectrophoresis, 24th MRS-J G: Nano-biotechnologies on Interface, Kanagawa, Japan, 2014.
- [11] 安川智之, 細胞膜表面抗原の免疫ラベルと 誘電現象に基づく稀少細胞の分離回収, 新学術領域「超高速バイオアセンブラ」第8回公開シンポジウム, 東京都, 2015.
- [12] Tomoyuki Yasukawa, Kohei Tominaga, Satoshi Arimoto, Ken Shimono, Toshihiko Yoshioka, Fumio Mizutani, Quantitative immunochromatographic assay based on electrochemical detection systems, ISMM2015, Kyoto, 2015.
- [13] Tomoyuki Yasukawa, Yuki Yoshimura, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Rapid Formation of Single-Cell Pairs on a Microwell Array Using Dielectrophoresis, *Tokyo International Conference 2015*, Chiba, 2015.
- [14] Ayaka Kawashima, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Direct Estimation of the Interaction between Cell Surface Antigen and Antibody on Solid Phase Using Dielectrophoresis, Tokyo International Conference 2015, Chiba, 2015.
- [15] Tomoyuki Yasukawa, Yuki Minakuchi, Hironobu Hatanaka, Fumio Mizutani, Negative dielectrophoretic separation of cells based on the expression of specific surface antigen, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Taiwan, 2015.
- [16] Yuki Igaki, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Measurement of oxygen consumption of contracting C2C12 myotube using scanning electrochemical microscopy, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Taiwan, 2015.
- [17] T. Yasukawa, F. Mizutani, Formation of cell-particle complexes by negative dielectrophoresis for rapid discrimination of an expression of surface antigen, 11th Asian Conference on Chemical Secosrs, Malaysia, 2015.
- [18] Yuki Igaki, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Investigation of oxygen consumption for micropatterns of contractile myotubes by scanning electrochemical microscopy, MHS2015, Nagoya, Japan, 2015.
- [19] 安川智之, バイオセンシングシステムの迅速化, 簡素化, 高感度化, 第61回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 兵庫県, 2015.
- [20] 富永浩平, 安川智之, 水谷文雄, 電気化学イムノクロマトグラフイーにおける測定領域の初期ラベル酵素量依存性, 第61回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 兵庫県, 2015.
- [21] 後藤卓真, 安川智之, 水谷文雄, 走査型誘電泳動による多孔質膜への自由度の高い粒子配列体の作製,

化学とマイクロ・ナノシステム学会 第32回研究会, 福岡県, 2015.

[22] Tomoyuki Yasukawa, Yuki Yoshikura, Masahiro Tomita, Fumio Mizutani, Rapid and highly-effective formation of precise single-cell pairing based on dielectrophoresis, Pacificchem 2015 Bio/chemical Approaches for Single Cell Biosensing Technologies, USA, 2015.

[23] 安川智之, 田中泰周, 水谷文雄, 微小孔を有するマイクロディスク電極を用いた誘電泳動による細胞の捕捉と再配置, 電気化学会第83回大会, 大阪府, 2016.

などその他含め計69件

(3) 図書 (計2 件)

[1] Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Chapter 5, Discrimination of Cells with Specific Antigens Expressed on a Membrane Based on the Dielectrophoresis, Springer, 2015, 69-78.

[2] 安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動を利用した細胞配列, 三次元ティッシュエンジニアリング技術最前線, 第1編第3章第5節, 149-158. 株式会社エヌティエス, 2015.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A01

課題番号：26106724

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：生体環境を模倣するマイクロカプセル培養技術と高速カプセルソーティング技術の開発

1. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 郁郎 (Ikuro, Suzuki) 東北工業大学・大学院工学研究科・准教授

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

セルソーターは細胞精製に必須な手法であるが、シャーレから剥がす際に死んでしまったり、本来の機能が失われてしまう接着細胞をダメージレスに分離回収することはできない。また、これまでのセルソーティングは、酵素処理などによりバラバラされた細胞懸濁液中の球形細胞を対象にしており、細胞ネットワークの性質や3次元微小組織モデルを解析・分離する技術では無かった。本研究では、接着細胞や細胞ネットワークをダメージレスにフローサイトメトリー解析およびソーティングできる技術開発を目的とした。生体材料で作製した粒子表面および粒子内に接着細胞を培養する Cell ball 技術を開発し、マイクロ流路型セルソーターと組み合わせることで、Cell ball のまま分離回収する方法を構築した。具体的には、コラーゲン粒子の表面にヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞、ラット初代神経細胞、ヒトがん細胞を培養することに成功し、シナプス形成や Ca²⁺オシレーション計測の結果から、平面培養と同様の機能を有していることが確認された。また、コラーゲングル粒子内に細胞を内包したオイルフリーのカプセル化技術を開発し、カプセル内における神経ネットワークの3次元形成、がん微小環境モデルの作製に成功した。マイクロ流路型セルソーターを用いて、フローサイトメトリー解析を行ったところ、マーカーによる分画が明確に現れ、特定の Cell ball のみを分離回収することに成功したことから、開発した Cell ball ソーティング技術は、従来難しかった接着細胞および3次元細胞ネットワークの性質をハイスループット解析および分離ができる技術であることが示唆された。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計2 件)

- [1] Odawara, A., Katoh, H., Matsuda N., and Suzuki, I. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific Reports*, 6, 26181, 1-14, 2016
- [2] Odawara, A., Katoh, H., Matsuda N., and Suzuki, I. Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 469(4), 856-62, 2016

(2) 学会発表 (計9 件)

- [1] 佐々木 陽良, 佐藤 伶, 小田原 あおい, 稲生 崇秀, 川瀬 芳恵, 鈴木 郁郎. 微小神経ネットワークのゲルカプセル培養技術の開発, H27 年度東北地区若手研究者研究発表会, 福島, 2015
- [2] 佐藤 伶, 佐々木 陽良, 小田原 あおい, 稲生 崇秀, 川瀬 芳恵, 鈴木郁郎. 細胞培養用マイクロゲルカプセルの創製, H27 年度東北地区若手研究者研究発表会, 福島, 2015
- [3] 佐々木 陽良, 佐藤 伶, 小田原 あおい, 稲生 崇秀, 川瀬 芳恵, 鈴木 郁郎. フローサイトメトリーへの応用を目指した微小神経ネットワークのゲルカプセル培養技術の開発, 第 24 回ライフサポート学会 フロンティア講演会, 東京, 2015
- [4] 佐々木陽良, 小田原あおい, 鈴木郁郎. Cell ballソーティング技術の開発, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2015
- [5] 佐々木陽良, 小田原あおい, 鈴木郁郎. Cell ballを用いたフローサイトメトリー解析・ソーティング技術の開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会, 福岡, 2015
- [6] 佐々木陽良, 小田原あおい, 鈴木郁郎. Cell ball作製技術の開発とフローサイトメトリー解析およびソーティング技術への応用, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪, 2016
- [7] 佐々木陽良, 小田原あおい, 鈴木郁郎. Cell ball作製技術によるソーティング技術への応用, 平成28年度電気関係学会東北支部連合大会, 宮城, 2016
- [8] 佐々木陽良, 小田原あおい, 鈴木郁郎. Cell ball技術による接着細胞のダメージレスソーティング, 第32回ライフサポート学会大会, 宮城, 2016
- [9] 佐々木陽良, 小田原あおい, 鈴木郁郎. 生体3次元微小環境を模倣する細胞内包型Cell ball作製技術の開発. 第16回日本再生医療学会総会, 宮城, 2017

(3) 図書 (計2 件)

- [1] 鈴木郁郎. 「細胞の特性計測・操作と応用」(細胞工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合-1) 第3章 細胞分離への応用 “マイクロ流体チップを用いた細胞カプセルの分離” 213-224, 2016, コロナ社
- [2] 鈴木郁郎. “特集:創薬とバイオマテリアル「ヒトiPS細胞由来ニューロンの長期培養と薬効評価技術」バイオマテリアル-生体材料-33巻-3号, 224-231, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A02

課題番号：24106503

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：がん細胞浸潤の4次元解析に関する研究

1. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 裕史 (Hirofumi, Matsui) 筑波大学・医学医療系・講師

(2) 研究協力者

中村 由美子 (Yumiko, Nakamura) 筑波大学・医学医療系・研究員

田村 磨聖 (Masato, Tamura) 筑波大学・人間総合科学研究科・博士課程3年

伊藤 紘 (Hiromu, Ito) 筑波大学・人間総合科学研究科・博士課程1年

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

本研究では、緑色蛍光発現正常ラット胃粘膜細胞株 (RGM-GFP) および赤色蛍光発現がん様変異 RGM 細胞株 (RGK-KO) の2種類の細胞を用いて、これら2種類の細胞が治療法開発などの医学研究および3次元培養システム構築など細胞工学研究に有用な細胞材料であるか検討を行った。RGM-GFP および RGK-KO による共培養の利点は、共培養した状態であっても、蛍光観察によって披見細胞を同定でき、正常細胞とがん細胞に対する効果を簡単に見分けることができる。さらに2種類の細胞を共培養することで、生体内を模倣する環境をディッシュ上に再現できると考えられる。

医学研究への細胞材料応用として、RGM-GFP および RGK-KO の正常—がん細胞共培養によりがん選択的殺傷効果を示す薬剤スクリーニングや放射線治療の効率的照射条件の探索への応用性を検討した。抗がん剤を曝露した結果、正常細胞・がん細胞問わずに殺傷する薬剤、がん細胞選択的に殺傷する薬剤を顕微鏡下で容易に区別可能であった。一方、放射線の照射線量を変化させることで、死滅する細胞数の変化だけでなく、がん選択的な殺傷効果に対しても変化が生じることが明らかとなった。これらの実験では経日的な観察を行っており、細胞が死滅し始めるターニングポイントとなる時間も同時に推測できた。

3次元培養下で RGM-GFP および RGK-KO がどのような挙動を示すかについても検討を行った。一般的に、正常細胞はゲル中へ浸潤せず、がん細胞は浸潤することが知られている。マトリゲル上に RGM-GFP あるいは RGK-KO を播種して培養した結果、RGM-GFP はゲル中へ浸潤せず、RGK-KO はゲル中へ浸潤する性質を示し

た。

以上の検討から、RGM-GFP および RGK-KO の共培養システムは、薬剤スクリーニングや3次元培養システムの構築に貢献することが可能であった。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計18 件)

- [1] Masato Tamura, Hiromu Ito, Hirofumi Matsui, Radiotherapy for cancer using X-ray fluorescence emitted from iodine, *Scientific Reports*, 2017, 7, 43667.
- [2] Masato Tamura, Hiromu Ito, Hirofumi Matsui, Ichinosuke Hyodo, Acetaldehyde is an oxidative stressor for gastric epithelial cells, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2014, 55(1), 26-31.
- [3] Hiromu Ito, Hirofumi Matsui, Masato Tamura, Hideyuki J. Majima, Hiroko P. Indo, Ichinosuke Hyodo, Mitochondrial reactive oxygen species accelerate the expression of heme carrier protein 1 and enhance photodynamic cancer therapy effect, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2014, 55(1), 67-71.
- [4] Hiromu Ito, Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Hideyuki J. Majima, Hiroko P. Indo, Ichinosuke Hyodo, Reactive oxygen species involved cancer cellular specific 5-aminolevulinic acid uptake in gastric epithelial cells, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2014, 54(2), 81-85.
- [5] Tamura, M., Matsui, H., Hyodo, I., Tanaka, J. & Miwa, Y. Fluorescence-based co-culture of normal and cancerous cells as an indicator of therapeutic effects in cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **63C**, 1-7 (2014).
- [6] Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Tsutomu Tomita, Hisato Sadakata, Hiroko P. Indo, Hideyuki J. Majima, Tsuyoshi Kaneko, Ichinosuke Hyodo, Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2014, 54(1), 12-17.
- [7] Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Yumiko Nakamura. Nagano, Tsuyoshi Kaneko, Hiroko P Indo, Hideyuki J Majima, Ichinosuke Hyodo, Salt is an oxidative stressor for gastric epithelial cells, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2013, 64(1). 89-94.
- [8] Kazuhiro Hiyama, Hirofumi Matsui, Masato Tamura, Osamu Shimokawa, Mariko Hiyama, Tsuyoshi Kaneko, Yumiko Nagano, Ichinosuke Hyodo, Junko Tanaka, Yoshihiro Miwa, Tetsuo Ogawa, Takeo Nakanishi and Ikumi Tamai. Cancer cells uptake porphyrins via heme carrier protein 1, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2012, 16, 1-8.
- [9] Nagano Yumiko, Matsui H, Tamura M, Shimokawa O, Nakamura Y, Kaneko T, Hyodo I. NSAIDs and acidic environment induce gastric mucosal cellular mitochondrial dysfunction. *Digestion*. 2012, 85(2), 131-5.
- [10] Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Tamura M, Rai K, Nakamura Y, Kaneko T, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I. Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)-induced lipid peroxidation by the MnSOD overexpression in gastrointestinal epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*. 2012, 63 (2), 137-42.

- [11] Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Nakamura Y, Tamura M, Rai K, Kaneko T, Hyodo I. Bishophonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. *J Clin Biochem Nutr.* 2012, 51(3), 196-203.
- [12] Kim BJ, Kim SY, Lee S, Jeon JH, Matsui H, Kwon YK, Kim SJ, So I. The role of transient receptor potential channel blockers in human gastric cancer cell viability. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90(2):175-86.
- [13] Okada H, Naito Y, Takagi T, Takaoka M, Oya-Ito T, Fukumoto K, Uchiyama K, Handa O, Kokura S, Nagano Y, Matsui H, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Detection of N-(hexanoyl)lysine in the tropomyosin 1 protein in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat gastric cancer cells. *J Clin Biochem Nutr.* 2012 Jan; 50(1):47-52.
- [14] Hiroko P. Indo, Osamu Inanami, Tomoko Koumura, Shigeaki Suenaga, Hsiu-Chuan Yen, Shizuko Kakinuma, Ken-Ichiro Matsumoto, Ikuo Nakanishi, William St Clair, Daret K. St Clair, Hirofumi Matsui, Richard Cornette, Oleg Gusev, Takashi Okuda, Yasuhito Nakagawa, Toshihiko Ozawa & Hideyuki J. Majima, Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE, *Free radical research*, 2012, 46(8), 1029-1043
- [15] Long Binh Vong, Tsutomu Tomita, Toru Yoshitomi, Hirofumi Matsui, Yukio Nagasaki, An Orally Administered Redox Nanoparticle that Accumulates in the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice, *Gastroenterology*, Vol. 143, No. 4, 1027-1036(2012)
- [16] Suemasu S, Yamakawa N, Ishihara T, Asano T, Tahara K, Tanaka K, Matsui H, Okamoto Y, Otsuka M, Takeuchi K, Suzuki H, Mizushima T. Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem Pharmacol.* 2012 Dec 1;84(11):1470-81.
- [17] Nakamizo H, Suzuki H, Miura S, Mogami S, Kishikawa H, Yoshida H, Matsui H, Hibi T. Transmural pressure loading enhances gastric mucosal cell proliferation. *Dig Dis Sci.* 2012 Oct;57(10):2545-54.
- [18] Tatsugami M, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M, Matsui H, Haruma K, Bile acid promotes intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Nov;21(11):2101-7.

(2) 学会発表 (計9 件)

- [1] Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Tsuyoshi Kaneko, Yumiko Nagano, Osamu Shimokawa, Ichinosuke Hyodo, Tsutomu Tomita: Mitochondrial Reactive Oxygen Species Increase Gastric Cancer Cellular Invading Ability. *Digestive Disease Week 2012*, Mo1632, May 21 2012 San Diego,
- [2] 長野由美子、松井裕史、下川治、田村磨聖、中村幸夫、頼冠甫、金子剛、兵頭一之介：ミトコンドリア障害による消化管酸化ストレスとしてのNSAIDs投与と酸環境曝露 第65回酸化ストレス学会、Y-3、徳島、June 9 2012
- [3] 田村磨聖、松井裕史、長野由美子、富田勉、貞方久人、犬童寛子、馬嶋秀行、兵頭一之介：ミトコンドリア由来活性酸素はがん浸潤を促進する 第65回酸化ストレス学会、0-31、徳島、June 9 2012
- [4] Hirofumi Matsui, Masato Tamura, Yumiko Nagano, Tsuyoshi Kaneko and Ichinosuke Hyodo. Salt as an oxidative stress in gastric mucosal cells. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, 0-20, Sep 11 Hawaii, 2012

- [5] Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Tsutomu Tomita, Hisato Sadakata, Hideyuki Majima, Hiroko Indo and Ichinosuke Hyodo, ROS Elimination by MnSOD or antioxidants suppressed tumor invasion. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, P-4, Sep 11 Hawaii, 2012
- [6] Yumiko Nagano, Hirofumi Matsui, Osamu Shimokawa, Aki Hirayama, Yukio Nakamura, Masato Tamura, Tsuyoshi Kaneko and Ichinosuke Hyodo. Bisphosphonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, P-7, Sep 11 Hawaii, 2012
- [7] 田村磨聖、松井裕史、馬嶋秀行、兵頭一之介：がん浸潤に対するミトコンドリア由来活性酸素の関与 第71回日本癌学会学術総会 口頭、札幌、Sep 19 2012
- [8] 富田勉、貞方久人、田村磨聖、松井裕史。消化器とフリーラジカル研究会2013。京都、Mar 13 2013.
- [9] Hiromu Ito, Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Tsutomu Tomita, Hisato Sadakata, Hiroko P. Indo, Hideyuki J. Majima, Ichinosuke Hyodo, Mitochondrial reactive oxygen species accelerated gastric cancer cellular invasion in vitro, The 7th Japan and US collaboration Conference in Gastroenterology, Tokyo, November 2013

(3) 図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計1 件)

名称：正常細胞とがん細胞との共培養系

発明者：松井裕史、田村磨聖、中村由美子、三輪佳宏

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：特願2012-272223

出願年月日：2012年12月13日

国内外の別：国内

公募研究 A02

課題番号：24106504

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：血管構造の高速モールドイングによる三次元骨組織の構築

1. 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

(2) 連携研究者

穴田 貴久 (Anada, Takahisa) 東北大学・大学院歯学研究科・助教

長野 真澄 (Nagano, Masumi) 筑波大学・大学院医学医療系・助教

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

骨は、微小血管を中心としたオステオンと呼ばれる最小単位（直径：0.2 mm）から構成されており、一定間隔で血管構造が存在している。骨の形成、維持においては骨芽細胞や破骨細胞が大きな役割を果たすが、これら骨形成と骨吸収は微小血管を中心として営まれている。骨組織は、複数の細胞種によって構成され、一般に考えられるより複雑な構造を有しているため、このような血管網を有する骨組織を *in vitro* で構築する技術は未だに確立されていないのが現状である。

そこで本研究では、電気化学を利用した血管様構造の作製技術を用いて、三次元的な骨様組織の作製に取り組んだ。平成25年度は、前年度に設計した自己組織化オリゴペプチドを用いた電気化学的な細胞脱離技術により、ハイドロゲル内に血管内皮細胞で内表面が覆われた血管様構造を高速モールドイングにより作製する技術を確立した。この血管内皮細胞は送液培養において徐々にゲル内に侵入して管腔構造を形成し、規則的に配置された血管様構造を互いに接続することが示された。さらに、ハイドロゲル内に骨細胞への分化が容易な間葉系幹細胞を導入しておくことで、送液培養中にハイドロゲル内で高密度になるまで増殖することを示した。この培養系をさらに骨分化誘導培地で培養することで、初期の骨分化マーカーが発現することを示した。また、多孔質の骨伝導剤 (b-TCP) をハイドロゲルと組み合わせることで、血管構造を有する骨様組織を作製した。今後、さらに長期的に送液培養し、なおかつ三次元的に血管様構造を配置することで、立体的な骨様組織が構築できる可能性を示した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計6 件)

- [1] T. Kageyama, T. Kakegawa, T. Osaki, J. Enomoto, T. Ito, T. Nittami and J. Fukuda, Rapid engineering of endothelial cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels, *Biofabrication*, in press
- [2] J. Enomoto, R. Takagi, R. Onuki-Nagasaki, S. Fujita, and J. Fukuda*, Reverse transfection in microchamber arrays for cell migration assays, *Sensors & Actuators: B* 2014; 190: 896-899
- [3] R. Takagi, J. Fukuda, K. Nagata, Y. Yawata, N. Nomura, and H. Suzuki, Microfluidic microbial culture device for rapid determination of the minimum inhibitory concentration of antibiotics, *Analyst* 2013; 138: 1000-3
- [4] S. Fujita, R. Onuki-Nagasaki, J. Fukuda, J. Enomoto, S. Yamaguchi, M. Miyake, Development of super-dense transfected cell microarrays generated by piezoelectric inkjet printing, *Lab on a Chip* 2013; 13(1): 77-80
- [5] T. Kakegawa, N. Mochizuki, N. Sadr, H. Suzuki, J. Fukuda*, Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells, *Tissue Engineering* 2013; 19(1-2): 290-8
- [6] N. Mochizuki, T. Kakegawa, T. Osaki, N. Sadr, NN. Kachouie, H. Suzuki, J. Fukuda*, Tissue Engineering Based on Electrochemical Desorption of an RGD-Containing Oligopeptide, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2013; 7: 236-43

(2) 学会発表 (計17 件)

- [1] N. Mochizuki, T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Engineering cell sheets with electrochemical reactions on membrane culture substrate, 3rd TERMIS World Congress, Vienna, Austria, 2012
- [2] N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Zwitterionic Oligopeptides for Cell Micropatterning and Electrochemical Rapid Cell Detachment, 3rd TERMIS World Congress, Vienna, Austria, 2012
- [3] N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrochemical approach to fabricate stacked thick cell sheets, PRiME, Honolulu, USA, 2012
- [4] J. Enomoto, R. Takagi, R. Nagasaki, H. Suzuki, S. Fujita, J. Fukuda, Microdevice For Cell Migration Assays Using Reverse-transfection, μ TAS 2012, Okinawa, Japan, 2012
- [5] T. Osaki, H. Suzuki, J. Fukuda, Rapid assembly of vascular-like structures by electrochemical cell transfer, *Biofabrication*, Manchester, UK, 2012
- [6] T. Kakegawa, A. Gautieri, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrochemical Cell Detachment using Zwitterionic Oligopeptides, *Biofabrication*, Manchester, UK, 2012
- [7] T. Kageyama, T. Ito, H. Suzuki, J. Fukuda, Development of in situ Cross-linkable Hydrogel for Rapid Engineering Vascular-like Structures by using Electrochemical Cell Detachment, MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, USA, 2012
- [8] T. Kakegawa, A. Gautieri, F. Rigoldi, A. Manenti, J. Fukuda, Self-Assembled ligopeptides for Electrochemical Cell Detachment, TERMIS-eu, Istanbul, Turkey, 2013
- [9] T. Osaki, J. Fukuda, Fabrication of perfusable vasculatures using micromolding and electrochemical cell transfer, IEEE EMBC, Osaka, Japan, 2013
- [10] T. Kageyama, T. Kakegawa, T. Osaki, T. Ito, T. Nittami, J. Fukuda, In situ crosslinkable hydrogel

for rapid engineering of vascular-like structures by using electrochemical detachment of cells, MicroTAS, Freiburg, GERMANY, 2013

