

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13849

研究課題名(和文)生物自体がもつ形態変化能を利用した、潜在的な安全性を備えた加工法創出への挑戦

研究課題名(英文)Development of riskless processing method using a capacity for morphological change

研究代表者

上杉 薫(Uesugi, Kaoru)

大阪大学・工学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20737027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞熱刺激システムを構築し、42℃以上で細胞が確実にアポトーシスを起こすことが分かった。次に、実際に加熱領域を限定し、熱刺激を加えたところ、任意の領域のアポトーシスを誘発することに成功した。

構築した組織の使用に際し、評価を行いその安全性を担保する必要がある。そこで、申請者は機械的特性を用いた評価法を提案した。人工的な組織の様に小型で発生張力の小さい試料の機械的特性評価が可能なシステムは存在せず、評価方法も確立していない。また、人工組織は機械的、化学的に脆弱で、把持、及びシステムへの固定が困難である。そこで、申請者は専用の評価システム、及び把持具を開発し人工組織を用いた疑似評価も行った。

研究成果の概要(英文)：A thermos stimulation system for cells was constructed and temperature that caused apoptosis was confirmed. Then, we successfully induce apoptosis of cells adhered on arbitrary area by thermos stimulation loaded on the arbitrary area.

It is necessary to evaluate artificial tissues for application of tissues. Therefore, we proposed the evaluation method which measuring mechanical properties of tissues. There had been few systems which had been able to evaluate artificial tissues whose size and contracting force was so small. Additionally, because of artificial tissues had been weak mechanically and chemically, there had been no fixtures which had been able to connect tissues to evaluation system. Thus, we also developed special systems. By using the developed system and artificial tissues (artificial heart tissues), we successfully simulate the evaluation. Then, we evaluated beating properties of heart tissue by using the developed system.

研究分野：BioMEMS, バイオメカニクス

キーワード：組織工学 細胞死 熱 評価 機械的特性

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞の科学に、細胞シート技術や積層組織、スフェロイド、細胞プリンティングのような組織工学の知見を統合することで、人間の体内に生きた部品を導入することが可能となる。しかしながら、生命科学と工学技術との間には未だ大きな離れが存在しており、この間を埋める新しい考え方の必要性を痛感している。しかしながら、生体に対して何らかの工学的操作を施すと、その影響を知るために膨大な検証実験が求められた上、完全な証明には至らず、いつまでも安全性への不安が付きまとう。戦略的に取り組まないと、機会の見落としや実験条件の爆発に翻弄されかねない。

申請者は、生きた部品の安全な加工法を創成するという目的のもとに考察した結果、生物に適した加工方法という発想を持ち、これに基づいて生物を取り扱う手段を選ぶべきであるという考えに至った。例えば従来のメスで切り取るような加工は組織に対し、深刻なダメージを蓄積し、調和を乱すことから細胞の壊死(ネクローシス)を誘発し得る。結果、その許容範囲内のみでの施術しか施すことができなくなる。

そこで、申請者は、プログラムされた細胞死(アポトーシス)を用いることで、より生物に対するダメージの小さい加工方法を目指した。

2. 研究の目的

細胞レベルから組織レベル($\mu\text{m} \sim \text{mm}$)における生体部品の創生を目指した。そのために生体に対して親和性を有した加工方法を検討した。本申請では、その嚆矢として“熱”を利用する。すなわち、熱を用いて細胞にアポトーシスを誘発させ、そのご死細胞を除去することにより組織の整形を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、熱を用いた組織形成を目指す。そのために以下2項目の研究を進めた。

(1) 細胞熱刺激法の確立

熱を用いた細胞のアポトーシス誘導に際して、どの程度の温度をどの程度の時間加えれば良いか調べる必要がある。過度な温度や時間で刺激をしてしまった場合、必要以上に細胞がダメージを受け、加工領域以外でのアポトーシスの発生や、ひどい場合は組織そのものが壊死してしまう可能性もある。

そこで、本研究では細胞に複数の条件で熱刺激を加え、細胞死の観察を行った。

(2) 細胞アポトーシスのパターンニング

任意の部位の細胞や組織にアポトーシスを起こすことで、任意の形状に加工できる。本研究では、細胞や組織の特定の領域に熱を加えその領域で細胞死を誘発させることで、細胞や組織の任意な形状への加工を試みた。

