

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19686049
 研究課題名（和文） ナノバイオ磁性ナノ粒子を用いたマルチスケールバイオマニピュレーション
 研究課題名（英文） Multi-scale biomanipulation using magnetic nanoparticles

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
 研究者番号：60345915

研究成果の概要：10 nm 程の直径の磁性ナノ粒子を、様々なバイオマテリアルで修飾することで、ナノバイオ磁性ナノ粒子を開発し、磁力を用いて細胞を操作する技術を開発した。具体的には、(1) レトロウイルスベクターを磁気操作する技術、(2) 共培養後の標的細胞を磁気分離する技術、(3) 細胞を磁力で配置するパターンニング技術、(4) 細胞を磁力で集積させて高度な三次元組織を構築する技術、といったナノからミリメートルに及ぶマルチスケールバイオマニピュレーションの開発を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：ティッシュエンジニアリング、磁性粒子、再生医療、ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者である井藤は今までに、標的分子デザインとして、磁性ナノ粒子表面に細胞・組織指向性を付加したバイオターゲティングの研究を行ってきた。具体的には、酸化鉄の磁性ナノ粒子（マグネタイト、 Fe_3O_4 ）に生体親和性を付加させるためにリポソームで包埋し、その表面に癌細胞特異的抗体を結合させることで、癌細胞に特異的に送達される機能性磁性ナノ粒子を開発し、磁性ナノ粒子が交番磁場で発熱するのを利用した癌温熱療法のためのナノメディシンの開発を行

ってきた。さらに、我々はバイオターゲティング技術を、近年、夢の医療として期待される組織工学分野（Langer R, Vacanti JP. *Science* 1993）へと発展させている。具体的には、機能性磁性ナノ粒子を予め細胞に添加することで細胞を磁気標識し、磁力で引きつけることにより、細胞を層状に積み重ねていき、一定時間磁力で保持することによる三次元培養で細胞外マトリクスを形成させ、三次元組織を構築する技術を新しく開発した。この技術によって、心筋や皮膚といった、細胞を重層化させてシート構造にすることで機

能はるかに促進される器官が構築可能であることを示してきた。本研究ではこのナノバイオ技術をさらに発展させ、細胞機能を制御する技術を開発することを目的とした。磁性ナノ粒子表面をリボソーム化、ポリエチレングリコール化、細胞接着ペプチドの結合、といったバイオマテリアルで修飾することで、磁性ナノ粒子 - 標的細胞間デザインを行うことで、医療応用可能なナノバイオ磁性粒子を開発し、新規医療技術への発展を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、10 nm 程の直径の磁性ナノ粒子を、様々なバイオマテリアルで修飾することで、ナノバイオ磁性ナノ粒子を開発し、磁力を用いて細胞を操作する技術を開発した。具体的には、近年発展が著しい再生医療の一つの技術であるティッシュエンジニアリング分野における以下の4つのプロセスへの応用を行った。

(1) 遺伝子導入用レトロウイルスベクターの磁気操作

レトロウイルスベクターは遺伝子の運び屋であり、目的遺伝子を標的細胞の染色体に組み込むことができるので、遺伝子治療における遺伝子導入の強力なツールであり、再生医療分野においても、人工多能性幹細胞 (iPS) の樹立等に使用されている。一方で、レトロウイルスベクターは、使用前に力価を高めるために濃縮する必要がある。そこで、レトロウイルスに静電的相互作用で結合するナノバイオ磁性ナノ粒子を作製し、レトロウイルスベクター溶液に添加して、磁石で磁気分離を行うことで、レトロウイルスベクターを高効率で回収することができ、回収後の懸濁溶液の液量を減らすことで、濃縮する技術の開発を行った。

(2) 共培養後の標的細胞の磁気分離法の開発

再生医療において、目的細胞を他の細胞と一緒に培養する方法 (共培養法) は有用な手段である。例えば、胚性幹細胞 (ES 細胞) は、マウス胚性線維芽細胞やその細胞株である STO 細胞をフィーダー細胞として、その上で共培養されることで、未分化能が維持される。本研究では、STO 細胞に予めナノバイオ磁性ナノ粒子を取り込ませておき、共培養後に磁気分離で排除するといった新しい磁気分離法を開発を行った。

(3) 細胞を磁力で配置するマイクロパターンニング法の開発

生体内の組織や臓器は、様々な種類の細胞が精緻に配置・配列されて、お互いが相互作用することで、機能を保持している。そこで、

再生医療分野において、細胞を自在に配置・配列する技術を開発することは、大変重要である。本研究では、以下の3種類のナノバイオ磁性ナノ粒子を用いて磁力によって物理的に細胞をパターンニングする技術を開発した。