[11] T. Osaki, T. Kakegawa, J. Fukuda, Rapid assembly of perfusable microvascular-like structures by electrochemical cell transfer, Termis-america, Atlanta, USA, 2013

[12] J. Enomoto, R. Nagasaki, S. Fujita, J. Fukuda, Microdevice for cell migration assays using reverse transfection, MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, USA, 2013

などその他含め17件。

(3) 図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計1 件)

名称：マイクロ流路装置及びこれに関する方法

発明者：福田淳二、鈴木博章、山岸安奈、榎本詢子、横川雅俊

権利者：国立大学法人 筑波大学

種類：特許

番号：特願2013-050756 (PCT/JP2014/054299)

出願年月日：出願日2013年3月13日 (出願日2014年2月24日)

国内外の別：国内 (国外)

公募研究 A02

課題番号：24106505

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題名：細胞環境の動的制御法の確立と3次元細胞システム構築への展開

1. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 洋史 (Yoshikawa, Hiroshi) 埼玉大学・理工学研究科・助教

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

本研究では、物理化学的に定義された細胞外環境モデル上での細胞応答の定量計測を通じて、3次元組織の形成や機能化を制御する外部環境因子を見出すことを目的としていた。

まず、細胞外環境モデルに関しては、機能性高分子材料を用いて、軟組織と硬組織のメカニクスを模倣可能なインビトロモデルの構築を目指した。その結果、軟組織はハイドロゲル材料、硬組織は疎水性のゴム材料を用いることにより、ヤング率で5桁 (0.1 kPa～10 MPa) に及ぶ広範囲な生体外環境モデルを構築することに成功した。実際にこれらのモデル上で骨肉種細胞や筋芽細胞を培養したところ、細胞の形状・骨格構造・接着性などが基板のメカニクスに対して応答していることを見出した。またこれらの細胞応答を、レーザー圧力波や光干渉を用いて定量計測する手法を独自に開発し、論文成果として発表した。

さらに機能的な3次元細胞システムの構築への応用として、横浜市立大学の武部貴則先生との領域内共同研究により、臓器原基の形成に最適な細胞・環境因子の解明に取り組んだ。その中でも特に顕著な発見として、硬さの制御が可能なハイドロゲル基板を用いて間葉系肝細胞および血管内皮細胞を共培養したところ、ある中庸な硬さ条件でのみ立体的な細胞凝集体形成が誘起されることを見出した。さらに、この細胞凝集ダイナミクスを解析したところ、最適なゲル上では細胞の運動速度や集団運動性が顕著に増大していることが明らかとなった。これらの結果は外部環境のメカニクスが臓器形成における重要因子の一つであることを示している。本研究成果はCell Stem Cell誌にて論文発表し、同誌の表紙に選ばれたとともにBest of Cell Stem Cell 2015にも選ばれた。さらに、Nature Methods誌にてハイライト記事が掲載された。また、武部先生とは、再生軟骨の力学特性評価に関する領域内共同研究も進め、その成果をStem Cell誌にて論文発表した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計10 件)

- [1] H. Y. Yoshikawa, J. Cui, K. Kratz, T. Matsuzaki, S. Nakabayashi, A. Marx, U. Engel, A. Lendlein, and M. Tanaka, Quantitative Evaluation of Adhesion of Osteosarcoma Cells to Hydrophobic Polymer Substrate with Tunable Elasticity, *Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 8024-8030.
- [2] H. Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, G. Sazaki, T. Kitatani, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, S. Nakabayashi, Y. Mori, and H. Masuhara, Spatially Precise, Soft Microseeding of Single Protein Crystals by Femtosecond Laser Ablation, *Crystal Growth & Design*, 12 (2012) 4334-4339.
- [3] H. Y. Yoshikawa, T. Kawano, T. Matsuda, S. Kidoaki, M. Tanaka, Morphology and Adhesion Strength of Myoblast Cells on Photocurable Gelatin under Native and Non-native Micromechanical Environments, *Journal of Physical Chemistry B*, 117 (2013) 4081-4088.
- [4] M. Mizuno, S. Kobayashi, T. Takebe, H. Kan, Y. Yabuki, T. Matsuzaki, H. Y. Yoshikawa, S. Nakabayashi, L. J. Ik, J. Maegawa, H. Taniguchi, "Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage, *Stem Cells*, 32 (2014) 816-821.
- [5] T. Matsuzaki, G. Sazaki, M. Suganuma, T. Watanabe, T. Yamazaki, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, High Contrast Visualization of Cell-Hydrogel Contact by Advanced Interferometric Optical Microscopy, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5 (2014) 253-257.
- [6] H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori, Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding, *Chemical Society Reviews*, 43 (2014) 2147-2158.
- [7] T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa, M. Kimura, H. Koike, Y. Ueno, T. Matsuzaki, T. Yamazaki, T. Toyohara, K. Osafune, H. Nakauchi, H. Y. Yoshikawa, and H. Taniguchi, "Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation, *Cell Stem Cell*, 16 (2015) 556-565 (Selected as a front cover and Best of Cell Stem Cell 2015). This article was featured in *Nature Methods*, 12 (2015) 600.

などその他含め計10件

(2) 学会発表 (計16 件)

- [1] T. Matsuzaki, M. Suganuma, T. Watanabe, G. Sazaki, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, Visualization of Cell-Hydrogel Interfaces by Advanced Interferometric Optical Microscopy, 9th International symposium Gelsympo 2012, 2012年10月9日～10月日, 茨城県.
- [2] 水野満, 小林眞司, 武部貴則, 鈴木啓, 村田駿介, 矢吹雄一郎, 安村和則, 松崎賢寿, 吉川洋史, 中林誠一郎, 前川二郎, 谷口英樹, 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた関節軟骨再構築, 第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月21日～3月23日, 神奈川県.
- [3] 吉川洋史, 光技術による細胞接着の定量評価, バイオアセンブラ第5回シンポジウム, 2013年7月18日, 東京都.
- [4] 武部貴則, 吉川洋史, 谷口英樹, 臓器原基創出法を活用した多細胞系からなる複雑な立体組織の人為的構成, 第13回日本再生医療学会総会, 2013年3月21日～3月23日, 神奈川県.

などその他含め計16件

(3) 図書 (計1 件)

[1] H. Y. Yoshikawa, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems (Chapter13), Springer, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計1 件)

名称：自己組織化用細胞集合体の作製方法

発明者：武部貴則，谷口英樹，吉川洋史

権利者：武部貴則，谷口英樹，吉川洋史

種類：特許

番号：特願2014-37341

出願年月日：2014 年2月27 日

国内外の別：国内

公募研究 A02

課題番号：24106512

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：三次元組織光分解造形法の開発

1. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦慎治 (Sugiura, Shinji) 独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

(2) 研究分担者

大和雅之 (Yamato, Masayuki) 東京女子医科大学・医学部・教授

高木俊之 (Takagi, Toshiyuki) 独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

服部浩二 (Hattori, Koji) 独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究員

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

我々の研究グループは簡便に光分解性ゲルを形成できる架橋剤として、活性エステル型光開裂性架橋剤の開発を行っている。本研究ではこの簡便な架橋剤を利用して調製した光分解性ゲルを用いて、新たな細胞操作・組織工学手法の開発を進めている。平成25年度はゲルの弾性率制御に関する検討と三次元組織の灌流培養手法に関する検討を行ったので、これらについて報告する。

1. ゲルの弾性率制御

ゲルの弾性率制御を行うために、光開裂性架橋剤 NHS-PC-4armPEG と非開裂性架橋剤 NHS-4armPEG を所定の比率で混合し、amino-4armPEG 溶液と反応させることで光照射に応じて部分的に分解するゲルを作成した。調製したゲルに対して光照射を行い、弾性率を解析した。光開裂性架橋剤の混合比の増加に伴い、光照射前後の弾性率が共に低下する傾向が確認された。また、マイクロパターン光照射と組み合わせることで、その弾性率をマイクロオーダーで3次的に制御できることが明らかとなった。本研究はA03班の水谷グループとの共同研究の成果である。

2. 三次元組織の灌流培養

三次元組織を長期培養するためには、三次元組織に培養液を灌流しながら培養することが必要であると考

えられる。今年度は光分解性ゲルに細胞を内包して作製した三次元組織体をマイクロ流体デバイスに組み込むことにより、作製した三次元組織の灌流培養を行う手法を確立した。モデルケースとしてゼラチンと光開裂性架橋剤 NHS-PC-4armPEG を混合して作製した光分解性ゲルにヒト肝癌由来の HepG2 細胞を内包し、マイクロパターン光照射により、所定の三次元構造を有する組織体を得た。マイクロ流体デバイスはポリジメチルシロキサンを用いてソフトリソグラフィ法により作製した。開閉型のマイクロチャンバーを有するマイクロ流体デバイスを採用することで、三次元組織体の構造を破壊することなく、培養チャンバーに作製した三次元組織体を組み込むことができ、三次元組織体に培養液を流しながら培養できることを確認した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計2 件) うち査読付論文 (計1 件)

- [1] Masato Tamura, Fumiki Yanagawa, Shinji Sugiura, Toshiyuki Takagi, Kimio Sumaru, *Hirofumi Matsui and Toshiyuki Kanamori, Optical cell separation from three-dimensional environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques, Sci. Rep., Vol. 4, pp.4793, 2014.
- [2] 柳川史樹、杉浦慎治、高木俊之、須丸公雄、金森敏幸、新規光開裂性架橋剤を用いた細胞迂路センシング技術の開発バイオ部会 News Letter, 34, pp.4-7, (2013).

(2) 学会発表 (計17 件)

- [1] S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru, M. Yamaguchi and T. Kanamori, Cell Micropatterning and Manipulation on the Photodegradable Hydrogel Sheet, The 5th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Xiamen, 2013.
- [2] F. Yanagawa, S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru and T. Kanamori, Photo-cleavable crosslinker capable of preparing photodegradable hydrogel by a two component reaction for hydrogel micro patterning, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Freiburg, 2013.
- [3] M. Tamura, F. Yanagawa, S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru, H. Matsui, and T. Kanamori, Optical cell picking in photodegradable hydrogels based on cellular morphology in 3d culture environment, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Freiburg, 2013.
- [4] S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru, M. Yamaguchi and T. Kanamori, Cell Micropatterning and Manipulation on a Photodegradable Hydrogel Sheet, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回研究会, 仙台, 2013.
- [5] 柳川 史樹、杉浦 慎治、高木 俊之、須丸 公雄、金森 敏幸, 三次元組織構築を目的とした光分解性ゲルによる細胞制御, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回研究会, 仙台, 2013.
- [6] 田村 磨聖、柳川 史樹、杉浦 慎治、高木 俊之、須丸 公雄、松井裕史、金森 敏幸, 光分解性ゲルへの局所光照射による3次元培養細胞の選択的分離, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回研究会, 仙台, 2013.
- [7] 杉浦 慎治、高木 俊之、須丸 公雄、金森 敏幸, 光分解性ゲルを用いた細胞マイクロパターンニングと細胞操作, 第62回高分子討論会, 金沢, 2013.
- [8] 柳川 史樹、杉浦 慎治、高木 俊之、須丸 公雄、金森 敏幸, 三次元組織構築を目的とした光分解性ゲル

ルのマイクロパターン分解挙動の解析, 第62回高分子討論会, 金沢, 2013.

[9] 杉浦 慎治、柳川 史樹、水谷武臣、高木 俊之、須丸 公雄、金森 敏幸, ハイドロゲルの構造および物理・化学特性の時空間制御を目指した活性エステル型光開裂性架橋剤の開発, 第62回高分子討論会, 金沢, 2013.

[10] 田村 磨聖、柳川 史樹、杉浦 慎治、松井裕史, 金森 敏幸, 光分解性ゲルへの局所光照射による3次元培養細胞の分離, 化学工学会 第79年会, 岐阜, 2014.

などその他含め計17件

(3) 図書 (計2 件)

[1] K. Hattori, S. Sugiura and T. Kanamori, Microfluidic Perfusion Culture, Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols, Third Edition, pp. 251-263, Humana Press, 2013

[2] Shinji Sugiura, Fumiki Yanagawa, and Tosiyuki Kanamori, Photofabrication Techniques for 3D Tissue Construct, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, pp. 203-211, Springer, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計3 件)

名称: 光分解性架橋剤、光分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法、細胞分別方法、組織体形成方法および組織体

発明者: 杉浦慎治、高木俊之、柳川史樹、須丸公雄、金森敏幸

権利者: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願2013-108429

出願年月日: 2013年5月22日

国内外の別: 国内

名称: 光および加水分解性架橋剤、光および加水分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法、細胞分別方法、並びに、組織体形成方法

発明者: 杉浦慎治、高木俊之、柳川史樹、須丸公雄、金森敏幸

権利者: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願2013-108430

出願年月日: 2013年5月22日

国内外の別: 国内

名称: 細胞分離装置及び細胞分離方法

発明者: 杉浦慎治、須丸公雄、柳川史樹、高木俊之、金森敏幸、松井裕史、田村磨聖

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人筑波大学

種類: 特許

番号: 特願2013-108431

出願年月日: 2013年5月22日

国内外の別: 国内

公募研究 A02

課題番号：26106702

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：ゲル基質の軟らかさと粘性を利用した上皮シートの3次元組織構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 永 (Haga, Hisashi) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

本研究課題は、ゲル基質を用いて上皮細胞に腸管絨毛のような立体構造（チューリップハット様の構造）を形成させるシステムを構築することを目的とする。これまでに、上皮細胞をマトリゲル上に播種すると、上皮シートの辺縁部が内側に収縮し、ゲル基質を変形させながら回転運動を行い、絨毛構造を形成することを発見した。本研究では、この現象を組織再生の基礎技術とするために、①上皮シートの辺縁部が収縮する機構、②ゲル基質の粘性がもたらす効果、③シート全体が回転運動する機構の3点に焦点を当てて研究を遂行した。

また、リーダー細胞の出現による形態形成への機序解明と様々な粘性係数をもつ粘性基質の開発を行った。実験の結果、上皮間葉転移（EMT）を誘引する受容体を薬剤阻害してもチューリップハット構造の形成が阻害されることはなかった。リーダー細胞の出現、およびチューリップハット構造の形成にはEMTのシグナル経路は関与しないことが明らかとなった。また、粘性基質の開発については、シリコンオイルにPDMSを混ぜることで任意の粘性係数を実現することに成功した。粘性基質上に播種した上皮細胞が様々な形の突起構造、管状構造を形成することを発見した。さらに、従来法であるマトリゲルに架橋剤としてゲニピンを混ぜることで、任意の粘性係数をもつ新規のマトリゲル基質を開発した。ゲニピンの濃度を調節し、粘性係数を変えることで任意のサイズの突起構造を形成させることに成功した。

これらの結果は、平成27年度内にScientific Reports誌に原著論文として公開することができた。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計6 件)

- [1] Transgene integration into the human AAVS1 locus enhances myosin II-dependent contractile force by reducing expression of myosin binding submit 85, Takeomi Mizutani, Rui Li, Hisashi Haga, and Kazushige Kawabata, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.465, No.2, pp. 270-274, 2015
- [2] Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate, Misako Imai, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga, Scientific Reports, Vol. 5, 14208, pp.1-10, 2015
- [3] Compressive Stress Induces Dephosphorylation of the Myosin Regulatoru Light Chain via RhoA Phosphorylation by the Adenylyl Cyclase/Protein Kinase A Signaling Pathway, Kenji Takemoto, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga, PLoS ONE, Vol.10, No.3 e0117937, pp. 1-17, 2015
- [4] Leader Cells Regulate Collective Cell Migration via Rac Activation in the Downstream Signaling of Integrin Beta1 and PI3K, Naoya Yamaguci, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga, Scientific Reports, Vol. 5, 7656, pp.1-8, 2015
- [5] An Improved Method for Western Blotting When Extracting Proteins from Mammalian Cells Cultured on a Collagen Gel under Serum-free Conditions, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kazusige Kawabata, and Hisashi Haga, Cyotechnology ,09 Jul., 1-8, 2014
- [6] Epithelial Sheet Folding Induces Lumen Formation by Madin-Darby Canine Kidney Cells in a Collagen Gel, Sumire Ishida, Ryosuke Tanaka, Noya Yamaguchi, Genki Ogata, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga, PLoS ONE, Vol.9, No.8, e99655, 1-11, 2014

(2) 学会発表 (計1 件)

- [1] Collective migration of Madin-Darby canine kidney cells led by leader cells is dependent onRac1, integrin beta1, and PI3K, Naoya Yamaguchi, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga, 第66回日本細胞生物学会大会, 2014. 6. 13, 奈良県春日野町

(3) 図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A02

課題番号：26106703

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：マルチチャンネルコラーゲンゲルを用いた巨大再生組織の高速構築システムの開発

1. 研究組織

(1) 研究代表者

古澤 和也 (Furusawa, Kazuya) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

本研究課題では、複雑な階層構造をもつ巨大再生組織の高速構築システムの開発を目的としています。

この結果以下の成果を得られました。

項目 1. ミニ再生組織の構築方法の確立

本研究の目的を達成するために、多管構造を持つ粒子状のコラーゲンゲル (MCCG ビーズ) を用いました。MCCG ビーズの多管構造の表面に血管内皮細胞を播種することで、生体模倣的な血管構造を MCCG ビーズ内部に構築することができました。このことにより、酸素や栄養を組織内部まで輸送するための経路を MCCG に構築することができました。また、MCCG ビーズのゲル基質部分に肝臓がん由来の細胞を埋め込み、三次元的に培養する方法を確立することも出来ました。さらに、MCCG を用いて構築した再生組織の構造を制御することにも成功しております。

項目 2. 巨大再生組織の構築方法の確立

項目 1 の方法で構築したミニ再生肝がん組織を、厚さ 2mm、直径 8mm のディスク状 MCCG に埋め込むことで、ディスク状の再生組織を構築することに成功しました。さらに、ディスク状再生組織を厚み方向に積層することで直径 8mm、厚さ 6mm の巨大再生組織を構築することにも成功しました。この方法の利点は、ミニ再生組織自体の構造、ミニ再生組織のディスク状再生組織内での配列、ディスク状 MCCG 自体の多管構造、およびディスク状再生組織の積層の方法や順番などを制御することで、巨大再生組織の構造をマイクロメートルからセンチメートルまでの広い大きさの範囲で制御することができることです。このことにより、巨大再生組織の階層構造がその機能に与える影響を系統的に調査することが可能になりました。

項目 3. 構築した再生組織の構造と機能の相関を解明することで機能的な巨大再生組織の構築原理を確立

MCCG の構造制御技術と MCCG を用いた HepG2 細胞の三次元細胞培養技術を組み合わせることで、様々な

構造のミニ再生肝がん組織を構築しました。このミニ再生肝がん組織のアルブミン生成能を評価したところ、構造との有意な相関は観測されませんでした。この結果は、構築するミニ再生肝がん組織の構造によらずに一定の機能を持った再生組織が構築されることを示唆しております。肝組織の特徴をより再現するために、HepG2 細胞だけでなく類洞内皮細胞 (HSEC) と肝星細胞 (HSC) を MCCG 中で三次元培養したところ、培養期間の経過とともに組織の大きさや形態が変化する現象を見出しました。この現象は HepG2 だけを培養したときには観察されなかった現象で、HSEC や HSC による再生組織の組織リモデリング作用によって引き起こされたものと考えられます。このことは、MCCG の多管構造を各細胞の初期配置決定のための鋳型として利用し、そこから細胞自身の働きによって最適な組織形態が構築される可能性を示唆しており、新しい三次元再生組織の構築原理の確立につながると期待されます。

項目 4. 巨大再生組織の自動化と高速化を実現すること

シリンジポンプと三次元アクチュエーターを組み合わせることによってミニ再生組織を 25 個/分の速度で自動構築するシステムを開発することに成功しました。このことにより、オペレーターの技術的習熟度によらない再現性のよいミニ再生組織の高速構築が可能となりました。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計9 件)

- [1] Development of the evaluation system for barrier functions of engineered epithelial lumens, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, and Naoki Sasaki, *Regenerative Therapy*, Vol. 3, pp. 82–89, 2016
- [2] Heterogeneous filament network formation by myosin light chain isoforms effects on contractile energy output of single cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells, Takeomi Mizutani, kazuya Furusawa, Hisashi Haga, and Kazushige Kawabata, *Regenerative Therapy*, Vol. 3, pp. 90–96, 2016
- [3] Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate, Misako Imai, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga, *Scientific Reports*, Vol. 5, pp. 14208, 2015
- [4] Application of multichannel collagen gels in construction of epithelial lumen-like engineered tissues, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Hiromi Machino, Saki Yahata, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 1, pp. 539–548, 2015
- [5] Construction of engineered liver cancer tissues with multichannel collagen gel, Kazuya Furusawa, Masayuki Tsuchida, and Saki Yahata, 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), pp. 200–202, 2015
- [6] One-step microfluidic spinning of collagen microfibers and their application to cell cultivation, Sakiko Enomoto, Yuya Yajima, Yuki Watabe, Masami Yamada, Kazuya Furusawa, and Minoru Seki, 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), pp. 210–212, 2015
- [7] Universality and specificity in molecular orientation in anisotropic gels prepared by diffusion method, Yasuyuki Maki, Kazuya Furusawa, Sho Yasuraoka, Hideki Okamura, Natsuki Hosoya, Mari Sunaga, Toshiaki Dobashi, Yasunobu Sugimoto, Katsuzo Wakabayashi, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 108, pp. 118–126, 2014