(3) 作製した組織の評価方法の確立

作製した組織が熱によるダメージを受けていないかの評価は重要である。組織が熱により何らかのダメージを受けていた場合、その組織特有の機能を失う可能性があり、最悪の場合移植した人体に悪影響を及ぼすからである。

本研究では、機械的特性を用いた組織の評価を試みた。機械的特性を用いることで、生化学的評価や形態学的評価に比べより包括的な評価が期待できる。本研究では近年、組織工学において発展が注目されている心筋組織に重点を置き、その機械的特性の評価方法の確立を目指し、組織の拍動特性の評価を行った。

また、体外で再構築した組織の機械的特性方法は未だ確立されておらず、評価方法も存在しなかったため、評価方法の開発も行った。

4. 研究成果

(1) 細胞熱刺激法の確立

まず、2次元平面状に培養した細胞に熱刺激を加える方法を確立した。通常のポリスチレンディッシュ、及びフィルムボトムディッシュに培地を充填し、ヒータを用いてディッシュ底面から熱刺激を加え熱伝達効率を調べた。この時、ディッシュとヒータの間の充填物は以下の様にした。すなわち、スペーサ(銅板)及び熱伝導グリス有り、スペーサのみ、そして充填物無しの3通りである。結果、通常のディッシュにスペーサ及びグリスを用いたものが最も効果的に培養表面に熱を伝達することが分かった。

次に、実際に細胞に熱刺激を加え、どの程度の温度でアポトーシスが誘発されるか調べた。図1に試験システムを示す。ヒータを用いて、通常ディッシュの培養表面をスペーサ、グリスを通して加熱する。温度は微小電対を用いてリアルタイムに測定し、調整した。刺激細胞には組織に多く含まれ、かつ培養が容易な線維芽細胞(NIH-3T3)を用いた。刺激時間は約10分間とし、刺激温度は37、38、40、42 とした。

結果、42において細胞はアポトーシスを起こし、全ての細胞が培養表面から剥離、除

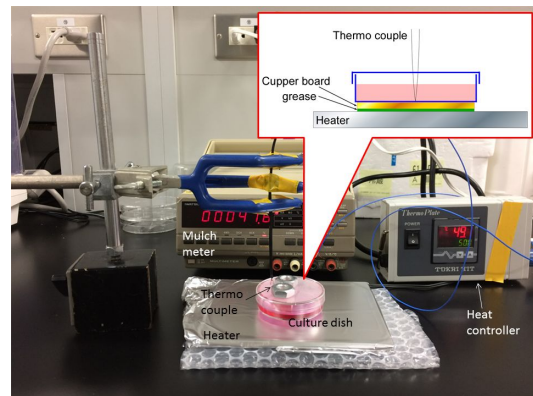


図1 細胞熱刺激試験

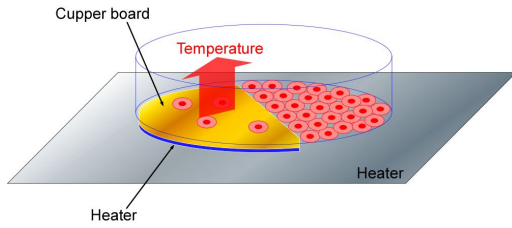


図2 熱刺激による細胞死パターンニング

去された。一方、40℃以下では目立った細胞死は確認できなかった。また、その後も培養を継続したところ、細胞の十分な増殖が観察された。このことから、熱を用いた細胞加工において、42℃の刺激を10分程度加えれば良いことが分かった。

(2) 細胞アポトーシスのパターンニング

35mm ディッシュ内に細胞を100%コンフルエントまで培養した。その後、銅板を介して、ヒータでディッシュ底面に熱刺激を加えた。銅板の形状は半円形であり、ディッシュ底面の半分だけに熱刺激が加わるようになっている(図2)。細胞には線維芽細胞に比べより複雑な機能を有する筋芽細胞(C2C12)を用いた。熱刺激を加えた結果、刺激を加えなかった領域に比べ刺激を加えた領域にて多くの細胞が死んで剥離していることが観察できた。以上より、細胞死による細胞のパターンニングの可能性が示唆された。

(3) 作製した組織の評価方法の確立
測定システムの開発

図3に開発した評価システムを示す。開発した評価システムは以下に示す3つの要素から構成される。すなわち 引張試験機構、吸引制御機構、及び 専用ソフトウェアである。

の引張試験機構に関しては、ステッピングモータにより試料にひずみ量を与え、この時発生した引張力を微小張力トランスデューサにより電圧値に変換する。電圧値はアンプで増幅され、専用ソフトウェアにより PC