- [8] Effects of a flow field on amyloid fibrillogenesis in a beta-lactoglobulin solution, Rajesh Kumar Sharma, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, Journal of Biological Macromolecules, Vol. 70, pp. 490-497, 2014
- [9] Control of structure of multi-channel collagen gel beads, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), pp1-3, 2014
- (2) 学会発表 (計15 件)
- [1] Construction of engineered liver cancer tissues with multichannel collagen gel, Kazuya Furusawa, Masayuki Tsuchida, Saki Yahata, 26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science(MHS2015), 2015. 11. 24, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- [2] One-step microfluidic spinning of collagen microfibers and their application to cell cultivation, Sakiko Enomoto, Yuya Yajima, Yuki Watabe, Masami Yamada, Kazuya Furusawa, and Minoru Seki, 26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2015), 2015. 11. 24, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- [3] Construction Method of Giant Engineered Tissues with Complex Hierarchical Structures, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics(AP Biomech 2015), 2015. 9. 18, 北海道大学 (北海道札幌市)
- [4] マルチチャンネルコラーゲンをを用いた三次元再生組織の構築, 古澤 和也, 土田 雅之, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第63回レオロジー討論会, 2015. 9. 23, 神戸大学 (兵庫県神戸市)
- [5] マルチチャンネルコラーゲンをを用いた巨大再生組織の構築, 古澤 和也, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第38回日本バイオレオロジー学会年会, 2015. 6. 6, 国立情報学研究所学術総合センター (東京都千代田区)
- [6] マルチチャンネルコラーゲンの形成機構に関する研究, 古澤 和也, 杉山 晃一, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第38回日本バイオレオロジー学会年会, 2015. 6. 6, 国立情報学研究所学術総合センター (東京都千代田区)
- [7] マルチチャンネルコラーゲンをを用いた上皮管腔様組織の構築, 古澤 和也, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第64回高分子学会年次大会, 2015. 5. 28, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- [8] マルチチャンネルコラーゲンをを用いた三次元培養システム, 八幡 早紀, 古澤 和也, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第64回高分子学会年次大会, 2015. 5. 28, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- [9] マルチチャンネルコラーゲンをを用いた巨大再生組織の構築技術の確立, 古澤 和也, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第14回日本再生医療学会, 2015. 3. 19, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- [10] 軟骨組織再生のための細胞足場としてのマルチチャンネルコラーゲンを, 古澤 和也, 上田 和貴, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第24回日本MRS年次大会シンポジウム, 2014. 12. 11, 横浜市開港記念会館 (神奈川県横浜市)
- [11] Control of structure of multi-channel collagen gel beads, Kazuya Furusawa, Akimasa Fukui, Naoki Sasaki, 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), 2014. 11. 11, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- [12] マルチチャンネルコラーゲンをを用いた再生肝組織の構築と細胞の浸潤, 古澤 和也, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第62回レオロジー討論会, 2014. 10. 15, 地域交流プラザ (福井県福井市)
- [13] 透析によって調製される異方性コラーゲンの形成機構と構造の研究, 古澤 和也, 第37回日本バイ

オレオロジー学会年会, 2014. 6. 6, 大宮ソニックシティビル (埼玉県大宮市)

[14] マルチチャンネルコラーゲンゲルを用いた上皮管腔構造の構築, 古澤 和也, 町野 ひろみ, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第37回日本バイオレオロジー学会年会, 2014. 6. 6, 大宮ソニックシティビル (埼玉県大宮市)

[15] 異方性DNAゲルの形成動力学と構造制御, 古澤 和也, 福井 彰雅, 佐々木 直樹, 第37回日本バイオレオロジー学会年会, 2014. 6. 5, 大宮ソニックシティビル (埼玉県大宮市)

(3) 図書 (計1 件)

[1] Editor:Toshiaki Dobashi and Rio Kita, Author of Chapter12: Kazuya Furusawa, “Chapter12 Control of the Multi-Scale Structure of Scaffolds and its Application in Tissue Engineering” in “Nano/Micro Science and Technology in Biorheology: Principles, Methods, and Application” Edited by Dobashi Toshiaki and Rio Kita, Springer, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A02

課題番号：26106705

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：酸化ストレスによって引き起こされる細胞システムの形態変化解析とその問題解決

1. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 豊 (Ikeda, Yutaka) 筑波大学・数理物質科学研究科・研究員

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,800,000	840,000	3,640,000
平成27年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	5,800,000	1,740,000	7,540,000

3. 研究成果

再生医療や細胞治療分野においては生体より採取した細胞を高純度化し、採取した細胞の機能及び形態を維持した培養技術が求められている。培養中に生じた過剰な活性酸素種はミトコンドリアの酸化還元電位を乱し、細胞の形態を変化させる。我々はこれまでに細胞培養環境において生じる過剰な活性酸素種を除去する培養基材を開発し、これがミトコンドリアの膜電位を変えず、高活性な細胞状態を保つ事を示してきた。本発表では更に展開し、マウス胎児より採取した造血幹細胞を高純度で分別し、未分化性を維持したまま培養する技術の開発を試みた。これまで抗体を固定した磁気ビーズ等による目的細胞の精製が行われてきたものの、抗体の活性低下や細胞の非特異的接着などのため、その選別効果は必ずしも十分とはいえず、回収した細胞も分離器材との接触などにより、期待しない分化や細胞機能及び生存率低下を招くことが問題であった。我々は、細胞の非特異的接着抑制機能と接触等によって生じる活性酸素の除去機能を併せ持つ表面を抗体固定表面に創り込んだ新しい分離基材を設計した。造血幹細胞の未分化マーカーであるCD34に対する抗体と表面処理剤を細胞培養基材に共固定し、マウス胎児から採取した造血幹細胞を培養した。この結果、固定した抗体の機能が維持され、細胞がより高度に純化されるとともに、細胞の未分化性も維持している事が確認された。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計2件)

[1] A novel biointerface that suppresses cell morphological changes by scavenging excess reactive

oxygen species, Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Yukio Nagasaki, Journal of Biomedical Materials Research, Part A, Vol.103, Issue 9, 2815-2822, 2015.

[2] Design of antioxidative biointerface for separation of hematopoietic stem cells with high maintenance of undifferentiated phenotype, Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Journal of Biomedical Materials Research: Part A, Volume 104, Issue 8, 2080-2085, 2016.

(2) 学会発表 (計15 件)

[1] Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Design and construction of oxidative stress-free cell culture system, 8th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (Halon, Vietnam)

[2] Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Impact of scavenging oxidative stress during cell culture on the maintenance of cellular properties, The 2nd International Conference on NanoMaterials for health energy and the environmen (ICNM2016), Mauritius

[3] Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Impact of scavenging oxidative stress during cell culture on the maintenance of cellular properties, APA International Conference on Advanced Polymers, Biomaterials, Bioengineering and Nano Drug Delivery, Mauritius

[4] Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Kouya Akasaka, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, A novel design of biointerface suppressing immune response on the substrate surfac, 11th Intrnational Polymer Conference (IPC2016), Fukuoka, Japan

[5] Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Construction of oxidative stress-free cell culture system to maintain cellular morphology, 10th World Biomaterials Congress, WBC (Montreal, Canada)

[6] Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Control of Undesired Cell Dysfunctions by ROS-scavenging Biointerfaces, 3rd Intrnational Symposium on Biomaterials Science (ICBS2016) University of Tokyo, Tokyo

[7] Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Construction of oxidative stress-free cell culture system for the separation of stem cells and the maintenance of separated cell properties, Society for Redox Biology and Medicine (SFRBM2016) (Hyatt Regency, San Fransisco, USA)

[8] 池田 豊、吉成友貴、赤坂幸也、三好浩稔、長崎幸夫、基材表面における免疫反応を抑制する新規コーティング材料の設計と評価、第65回高分子学会討論会、神奈川大学、横浜、神奈川

[9] 池田 豊、赤坂幸也、長崎 幸夫、金属材料表面における血液凝固反応を抑制する新規材料開発、第69回日本酸化ストレス学会学術集会 (仙台国際センター、仙台)

[10] 池田 豊、赤坂幸也、長崎幸夫、抗血栓機能を有する金属コーティングポリマーの開発、第45回医用高分子シンポジウム、産総研臨海副都心センター、東京

などその他含め計15件

(3) 図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計1 件）

名称：リン酸残基を有するニトロキシラジカル含有共重合体及びその使用

発明者：池田豊、長崎幸夫、赤坂幸也

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：特願-2015-234005

国内外の別：国内

公募研究 A02

課題番号：26106709

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：免疫抑制剤の不要な移植を目指した患者由来細胞と膵島の3次元複合体の創製

1. 研究組織

(1) 研究代表者

寺村 裕治 (Teramura, Yuji) 東京大学・バイオエンジニアリング専攻・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

A02 班寺村グループでは、レシピエント由来の細胞を利用して、生きた細胞により膵ランゲルハンス島（膵島）との3次元複合体を構築して、移植後の免疫拒絶反応を抑制できる生体適合性の高いバイオ人工膵臓を開発した。両親媒性高分子である DNA—ポリエチレングリコール結合脂質（DNA-PEG 脂質）を利用して、膵島表面に異種細胞である血管内皮細胞、線維芽細胞などの様々細胞との3次元複合化に成功した。特に、異なる細胞同士の細胞接着を詳細に調べ、細胞を自在に接着制御できる DNA-PEG 脂質の開発に成功した (Y. Teramura *Biomaterials* 2015)。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計2件) うち査読付論文 (計2件)

[1] Yuji Teramura, Kohei Kuroyama, Madoka Takai, Influence of molecular weight of PEG chain on interaction between streptavidin and biotin-PEG-conjugated phospholipids studied with QCM-D, *Acta Biomaterialia*, Vol.30, pp135-143, 2016.

[2] Yuji Teramura, Cell surface modification with ssDNA-PEG-lipid for analysing intercellular interactions between different cells, *Biomaterials*, Vol.48, pp.119-128, 2015

(2) 学会発表 (計4件)

[1] Yuji Teramura, 1st International Conference on Immune Responses to Biosurfaces: Mechanisms and Therapeutic Interventions, Chania, Greece, (H26/9/27-H26/26/10)。

(3) 図書 (計1件)

[1] 寺村裕治 「糖尿病治療を目指した生体適合性の高い三次元膵島複合体の構築」 3次元細胞システム設計論 (バイオアセンブラシリーズ2巻) コロナ社

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0件)

公募研究 A02

課題番号：26106719

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：磁気細胞操作技術による高速3次元細胞システム構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

井藤 彰 (Ito, Akira) 九州大学・大学院工学研究院・准教授

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

本研究は、磁性ナノ粒子と磁力を用いたことで、「遺伝子修飾工程」と「三次元組織構築工程」のプロセスを高速化し、それらをまとめて一連の「磁気細胞操作技術による高速3次元細胞システム」を完成することを目的に行った。申請書の内容にしたがい、研究期間中に以下の成果を挙げた。

1) 遺伝子修飾工程：磁力を用いた遺伝子導入法「マグネトフェクション法」の開発を行った。正電荷脂質包埋型磁性ナノ粒子を作製し、これをレトロウイルスベクターに添加して、iPS細胞に磁力で引き寄せることで、磁力なしの場合と比較して、約4倍遺伝子導入効率が上昇した。また、遺伝子回路構築および遺伝子導入細胞構築において、以下の成果を挙げた。①磁場応答型遺伝子発現システムの開発：血管新生遺伝子としてVEGFとANG1に着目した。VEGFとANG1は強力な血管新生誘導因子であるが、体内で細胞にVEGFを持続的・構成的に発現させると、新生した血管の透過性が過剰になってしまうという報告がある (Zangi et al. Nat Biotechnol. 31. 898-907, 2013)。一方、ANG1の発現はVEGFの血管透過性亢進を妨げる。我々はHSP70B'プロモーターを基にした合成生物学的アプローチによって、温度上昇を引き金に、一過性に高発現するシステムを含む遺伝子回路 (VEGF用) と、一度スイッチが入ると持続的に高発現する遺伝子回路 (ANG1用) をそれぞれ設計・作製した。さらに、レトロウイルスベクターを用いてHeLa細胞やC2C12細胞に導入し、加温後にレポーター遺伝子の発現解析を行うことで、それぞれの遺伝子発現システムの構築に成功した。②低酸素応答型遺伝子発現システムの開発：組織を構築した際に低酸素となった部分が遺伝子発現するシステムとして、低酸素誘導型RTP801プロモーターを用いて、Tet-Onシステムと組み合わせることで、三次元組織内における低酸素環境下で目的遺伝子を高発現するシステムを構築した。③遺伝子工学的手法による細胞の磁化法の開発：磁性ナノ粒子は交流磁場中で発熱するため、磁性ナノ粒子を細胞内に導入することで、磁場をスイッチとしてHSP70B'プロモーターを介した遺伝子発現誘導が可能となる。

我々は、遺伝子工学的なアプローチとして、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンの遺伝子に着目して研究を行った。遺伝子導入 48 時間後にベルリンブルー鉄染色を行ったところ、細胞が青く染色された。また、遺伝子導入細胞をペレットにして交流磁場を照射したところ、ペレットの発熱がみられた。これらの結果から、フェリチン遺伝子を用いた合成生物学的アプローチによって、細胞を加温することが可能であり、治療遺伝子の発現をコントロール可能であることが示唆された。

2) 三次元組織構築工程：三次元細胞システムの構築として、磁力を用いて遺伝子導入筋組織を構築し、機能する（強い収縮力を示す）三次元筋組織を構築した。筋分化を促進する IGF-I 遺伝子と細胞内部の低栄養/低酸素状態でのアポトーシスを阻害する Bcl-2 遺伝子を筋芽細胞に共導入することで、高筋分化かつ高細胞密度の三次元筋組織を作製することに成功した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計4 件)

- [1] Kazushi Ikeda, Akira Ito, Masanori Sato, Shota Kanno, Yoshinori Sato, Masamichi Kamihira, Effects of heat stimulation and L-ascorbic acid 2-phosphate supplementation on myogenic differentiation of artificial skeletal muscle tissue constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* in press, 2017
- [2] Kazushi Ikeda, Akira Ito, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Improved contractile force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs by IGF-I and Bcl-2 gene transfer with electrical pulse stimulation. *Regenerative Therapy* Vol. 3 pp. 38-44, 2016
- [3] Masanobu Horie, Akira Ito, Takeshi Maki, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Magnetic-labeled feeder system for mouse pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 119 pp. 614-616, 2015
- [4] Akira Ito, Masahiro Yamamoto, Kazushi Ikeda, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Effects of type IV collagen on myogenic characteristics of IGF-I gene-engineered myoblast cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 119 pp. 596-603, 2015

(2) 学会発表 (計4 件)

- [1] 池田一史、井藤 彰、佐藤流暢哲、河邊佳典、上平正道「遺伝子導入筋芽細胞を用いた人工骨格筋組織の機能強化」化学工学会第81回年会 2016年3月13日-15日 大阪市
- [2] 井藤 彰「磁性ナノ粒子を用いたティッシュエンジニアリング」新学術領域バイオアセンブラ第8回公開シンポジウム 2015年3月24日 東京都
- [3] 佐藤智詠、井藤 彰、河邊佳典、上平正道「低酸素応答細胞センサーの開発」化学工学会第46回秋季大会 2014年9月17日-19日 福岡市
- [4] 小野章彦、井藤 彰、鈴木大雅、山口雅紀、河邊佳典、上平正道「DNAダメージ誘導型遺伝子発現システムを用いた細胞センサーの開発」第66回日本生物工学会大会 2014年9月9日-11日 札幌市

(3) 図書 (計1 件)

- [1] 井藤 彰, 三次元細胞システム設計論 (2.3 磁気細胞操作技術による3次元細胞組織の構築, pp. 38-49), コロナ社, 2016

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計0件）

公募研究 A03

課題番号：24106502

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：3次元形態形成過程における細胞基質間および細胞細胞間の力学場測定

1. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷武臣 (Mizutani, Takeomi) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

3次元構造を持った組織や臓器を細胞集団が運動しながら形成していく際には、ケモアトラクタントのような生化学的な因子の拡散現象だけでは、細胞集団の運動を説明することは不十分である。細胞が出す力やそれに伴う歪などの物理学的な因子が細胞集団の運動を説明してくれるのではとの仮説の下、研究を進めている。新たな測定・解析手法を用いて、細胞運動における物理学的な要因を調べてゆくことが重要だと考える。そこで本研究では、細胞や細胞外基質を蛍光標識し、その動きをライブセルイメージングし、画像群に含まれる輝度情報、位置情報、時間情報を数値解析することにより、細胞内外に発生した力や歪を測定することに成功した。そしてこれを研究セミナー等で発表し、高い評価を受けた。また、上皮細胞の極性を左右する因子と細胞間の接着力が変化することを発見し、投稿論文に発表した(2014 T. Mizutani, et al., *Histochem Cell Biol*)。更に、上皮細胞集団が新たな細胞-細胞間接着を形成する際の力学量を原子間力顕微鏡で測定することに成功している(2013 R. Tanaka, T. Mizutani, et al., *Jpn J Appl Phys Conf Proc*)。これらの研究成果は、細胞集団が運動する際の数理モデルを構築するうえで重要な情報である。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計4件) うち査読付論文 (計4件)

[1] T. Mizutani, K. Takeda, H. Haga, M. Todo, K. Kawabata, Modulation of extracellular conditions prevents the multilayering of the simple epithelium, *Histochemistry and Cell Biology*, Vol. 141(5), (2014) 459-471.

[2] R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata, Tempo-Spatial Change of Cellular Stiffness and Geometry in the Process of Developing Epithelial Cell-Cell Adhesion Measured by Atomic Force Microscopy, Japanese Journal of Applied Physics Conference Proceedings, Vol. 1 (2013) 011004 (7 pages).

(2) 学会発表 (計2 件)

- [1] 水谷 武臣、細胞の力学コミュニケーション、東京女子医大グローバルCOEセミナー、2013年 東京都 新宿区 東京女子医大
- [2] 水谷 武臣、細胞の力学コミュニケーション、大阪府立母子保健総合医療センター研究所セミナー、2013年 大阪府和泉市 大阪府立母子保健総合医療センター研究所

(3) 図書 (計1 件)

- [1] Takeomi Mizutani and Ryosuke Tanaka, Tempo-Spatial Dynamics of Cellular Mechanics, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, pp. 295-304, Springer, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A03

課題番号：24106506

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：Organ-Explant-Chipにおけるバイオニックシミュレータ

1. 研究組織

(1) 研究代表者

益田 泰輔 (Masuda, Taisuke) 名古屋大学・大学院工学研究科・助教

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

再生医療や創薬研究において、作業の効率化や動物実験等の実施が難しくなっている等の理由から、生体機能の一部を模倣することが可能なバイオニックシミュレータが必要とされている。本研究は、生体から摘出した器官をマイクロ流体チップに外植し、生体機能の一部を機械システムと融合させて継続的な機能維持を図る“Organ-Explant-Chip”を新たに提案する。

24年度は、代替実験動物の候補動物として推奨されており、比較的人間の循環器系に近い構造を有するニワトリ胚に着目し、ニワトリ胚の心臓を用いた Organ-Explant-Chip によるバイオニックシミュレータの構築を行った。ニワトリ胚から摘出した心臓の機能を生体外環境で長期維持させるためには、栄養及び酸素の供給が重要である。ここでは、大動脈/静脈血管と人工のマイクロ流路を接続するために血管吸引誘導固定法 (Suction-Induced Vascular Fixation Method : SVF 法) を新たに提案し、外植した心臓に繋がる複数の血管を一括で位置決め、ならびにマイクロ流路への接続を行った。血管吸引誘導固定デバイスは、ミリオーダーの厚みを必要とする血管を吸引誘導する縦穴の部分とマクロオーダーの加工精度を要する吸引固定するチャンネルの部分の加工を同時に達成するため、鋳造技術とフォトリソグラフィを組み合わせたレイヤーファブリケーション法によって作製した。作製したデバイスを用いて外植したニワトリ胚の心臓とマイクロチューブ (外径 0.5 mm) とを接続した様子について示す。接続部には生体用接着剤 (ダーマボンド) を用いている。吸引機構を有するデバイスを用いた接続によって、各血管の位置決めが容易に行え、作業時間が短縮を図れただけでなく、血管同士の癒着を防ぐことができた。

25年度は、昨年度提案したニワトリ胚の心臓を用いる Organ-Explant-Chip によるバイオニックシミュレータを利用して、心臓の循環系を再構築し、薬剤投与に伴う拍動変化を画像処理によって計測した。交感神経を刺激する心臓作動薬としてはアドレナリン作動薬であるイソプロテレノール(ISO)を、副交感神経

を刺激する試薬としてはコリン作動薬であるカルバコール(CHH)を用いた。交感神経の活性化は、房室結節より活動電位を発生する頻度が高まり、心拍数が上昇する。一方、副交感神経の活性化は、心拍数・心筋の収縮力が低下する。アドレナリン作動薬である ISO 0.1 μM を循環 (10 $\mu\text{L/s}$) させ場合、外植した心臓の心拍数は 80 times/min となりコントロール (40 times/min) と比較して約2倍増大した。一方で、コリン作動薬である CHH 0.1 μM を循環 (10 $\mu\text{L/s}$) させた場合、心拍数は 30 times/min となった。このことから、外植した心臓が通常的心臓と同じ機能を維持していることが確認された。さらには、試薬濃度において心臓の心拍数に変化を生じさせることができたことから、生体器官を用いたバイオニックシミュレータとしての応用可能性も確認することができた。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計4 件)

- [1] Taisuke Masuda, Natsuki Takei, Takuma Nakano, Takahisa Anada, Osamu Suzuki, Fumihito Arai, A microfabricated platform to form three-dimensional toroidal multicellular aggregate, *Biomedical Microdevices*, 14, pp. 1085-1093, 2012
- [2] Hirofumi Owaki, Taisuke Masuda, Tomohisa Kawahara, Kota Miyawaki, Toshio Ogura, Fumihito Arai, Concurrent Connection of Embryonic Chick Heart Using a Microfluidic Device for Organ-Explant-Chip, *Procedia CIRP*, 5, pp. 205-209, 2013
- [3] Taisuke Masuda, Yuka Yamagishi, Natsuki Takei, Hirofumi Owaki, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Fumihito Arai, Three-dimensional assembly of multilayered tissues using water transfer printing, *Journal of Robotics and Mechatronics*, 25(4), pp. 690-697, 2013
- [4] 益田泰輔, オンチップバイオミネラリーゼーションの実現にむけて, *生物工学会誌*, 2014

(2) 学会発表 (計10 件)

- [1] 大脇浩史, 益田泰輔, 川原知洋, 宮坂恒太, 小椋利彦, 新井史人, マイクロ流体デバイスを用いたニワトリ胚心臓の微小血管接続法, *日本ロボット学会第30回記念学術講演会*, 札幌, 2012
- [2] Hirofumi Owaki, Taisuke Masuda, Tomohiro Kawahara, Natsuki Takei, Keiko Miwa-Kodama, Kota Miyasaka, Toshihiko Ogura, Fumihito Arai, Organ-explanted bionic simulator (OBiS): concurrent microcardiovascular anastomosis of chick embryo, 2012 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS2012), Algarve, 2012
- [3] Hirofumi Owaki, Taisuke Masuda, Tomohiro Kawahara, Kota Miyasaka, Toshihiko Ogura, Fumihito Arai, Simple and rapid connection of chicken embryonic cardiovascular system, 2012 IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2012), Nagoya, 2012
- [4] 大脇浩史, 益田泰輔, 川原知洋, 宮坂恒太, 小椋利彦, 新井史人, Organ-Explant-Chipにおけるバイオニックシミュレータ, *日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会*, つくば, 2013
- [5] Hirofumi Owaki, Taisuke Masuda, Tomohiro Kawahara, Kota Miyasaka, Toshihiko Ogura, Fumihito Arai, All-in-one microfluidic device for microvascular connection, 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2013), Taipei, (2013)
- [6] 山岸由佳, 益田泰輔, 大脇浩史, 明石満, 新井史人, 三次元アセンブリされた積層細胞のオンチップ培養評価システム, *日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会*, 13, つくば, 2013
- [7] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Hirofumi Owaki, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Fumihito Arai,

Fabrication of multilayer structured tubular tissue using water transfer printing, 2013 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation (ICMA2013), Takamatsu, 2013

- [8] 益田泰輔, 山岸由佳, 大脇浩史, 明石満, 新井史人, 3次元組織化された血管様管状組織による循環培養システム, 日本機械学会2013年度年次大会, 岡山, 2013
- [9] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Hirofumi Owaki, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Fumihito Arai, Microfluidic perfusion cultivation system for multilayer structured tubular tissue, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS2013), Freiburg, 2013
- [10] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Natsuki Takei, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Fumihito Arai, Circulatory culture system for multilayer structured tubular tissues, 2013 IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2013), Nagoya, 2013

(3) 図書 (計1 件)

- [1] 益田泰輔, In vitro毒性・動態評価の最前線/ マイクロ・ナノシステムによる三次元組織体の構築, シーエムシー出版, 2013

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A03

課題番号：24106507

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：各種石灰化形成における細胞動態の解析とそれを利用した生体外石灰化モデルの構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 隆典 (Kihara, Takanori) 北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

(2) 研究協力者

古谷 由香里 (Furutani, Yukari) 北九州市立大学・国際環境工学部・実験補助者

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

生体内の様々な部位で生じる正常・異所性石灰化の形成機構・形成制御について統一的に検討する系を構築することができれば、広く生体内石灰化機構の解明とその制御に大いに資する。本研究では、細胞培養系で生じる石灰化を生体内で生じる様々な石灰化組織の再現系として捉え、各種生体内石灰化現象を生体外にて解析するための方法論の提案を目指す。

まず、生体外で様々な細胞によって形成される石灰化を統一的に検討するための、独自の石灰化シミュレーターの構築を行った。このシミュレーターは、細胞の動態をパラメーターとし、in silico 空間で二次元的にマクロに石灰化をシミュレートするものである。また、グラフィカルユーザーインターフェースを採用することで、パラメーター調整と結果の確認が容易になるものとした。

次に、ラット間葉系幹細胞や骨肉腫細胞といった石灰化形成細胞を用いて、骨芽細胞への分化・石灰化組織の形成について経時的にその過程を観察することで、それぞれの細胞腫の骨芽細胞分化・石灰化形成の特徴の明確化を行った。さらにこれら経時的な過程から、シミュレーターで利用するいくつかの細胞動態パラメーターを決定した。

経時的な観察により得られたこれら細胞の骨芽細胞分化・石灰化形成過程をモデルとし、作成したシミュレーターを用いてその過程の再現を行った。これにより、これら細胞の骨芽細胞分化・石灰化の動態を再現するための、各種細胞動態パラメーターの同定に成功した。

さらに、作成した石灰化シミュレーターを用いてヒト間葉系幹細胞の石灰化形成過程の解析を行った。ヒト間葉系幹細胞は個人差が大きいことから3人のドナーの細胞を実験に用いた。まず、ヒト間葉系幹細

胞を培養条件下で石灰化させ、それぞれの細胞の石灰化過程の画像を取得した。得られた画像から骨芽細胞数と石灰化領域を算出し、経時的な細胞数と石灰化領域の変化をそれぞれのドナー細胞に対して得た。これらの数値データおよび画像データを再現可能なパラメーターの値を石灰化シミュレーターによって解析した。3 ドナー全てに共通するパラメーターとして、ヒト間葉系幹細胞は細胞間相互作用が大きく、さらに骨芽細胞への分化も早期に生じていることが明らかとなった。特に細胞分化は幹細胞からの分化が生じやすいことが原因であると考えられた。また、分化した骨芽細胞からの石灰化形成は抑制されており、特に石灰化拡大のパラメーターは極度に抑制されていた。

さらに、作成した石灰化シミュレーターを改変し、癌細胞の正常細胞への浸潤の過程を解析するためのシミュレーターも作成した。

本研究では、石灰化現象を統一的に解析するプラットフォーム、さらには癌細胞の浸潤課程を解析するためのシミュレーターの構築に成功した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計3 件)

- [1] Shinohara, S., Kihara, T., Sakai, S., Matsusaki, M., Akashi, M., Taya, M., Miyake, J., Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, *J. Biosci. Bioeng.*, 116 (2), 231-234 (2013)
- [2] Kihara, T., Ito, J., Miyake, J., Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy, *PLoS ONE*, 8 (11), e82382 (2013)
- [3] Haghparast, S. M., Kihara, T., Shimizu, Y., Yuba, S., Miyake, J., Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells, *J Biosci Bioeng*, 116 (3), 380-385 (2013)

(2) 学会発表 (計10 件)

- [1] 木原隆典, 古谷由香里, 細胞による三次元空間内での石灰化制御メカニズム, 第36回日本分子生物学会年会, Dec 3-6, 2013, 神戸
- [2] 木原隆典, 柏谷康介, 鈴木達郎, 弓場俊輔, 三宅淳, 石灰化シミュレーターによる培養骨組織の解析, 第45回日本結合組織学会学術大会 第60回マトリックス研究会大会 合同学術集会, Jun 28-29, 2013, 和歌山
- [3] 木原隆典, 柏谷康介, 鈴木達郎, 弓場俊輔, 三宅淳, シミュレーションを利用した培養石灰化組織のプロセス解析, 第65回日本生物工学会大会, Sep 18-20, 2013, 広島
- [4] Shinohara, S., Kihara, T., Sakai, S., Taya, M., Miyake, J., Fabrication of in vitro blood vessel inflammation model for dynamic analysis of atherosclerosis, *Biosensors2012*, 2012. 5.
- [5] 鈴木達郎, 木原隆典, 柏谷康介, 弓場俊輔, 三宅淳, 培養骨組織形成シミュレータ Sim-Culture bone を用いた石灰化形成現象の解析, 第 64 回日本生物工学会大会, 2012. 10.
- [6] 篠原翔, 木原隆典, 境慎司, 田谷正仁, 三宅淳, ゼラチンゲルを基質として用いた血管様構造体の構築, 第 64 回日本生物工学会大会, 2012. 10.

などその他含め計10件

(3) 図書 (計2 件)

- [1] Shinohara, S., Shinohara, S., Kihara, T., Miyake, J., Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells, Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans, Sugi, H. (ed), InTech, pp331-344 (2012)
- [2] Kihara, T., Three-Dimensional Mineralized Tissue Formation of Cultured Bone Marrow Stromal Cells, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Arai, T., Arai, F., Yamato, M. (ed), Springer, pp 317-326 (2015)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A03

課題番号：24106508

研究期間：平成24年～平成25年

研究課題名：三次元腺組織の *in vitro* 作製と組織形態形成におけるメカニクス理解

1. 研究組織

(1) 研究代表者

松本卓也 (Matsumoto, Takuya) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

(2) 研究協力者

Sathi Gulsan Ara 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 特別研究員

武田宏明 (Taketa, Hiroaki) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 医員

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成25年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成26年度			
平成27年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

3. 研究成果

本研究では、細胞、組織周囲環境 (生体擬似的物理化学的環境) を *in vitro* にて再現、三次元細胞集合体 (腺上皮細胞) の自己組織化を誘導し、三次元生体組織 (腺組織) の *in vitro* での作製ならびにその制御を試みている。平成24年度、25年度はフィブロネクチンの微小細胞接着モチーフである GRGDS ペプチドを固定化したゲル基板の作成とその最適化、このゲル上での腺組織形態変化、神経細胞の伸長変化、ゲルビーズを用いた組織形態制御を行った。

1. 三次元細胞塊を包埋するためのゲルビーズ作製方法を開発：

三次元細胞塊からの組織誘導や生成組織の形態制御においてゲルビーズは利用価値が高い。そこでゲルビーズを大量に短期間で製作するための装置を開発した。細胞を含むアルギン酸溶液もしくはアガロース溶液を銃口から吐出する際、周囲の流速を変えることで作製ビーズのサイズ制御に成功した。これにより 50-250 μm の任意サイズのゲルビーズを短期間に大量に作製できるようになった。(K. Rahman ら 3D printing & Additive Manufacturing, 2015)

2. 生体組織成長促進ゲルの開発：

堅さの異なるアガロースゲルを用いた硬組織培養によりマウス骨端部二次石灰化領域における迅速な石灰化誘導に成功した。この迅速石灰化には最適値があり、ヤング率で 10 kPa において最も高い石灰化効率が確認された。(G. Sathi ら Tissue Eng C, 2015)

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文発表（その他を含め学術論文合計6件 すべて査読有）

- [1] Rahman KA, Sathi GA, Taketa H, Farahat M, Okada M, Torii Y, Matsumoto T. Novel 3D printing device for the simple preparation of hydrogel beads. *3D printing*. 2 (2015) 5-11
- [2] Hara ES, Ono M, Hai PT, Sonoyama W, Kubota S, Takigawa M, Matsumoto T, Young MF, Olsen BR, Kuboki T. Fluocinolone acetonide is a potent synergistic factor of TGF- β 3-associated chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for articular surface regeneration. *J Bone Miner Res* 30 (2015) 178-184 doi: 10.1002/jbmr.2502
- [3] Sasaki J, Matsumoto T, Imazato S. Oriented bone formation using biomimetic fibrin hydrogels with three-dimensional patterned bone matrices. *J Biomed Mater Res A* 103 (2015) 622-7 doi: 10.1002/jbm.a.35212
- [4] Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki JI, Uruguchi S, Yatani H. Application of cyclic strain for accelerated skeletal myogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with cell alignment. *Tissue Eng A*, 19 (2013)770-782
- [5] Sasaki J, Matsumoto T, Nishiguchi M, Matsusaki M, Egusa H, Nakano T, Akashi M, Imazato S, Yatani H. In vitro reproduction of endochondral ossification using 3D cell constructs. *Integr Biol*, 4 (2012) 1207-1214

(2) 学会発表（その他を含め国際会議発表4件、国内会議発表4件）

- [1] Matsumoto T., “Manipulation of gland tissue morphogenesis by using hydrogel”, IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, (Osaka, Japan), Jul. 2013 (Invited)
- [2] Matsumoto T., “Hydrogel-based biomimetic environment for in vitro cell and tissue manipulation”, Interface Oral Health Sciences, Sendai, Japan, Jan, 2014 (Invited)
- [3] Matsumoto T., “Control of submandibular gland morphogenesis using alginate hydrogel”, TERMIS-AP, Sep, 2014. (Invited)

(3) 図書（その他を含め4件）

- [1] 松本卓也 骨組織、骨組織再生研究の最先端 バイオマテリアル研究の最先端（2014）日本金属学会編 207-208
- [2] 松本卓也 細胞ならびに細胞外基質制御研究の最先端 バイオマテリアル研究の最先端（2014）日本金属学会編 221-222、225-226
- [3] 松本卓也 三次元腺構造の作製 細胞の三次元組織化(2013) メディカルドゥ社 288-292

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計0件）

公募研究 A03

課題番号：26106704

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：細胞アセンブルに向けた力学場計測

1. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷武臣 (Mizutani, Takeomi) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	5,400,000	1,620,000	7,020,000

3. 研究成果

細胞を用いて臓器のような3次元形状を形成するために、細胞を人為的操作によって任意の形に積み重ねていく方法、細胞が持つ性質を利用して構造体を形成させる方法、が提案され、研究が進められている。後者の方法の場合、細胞や細胞集団による運動性と力学性質を理解することは大変重要である。このために本研究では、①ゲノム編集した細胞での力学性質と運動性の評価、②モデル上皮細胞株を用いた集団的運動性の機構解明、③iPS細胞由来の心筋細胞での力学性質の機構解明、にそれぞれ取り組んだ。

①では、ヒト AAVS1 遺伝子座への遺伝子改変には、細胞の力が変化することを明らかにした(2015 T. Mizutani, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications)。AAVS1 領域への遺伝子改変は細胞に影響が出にくいとされているが、本研究ではミオシン分子の活性の変化により細胞の力が変化することを実験的に示した。更に、AAVS1 領域に遺伝子改変を加えた細胞と野生型の細胞との間での移動速さの違いを計測した。有意な違いを計測できなかったものの、野生型の移動速さが高い傾向にあった(2016 T. Mizutani, et al., Data in Brief)。

②では、細胞-基質間に発生する力を評価する技術、細胞集団における細胞の各細胞の核の位置の時間変化を計測する技術を構築し、それらに基づいた研究成果を発表した(2015年 水谷武臣、バイオアセンブラシンポジウム；2015年 水谷武臣、第17回次世代医工学研究会)。

③では、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞に対して、心拍エネルギーの計測に成功した(2016 T. Mizutani, et al., Regenerative Therapy)。iPS 心筋細胞内には、心筋型のミオシンによる繊維と非心筋型のミオシンによる繊維が存在し、非心筋型のミオシンの繊維が拍動の抵抗となっていることを明らかとした。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計4 件) うち査読付論文 (計4件)

- [1] T. Mizutani, K. Furusawa, H. Haga, K. Kawabata, Heterogeneous Filament Network Formation by Myosin Light Chain Isoforms Effects on Contractile Energy Output of Single Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Regenerative Therapy*, Vol.3 (2016) 90-96.
- [2] K. Furusawa, T. Mizutani, N. Sasaki, Development of the evaluation system for barrier functions of engineered epithelial lumens, *Regenerative Therapy*, Vol.3 (2016) 82-89.
- [3] T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata, Data set for comparison of cellular dynamics between human AAVS1 locus-modified cells and wild type cells, *Data in Brief*, Vol.6 (2016) 793-798.
- [4] T. Mizutani, R. Li, H. Haga, K. Kawabata, Transgene Integration into the Human AAVS1 Locus Enhances Myosin II-Dependent Contractile Force by Reducing Expression of Myosin Binding Subunit 85, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.465(2) (2015) 270-274.

(2) 学会発表 (計2 件)

- [1] 水谷 武臣、細胞運動のメカニズム解明に向けた多次元力学計測、バイオアセンブラシンポジウム 2015年 豊中市
- [2] 水谷 武臣、力学計測による細胞運動へのアプローチと応用展開、第17回次世代医工学研究会 2015年 登別市

(3) 図書 (計1件)

- [1] 水谷 武臣, 3次元化細胞の力学, 細胞社会学, コロナ社, 2016

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A03

課題番号：26106711

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：大脳組織修復をめざすニューロン・グリア・血管内皮細胞の生体外三次元構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

味岡 逸樹 (Ajioka, Itsuki) 東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授

2. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

損傷を受けた脳は再生しないと長く考えられてきたが、成体脳における神経幹細胞の発見をきっかけに、脳の再生医療実現化も現実味を帯びてきた。その実現化にむけた戦略として、成体の神経幹細胞から生み出された新生ニューロンを損傷領域に再配置させ、機能回復をめざす戦略が注目を浴びている。最近の研究により、脳が損傷を受けると、内在性の神経幹細胞から産み出された本来嗅球へと向かって遊走するニューロンが、脳の損傷領域に向かって遊走することが明らかとなってきた。さらに、ニューロンは血管を足場として遊走することも明らかとなってきた。しかしながら、損傷中心部と損傷周辺部の間にはアストロサイトによって形成されたグリア瘢痕が2つの領域のバリアのように存在し、遊走ニューロンは損傷中心部まで遊走しないという問題点があった。平成26年度は、新生ニューロンを損傷領域に配置させるための人工足場としてラミニンスポンジを作製し、その問題点を克服し、平成27年度は、損傷中心部における血管網再生を目指し、増殖因子配向スポンジを作製した。具体的には、血管内皮細胞の増殖因子である VEGF の C 末端をラミニンスポンジに結合させ、損傷脳の再生を促進しうる人工足場を作製した。また、ニューロン・グリア・血管内皮細胞を VEGF スポンジ内で培養する実験系も立ち上げた。今後は、本実験システムを利用して、損傷脳の修復過程における脳内細胞群の振る舞いを in vivo と in vitro で解析する予定である。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計2 件)

- [1] *I. Ajioka, Biomaterial-engineering and neurobiological approaches for regenerating the injured cerebral cortex, *Regenerative Therapy*, 査読有, vol.3, pp.63-67, 2016.
- [2] *I. Ajioka, H. Jinnou, K. Okada, Ma. Sawada, S. Saitoh, and *K. Sawamoto, Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge, *Tissue Eng Part A*, 査読有, vol.21, pp.193-201, 2015.

(2) 学会発表 (計5 件)

- [1] 味岡逸樹、神農英雄、岡田桂、澤田雅人、澤本和延, ラミネンスポンジ移植による損傷脳へのニューロン集積, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 2014/11/18, 東京
- [2] 味岡逸樹, 大脳皮質ニューロンの潜在的再生能とその発揮技術開発, 第31回日本DDS学会学術集会, 2015/7/3, 東京
- [3] 味岡逸樹, Biomaterial Engineering and Neurobiological Approaches for Neural Remodeling Researches, 第38回日本神経科学大会, 2015/7/30, 神戸
- [4] I. Ajioka, Understanding self-repairing potential by biological and biomaterial engineering approaches for brain regeneration, 25th Biennial Meeting of the ISN, 2015/8/25, ケアンズ (オーストラリア)
- [5] I. Ajioka, Biological and Biomaterial Engineering Approaches for Injured Brain Regeneration, 第26回 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2015), 2015/11/24, 名古屋

(3) 図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A03

課題番号：26106720

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：顎関節の器官構築に向けた3次元器官培養法の確立

1. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 一郎 (Takahashi, Ichiro) 九州大学・大学院歯学研究院・教授

(2) 研究協力者

寺尾 文恵 (Terao, Fumie) 九州大学大学院・歯学研究院・助教

益田 泰輔 (Masuda, Taisuke) 名古屋大学・大学院工学研究院・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

三次元器官培養システムの開発：培養チャンバー上部には4つの異なる培地を供給出来る流路とスリットを有し、下面には培地を排出するための多孔PDMS膜を設定した、マイクロ流体培養システムを構築した。

下顎頭類似軟骨組織の作製：マウスの四肢胚を開発した培養システムで培養し、マウスの下顎頭、およびマウス下顎頭原基を摘出して培養を行った培養器官 (M. Umeda ら Journal of Dental Research 2015) にも類似した層状構造を有する軟骨組織を作製することに成功した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計27件)

[1] Hoshi K, Kawaki H, Takahashi I, Takeshita N, Seiryu M, Murshid SA, Masuda T, Anada T, Kato R, Kitaura H, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway. J Bone Miner Res. 29(5): 1244-57, 2014.

[2] Albogha MH, Takahashi I, Sawan MN. Early treatment of anterior open bite: Comparison of the vertical and horizontal morphological changes induced by magnetic bite-blocks and adjusted rapid molar intruders Korean J Orthod. 45(1): 38-46, 2014.

[3] Umeda M, Terao F, Miyazaki K, Yoshizaki K, Takahashi I. : MicroRNA-200a Regulates the Development

of Mandibular Condylar Cartilage. J Dent Res. 94: 795-802, 2015.

- [4] Albogha MH, Takahashi I. Generic finite element models of orthodontic mini-implants: Are they reliable? J Biomech. 48(14): 3751-6, 2015.
- [5] Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Maximum principal strain as a criterion for prediction of orthodontic mini-implants failure in subject-specific finite element models. The Angle Orthodontist. 86(1): 24-31. 2016.