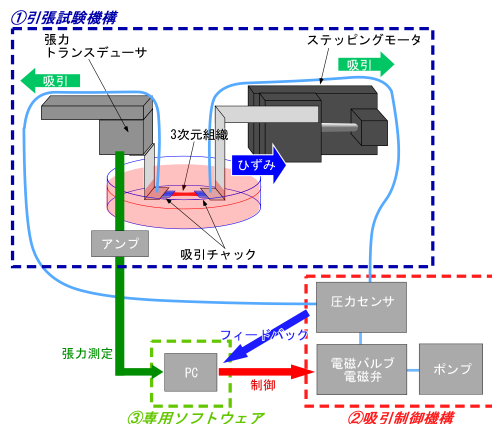


図3 組織評価システム

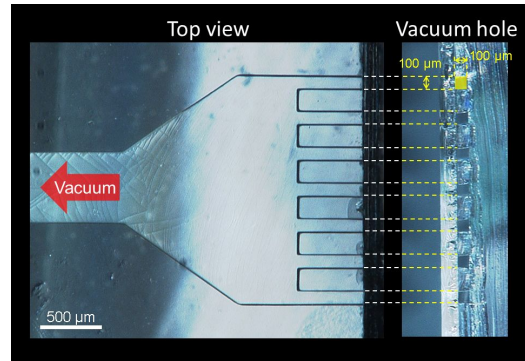


図4 Micro Vacuum Chuck (MVC)

に保存される。

の吸引制御機構に関しては、小型ポンプにより吸引圧を与え、専用ソフトウェアにより電磁弁、電磁バルブをフィードバック制御することにより、常に安定した圧力供給を行う。

の専用ソフトウェアは、試験時における引張速度や圧力の設定が可能である。試験時以外でもこれらのパラメータは調整可能であり、試験システムへの3次元組織の速やかなセッティングを実現している。

把持方法の確立

体外で再構築した組織は機械的、科学的に非常に脆弱であり、通常の把持方法(クランプや接着)での把持は難しい。そこで我々は吸引による組織の把持を検討し、Micro Vacuum Chuck (MVC)の開発を行った(図4)。MVCは複数の微小吸引孔を持ち、吸引時に発生し得る組織への応力の分散が期待できる。また、吸引孔の集積密度を上げることにより、吸引孔内への3次元組織の過度な吸引の回避も可能である。

MVCは集積した微細構造が必要なため、フォトリソグラフィにより作製した。シリコン基板上にフォトレジスト、とマスクを設置し、露光、現像した。現像した微細構造をPDMSに転写し、カバーガラスに接着した。吸引孔の各辺は100μmとした。これよりも大きいと試料が必要以上に吸引孔内に引き込まれてしまう。

心筋組織の拍動特性評価

構築した心筋組織の拍動特性を評価する場合、測定システムの構造上、インキュベータ内での測定は難しく室温での拍動力特性評価となる。一方で、培養表面から剥離、回収した組織はしばらくの間拍動が停止する。この拍動の停止が培養温度(37℃)から室温(25℃前後)に低下したためによるものか、剥離時の機械的な衝撃により細胞内骨格が破壊され起こるものか調べた。

複数の心筋組織を用意し、剥離後20分毎に拍動、及び細胞内骨格を観察した。細胞内骨格の観察に際しては、組織を固定後アクチ

ンフィラメントを傾向観察した。結果、拍動している組織、及び拍動していない組織の両者において目立ったアクチンフィラメントの差異は確認できなかった。剥離した組織は40分程度で拍動の復帰が見られた。このことから、心筋組織の拍動は剥離時の衝撃による細胞内骨格の破損によるものではなく、温度的な衝撃によるものである可能性が示唆された。しかしながら、一方で拍動は短期間で復旧することから、心筋組織の熱加工において、深刻なダメージを追う可能性が少ないことが示唆された。

昆虫心臓組織の熱刺激拍動特性評価

の結果より組織の拍動特性は熱によって影響を受ける可能性もあることが分かった。そこで、実際に熱が組織の拍動に対してどのような影響を与えるか調べた。でも述べたように測定システムの構造上、インキュベータ内での評価は難しく、評価は室温で行われる必要がある。そこで、本研究では室温においても長期間培養ができる昆虫心臓組織を用いて拍動特性に熱を与える影響を調べた。