などその他含め計27件

(2) 学会発表 (計37 件)

- [1] 星健治、川木晴美、高橋一郎、竹下信郎、清流正弘、Sakhr A Murshid、益田泰輔、穴田貴久、加藤龍史、北浦英樹、鈴木治、山本照子 圧縮力負荷に伴い骨細胞より産生された CCN2 は ERK1/2 経路を介しアポトーシスを誘導する。 第 53 回日本生体医工学会 2014 年 6 月 24-26 日

などその他含め計37件

(3) 図書 (計2 件)

- [1] 高橋一郎, 細胞社会学 (細胞工学ライブラリーマイクロロボティクスとバイオの融合-3) 3 細胞社会の人為的構成～細胞社会を創造する～ 3.4 関節 コロナ社
- [2] Ichiro Takahashi, Mechano-Reaction of Chondrocytes in the Mandibular Condyle During Orthopedic-Orthodontic Intervention. in Orthodontic Treatment of Class III Malocclusion, eds. Peter W. Ngan, Toshio Deguchi, Eugene W. Roberts, Chapter 3. Bentham Science Publishers Ltd. Sharjah, U. A. E: 2014, pp37-60.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 A03

課題番号：26106725

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：マウス皮膚再構成モデルにおける上皮-間葉細胞のクロストークと組織幹細胞の機能

1. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 健 (Kataoka, Ken) 岡山理科大学・理学部・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	0	0	0
平成24年度	0	0	0
平成25年度	0	0	0
平成26年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成27年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	5,600,000	1,680,000	7,280,000

3. 研究成果

【皮膚組織原基の培養内形成】

本研究領域の研究メンバーである横浜市立大学・武部准教授 (B01 班) らによる組織原基 (肝芽) 形成を参考にして、我々は妊娠 16 日目胎仔マウス皮膚より調製した表皮細胞・真皮細胞にヒト血管内皮細胞・間葉系幹細胞、さらにはマウスマクロファージをマトリゲル上で混合培養した。培養 24 時間で細胞は凝集してまとまり始め、72 時間で球状のスフェロイドを形成した。このスフェロイドを染色して観察したところ、皮膚組織様の層状構造を形成していた。

【皮膚組織原基の移植と細胞間インタラクション】

さらに形成した組織原基 (スフェロイド) をヌードマウス皮膚へ移植したところ、マクロファージ陽性のスフェロイドのみに移植細胞の残存を認めた。以上の結果から、上皮-間葉インタラクションにマクロファージが重要な役割をしていることがわかった。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計4 件)

- [1] Kataoka K, Rikitake Y, Ayabe Y. Expression pattern of Dkk-3, a secreted Wnt pathway inhibitor, in mouse intestinal tissue and three-dimensional cultured Caco-2 spheroids. *J Stem Cells and Regenerative Medicine* 査読有, 11, 2015, 48-50
- [2] Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 regulates PINK1 expression

under oxidative stress conditions. PLoS One 査読有, 10, 2015, e0142438

- [3] 片岡健：細胞培養における基礎知識と注意点. 臨床エンブリオロジスト学会雑誌. 査読無. 17, 2015, 1-4
- [4] Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, Huh NH. DNAX-Activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes. J Biol Chem 査読有, 289, 2014, 23389-23402

(2)学会発表 (計7 件)

- [1] Ayabe Y, Tsuruda T, Sakaguchi M, Kataoka K: Potential role of tumor suppressor gene REIC/Dkk-3 as a regulator of skin tissue inflammation. 2015 ASCB Annual Meeting、2015年12月15日、米国
- [2] 片岡 健、藤井万紀子、筒井健機：教育研究システム委員会主催 細胞培養指導士講習会「細胞培養基盤技術コースI 指導の要点」。日本組織培養学会第88回大会、2015年5月27日、広島)
- [3] 綾部雄基、鶴田太輝、阪口政清、片岡 健：TNF- α によるREIC/Dkk-3の発現制御とケラチノサイトの挙動への影響。日本組織培養学会第88回大会、2015年5月26日、広島
- [4] 鶴田太輝、綾部雄基、辻極秀次、片岡 健：In vitro自己組織化による皮膚組織原基の形成。日本組織培養学会第88回大会、2015年5月26日、広島
- [5] 片岡 健：教育講演「細胞培養における基礎知識と注意点」。第20回記念 日本臨床エンブリオロジスト学会、2015年1月11日、東京
- [6] 綾部雄基、鶴田太輝、阪口政清、片岡 健：TNF- α によるREIC/Dkk-3の表皮細胞における発現制御と増殖・分化の関係。第9回日本臨床検査学教育学会学術学会、2014年8月21日、東京
- [7] Kataoka K, Kohara A, Enosawa S: Program for cell culturists and the instructors for cell culturing organized by the JTCA education & research committee. 日本組織培養学会第87回大会、2014年5月30日、東京

(3)図書 (計0 件)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 B01

課題番号：26106710

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：マイクロメッシュを用いた層状細胞構造の構築と機能発現およびその計測

1. 研究組織

(1) 研究代表者

鷲津 正夫 (Washizu, Masao) 東京大学・工学系研究科・教授

(2) 連携研究者

オケヨ ケネディ (Okeyo, Kennedy) 東京大学・工学系研究科・助教 平成26年度～平成27年度

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	0	0	0
平成24年度	0	0	0
平成25年度	0	0	0
平成26年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
平成27年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

3. 研究成果

細胞集合体である臓器の多くでは、異種の細胞が層状の構造を作り、それを通した物質の輸送が本質的役割を果たす。このような層状細胞構造の構造や、それを組み立てることにより得られる3次元形状を実現するため、申請者らは、フォトリソグラフィにより作製されたマイクロメッシュをスカフォールドとして用いる細胞培養法（メッシュ培養法）を開発した。すなわち、培養液中に宙づりとなった太さ数ミクロン、間隔数百ミクロンのマイクロメッシュに細胞を播種すると、ちょうど木枠に紙の障子を貼ったような、細胞のモノレイヤーが得られる。この現象を利用して、1. 一種の細胞層の上に他種の細胞を播種することにより作製する細胞重層構造の形成や、2. それを養蜂箱のようにスタックすることによる大量培養の手法の開発を行った。また、3. 異方性のメッシュパターン（たとえば菱形）を用いると、そのパターンの長軸方向に細胞が配向されることを発見し、これを用いて、筋芽細胞を配向し、それに分化誘導処理を施すことにより、一方向に向きをそろえた筋管細胞を得ることに成功した。さらに、シリコンゴム性の変形可能なメッシュを制作、これを用いて筋芽細胞にストレッチをかけ、分化や配向に対する影響の調査を行った。また、4. マウス iPS 細胞を適切なピッチを持つメッシュ上で培養すると、トロフォブラストに分化することを発見した。これは、足場の幾何学的形状が細胞分化に明確な影響を与えるという、おそらく初の発見ではないかと考えている。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計6 件)

- [1] Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu: "Minimization of cell-substrate interaction using suspended microstructured meshes initiates cell sheet formation by self-assembly organization", *Biomed. Phys. Eng. Express* vol. 2, no.6 (2016) 065019 (14 pages) doi:10.1088/2057-1976/2/6/065019
- [2] Shota Sakamoto, Kennedy Okeyo, Satoshi Yamazaki, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: "Adhesion patterning by a novel air-lock technique enables localization and in-situ real-time imaging of reprogramming events in one-to-one electrofused hybrids", *Bio microfluidics*, vol.10, no.5 054122 (13 pages) DOI: 10.1063/1.4965422 (2016)
- [3] Okeyo KO, Kurosawa O, Yamazaki S, Hidehiro O, Kotera H, Nakauchi H, Washizu M. "Cell Adhesion Minimization by a Novel Mesh Culture Method Mechanically Directs Trophoblast Differentiation and Self-Assembly Organization of Human Pluripotent Stem Cells", *Tissue Eng Part C Methods*, 21(10), 1105-1115 (2015) 2015 Apr 27, DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0038
- [4] K. Terao, C. Masuda, M. Gel, H. Oana, M. Washizu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa and F Oohira: "Characterization of optically driven microstructures for manipulating single DNA molecules under a fluorescence microscope", *IET Nanobiotechnology*, vol.10, no.3, p.124-128 (2015) DOI: 10.1049/iet-nbt.2015.0036 , Online ISSN 1751-875X Available online: 27 October 2015
- [5] Kyohei Terao, Murat Gel, Atsuhito Okonogi, Ariko Fuke, Teru Okitsu, Takashi Tada, Takaaki Suzuki, Shinya Nagamatsu, Masao Washizu & Hidetoshi Kotera: "Subcellular glucose exposure biases the spatial distribution of insulin granules in single pancreatic beta cells" *Scientific Reports*, 4 : 4123, p.1-6 (2014) DOI: 10.1038/srep04123
- [6] Hidehiro Oana, Kaori Nishikawa, Hirotada Matsuhara, Ayumu Yamamoto, Takaharu G. Yamamoto, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraokade and Masao Washizu: "Non-destructive handling of individual chromatin fibers isolated from single cells in a microfluidic device utilizing an optically driven microtool" *Lab Chip*, 2014, 14, 696-704 (2014) DOI: 10.1039/C3LC51111A

(2) 学会発表 (計38 件)

- [1] Shota Sakamoto, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana and Masao Washizu: "Live imaging of somatic nuclear reprogramming using an electrofusion microfluidic device with air-lock patterned adhesion areas for fusant localization", the 20th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, (Oct., 2016, Dublin, Poster), p. 371-372
- [2] Kennedy O. Okeyo, M. Azeyanagi, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, and Masao Washizu, "Fabrication of freely standing oriented myotubes using a novel mesh culture method and analysis of calcium dynamics for functionality assay", the 20th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS), Oct., 2016, Dublin, Poster, p.439-440.
- [3] Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu and Hidehiro Oana, "Direct acquisition of genome-wide epigenetic information along intact chromatin fibers on individual chromosomes isolated from single mammalian cells", the 20th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS) 2016 (Oral) , p.182-183
- [4] Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, .Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Hiromitsu

- Nakauchi, and Masao Washizu, “Mechanical induction of trophoblast-like differentiation in human iPS cells” , Cell Symposia-10 Years of iPSCs, Berkeley, California, USA, September 25-27, 2016 (poster)
- [5] Kennedy O. Okeyo, Kai Yamada, Rina Yanaru, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, and Masao Washizu, “The Shoji Technique for Cell Adhesion Control and Fabrication of Cell Sheets” , Japan Society of Applied Physics, Autumn meeting, Niigata City, Japan, Oct. 13-16, 2016.
- [6] Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: “Cell adhesion control by a novel mesh culture method directs differentiation and self-assembly of human iPS cells into trophoblasts; towards organ-on-chip embryogenesis”, micro-TAS 2015 Gyeongju, Korea 2015.10.25-29 p.573-575 (2015)
- [7] Hiroki Mori, Kennedy Omondi Okeyo, Masao Washizu and Hidehiro Oana: “Mapping positional distribution of higher-order structures along unfragmented native chromatin fibers isolated from single cells in a microchannel”, micro-TAS 2015 Gyeongju, Korea 2015.10.25-29 p.1259-1261 (2015)
- [8] Leqian Yu, Li Liu, Junjun Li, Yong Chen, Hitrohumi Shintaku, Ryuji Yokokawa, Takaaki Suzuki, Masao Washizu, Kennedy M. Okeyo and Hidetoshi Kotera: “ Importance of substrate and interaction between cell for culturing and realizing nano-human”, 2nd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC 2015), Nairobi from 09.17-18 (2015)
- [9] D. Sueyoshi, A. Kishimura, H. Oana, Y. Anraku, M. Takai, M. Washizu, and K. Kataoka: “Microchannel-assisted preparation of polyion complex vesicles and real-time observation of their dynamic responses to external electric fields”, μ TAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 1882-1884 (2014)
- [10]K. O. Okeyo, R. Yanaru, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu: “Generation of epithelial cell sheets with defined cell orientation using microstructured mesh sheets as a substrate for cell culture”, μ TAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 1128-1130 (2014)
- [11]K.O. Okeyo, T. Isozaki, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu: “Stable and long term culture of stem cells under shear flow on a microstructured mesh sheet embedded in a fluidic chamber”, μ TAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 907-909 (2014)
- [12]Yutaro Itagaki, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Miwako Narita, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: “Cytoplasmic transfer without nuclei mixing between dendritic cells and tumour cells achieved by one-to-one electrofusion via microorifices in a microfluidic device”, μ TAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 814-816 (2014)
- [13]Kennedy O. Okeyo (invited), Kai Yamada, Rina Yanaru, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, and Masao Washizu, The shoji technique for cell adhesion control and fabrication of cell sheets, The 77 Japan Society of Applied Physics Autumn Meeting, Niigata Mese, Niigata, Japan, 2016.9.13-16, 2016
- [14]Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, .Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Hiromitsu Nakauchi, and Masao Washizu: “Mechanical induction of trophoblast-like differentiation in human iPS cells” , Cell Symposium, 10 years of iPSCs, Berkeley, California, USA. September 25-27, 2016.
- [15]Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Jun Ueda, Hidehiro Oana, “Optical mapping of epigenetic information along intact chromatin fibers isolated from single cells in a microchannel”, MNST2016

- [16]Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Jun Ueda, Hidehiro Oana, "Direct Observation of Epigenetic Modifications along Intact Chromatin Fibers of Individual Chromosomes Isolated from Single Cells in a Microfluidic Channel", SSDM2016
- [17]Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Hidehiro Oana, "Direct acquisition of epigenetic information along chromatin fibers isolated from single mammalian cells", International Conference on Single Cell Research 2016
- [18]Hidehiro Oana, Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo and Masao Washizu: "Development of a Method for Investigation of Individual Intact Chromatin Fibers Isolated from Single Cells in a Microfluidic Channel", SELECTBIO Conference, Single Molecule & Single Cell Analysis (SMSCA2016), 2016.03.15-16/2016.03.15, 16 Madrid, Spain
- [19]Shota Sakamoto, Kennedy Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu: "Study of reprogramming using on-chip one-to-one electrofusion of somatic cells with embryonic stem cells", the 11th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2016), (Apr., 2016, Miyagi, Oral)
- [20]Hidehiro Oana, Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo and Masao Washizu:"A Microfluidic platform for analysis of single chromatin fibers: toward single cell epigenetic study", the 8th international conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB-2016) 2016.04.20-22 p.74-75
- [21]Kennedy O. Okeyo, Yutaro Itagaki, Osamu Kurosawa, Miwako Narita, Hidehiro Oana, and Masao Washizu: "A microfluidic device for one-to-one cell electrofusion and its application toward the generation of dendritic cell for cancer immunotherapy", the 8th international conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB-2016) 2016.04.20-22 p.64-65, Best Poster Award
- [22]Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu, "Cell Adhesion Control using Microstructured Meshes Induces Self-Assembly-Mediated Organoid Formation by Human iPS Cells", 2015 IEEE/ International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2015), Nagoya, Japan, Nov. 23 - 25, 2015. IEEE/MHS Best Paper Award受賞論文
- [23]Shota Sakamoto, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu: "On-chip high-yield electrofusion by electric field constriction and culture of fusants on air-lock patterned adhesion areas", Proceedings of the 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2015 (ISMM2015), (June 8-10, 2015, Kyoto, Oral)
- [24]Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu, "Microstructured Meshes as Platforms for Cell Culture and Induction of Self-Assembly-Mediated Organoid Formation", The 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2015), November 10-13, 2015, Toyama International Conference Center, Toyama, Japan (Invited)
- [25]Kennedy Okeyo and Masao Washizu, "Engineering Free Standing 2D and 3D Biostructures by Induction of Self-Assembly Organization of Cells in a Suspension", Lab-on-a-Chip, Microfluidics & Microarrays World Congress, Marriot Hotel, Del Mar, San Diego, USA, September 28-30, 2015. (invited)
- [26]Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hitoshi Suzuki, Yoshihide Saito and Masao Washizu: "Lab-on-a CD Device for Rapid Sorting of Blood Cells and Real Time Analysis : Toward Early Detection of Maralia", 2nd Africa international biotechnology and biomedical conference, 2015.9.17, Nairobi

Kenya (2015) (invited)

- [27] Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu, "Cell Adhesion Minimization Mechanically Triggers Trophoblast Differentiation of hiPS Cells by a Self-Assembly Mediated Process", The 26th CDB Meeting "Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization", RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan, September 8-9, 2015. poster
- [28] Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu, "Mechanical Derivation of Trophoblast Differentiation on a Mesh", International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics and Function, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, August 23-26, 2015. poster
- [29] Hidehiro Oana, Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo and Masao Washizu, "Direct Observation of Distribution and Stability of Higher-order Structure along Tethered Chromatin Fibers in a Micro-flow Channel," International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics and Function, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, August 23-26, 2015. poster
- [30] Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Hidehiro Oana, "Measurement of Higher-order Structural Changes of Tethered Chromatin Fibers in a Micro-flow Channel", Proceedings of the 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2015, Kyoto University Katsura Campus, June 8-10, 2015, poster
- [31] Rina Yanaru, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Masao Washizu, "Fabrication of Microstructured PDMS Mesh Sheets and Their Application to the Generation of Myoblast Cell Sheets by the "Shoji" Process", Proceedings of the 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2015, Kyoto University Katsura Campus, June 8-10, 2015, poster
- [32] Kennedy O. Okeyo, Rina Yanaru, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu, "Technique for Cell Adhesion Control and Initiation of Cellular Structure Formation Employing Suspended Microstructured Meshes", Proceedings of the 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2015, Kyoto University Katsura Campus, June 8-10, 2015, Oral
- [33] Rina Yanaru, Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu: "Control of Cell Orientation in Mesenchymal Cell Sheets Fabricated Using Microstructured Mesh Sheet", IEEE MHS2014, November 9-12, Nagoya, p.230-233 (2014)
- [34] S. Sakamoto, K. O. Okeyo, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera and M. Washizu: "Narrowing slit device for high yield one-to-one electrofusion and culture of fusants without gene mixing", IEEE MHS2014, November 9-12, Nagoya, p.291-294 (2014)
- [35] Kennedy O. Okeyo, Rina Yanaru, Kurosawa Osamu and Masao Washizu: "A Novel Culture Method Utilizing Micro Structured Shoji-like Meshes for Self-Assembly Driven Fabrication of 2D and 3D Cellular Structures", Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi, Kenya, 2014. 09.09, WS1-3, (2014) (invited)
- [36] Hidehiro Oana, Kaori Nishikawa, Hirotada Matsuhara, Ayumu Yamamoto, Takaharu G. Yamamoto, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Masao Washizu: "Immunofluorescence staining and extending of individual intact chromatin fibers isolated from single cells utilizing a microfluidic device" Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th

International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi, Kenya, 2014.09.09, WS1-3, (2014) (invited)

[37] Kennedy O. Okeyo, R. Yanaru, O. Kurosawa, H. Oana, and M. Washizu, “A New Approach to Cell Culture and Cell Sheet Fabrication by the “Shoji” Process”, RSC Tokyo International Conference 2014- Analytical Technology Towards Future Society-, September 4-5, 2014, Makuhari Convention center, Chiba, Japan (Invited)

[38] Kennedy O. Okeyo, R. Yanaru, O. Kurosawa, H. Oana, and M. Washizu “Cell culture on “Shoji” for Self-Assembly Driven Fabrication of 2D and 3D Cellular Structure” International Symposium on 3D Tissue Fabrications, May 20-21, 2014, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Meguro-ku, Tokyo, Japan. (Invited)

(3) 図書 (計2 件)

[1] 鷺津正夫・オケヨケネディ: 「マイクロメッシュを用いた層状細胞構造の構築」3次元細胞システム設計論 第3章第2節 p. 89-98 コロナ社 (2016) ISBN978-4-339-07262-4

[2] 鷺津正夫・オケヨケネディ: 「オンチップ細胞操作技術の開発」バイオチップの基礎と応用 第2編第4章3細胞操作用バイオチップ p. 216-225 シーエムシー出版 (2015)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0 件)

公募研究 B01

課題番号：26106712

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：血管構造の高速モールドイングによるヒト iPS 細胞を用いた肝組織構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 淳二 (Fukuda, Junji) 横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

(2) 連携研究者

穴田 貴久 (Anada, Takahisa) 東北大学・大学院歯学研究科・准教授

武部 貴則 (Takebe, Takanori) 横浜市立大学・医学部・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	7,000	2,100	9,100
平成27年度	7,500	2,250	9,750
総計	14,500	4,350	18,850

3. 研究成果

本研究では、電気化学的な細胞脱離を用いた血管様構造の高速モールドイング技術を確立した。この技術では、金ニードル表面に接着させた血管内皮細胞をハイドロゲル側に電気化学反応を利用して素早く転写することで、内表面が血管内皮細胞に覆われた血管様構造を作製した。そして、この技術を基盤として、次の3つの技術を確立し、血管構造を備えた肝組織を作製した。すなわち、1) 組織形成の足場となるハイドロゲルの作製では、メタクリレート基を付与した光架橋性ゼラチンゲルを作製し、素早くゲル化し、なおかつ血管内皮細胞のネットワーク形成を妨げず、肝前駆細胞の成熟化を促すよう工夫した。2) ヒト iPS 由来肝前駆細胞の誘導法の確立では、効率的な肝前駆細胞の誘導と大量調製を念頭に、酸素供給能を持つスフェロイド形成培養器を作製し、ヒト iPS 由来 hepatic endoderm スフェロイドを形成させることで、アルブミン分泌能などを備えた微小肝組織を作製した。3) 肝組織誘導のための3種類の細胞共培養法の確立では、ヒト iPS 由来 hepatic endoderm スフェロイド、間葉系幹細胞、血管内皮細胞の共培養条件を決定し、血管網の伸長とヒト iPS 由来 hepatic endoderm スフェロイドとの融合を確認した。そして、送液培養中に種々の肝機能が向上することを示した。また、マウスの門脈に直接吻合することで、作製したデバイスが移植可能であることを示した。以上により、送液可能な血管網を備えた立体的な肝組織を作製する基盤技術を確立した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計6 件)

- [1] T. Kageyama, T. Osaki, J. Enomoto, D. Myasnikova, T. Nittami, T. Hozumi, T. Ito, and J. Fukuda, In situ cross-linkable gelatin-CMC hydrogels designed for rapid engineering of perfusable vasculatures, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2 (6), 1059-66 (2016)
- [2] J. Enomoto, N. Mochizuki, K. Ebisawa, T. Osaki, T. Kageyama, D. Myasnikova, T. Nittami, J. Fukuda, Engineering thick cell sheets by electrochemical desorption of oligopeptides on membrane substrates, *Regenerative Therapy*, 3, 24-31 (2016)
- [3] C. Arrigoni, M. Bongio, G. Talò, S. Bersini, J. Enomoto, J. Fukuda, M. Moretti, Rational Design of Prevascularized Large 3D Tissue Constructs Using Computational Simulations and Biofabrication of Geometrically Controlled Microvessels, *Advanced Healthcare Materials*, 5(13), 1617-26 (2016)
- [4] H. Sasaki, J. Enomoto, Y. Ikeda, H. Honda, J. Fukuda, and R. Kato, Comparisons of cell culture medium using distribution of morphological features in microdevice, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121, 1, 117-23 (2016)
- [5] T. Osaki, T. Kakegawa, T. Kageyama, J. Enomoto, T. Nittami, J. Fukuda*, Acceleration of vascular sprouting from fabricated perfusable vascular-like structures, *PLoS ONE*, 10(4), e0123735 (2015)
- [6] Y. Kang, N. Mochizuki, A. Khademhosseini, J. Fukuda, Y. Yang, Engineering a vascularized collagen- β -tricalcium phosphate graft using an electrochemical approach, *Acta Biomaterialia*, 11, 449-58 (2015)

(2) 学会発表 (計44 件)

- [1] J. Fukuda, Electrochemical cell detachment for engineering vascularized tissues, KSBB, Gyeongju, Korea, 2014
- [2] Kageyama, T. Kakegawa, T. Osaki, J. Enomoto, T. Ito and J. Fukuda, Rapid micromolding of endothelial cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels, Termis-EU, Genova, Italy, 2014
- [3] T. Osaki, J. Fukuda, Engineering hepatic tissues with perfusable vascular structures, WC9 Alternatives and Animal Use Experiment, Prague, Czech Republic, 2014
- [4] T. Osaki, T. Takebe, J. Fukuda, Fabrication of vascularized liver-like tissues using human iPS-derived hepatic endoderm cells and electrochemical cell transfer, Termis-AP 2014, deagu, Korea, 2014
- [5] A. Gautieri, T. Osaki, T. Kageyama, F. Rigoldi, A. Manenti, J. Fukuda, Design of Self-Assembled Oligopeptides for Electrochemical Cell Detachment, Termis-AP 2014, deagu, Korea, 2014
- [6] T. Osaki, T. Takebe, J. Fukuda, Micro-Molding of Vascularized Liver-Like Tissues with iPS-Derived Hepatic Endoderm Spheroids, MRS fall meeting, Boston, USA, 2014
- [7] J. Fukuda, Electrochemical cell detachment for engineering vascularized 3D tissues, E-MRS, Lille, France, 2015
- [8] T. Osaki, T. Takebe, J. Fukuda, Engineering of transplantable liver tissues with iPS-derived hepatic spheroids, Targeting liver disease, Malta, 2015

- [9] J. Enomoto, T. Kakegawa, T. Osaki, T. Kageyama, J. Fukuda, Design of zwitterionic oligopeptide for catch-and-release of target cells, 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials, Seattle, USA, 2015
- [10] T. Osaki, T. Kakegawa, T. Takebe, J. Fukuda, Engineering of liver-like tissues using cell adhesive zwitterionic oligopeptide, 2nd International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials, Seattle, USA, 2015
- [11] T. Kageyama, T. Osaki, T. Ito, T. Anada, O. Suzuki, J. Enomoto, J. Fukuda, Vasclarized bone tissue engineering using rapid vascular fabrication technique, 4th TERMIS WORLD CONGRESS, Boston, USA, 2015
- [12] J. Enomoto, T. Osaki, T. Kageyama, J. Fukuda, Catch-and-release of target cells using aptamer and electrochemical cell detachment, 4th TERMIS WORLD CONGRESS, Boston, USA, 2015
- [13] J. Enomoto, T. Kakegawa, T. Osaki, T. Kageyama, J. Fukuda, Surface design for selective cell catch-and-release using electrochemical trigger, International Conference on Biofabrication, Utrecht, The Netherlands, 2015
- [14] C. Yoshimura, T. Kageyama, J. Fukuda, Biofabrication of hair follicle using microfabricated PDMS spheroid chip, International Conference on Biofabrication, Utrecht, The Netherlands, 2015
- [15] T. Kageyama, K. Kataoka, J. Fukuda, Fabrication of regularly aligned hair follicles using microfabricated PDMS microarray chips, MRS Spring meeting, Phoenix, USA, 2016

などその他含め44件。

(3) 図書 (計11 件)

- [1] 大崎達哉、福田淳二、モールドイングによる血管構造を含む立体組織の構築、コロナ社、3次元細胞システム設計論、4章、pp. 184-96、2016
- [2] 大崎達哉、福田淳二、組織工学における3D肝組織のイメージング、Medical & Imaging, オプトロニクス社、No.3、pp. 62-8、2015
- [3] 榎本詢子、福田淳二、自己組織化単分子膜を利用した再生医療のための臓器・組織の作製、応用物理学会、84(8)号、pp. 732-5、2015
- [4] J. Enomoto, T. Kakegawa, T. Osaki, T. Kageyama, J. Fukuda, Cell detachment for engineering three-dimensional tissues, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Eds. T. Arai, F. Arai, M. Yamato, Springer, Chapter 12, 213-22, 2015, ISBN 978-4-431-55297-0
- [5] 大崎達哉、福田淳二、小池博之、武部貴則、ヒト iPS 細胞を用いた複雑臓器の成形加工と移植医療への応用、実験医学、羊土社、33(8)、pp. 1259-65、2015
- [6] 大崎達哉、福田淳二、電気化学を用いた細胞操作、三次元ティッシュエンジニアリング (監修: 大政健史、福田淳二)、エヌ・ティー・エス、1編、3章、3節、129-34、2015
- [7] 穴田貴久、福田淳二、鈴木治、酸素透過性三次元細胞培養デバイスの開発、三次元ティッシュエンジニアリング (監修: 大政健史、福田淳二)、エヌ・ティー・エス、2編、1章、4節、213-8、2015
- [8] 大崎達哉、福田淳二、血管構造のモールドイングによる肝組織形成、三次元ティッシュエンジニアリング (監修: 大政健史、福田淳二)、エヌ・ティー・エス、2編、2章、5節、273-8、2015
- [9] 景山達斗、福田淳二、送液可能な血管構造を作るアプローチ、HAB Newsletter、HAB 研究機構、21, 1, 6-8, 2014
- [10] 景山達斗、掛川貴弘、福田淳二、成形加工プロセスを模した立体組織作製、マイクロバイオ技術の潮流と展望、生物工学会誌、92, 4, 166-70, 2014

[11] 福田淳二、掛川貴弘、細胞培養マイクロデバイスの研究ーマイクロスケールでの細胞培養・解析技術、化学と生物、52, 6, 356-8, 2014

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計4件）

名称：血管網被包細胞包埋ビーズ及びその製造方法、並びに前記血管網被包細胞包埋ビーズを用いた集積体及びその製造方法

発明者：福田淳二、景山達斗、園山由希江、荒木拓人

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願2015-215034

出願年月日：2015年10月30日

国内外の別：国内

名称：再生毛包原基の集合体の製造方法、毛包組織含有シート及び毛包組織含有シートの製造方法

発明者：福田淳二、景山達斗、吉村知紗、大西希咲

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願2015-214547（PCT/JP2016/081747）

出願年月日：2015年10月30日（出願日2016年10月30日）

国内外の別：国内（国外）

名称：血管様立体構造物およびその製造方法、血管様立体構造物製造装置、並びに血管様立体構造物製造用ニードル

発明者：福田淳二、嶋津祐香、大崎達哉、丸尾昭二、平出亮二

権利者：横浜国立大学、テクダイヤ株式会社

種類：特許

番号：特願2015-185280

出願年月日：2015年9月18日

国内外の別：国内

名称：細胞包埋ビーズ及びその製造方法

発明者：福田淳二、景山達斗、園山由希江、荒木拓人

権利者：横浜国立大学

種類：特許

番号：特願2015-179750

出願年月日：2015年9月11日

国内外の別：国内

公募研究 B01

課題番号：26106713

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：心筋組織、人工リンパ節の3次元アセンブリ

1. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 真人 (Nakamura Makoto) 富山大学・大学院理工学研究部 (工学) ・教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
平成27年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	6,800,000	2,040,000	8,840,000

3. 研究成果

本研究では、「アセンブリ技術」をキーワードに、人工心筋組織と人工リンパ節組織を対象に、心筋組織のスケールアップと3次元構造内部の細胞構成の制御にチャレンジすることを目的に取り組んだ。

心筋組織は、心筋細胞が一方向に配向して存在する。そこで本研究では、心筋細胞が配向した心筋パーツをアセンブリしてスケールアップする構想のもと、配向した心筋組織パーツの作製に取り組んだ。パターン基板上でパターン培養 (プレ培養) を行うことにより配向した筋組織を作ることができ、また、配向し始めたプレ組織を積層転写で複合化することも示せた。また、マイクロモールドをデザインして作製し、心筋細胞でのマイクロ鋳型培養を行った。細胞接着性ゲルの併用で細胞増殖もハンドリング性もよくなった。作製した心筋パーツは、心筋細胞の配向性を持ち、アドレナリン薬剤負荷にも反応した。有効な心筋パーツとみなせる。さらに作製した心筋組織パーツをハンドリングして、積層したり連結することにも成功した。バイオアセンブリングのコンセプトを実証することができた。

人工リンパ節に関しては、コラーゲン結合性ケモカインを3次元で配することを目指して、従来使用してきたアルギン酸分子にコラーゲンペプチドを固定する方法を開発した。粘度の問題から高粘度でも吐出可能な特殊紡糸ノズルによる押し出し法の利用で、コラーゲンペプチドを配した3次元構造体の作製ができた。共同研究で並行して合成してもらったコラーゲン結合性ケモカインがすでに合成済であるので、近日動物実験に移る予定である。

また、本研究班内での情報交換により、有効なマイクロ流路リアクター技術を学んだ。内部構造をデザインし手構築した3次元人工リンパ節組織のin vitro評価系の開発を目指せるところに進むことができた。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (9件+2016年度以降5件=合計14件)

- [1] 戸田英樹、荒井健一、二階堂敏雄、岡部素典、中村真人、血管組織設計のための血管構造抽出画像フィルタ、設計工学49 (6), 14-22, 2014 (査読有)
- [2] 中村真人、荒井健一、戸田英樹、小原千寿香、[次世代組織工学] 細胞プリンティング、再生医療の最新の進歩(後編)組織工学とその臨床応用 岡野光夫、岩田隆紀監修、最新医学、69(7, Supple) 1465-1477, 2014(査読無し)
- [3] 荒井健一、中村真人、生体組織作製を目指す3D バイオプリンターの開発、高分子 63 (8), 530-531, 2014. (査読無し)
- [4] Nakamura M, Mir TA, Arai K, Ito S, Yoshida T, Iwanaga S, Kitano H, Obara C, Nikaido T.. Bioprinting with pre-cultured cellular constructs towards tissue engineering of hierarchical tissues. *International Journal of Bioprinting*, 1(1): 39-48. 2015, (査読有).
- [5] Groll J, Boland T, Blunk T, Burdick JA, Cho DW, Dalton PD, Derby B, Forgacs G, Li Q, Mironov VA, Moroni L, Nakamura M, Shu W, Takeuchi S, Vozzi G, Woodfield TB, Xu T, Yoo JJ, Malda J, Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*. 2016 8(1):013001. doi: 10.1088/1758-5090/8/1/013001. (査読有)
- [6] 荒井健一、中村真人、3Dバイオプリンティングの国内外の現状と課題、実験医学特集号『医療・創薬に向けた立体臓器をつくる：細胞の性質を利用し、工学的に組み上げる』2015年5月 実験医学33{8}, 1266-1272, 2015 (査読無し)
- [7] 中村真人、荒井健一、ヒトの組織を3次元印刷、人工臓器学会誌44(1), 37-40, 2015. (査読無し)
- [8] 戸田英樹、荒井健一、堀江三喜男、中村真人、バイオプリンティング：バイオプリンタ遠隔操作制御の試み、システム制御情報学会「システム/制御/情報」, 59(8), 313-318, 2015. (査読無し)
- [9] 梅津 信二郎, 中村 真人, 3Dプリンタの医用応用. 日本画像学会誌54 (4) 326-33, 2015. (査読無し)
*2016年度以降
- [10] Mir TA, Nakamura M, 3D-BioPrinting: Towards the Era of Manufacturing Human Organs as Spare Parts for Healthcare and Medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Jan 19. doi: 10.1089/ten.TEB.2016.0398. [Epub ahead of print] (査読有)
- [11] Arai K, Tsukamoto Y, Yoshida H, Sanae H, Mir TA, Sakai S, Yoshida T, Okabe M, Nikaido T, Taya M, Nakamura M. The development of cell-adhesive hydrogel for 3D printing. *International Journal of Bioprinting*, 2(2): 44-53. 2016. <http://dx.doi.org/10.18063/IJB.2016.02.002> (査読有)
- [12] 中村真人、バイオプリンティングの動向、3Dプリンタの医療応用最前線 II, *Inner Vision* 31(7). 18-19, 2016 (査読無し)
- [13] Arai K, Yoshida T, Okabe M, Goto M, Mir TA, Soko C, Tsukamoto Y, Akaike T, Nikaido T, Zhou K, Nakamura M. Fabrication of 3D-culture platform with sandwich architecture for preserving liver-specific functions of hepatocytes using 3D bioprinter. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Sep 19. doi: 10.1002/jbm.a.35905. [Epub ahead of print]
- [14] Sakai S,* Yamamoto Y, Enkhtuul G, Ueda K, Arai K, Taya M, Nakamura M,, Inkjetting Plus Peroxidase-Mediated Hydrogelation Produces Cell-Laden, Cell-Sized Particles with Suitable Characters for Individual Applications *Macromolecular Bioscience Online* 2017, DOI: 10.1002/mabi.201600416 .

(2) 学会発表 (計20件+2016年度以降17件=37件)

*国際会議 (招待講演6+2016年度以降1=合計7)

- [1] Keynote speaker: Nakamura M, The concepts of the challenges for the developments of Bioprinting and Biofabrication, International Bioprinting Congress in Singapore, 24-25, July 2014, Biopolis, Singapore.
- [2] Plenary Keynote speaker: Nakamura M, The breakthrough concepts by Bioprinting and Biofabrication in tissue and organ engineering, ISBF annual Conference on Biofabrication 2014, 2014. Sep 29 Pohang Korea
- [3] Plenary Keynote speaker: Nakamura M, Biofabrication: Challenging on 3D fabrication with biological living materials, The 9th International Workshop on Microfactories" (IWMF 2014), 2014. Oct 6-8, Honolulu, USA
- [4] Keynote Speech: Nakamura M, Arai K, Micro-nano-technology for biofabrication Makoto Nakamura, International Forum on MicroManufacturing & Biofabrication 15' , 19, May 2015, Toyama
- [5] Invited Lecture: Nakamura M, Biofabrication of Hierarchical Tissues: Bio-assembly with Pre-cultured Pre-tissue Components, The 19th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference; 3D Modeling and Printing of Tissues and Organs; March 10, 2016, FDA White Oak Campus, Maryland, USA
- [6] Invited Speaker: Nakamura M, Tsukamoto Y, Arai K, Mir TA, Sugimoto K, Sakai S, Taya M, Tohyama S, Fujita J, Fukuda K, Bio-Fabrication of Hierarchical Tissues: Bio-Printing and Bio-Assembly with Pre-Cultured Tissue Components, Symposium: SM10: Biofabrication-Based Biomaterials and Tissues, MRS Spring Meeting, March 28-April 1, 2016, Phoenix, Arizona, USA

*2016年度以降

- [7] Invited Speaker; Riken CEMS Topical Meeting on Soft Robotics, Nakamura M, Mir TA, Challenge to Tissue and Organ Engineering using Machines October 27-28, 2016, Wako, Japan.

*国際会議 (発表4件+2016年度以降1件=合計5件)

- [1] ○Arai K, ○Tsukamoto Y, Yoshida H, Sakai S, Taya M, Nakamura M, Inkjet 3D-biofabrication using cell-adhesive hydrogel, International symposium on 3D Tissue fabrication, 2014 May 20, Tokyo,
- [2] Arai K, Yoshida T, Tsukamoto Y, Okabe T, Koike C, Nikaido T, Akaike T, ○Nakamura M, The fabrication of hepatocyte culture device with sandwich gel by using 3D bioprinter International Forum on Micromanufacturing and Biofabrication 2015, 20, May 2015, Toyama.
- [3] Arai K, Yoshida H, Tsukamoto Y, Sakai S, Taya M, ○Nakamura M, The exploration of cell-adhesive hydrogel to fabricate 3D gel structure by using 3D-bioprinter. International Forum on Micromanufacturing and Biofabrication 2015, 20, May, 2015, Toyama.
- [4] ○Mimura T, Arai K, Nakamura M, Yamamoto R, Yonetoku Y, Kanatitsu T. Micro-scaled fabrication of biocompatible hydrogel fibers applying micro-fabricated nozzle. International Forum on Micromanufacturing and Biofabrication 2015, 20, May, 2015, Toyama.

*2016年度以降

- [5] ○Doi N, Suzuki M, Nakamura M, Visualization of three-dimensional oxygen concentration for three-dimensional tissue culture. 10th World Biomaterials Congress (WBC), 17-22, May 2016, Montreal, Canada,

*国内招待講演・シンポジウム講演 (17件+2016年度以降11件=合計28件)

- [1] 特別講演: 中村真人、荒井健一、プリンティング技術で医療の進歩を創出する、(一社)日本印刷学会、

第131回研究発表会：2014年5月30日、東京

- [2] 招待講演：中村真人、バイオプリンティングのあゆみから学ぶ：工学技術による再生医療のブレークスルー、再生医療サポートビジネス懇話会、2014年6月6日、京都
- [3] 大会長特別シンポジウム招請講演：中村真人、荒井健一、戸田英樹、3Dプリンターと人工臓器の考え方、第52回日本人工臓器学会、2014年10月18日、札幌
- [4] シンポジウム講演：中村真人、荒井健一、塚本佳也、戸田英樹、笹原正清、3Dプリンターが拓く未来の医療：生命を吹き込む医工学の時代へ、（主題シンポジウム：3Dプリンターが変える未来の医療）第32回日本臨床医学会総会 2014年11月21日、郡山
- [5] 特別講演：中村真人、3次元組織モデルをいかに作るべきか？第27回日本動物実験代替法学会 2014年12月5日、横浜
- [6] 招待講演：中村真人、医療に応用する 3Dプリンターの研究開発について、平成26年度第4回高信頼システム情報交換会・北陸：2015年2月13日、金沢
- [7] 招待講演：中村真人、細胞の3次元プリンティング、Matching HUB Kanazawa 2015プリンティング分科会：2015年2月23日 金沢
- [8] シンポジウム講演：中村真人、3Dプリンターの再生医療への応用について、第90回日本医療機器学会大会、2015年5月29日、横浜
- [9] 招請講演：中村真人、動物性集合胚の取扱いに係る科学的観点からの検討について「工学による組織作製：Bioprinting & Biofabrication」第10回動物性集合胚の取扱いに関する作業部会：2015年6月10日、東京（文科省）
- [10] シンポジウム講演：中村真人「逃げ切れ日本の医療：再生医工学のインフラを作れ！」バイオアセンブラ第9回公開シンポジウム：2015年7月2日、大阪
- [11] 招請講演：中村真人：「3Dプリンターで本物の臓器は作れるのか？：3Dプリンターの医療への応用について」電子情報技術産業協会(JEITA)「ヘルスケアデバイス・システム技術分科会」：2015年9月25日（東京）
- [12] セミナー講演：中村真人「機械で臓器が作れるか」北陸4大学連携まちなかセミナー：大学における工学と医学のコラボレーション：2015年10月24日、金沢
- [13] パネルディスカッション（座長・講演）：中村真人、米川元樹、「人工臓器における3Dプリンターの応用」第53回日本人工臓器学会2015年11月20日、東京
- [14] 招待講演：中村真人「オーガニファブリケーション～機械で臓器を作る～」第3回「生きた再生医療用材料の研究開発研究会」：2015年11月26日 名古屋
- [15] シンポジウム講演：中村真人「生きた3次元臓器を作る研究のあゆみ：バイオプリンティングからオーガニファブリケーションへ」平成27年度生命融合科学教育部シンポジウム「医療と3D」：2015年12月1日、富山
- [16] 特別講演 中村真人、生命工学・再生医工学から見た塑性加工分野への期待、塑性学会北陸支部講演会：2016年3月8日、富山
- [17] シンポジウム講演、中村真人、塚本佳也、荒井健一、Tanveer Mir Ahmad、杉本和之、戸田英樹、ヒトの組織を3次元印刷：～2次元印刷から3次元造形へ、そして臓器構築の時代へ～、第15回 日本再生医療学会総会2016年3月、大阪

*2016年度以降

- [18] セミナー講演：中村真人、バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線から、シーエムシーリサーチ・セミナー2016年4月4日、東京
- [19] 大会長講演：中村真人、生命を吹き込む医工学と生命を届ける医工学、第55回日本生体医工学会大会、

2016年4月26日、富山

- [20]教育講演：中村真人、21世紀は科学と技術で機能する臓器を創出する医療の時代を目指せ！医工学による挑戦：泌尿器科領域での 臓器再生、第13回泌尿器科再建再生研究会、2016年6月16日、鳥取
- [21]招待基調講演：中村真人、再生医工学～臓器工学の時代へ：医工学による挑戦、「JUASサマースクエア 富山2016」日本情報システム・ユーザー協会（JUAS） 2016年7月8日、富山
- [22]招待講演、中村真人、3Dプリンターがいつか人の命を救う：3Dプリンターと心臓、平成28年度東海北陸地区技術職員合同研修会（生物・生命） 2016年8月8日、富山大学
- [23]シンポジウム招待講演：中村真人、バイオ3Dプリンターの現状、展望、課題、日本化学工学会バイオ部会シンポジウム：次世代再生医療の実現に向けた化学工学の役割、2016年9月6日、徳島
- [24]シンポジウム・パネルディスカッション招待講演：中村真人、Tissue Engineeringのためのバイオプリンティング戦略と今後の課題、第68回日本生物工学会大会、シンポジウム「2D/3Dプリンタを用いる細胞操作の可能性」、2016年9月29日、富山
- [25]シンポジウム講演：中村真人、小倉 亮介、寺口 博也吉池 成弥、土山 祥之、森 光一、医工学による生きた臓器の作製への挑戦のあゆみ、第43回日本臓器保存生物医学会学術集会シンポジウム 2016年11月27日（東京薬科大学 八王子）
- [26]招待講演：一般社団法人 研究産業・産業技術振興協会（JRIA）、平成28年度 先導技術交流会・シンポジウム：次世代再生医療の基礎と夢「細胞機能制御(臓器形成)への医学、工学的アプローチ」：中村真人、バイオ3Dプリンター・機械で生きた臓器を作る挑戦、2017年2月1日、東京
- [27]招待講演：日本学術振興会産学協力研究委員会、将来加工技術136委員会 テーマ：バイオ・人工テクノロジーと将来加工技術：中村真人、バイオプリンティング・バイオファブリケーションによる人工臓器開発、2017年2月3日、東京
- [28]シンポジウム講演：中村真人、生体医工学による再生医工学：バイオプリンティングのコンセプトと意義、第16回日本再生医療学会：シンポジウム2、再生医療における3次元バイオプリンターの進化、2017年3月7日、仙台

(2) 学会発表（9件+4件=13件）

- [1] ○杉本和之 出島遼 塚本佳也 中村真人、透過型シート状レーザー光を用いた3Dスキャナーの開発、計測自動制御学会 ライフエンジニアリング部門シンポジウム2014、2014年9月17日、金沢
- [2] ○塚本佳也、荒井健一、木下耕史、廣野恵一、市田露子、中村真人、鋳造型造形法による細胞ファイバー作製、日本組織培養学会第87回大会、2014年5月29日、東京
- [3] ○早苗秀敏、土井尚俊、中村真人、均一粒子作製を目指す、第9回北陸地区化学工学研究交流会2014年8月、金沢（優秀賞受賞）
- [4] ○長谷部優希、中村真人、凍結可視化装置による組織の凍結保存に向けた基礎研究、Cryopreservation Conference 2014、2014年10月23-24日（岡崎）
- [5] ○田川 淳吾、杉本 和之、荒井 健一、中村 真人 心臓の3次元モデル：コンピュータモデルから3D Bio printerによる再構築へ 生体医工学会北陸支部大会 2014年12月5日 富山
- [6] ○土井尚俊、鈴木正康、中村真人、3次元培養のための酸素イメージング法の開発、第10回北陸化学工学研究交流会、2015年8月、福井（優秀講演発表賞受賞）
- [7] 塚本佳也、○加藤陸、杉本和之、荒井健一、境慎司、遠山周吾、藤田淳、福田恵一、中村真人、3Dプリンターを応用した配向する心筋組織作製、平成27年度日本生体医工学会北陸支部大会、2015年12月、富山（研究奨励賞受賞）
- [8] ○塚本佳也、荒井健一、加藤陸、杉本和之、境慎司、遠山周吾、藤田淳、福田恵一、中村真人、心筋組

織を模倣した三次元組織構築のためのゲルScaffoldを用いた心筋組織パーツ作製の検討, 第15回 日本再生医療学会総会2016年3月、大阪

- [9] ○塚本佳也、荒井健一、加藤陸、杉本和之、境慎司、遠山周吾、藤田淳、福田恵一、中村真人、心筋とリンパ節のバイオアセンブリ, 新学術領域「超高速バイオアセンブラ」公開シンポジウム・ポスター発表 2016年3月 東京

*2016年以降

- [10] 土山祥之、杉本和之、中村真人、臓器構築のための細胞ファイバーの作製 : マイクロファイバーの応用、日本生体医工学会北陸支部大会、2016年12月3日、富山
- [11] 杉本和之、吉田真人、塚本佳也、荒井健一、境慎司、中村真人、バイオインク「フェノール基導入ゲル」による3Dバイオプリンターを用いた組織体構築、第16回日本再生医療学会、2017年3月7日、仙台
- [12] 吉田真人、杉本和之、浜田裕太、塚本佳也、荒井健一、境慎司、中村真人、Inkjet 3D Bioprinterを用いた心筋組織パーツの作製、第16回日本再生医療学会、2017年3月7日、仙台
- [13] 浜田 裕太, 杉本 和之, 吉田 真人, 塚本 佳也, 荒井 健一, 境 慎司, 中村 真人 3次元バイオアセンブリの心筋組織パーツの作製、第56回日本生体医工学会大会、2017年5月5日、仙台

(3) 図書 (2件+2016年度以降4件=合計6件))

- [1] 逸見千寿香、中村真人、西山勇一、インクジェット技術を応用した細胞の3次元パターンニング. 酒井康行、民谷栄一 監修、動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス(普及版)、シーエムシー出版、p. 203-209、2014年4月2日
- [2] Iwanaga S, Arai K, Nakamura M, Chapter 4, Inkjet Bioprinting, Essentials of 3D Biofabrication and Translation Anthony Atala, James J.Yoo Eds. S&T Books, Elsevier, 07 Aug 2015. pp.61-80.