昆虫心臓組織に5～40の熱刺激を加えた場合、拍動周波数は温度の上昇に合わせ増加傾向にあった。一方で、拍動力は15前後で最大を示した。これは細胞や組織の拍動機能の維持において、最適な温度領域が存在することを示している。すなわち、熱加工時においても、この最適温度を明らかにすることにより、より効率的な加工が実現できると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- 1) K. Uesugi, K. Shimizu, Y. Akiyama, T. Hoshino, K. Iwabuchi, K. Morishima, "Contractile performance and controllability of insect muscle powered bioactuator with different stimulation strategies", *Soft Robotics*, Vol. 3, No. 1, pp. 13-22 (2016.3) (査読有り)

[学会発表](計13件)

国際発表

- 1) K. Uesugi, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, K. Morishima, "Evaluation System for Mechanobiology of Three-Dimensional Tissue Multilayered In Vitro", *Proceedings of Micro-NanoMechatronics and Human Science 2015*, pp. 336-338, Nagoya (Nov 2015) (査読有り)
- 2) K. Uesugi, K. Fukumoto, F. Shima, S. Miyagawa, Y. Sawa, M. Akashi, and K.

Morishima "Micro fluidic vacuum chuck system for handling of regenerative three dimensional tissue" *Proceedings of the 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2016)*, pp.671-672, Dublin (Oct 2016) (査読有り)

- 3) K. Uesugi, Y. Amano, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, K. Morishima "Beating properties of 3D layered tissue constructed from iPS cardiocyte" *Proceedings of the 26th CDB Meeting Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization*, Kobe, P26 (Sep 2015) (査読無し)
- 4) K. Uesugi, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, K. Morishima "Design of Micro Vacuum Chuck for Measuring Mechanical Properties of Three Dimensional Multilayered" *International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology*, p.34, Tsukuba (Jul 2015)

国内学会

- 5) 上杉 薫, 塚本佳也, 日浦綾美, 福本健, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "機械刺激付加時のiPS細胞由来3D心筋組織の拍動特性評価", 第16回日本再生医療学会総会, 仙台 (2017.3)
- 6) 上杉 薫, 塚本佳也, 日浦綾美, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "伸展刺激によるバイオエンジニアリング的評価を目指した3次元組織の機械的特性測定", 日本機械学会 第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋 (2017.1)
- 7) 上杉 薫, 日浦綾美, 塚本佳也, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "3次元組織の機械的特性評価を目指した試験システム, 及び専用把持具の最適化", 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡 (2016.11)
- 8) 上杉 薫, 日浦綾美, 塚本佳也, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "3次元組織の機械的特性評価を目的とした試験システムの統合, およびその操作性の向上", 第34回ロボット学会学術講演会, 山形 (2016.9)
- 9) 上杉 薫, 福本健, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "3次元再生組織の機械的特性測定" 分子ロボティクス第7回領域会議, 愛知 (2016.3)
- 10) 上杉 薫, 福本健, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "iPS細胞由来心筋細胞から成る3次元構造体のメカノバイオロジー評価", 第15回日本再生医療学会総会, 大阪 (2016.03)

- 11) 上杉薫,天野雄斗,西口昭弘,松崎典弥,明石満,森島圭祐“ マイクロバキュームチャックを用いた引張試験による iPS 心筋細胞 3 次元積層組織の引張力測定 ”, 第 33 回ロボット学会学術講演会, 東京 (2015.9)
- 12) 上杉薫,松崎典弥,明石満,森島圭祐“ マイクロバキュームチャックを用いた 3 次元組織構造体の機械的特性測定 ”日本バイオマテリアル学会 第 10 回関西若手研究発表会, 大阪 (2015.8)
- 13) 上杉薫,西口昭広,松崎典弥,明石満,森島圭祐“ 3 次元積層細胞の引張試験のためのマイクロバキュームチャックの開発 ” ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 京都 (2015.5)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 上杉薫,森島圭祐“ 実用化に向けたソフトアクチュエータの開発と応用・制御技術 ”, シーエムシー出版, pp. 114-131 (2017.3)

出願状況 (計 1 件)

- 1) 名称: 組織用吸引把持具
発明者: 上杉薫,森島圭祐
出願番号: 2016-113949
出願年月日: 2016 年 6 月 7 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上杉薫 (UESUGI Kaoru)
大阪大学・大学院工学研究科・特任助教
研究者番号: 20737027

(2) 研究分担者

森島圭祐 (MORISHIMA Keisuke)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 60359114