*2016年度以降

- [3] Nakamura M, Arai K, Mimura T, Tagawa J, Yoshida H, Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Kobayashi Y, and Watanabe T, Engineering of Artificial Lymph Node, in Synthetic Immunology, Watanabe T, Takahama Y, eds. Springer, 2016, Chapter 9, pp.181-200
- [4] Kobayashi Y, Kato K, Nakamura M, Watanabe T, Synthesis of Functional Tertiary Lymphoid organs. in Synthetic Immunology, Watanabe T, Takahama Y, eds. Springer, 2016, Chapter 7, pp.151-170
- [5] 中村真人、バイオプリンティング技術による3次元アセンブリ、組織工学ライブラリー-マイクロロボティクスとバイオの融合-2)、3次元細胞システム設計論、新井健生編、コロナ社、2016/08/26 発刊、ISBN : 978-4-339-07262-4、pp. 156-170.
- [6] バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線 The Frontiers and Development of Bio-Medical 3D printing、監修：中村真人、2016年12月16日、編集発行：(株)シーエムシー・リサーチ、ISBN 978-4-904482-32-2

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計0件)

6. その他

◎新聞・雑誌・Webなどへの掲載（22件）

- [1] NHK : NEWS WEB、2014年5月8日（再放送5月12日）
- [2] NHK「試してガッテン」2014年5月28日（再放送6月4日）
- [3] テレビ朝日「池上彰の解説塾」2014年6月4日
- [4] 半導体産業新聞6月18日
- [5] 月刊北国アクタス2014年7月号（北国新聞社） 2014年06月20日
- [6] Tom's press 第30号 2014年10月15日（富山大学機関誌）
- [7] 日刊工業新聞 2014年10月29日
- [8] NHK名古屋（東海北陸）「ナビゲーション」2014年11月7日
- [9] NHKためしてガッテン2014・2015Vol. 25, 冬号(主婦の友社) 2014年12月16日
- [10]NHK富山「おはよう富山」2014年12月4日
- [11]NHK : World News、「Building Human Organs」 2015年1月27日
- [12]NE日経エレクトロニクス・デジタル 2014年12月08日 3Dプリンターで本物の臓器は作れるのか？「第76回 日本臨床外科学会総会」のシンポジウムから
<http://techon.nikkeibp.co.jp/article/FEATURE/20141208/393196/?ST=nedsmart>
- [13]富山新聞 2015年5月20日
- [14]北国新聞 2015年6月10日(夕刊)：細胞の糸で人工臓器を
- [15]北陸中日新聞 2015年6月11日：細胞の糸で人工臓器を
- [16]北日本新聞 2015年6月11日：細胞の糸で人工臓器を
- [17]信濃毎日新聞 2015年6月11日：細胞をつなぎ糸状の人工臓器を
- [18]Medical Tribune 2015年12月17日 P24-5, Clinical Topics; 3Dプリンター；人工臓器の製造・開発の支援に有効
- [19]Medical Tribune Web版；2015. 12. 19 臓器の製造・開発の支援に3Dプリンターが有効〈上・中・下〉
<https://medical-tribune.co.jp/news/2015/1219038060/>、
<https://medical-tribune.co.jp/news/2015/1220038061/>
<https://medical-tribune.co.jp/news/2015/1221038062/>
- [20]福井県広報誌「あつとほうむ」：科学の缶詰自然に学ぶテクノロジー『固まる』：2016年1月15日
- [21]医用画像3Dモデリング・3Dプリンター活用実践ガイド 杉本 真樹（著） 技術評論社（2016/3/26）
ISBN-10: 4774180092、ISBN-13: 978-4774180090に名前入りで引用 PP306-7
- [22]STI Horizon 2(1), 2016. 24-31, レポート;蒲生秀則、デジタルファブリケーション・医療応用のHorizon～3Dデジタルデータの活用とバイオファブリケーションの進展～； 2016/03/28

公募研究 B01

課題番号：26106714

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：繋ぐ技術で拓く弾性型血管の創生とバイオニックヒューマノイド

1. 研究組織

(1) 研究代表者

益田 泰輔 (Masuda, Taisuke) 名古屋大学・大学院工学研究科・助教

(2) 連携研究者

横山 詩子 (Yokoyama, Utako) 横浜市立大学・医学部・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
平成27年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

3. 研究成果

生体組織の生物学的・機械的特性を解明するために、3次元生体組織の再構築に関して様々な研究が行われている。再構築した組織は、生体内と同様の形態や機能を獲得するために力学的刺激が重要であることがよく知られている。細胞はこの力学刺激を感知し、応答することで組織形成および機能維持を示すことが知られている。本研究は、アセンブリした組織を長期機能維持させるためには、酸素および栄養の供給源を確保するためにも外部と必ず“繋ぐ”必要があるという着想に基づき、外部の灌流培養システムと融合することを前提に3次元組織構造体を作製し、機械システムと繋いだバイオニックシミュレータを開発する。

H26年度は、生体血流環境を模倣した灌流培養システムとLBL積層細胞法と積層細胞転写法を利用して作製した血管様管状組織体を融合させ、弾性線維の形成過程を評価し得るバイオニックシミュレータの構築を行った。灌流培養システムは培養器、遠心ポンプ、流量計、圧力センサ、リザーバーから構成され、生体内と同じ最大1 Paのせん断応力がかかるように、最大流量165 ml/min、最小流量116 ml/minを与えるものとし血管の脈動流を再現させた。

H27年度は、昨年度までに構築した脈動流を印加する灌流培養システムに対して、圧力フィードバック制御を追加し、生体の脈動流をより再現するしるようなシステムの改良を行った。マウス胎児由来血管平滑筋細胞を用いて直径3 mm、長さ10 mmの人工血管組織を作製し、拍動流が印加可能な循環培養システムの培養器の部分に接続した。培養チャンバの直前に圧力センサを設置し、計測圧力をフィードバック制御することにより、負荷圧力を調節した循環培養を行う。生体内と同じ最大1 Paのせん断応力がかかるように、流量は165 ml/minとした。マウス平滑筋細胞を用いて小口径血管組織を構築し、灌流培養後に全

RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により弾性線維形成マーカである Fibrillin1, Fibrillin2, および SM1 の mRNA の発現から評価した。GAPDH をリファレンス遺伝子として Δ Cp 法により整理した。拍動流を印加することで弾性線維形成タンパク質の発現量が多くなることが明らかとなった。生体内環境に近い力学刺激を与えることにより、組織の再生が促進されることが確認された。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計2 件)

- [1] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Utako Yokoyama, Fumihito Arai, Microfluidic perfusion culture system for multilayer artery tissue models, *Biomicrofluidics*, 8, 064113:1-10, 2014
- [2] Masakazu Yamada, Takahisa Anada, Taisuke Masuda, Teruko Takano-Yamamoto, Osamu Suzuki, Effect of mechanical stress on differentiation of mouse mesenchymal stem cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold, *Sens Actuators B Chem*, 220(1), pp. 125-130, 2015

(2) 学会発表 (計6 件)

- [1] 武井菜月, 山岸由佳, 益田泰輔, 松崎典弥, 明石満, 横山詩子, 新井史人, Bionic Synthesizerによる血管様多層組織の弾性線維形成評価, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第29回研究会, 東京, 2014
- [2] 山岸由佳, 益田泰輔, 武井菜月, 松崎典弥, 明石満, 新井史人, 血管様多層細胞チューブの力学的特性評価のための長期間連続モニタリングシステム, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会' 14, 富山, 2014
- [3] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Mitsuhiro Ukiki, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Utako Yokoyama, Fumihito Arai, Microfluidic Perfusion Cultivation System for Artery-like Tubular Tissues with PLCL Scaffolds, 18th Int. Conf. on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (microTAS2014), San Antonio, 2014
- [4] Yuka Yamagishi, Taisuke Masuda, Mitsuhiro Ukiki, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Utako Yokoyama, Fumihito Arai, Circulatory Culture System for Multilayer-structured Tubular Tissues, 2014 IEEE Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2014), Nagoya, 2014
- [5] 益田泰輔, 山岸由佳, 浮亀光弘, 松崎典弥, 明石満, 横山詩子, 新井史人, 3D積層技術を用いた小口径血管の構築, 新潟, 2015
- [6] 浮亀光弘, 益田泰輔, 松崎典弥, 明石満, 横山詩子, 新井史人, 血管様多層構造チューブの弾性線維形成誘導のための拍動循環培養システム, 第16回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 名古屋, 2015

(3) 図書 (計2 件)

- [1] Taisuke Masuda, Fumihito Arai, Tatsuo Arai, Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application/ Rapid assembly of cellular aggregation using micro-nano, Springer, 2014
- [2] Taisuke Masuda, Hirofumi Owaki, Tomohiro Kawahara, Fumihito Arai, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems/ Bionic Simulator Based on Organ-Explant-Chip, Springer, 2015

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計0件）

公募研究 B01

課題番号：26106717

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：インクジェットLbL法による多機能性3次元皮膚モデルの高速構築と複合的機能発現

1. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 典弥 (Michiya, Matsusaki) 大阪大学・大学院工学研究科・准教授

(2) 連携研究者

明石 満 (Akashi, Mitsuru) 大阪大学・大学院工学研究科・教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
平成27年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

3. 研究成果

本研究は、大別して1) 1細胞レベルで制御された多機能性3次元皮膚モデルの高速構築と2) 多機能性皮膚モデルを用いた複合的機能発現、の2項目から構成される。研究成果と進捗は以下の通りである。

「1細胞レベルで制御された多機能性3次元皮膚モデルの高速構築」

本研究項目では、「細胞表面へのナノ薄膜形成装置」及び「細胞プリント装置」のプロトタイプを企業との共同研究で開発した。厚さ約50µmの真皮層構造を作製する場合、10層分のコーティングされた線維芽細胞を24ウェルにおよそ20分間で吐出可能であり、その後に1日培養することで組織体が得られた。また、真皮層の上に表皮層を形成する場合、1層分のケラチノサイトを24ウェルに形成すればよいため、約2分間の吐出で完了する。しかし、その後、分化誘導に約1週間が必要であるため、高速構築には培養期間が律速であることを確認した。また、これまでの細胞表面へのナノ薄膜形成では1時間近くの処理が必要であった。収率も60-70%程度であり、約18回の遠心分離で細胞膜へのダメージも懸念された。そこで、新しい三次元組織化方法を考案した。5分以内の処理で容易に三次元組織体が構築可能であり、高い収率かつ低いダメージである。本手法は、新しい高速構築のための良い手本となることが期待される。

「多機能性皮膚モデルを用いた複合的機能発現」

これまで、真皮構造の毛細血管へのがん細胞の浸潤と移動や、免疫原を補足して活性化した樹状細胞の毛細リンパ管への侵入など複合的機能発現を報告してきた。さらに、細動脈-毛細血管-細静脈の一連の血管構造を三次元組織体内部に形成し、外部から層液可能な技術の開発にとりくんだ。直径100-200µmの

細血管構造が三次元組織体内部に造形できることが示唆された。新しい血管網構築技術として期待される。
以上より、当初の予定通り研究を進めることができた。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計10 件)

- [1] D. Hikimoto, A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, High-Throughput Blood- and Lymph-Capillaries with Open-Ended Pores which allow the Transport of Drugs and Cells, *Adv. Healthcare Mater.* **5**, 1969-1978 (2016).
- [2] C. Y. Liu, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Control of Vascular Network Location in Millimeter-sized 3D-Tissues by Micrometer-sized Collagen Coated Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **472**, 131-136 (2016).
- [3] P. Chetprayoon, **M. Matsusaki**, U. Yokoyama, T. Tejima, Y. Ishikawa, M. Akashi, Use of Three-dimensional Arterial Models To Predict the In Vivo Behavior of Nanoparticles for Drug Delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 4461-4466 (2016).
- [4] Y. Asano, H. Shimoda, D. Okano, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Transplantation of three-dimensional artificial vascular tissues fabricated using an extracellular matrix nanofilm-based cell-accumulation technique, *J. Tissue Eng. Reg. Med.*, *in press* (2015).
- [5] **M. Matsusaki**, K. Fujimoto, Y. Shirakata, S. Hirakawa, K. Hashimoto, M. Akashi, Development of Full-Thickness Human Skin Equivalents with Blood and Lymph-like Capillary Networks by Cell Coating Technology, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **103**, 3386-3396 (2015).
- [6] A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Harvesting Functional 3D-Engineered Tissues by Dynamic Wettability Control at Nano-Interfaces, *Adv. Healthcare Mater.* **4**, 1164-1168 (2015).
- [7] A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Cell-Cell Crosslinking by Bio-Molecular Recognition of Heparin-Based Layer-by-Layer Nanofilms, *Macromol. Biosci.*, **15**, 312-317 (2015). **Elected as a front cover**
- [8] A. Matsuzawa, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Construction of Three-Dimensional Liver Tissue Models by a Cell Accumulation Technique and Metabolic Function Maintenance in a Long-Term Culture without Medium Change, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **103A**, 1554-1564 (2015).
- [9] **M. Matsusaki** and M. Akashi, Control of Extracellular Microenvironments Using Polymer/Protein Nanofilms for Development of Three-dimensional Human Tissue Chips, *Polymer J.*, **46**, 524-536 (2014). **Invited Focus Review**
- [10] C. Liu, **M. Matsusaki**, M. Akashi, The Construction of Cell-Density Controlled Three-Dimensional Tissues by Coating Micrometer-Sized Collagen Fiber Matrices on Single Cell Surfaces, *RSC Adv.* **4**, 46141 (2014).

(2) 学会発表 (計10 件)

- [1] M. Matsusaki and M. Akashi, Control of Cell Surfaces by Polymer/Protein LbL Films for Fabrication of 3D-Human Tissue Models, PCT2015, June 18-19, 2015, Bangkok, Thailand.
- [2] M. Matsusaki and M. Akashi, Control of Cell Surfaces by LbL Films for Fabrication of 3D-Human Tissue Models, 4th International Conference "Strategy in Tissue Engineering", June 10-12, 2015

Wuerzburg, Germany

- [3] M. Matsusaki and M. Akashi, Artificial 3D-Blood and Lymphatic Network Tissue Models Induce Cancer Metastasis, 2nd Tissue Models & Drug Screening Conference, May 5-6, 2015, Berlin, Germany.
- [4] M. Matsusaki and M. Akashi, 3D-Human Tissue Models for Drug Assessments and Regenerative Medicine, Nanotech, June 17, June 17, 2015, Bangkok Thailand.
- [5] M. Matsusaki and M. Akashi, Cell Surface Engineering Using Polymer/Protein Nanofilms for Tissue Engineering, IUMRS-ICAM2015, Oct. 25-29, 2015, Jeju Island, Korea.
- [6] 松崎典弥、明石 満、組織構築におけるナノバイオ技術、文部科学省GRENE事業ナノバイオコース、2015年2月16日、東京工業大学田町キャンパス
- [7] 松崎典弥、明石 満、三次元ヒト生体組織モデルの構築と医療・創薬分野への応用、第54回関西バイオポリマー研究会、2015年2月10日、京都工芸繊維大学
- [8] 松崎典弥、明石 満、細胞表面への高分子ナノ薄膜形成と三次元生体組織モデルの構築、第19回関西大学先端科学技術シンポジウム、2015年1月23日、関西大学
- [9] 松崎典弥、明石 満、立体臓器開発、JST-CRDSバイオナノ分野俯瞰ワークショップ、2014年8月28日、JST東京本部別館
- [10] 松崎典弥、明石 満、Construction of 3D-Functional Human Skin Models by Coating of Layer-by-Layer ECM Nanofilms on Cell Surfaces, 3rd International Conference on Nutraceutical and Cosmetic Sciences, November 12, 2014, Keioplaza Hotel

(3) 図書 (計5 件)

- [1] 松崎典弥、明石 満、4.2 インクジェット交互積層 (LbL) 法による多機能性3次元皮膚モデル、3次元細胞システム設計論、コロナ社、2、196-208 (2016)。ISBN: 978-4-339-07262-4
- [2] 松本卓也、荏原充宏、松崎典弥、2.5 物理化学環境の整備、細胞社会学、コロナ社、3、62-77 (2016)。ISBN: 978-4-339-07263-1
- [3] 松崎典弥、明石 満、第III編 第3章 立体心筋組織体の創製、バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線、シーエムシーリサーチ出版、167-181、(2016)。ISBN978-4-904482-32-2
- [4] 西口昭広、松崎典弥、明石 満、第2編 第2章 細胞外マトリックスのレイヤーバイレイヤーによる組織構築、三次元ティッシュエンジニアリング、エヌ・ティ・エス、281-291 (2015)。ISBN: 978-4-86043-426-7
- [5] 松崎典弥、明石 満、第4編 第23章 生体由来ポリマーを用いた三次元組織構築、進化する医療用バイオベースマテリアル、シーエムシー出版、(2015) ISBN: 978-4-7813-1054-1.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況 (計5 件)

名称：脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織

発明者：松崎典弥

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願2016-027196

出願年月日：2016年2月16日

国内外の別：国内

名称：人工皮膚モデルの製造方法、及び人工皮膚モデル

発明者：明石 満・松崎典弥・佐倉武司・橋本公二・白方裕司・平川聡史

権利者：国立大学法人大阪大学・住友ベークライト株式会社・国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：特願2015-104786

出願年月日：2015年5月22日

国内外の別：国内

名称：人工皮膚モデルの製造方法、及び人工皮膚モデル

発明者：明石 満・松崎典弥・佐倉武司・橋本公二・白方裕司・平川聡史

権利者：国立大学法人大阪大学・住友ベークライト株式会社・国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：特願2015-104785（特許第5920749号）

出願年月日：2015年5月22日

国内外の別：国内

名称：人工組織及びその製造方法

発明者：明石 満・松崎典弥・海野倫明・坂田直昭・吉松軍平

権利者：国立大学法人大阪大学・国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願2014-248292

出願年月日：2014年12月8日

国内外の別：国内

名称：細胞培養用基材、コーティングキット、及び三次元組織の製造キット

発明者：明石 満・松崎典弥・西口昭広

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願2014-097103

出願年月日：2014年5月8日

国内外の別：国内

公募研究 B01

課題番号：26106718

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：三次元外分泌腺組織の in vitro 作製と生体組織度評価システムの構築

1. 研究組織

(1) 研究代表者

松本卓也 (Matsumoto, Takuya) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

(2) 研究協力者

Sathi Gulsan Ara 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ポスドク

武田宏明 (Taketa, Hiroaki) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 医員

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
平成27年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

3. 研究成果

我々の研究グループでは、本プロジェクトにおいて顎下腺組織、骨組織の in vitro 構築、これら技術を利用した組織成長制御、さらに新しいサイトカイン機能の解明、ならびに評価技術の確立を目的に研究を進めた。

機能性ペプチドを導入した生体組織成長促進ゲルの開発：細胞接着ペプチドを導入したアルジネートゲを

1. 用いることで単離した唾液腺組織の成長を促進させることを見出し、また、そのメカニズムとして RGD が持つ神経細胞伸長促進に関与することを見出した。(H. Taketa ら *Sci Rep*, 2015)

2. **iPS 細胞の三次元集合体から骨組織を生成：**iPS 細胞の三次元集合塊を作製し、適切な分化誘導をかけることで任意形状、任意サイズの骨組織生成に成功した。また、この組織形成時に血管内皮細胞を介在させることで血管ネットワークを有する骨組織生成にも成功した。(H. Okawa ら *Stem Cells Int*, 2016)

3. **構築した技術を利用した新しい生命科学現象の理解：**外部刺激環境を利用することで MCSF 顎下腺組織成長を促進し、かつマクロファージ産生に寄与していることを世界で初めて示した。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文発表（その他を含め学術論文合計 11 件、すべて査読有）

- [1] Ikeda A, Taketa H, Sathi GA, Hirano Y, Iida S, Matsumoto T. Functional peptide KP24 enhances submandibular gland tissue growth in vitro. *Regener Ther.* 3 (2016) 88-96 doi:10.1016/j.reth.2016.02.006
- [2] Okada M, Hiramatsu D, Okihara T, Matsumoto T. Adsorption and desorption behaviors of cetylpyridinium chloride on hydroxyapatite nanoparticles with different morphologies. *Dent Mater J.* 35 (2016) 651-658
- [3] Okawa H, Kayashima H, Sasaki J, Miura J, Kamano Y, Kosaka Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H. Scaffold free fabrication of osteoinductive cellular constructs using mouse gingiva-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Int*, 2016 (2016) ID 6240794. doi:10.1155/2016/6240794
- [4] Hara ES, Ono M, Yoshioka Y, Ueda J, Hazehara Y, Pham HT, Matsumoto T, Kuboki T. Antagonistic Effects of Insulin and TGF- β 3 during Chondrogenic Differentiation of Human BMSCs under a Minimal Amount of Factors. *Cells Tissues Organs.* 2016;201(2):88-96. doi: 10.1159/000442411. Epub 2016 Feb 12.
- [5] Taketa H, Sathi GA, Farahat M, Rahman KA, Sakai T, Hirano Y, Kuboki T, Torii Y, Matsumoto T. Peptide-modified Substrate for Modulating Gland Tissue Growth and Morphology In Vitro. *Sci Rep* 5 (2015) 11468, doi: 10.1038/srep11468

(2) 学会発表（その他を含め国際会議発表4件、国内会議発表4件）

- [1] Matsumoto T Synthesized mechanical environment for understanding salivary gland tissue development (Forsite Meeting, Tokyo Women's Medical University) Mar, 2016. (Invited)
- [2] Matsumoto T "Mechanically and chemically tuned environment for modulation of glandular tissue growth in vitro" International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, Jul, 2015. (Invited)
- [3] Matsumoto T Hydrogel-based biomimetic environment for understanding bone tissue formation 2014 Japanese Association for Dental Research general meeting (招待講演)

(3) 図書 (2件)

- [1] 松本卓也 組織工学ライブラリ 細胞社会学 (大和雅之 編) (2016) コロナ社
- [2] 松本卓也、武田宏明、鳥井康弘、中野貴由 基材の力学特性と組織形態形成 三次元ティッシュエンジニアリング (大政健史、福田淳二 編) (2015) NTS 出版

公募研究 B01

課題番号：26106726

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：ヒトiPS細胞由来機能性臓器の試験管内誘導へ向けた集学的アプローチ

1. 研究組織

(1) 研究代表者

武部貴則 (Takanori, Takebe) 公立大学法人横浜市立大学・臓器再生医学・准教授

(2) 連携研究者

吉川 洋史 (Hiroshi, Yoshikawa) 国立大学法人埼玉大学・化学科・准教授

鈴木 治 (Osamu, Suzuki) 国立大学法人東北大学・歯学研究科・教授

新井 史人 (Fumihito, Arai) 国立大学法人名古屋大学・工学研究科・教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
平成27年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

3. 研究成果

本研究提案では、申請者が独自開発した Organ Bud Generation 法を起点として、工学などさまざまな異分野の技術を融合し、発展型の培養系確立を目指している。

本年においては、まず細胞内・外環境の至適化を目指す研究において、著名な進展を認めた。すなわち、Organ Bud 形成における原理解明とその拡張性を実証し、A01, 2 班との連携による成果が Cell Stem Cell 5月号に表紙に採択されたほか、Nature Methods 誌において特集記事が掲載された。さらに、新たな原著論文(Inside the Cell)がまもなく論文投稿予定であるほか、原理を体系化した総説論文(Developmental Biology)がまもなく受理予定である。

次に、A03 班東北大グループとの連携による成果において、Liver Bud を高機能化する酸素供給条件の明確化に成功し、現在論文投稿に向けた準備を進めている。さらに、A02 班 名古屋大グループとの連携により、Organ Bud の粘弾性評価系を確立することに成功した。これらの成果は、国際学会発表を行ったほか、論文投稿準備中である。その他、本領域における成果をまとめ、Regenerative Therapy 誌に論文報告を行ったほか、Organ Bud 形成に関する指導原理などを体系化した書籍を2編共同執筆した。

また、若手育成に関して著名な成果を認めた。本研究に携わった、博士学生らが学術振興会 DC1 や PD など4つの研究助成金を獲得したほか、学会賞を6件受賞した。今後もこれらの成果を礎として、Organ Bud Generation 法の技術開発を継続していくことで、将来、移植医療や薬剤スクリーニングへの応用開発へと

発展させる。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文 (計34 件) うち査読付論文 (計22件)

- [1] Kagimoto S, **Takebe T***, Kobayashi S, Yabuki Y, Hori A, Hiroto K, Mikami T, Uemura T, Maegawa J, Taniguchi H: Autotransplantation of monkey ear perichondrium-derived progenitor cells for cartilage reconstruction. *Cell transplantation*. (*Joint corresponding authors), 2016;25(5):951-62.
- [2] **Takebe T***, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa H-Y, Taniguchi H: Vascularized And Complex Organ Buds From Diverse Tissues Via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell*. (*Corresponding author, Selected as **Cover Work**) 2015 16(5): 556-565, Apr 15. pii: S1934-5909(15)00115-0 doi:10.1016/j.stem.2015.03.004
- [3] Lee S, Takahashi Y, Lee KM, Mizuno M, Nemono JG, **Takebe T**, Lee JI: Viability and functional assessment of murine pancreatic islets after transportation between Korea and Japan. *Transplant Proc*. 2015 Apr; 47(3):738-41 doi: 10.1016/j.transproceed.2014.12.031.
- [4] Rashid T, **Takebe T**, Nakauchi H: Novel strategies for liver therapy using stem cells. *Gut*, 2015 Jan; 64(1):1-4. Doi:10.1136/gutjnl-2014-307480. Epub 2014 Sep 2.
- [5] **Takebe T ***, Kobayashi S, Suzuki H, Mizuno M, Chang YM, Yoshizawa E, Kimura M, Hori A, Asano J, Maegawa J, Taniguchi H: Transient vascularization of transplanted human adult-derived progenitors promotes self-organizing cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 2014 Oct 1:124(10):4325-34. doi: 10.1172/JCI76443. Epub 2014 Sep 9. (*: Correspondence)
- [6] Zhang RR, **Takebe T**, Miyazaki L, Takayama M, Koike H, Kimura M, Enomura M, Zheng YW, Sekine K, Taniguchi H: Efficient hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells in a three-dimensional microscale culture. *Methods Mol Biol*. 2014;1210:131-41. doi: 10.1007/978-1-4939-1435-7_10.
- [7] **Takebe T***, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Sekine K, Taniguchi H*: Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols* 9, 396-409 (2014). (*: Correspondence) doi: 10.1038/nprot.2014.020
- [8] Nam BM, Kim BY, Jo YH, Lee S, Nemono JG, Yang W, Lee KM, Kim H, Jang IJ, **Takebe T**, Lee JI : Effect of cryopreservation and cell passage number on cell preparations destined for autologous chondrocyte transplantation. *Transplant Proc*. 46(4):1145-9 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.117.
- [9] Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Nakata S, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, **Takebe T**, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Polycomb Group Protein Ezh2 Regulates Hepatic Progenitor Cell Proliferation and Differentiation in Murine Embryonic Liver. *PloS one* 9 (8), e104776, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0104776
- [10] Kim BY, Nam BM, Lee KM, Jo YH, Nemono JG, Yang W, Lee S, Kim H, Jang IJ, **Takebe T**, Lee JI: Effect of Preservation Conditions on Cartilage Tissue for Cell Transplantation. *Transplant*

- Proc.* 46 (4), 1139–1144, 2014 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.125.
- [11] Jo YH, Jang IJ, Nemeno JG, Lee S, Kim BY, Nam BM, Yang W, Lee KM, Kim H, **Takebe T**, Kim YS, Lee JI: Artificial Islets From Hybrid Spheroids of Three Pancreatic Cell Lines. *Transplant Proc.* 46 (4), 1156–1160, 2014 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.074.
- [12] Yang W, Lee S, Jo YH, Lee KM, Nemeno JG, Nam BM, Kim BY, Jang IJ, Kim HN, **Takebe T**, Lee JI: Effects of Natural Cartilaginous Extracellular Matrix on Chondrogenic Potential for Cartilage Cell Transplantation. *Transplant Proc.* 46 (4), 1247–1250, 2014 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.082.
- [13] Zheng YW, Nie YZ, Tsuchida T, Zhang RR, Aoki K, Sekine K, Ogawa M, **Takebe T**, Ueno Y, Sakakibara H, Hirahara F, Taniguchi H: Evidence of a Sophisticatedly Heterogeneous Population of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Transplant Proc.* 46 (4), 1251–1253, 2014 doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.077.
- [14] Sekine K, **Takebe T**, Taniguchi H: Fluorescent Labeling and Visualization of Human Induced Pluripotent Stem Cells With the Use of Transcription Activator-like Effector Nucleases. *Transplant Proc.* 46 (4), 1205–1207
- [15] Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, Li B, **Takebe T**, Zhang RR, Sakurai Y, Ueno Y, Sekine K, Ishibashi N, Imajima M, Tanaka T, Taniguchi H: The CD133+CD44+ Precancerous Subpopulation of Oval Cells Is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Stem Cells and Development*, in press. 2014 Sep 15;23(18):2237–49 doi:10.1089/scd.2013.0577. (IF= 4.67)
- [16] **Takebe T**, Taniguchi H: Human iPSC-derived miniature organs: a tool for drug studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Sep;96(3):310–3. doi: 10.1038/clpt.2014.110. Epub 2014 May 21.
- [17] Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Ouchi R, Obana Y, Mori M, Sekine K, **Takebe T**, Zheng YW, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Ring1B Promotes Hepatic Stem/Progenitor Cell Expansion via Simultaneous Suppression of Cdkn1a and Cdkn2a. *Hepatology*, in press. 2014 Jul;60(1):323–33. doi: 10.1002/hep.27046.
- [18] Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, **Takebe T**, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H: The development of humanized liver with Rag1 knockout rats. *Transplant Proc.* 2014 May; 46(4):1191–1193. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.026.
- [19] Okuda R, Sekine K, Hisamatsu D, Ueno Y, **Takebe T**, Zheng YW, Taniguchi H: Tropism of cancer stem cells to a specific distant organ. *In Vivo.* 28 (3), 361–365, 2014.
- [20] Takahashi Y, **Takebe T**, Taniguchi H: Engineering pancreatic tissues from stem cells towards therapy. *Regenerative Therapy* 2016(3): 15–23, 1 Mar 2016, doi: 10.1016/j.reth.2016.01.002
- [21] Rashid T, **Takebe T**, Nakauchi H: Novel strategies for liver therapy using stem cells. *Gut*, 2014
- [22] **Takebe T**, Taniguchi H: Human iPSC-derived miniature organs: a tool for drug studies. *Clinical Pharmacology Therapeutics.* 96(3): 310–3
- [23] 大崎達哉、福田淳二、小池博之、**武部貴則** “ヒト iPS 細胞を用いた複雑臓器の成形加工と移植医療への応用”, Vol. 33 No. 8, 2015年5月, **実験医学**
- [24] 谷口英樹、**武部貴則** “iPS 由来器官原基移植による機能的なヒト肝臓の創出”, Vol. 70 No. 2, 298–315, 2015年, **最新医学**
- [25] 谷口英樹、**武部貴則** “iPS 細胞を用いた機能的なヒト肝臓の創出”, Vol. 70 No. 3, 353–360, 2015年, **肝胆膵**
- [26] 谷口英樹、**武部貴則** “iPS 細胞を活用したヒト臓器の創出”, Vol. 7 No. 3, 36–41, 2015年, **月刊糖**

尿病 DIABETES

- [27] 谷口英樹、**武部貴則** “iPS細胞を活用したヒト器官の創出に向けた開発戦略”, 11-15, 2015年, **膝島の再生医療—膵β細胞の発生と再生をめぐる新展開—**
- [28] **武部貴則**、谷口英樹 “iPS細胞を用いた機能的なヒト臓器の創出”, 25-31, 2015年, **Annual Review 2015 糖尿病・代謝・内分泌**
- [29] **武部貴則**、谷口英樹 “iPS細胞由来器官原基の人為的構成に基づくヒト肝臓の創出”, Vol.65 No.4, 503-507, 2014年, **横浜医学**
- [30] 谷口英樹、**武部貴則** “幹細胞と微小環境の相互作用に基づくヒト3次元組織の人為的再構成”, Vol.12 No.3, 66-71, 2014年, **がん分子標的治療**
- [31] 高橋禎暢、**武部貴則**、谷口英樹 “多能性幹細胞を用いた膵β細胞分化誘導研究の最新動向”, Vol.21 No.2, 110-118, 2014年, **Organ Biology**
- [32] 谷口英樹、**武部貴則** “ヒトiPS細胞を活用した再生医療の開発戦略”, Vol.37 No.8, 2014年7月, **消化器外科**
- [33] 谷口英樹、**武部貴則** “ヒト代謝性臓器の創出に向けた開発戦略”, Vol.69 No.3, 100-109, 2014年, **最新医学**
- [34] **武部貴則**、関根圭輔、谷口英樹 “ヒト臓器の人為的構成に基づく肝細胞の分化誘導 ES・iPS細胞実験スタンダード—再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識—”, 235-245, 2014年, **羊土社**

(2) 学会発表 (計23件)

国際学会 (10件)

- [1] **Takebe T**: Human iPSC-derived organ bud based approaches towards clinical application. *8th Pan Pacific Symposium 2015 on Stem Cells and Cancer Research*, 11 Apr 2015, Taiwan. **Invited Speaker**
- [2] **Takebe T**: Liver organogenesis. *ASTELLAS FRANCE Annual Meeting of Transplantation Club*, 6 Feb, 2015, France. **Invited Speaker**
- [3] **Takebe T**: Transient vascularization of transplanted human adult-derived progenitors promotes self-organizing cartilage. *Asian Cartilage Repair Society 2nd Annual Congress*, 27 Dec, 2014. 12.7, Seoul, Korea. **Invited Speaker**
- [4] **Takebe T**: Realization of iPSC-Organ Bud Transplantation Therapy. *World Alliance forum*, 6-7 Nov, 2014, San Francisco, CA, USA. **Invited Speaker**
- [5] **Takebe T**: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Advances and Applications of Functional Hepatocytes Symposium*, 29-30 Oct, 2014, Shanghai, China. **Invited Speaker**
- [6] **Takebe T**: Pluripotent stem cells and organ reconstitution for rare diseases. *Translational Science of Rare Diseases - From Rare to Care II*, 8-10 Oct, 2014 Munich, Germany. **Invited Speaker**
- [7] **Takebe T**: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *KEY Forum: From Stem Cells to Organs*, 11 Sep, 2014, Kumamoto. **Invited Speaker**
- [8] **Takebe T**: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists*, 28 May, 2014,

Nagoya. Invited Speaker

- [9] **Takebe T**: Realization of human iPSC-derived organ bud transplantation therapy. *The Whole Liver Replacement State-of-the-Science Summit*, 29-30 Apr, 2014, Chicago. Invited Speaker
- [10] **Takebe T**: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *7th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC)*, 12-14 Apr, 2014, Taiwan. Invited Speaker

国内学会(10件)

- [1] 高橋禎暢、**武部貴則**、小池直人、関根圭輔、谷口英樹：血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立 **第44回日本膵・膵島移植研究会** 2016. 3. 10-11 京都
- [2] 小井土大、木村昌樹、谷口英樹、**武部貴則**：ゲノムデータを活用した iPS 細胞研究の新展開 **第16回日本再生医療学会総会** 2016. 3. 7-9 仙台
- [3] 松崎賢寿、吉川洋史、谷口英樹、**武部貴則**：人工細胞外基質の硬さと器官原基の自己組織化 **第16回日本再生医療学会総会** 2016. 3. 7-9 仙台
- [4] 高橋禎暢、**武部貴則**、小池直人、関根圭輔、谷口英樹：血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立 **第16回日本再生医療学会総会** 2016. 3. 7-9 仙台
- [5] **武部貴則**：臨床応用の基盤形成を目指した肝再生研究の新展開 **第51回日本肝臓学会総会** 2015. 5. 22 熊本
- [6] **武部貴則**：iPS 細胞を用いた代謝性臓器の再生医療 **第14回日本再生医療学会総会** シンポジウム「内胚系臓器の再生医療と幹細胞生物学」 2014. 3. 19
- [7] **武部貴則**：Realization of iPSC-organ bud transplantation therapy **第18回武田科学振興財団生命科学** シンポジウム 2015. 1. 16 京都
- [8] **武部貴則**：臨床応用へ向けた iPS 細胞由来ヒト臓器原基操作技術の開発 **第41回日本臓器保存生物医学会学術集会** 2014. 11. 28 大阪 奨励賞受賞講演
- [9] **武部貴則**：器官発生初期プロセスの再現による複雑なヒト臓器の人為的構成 **第37回日本分子生物学会年会** シンポジウム「生命システムの階層性に構成アプローチで挑む：複合的な視点による深化」 2014. 11. 25-27 横浜
- [10] **武部貴則**：多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成 **第66回日本生物工学会大会** シンポジウム「バイオアセンブラ ～ロボティクス×バイオ・医学の新領域開拓～」 2014. 9. 10
- ほか招待講演31件

(3) 図書 (計2件)

- [1] Koike H, **Takebe T**. “Growing Mini-Organs from Stem Cells.” *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH, 2016.
- [2] Zhang R-R, Koike H, **Takebe T**. “Chapter 17. The visualization of human organogenesis from stem cells by recapitulating multicellular interactions.” *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems*, Springer.

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計7件）

- [1] 谷口英樹(40%)、上野康晴(20%)、武部貴則(10%)、関根圭輔(10%)、奥田諒(10%)「癌微小環境を再現できる癌組織の再構築法」特願2016-53074（2016.3.16）、出願人：公立大学法人横浜市立大学
- [2] 江尻洋子(10%)、谷口英樹(50%)、武部貴則(40%)「培養方法及び細胞塊」．特願2014-112959（2014.5.30）
- [3] 武部貴則(70%)、吉川洋史(20%)、谷口英樹(10%)「自己組織化用細胞集合体の作製方法」特願2014-37341(2014.2.27)
- [4] 武部貴則(50%)、谷口英樹(40%)、高橋禎暢(10%)「生物学的組織に血管系を付与する方法」特願2013-153056（2013.7.23）PCT/JP2014/68808(出願日2014.7.15)
- [5] 江尻洋子、綾野賢、福原直人、谷口英樹、武部貴則「組織構造体及びその作製方法」特願2013-122190（2013.6.10）PCT出願：PCT/JP2014/003067（出願日2014.6.9）
- [6] 江尻洋子、綾野賢、福原直人、谷口英樹、武部貴則「培養容器及び培養方法」特願2013-120915(2013.6.7) PCT出願：PCT/JP2014/002993（出願日2014.6.5）
- [7] 谷口英樹(35%)、武部貴則(34%)、上野康晴(15%)、小池博之(15%)「アミノ酸製剤による細胞増幅法」特願2013-106289（出願日2013.5.21）PCT出願：PCT/JP2014/63181（出願日2014/05/19）

公募研究 B01

課題番号：26106722

研究期間：平成26年～平成27年

研究課題名：薬物代謝のリアルタイム評価を可能とするマイクロ流路を備えた肝組織の作製

1. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 伸彦 (Kojima, Nobuhiko) 横浜市立大学・総合科学部・准教授

2. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度			
平成24年度			
平成25年度			
平成26年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
平成27年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

3. 研究成果

計画1: 「類洞・肝細胞索に加えて、毛細胆管構造を備えた『微細構造化3次元肝組織』の構築」を実施し、さらに計画2: 『「薬物の吸収・代謝・排泄をリアルタイムに評価できるデバイス」の作製』と計画3: 『薬物代謝に関する遺伝子ノックダウンによる「薬物代謝デバイスの有効性」の検証』に取り組んだ。計画1について、マウス胎仔肝細胞とハイドロゲルビーズを使って類洞構造および肝細胞索構造を持つ肝スフェロイドを作製し、その後比較的長期間の培養を行うことによって毛細胆管と想定される構造の構築に成功した。計画2について、モデル薬物の吸収・代謝・排泄を共焦点顕微鏡下で観察できるデバイスの作製を行うことができた。計画3について、RNAiによるノックダウンよりも簡便で確実な手法としてトランスポーター阻害剤を用いた評価法を行い、毛細胆管と思われる構造への排泄能力の低下を観測できた。また、超高速バイオアセンブラの取り組みとして、臍島や骨髄、さらには精巣の再構築にも取り組み、成果を得た。

4. 主な研究発表

(1) 雑誌論文(全て査読有) (計5件)

- [1] Sayo, K., Aoki, S. and Kojima, N. Fabrication of bone marrow-like tissue in vitro from dispersed-state bone marrow cells. *Regen. Ther.*, 3, 32-37 (2016).
- [2] Kamitori, S., Ozeki, Y. and Kojima, N. β -galactoside-mediated tissue organization during islet reconstitution. *Regen. Ther.*, 3, 11-14 (2016).
- [3] Motoyama, W., Sayo, K., Mihara, H., Aoki, S. and Kojima, N. Induction of hepatic tissues in

multicellular spheroids composed of murine fetal hepatic cells and embedded hydrogel beads. *Regen. Ther.*, 3, 7-10 (2016).

- [4] Okada, R., Hara, T., Sato, T., Kojima, N. and Nishina, Y. The mechanism and control of Jagged1 expression in Sertoli cells. *Regen. Ther.*, 3, 75-81 (2016).
- [5] Yano, Y., Iimura, N., Kojima, N. and Uchiyama, H. Non-neural and cardiac differentiating properties of Tbx6-expressing mouse embryonic stem cells. *Regen. Ther.*, 3, 1-6 (2016).

(2) 学会発表 (計49 件)

- [1] 小島伸彦 内部構造の制御による肝および膵島様スフェロイドの高機能化, 日本組織培養学会第87回大会 (東京都千代田区・星陵会館) 2014年5月29日
 - [2] Kojima, N., Functional Enhancement of Multicellular Spheroid by Microchannel Fabrication. TERMIS EU 2014 Chapter Meeting. Magazzini del Cotone Conference Center, Genova, Italy. June 10-13 2014
 - [3] Motoyama, W., Aoki, S. and Kojima, N., Protection from Cell Death in Multicellular Spheroids. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. Hotel Hilton Prague, Prague, Czech Republic. August 25 2014
 - [4] Tao, F., Sato, T., and Kojima, N. Induction of hepatic functions in the ECM-loaded spheroids. International Forum on MicroManufacturing and Biofabrication 2015. Toyama International Conference Center, Toyama, Japan. May 19 2015
 - [5] 小島伸彦 組織設計技術によるミニチュア臓器のつくりかた, 第34回分子病理学研究会 (兵庫県神戸市・神戸ホテルフルーツ・フラワー) 2015年7月26日
 - [6] Motoyama, Y., Aoki, S. and Kojima, N. 3D Microfabrication and Cell Polarity Formation in Multicellular Spheroids. 4th TERMIS World Congress 2015. Boston Marriott Copley Place Hotel, Boston, Massachusetts, USA. September 9 2015
 - [7] Motoyama, F., Aoki, S. and Kojima, N. Prevention of apoptosis in epithelial-cell- spheroids. International Conference on Biofabrication 2015. Utrecht University Hall, Utrecht, Netherlands. November 8 2015
 - [8] Tao, F., Aoki, S. and Kojima, N. A New Method for Fabricating Cell-embedded ECM Capsules and ECM-loaded Spheroids. 26th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science in 2015 (MHS2015). Noyori Memorial Conference Hall, Nagoya University, Aichi, Japan. November 24 2015
 - [9] Tao, F. and Kojima, N. A method to fabricate multicellular spheroids containing various amount of extracellular matrix. TERMIS-EU 2016. Uppsala Concert and Congress, Uppsala, Sweden. June 28-July 1 2016
 - [10] 小島伸彦 高付加価値なスフェロイドをつくる技術, 日本動物実験代替法学会 第29回大会 (福岡県福岡市・九州大学百年講堂&同窓会館) 2016年11月16-18日
- などその他含め計49件

(3) 図書 (計1 件)

- [1] 小島伸彦 (分担執筆) 高粘性培地によるスフェロイド培養システム, 三次元ティッシュエンジニアリング, 大政健史・福田淳二監修, エヌ・ティー・エス, 197-204 (2015)

5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

○出願状況（計2 件）

名称：骨髄細胞凝集体の作製方法

発明者：小島伸彦

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/51009, 特願2016-571924

出願年月日：2016年1月14日

国内外の別：国内および国外

名称：高分子を細胞と共に凝集させる技術

発明者：小島伸彦

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/64167, 特願2016-517982

出願年月日：2016年5月12日

国内外の別：国内および国外