細胞接着ペプチド結合型磁性ナノ粒子を用いたパターンニング法の開発

細胞接着ペプチドである RGD ペプチドを磁性ナノ粒子表面に結合し、磁力を用いて細胞非接着表面上に配置することで、細胞接着エリアを作製し、その上から目的細胞を播種することで、細胞のパターンニングを行った。

細胞非接着高分子結合型磁性ナノ粒子を用いたパターンニング法の開発

細胞を接着させない素材として知られるポリエチレングリコール (PEG) を表面に固定化した磁性ナノ粒子を用いて細胞接着表面上に磁力で配置することで、細胞非接着エリアを作製し、その上から目的細胞を播種することで、細胞のパターンニングを行った。

予め磁気ラベルした細胞を用いたパターンニング法の開発

標的細胞に予め磁性ナノ粒子を取り込ませることで磁気標識を行い、その細胞を磁力で引き寄せることでパターンニングを行った。特に、本方法は組織上への細胞パターンニングに使用した。

(4) 複数種類の細胞を磁力で集積させて高度な三次元組織を構築する技術

生体内の組織・臓器は複数種類の細胞からなっているため、ティッシュエンジニアリングにおける組織構築も、生体組織を模倣する必要がある。本研究では、肝実質細胞と非実質細胞の三次元共培養組織のモデル系として、予めナノバイオ磁性ナノ粒子で磁気ラベルした肝ガン細胞株 HepG2 細胞とマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞からなる三次元組織作製を行った。

本研究では、これら4つの研究課題を行い、ナノメートルからミリメートルに及ぶマルチスケールバイオマニピュレーションの開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入用レトロウイルスベクターの磁気操作

レトロウイルスベクターを磁気ラベルするために、レトロウイルスが動物細胞の細胞膜と同じ負電荷を持っていることを利用して、正電荷脂質包埋型磁性ナノ粒子

(Magnetite cationic liposome, MCL) を作製した。MCL はリン脂質である DLPC、DOPE および正電荷を持つ TMAG からなるカチオン性リポソームに、10 nm の水分散マグネタイト (Fe_3O_4) を超音波法にて包埋させることで作製した。

LacZ 遺伝子を持つウイルス溶液中に MCL を、ウイルスを感染させる Neuro2a 細胞に対して 100 pg/cell で加え、時々緩やかに攪拌しながら氷上に 30 分間静置した。その後、磁石をあて、磁石に寄った MCL と上清とに分けて、Neuro2a 細胞に感染させ、48 時間後に Xgal 染色によりウイルスの力価を測定した。

(2) 共培養後の標的細胞の磁気分離法の開発

ES 細胞の培養系としてマウス ES 細胞株 H-1 と STO 細胞の共培養を行った。MCL で予め磁気ラベルし、さらに蛍光およびマイトマイシン C 処理した STO 細胞 (1×10^6 cells) をゼラチンコートディッシュで培養し、これをフィーダー細胞とした。翌日、H-1 細胞 (5×10^5 cells) をフィーダー細胞上に播種して 2 日間共培養を行った。共培養後、トリプシン処理にて H-1 細胞と STO 細胞の混在した懸濁液とし、磁気分離を行うことで、懸濁液から STO 細胞を除去し、計数にて H-1 細胞の精製度及び回収率を求めた。続いて、磁気分離の有無による各々の H-1 細胞を用いてハンギングドロップ法にて胚様体を作製し、その形成率を評価した。

(3) 細胞を磁力で配置するマイクロパターンニング法の開発

細胞接着ペプチド結合型磁性ナノ粒子を用いたパターンニング法の開発

MCL の表面に、足場タンパク質中のインテグリン認識結合部位である RGD (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸) ペプチドを結合させることで細胞接着性の磁性ナノ粒子 RGD-MCL を作製した。CAD により作製したパターン化磁石により RGD-MCL を、低接着性の培養皿に特定形状に配置させることで細胞のパターンニングを行った。ターゲットの細胞としては、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT を足場依存性の高い細胞のモデルとして用いた。

細胞非接着高分子結合型磁性ナノ粒子を用いたパターンニング法の開発

アミノシランで被覆し、ポリエチレングリコール (PEG) を結合させることで細胞非接着性の磁性ナノ粒子 PEG-Mag を作製した。まず、この PEG-Mag をパターン化磁石により培養表面で特定形状に配置し細胞を播種した。ここで、PEG-Mag を配置した領域には細胞は接着できない。細胞の接着後、PEG-Mag を取り除

き、他の種類の細胞を播種することにより 2 種類の細胞のパターン化共培養系の構築を試みた。次に、コンフルエントな単層の細胞上にパターン化磁石を用いて特定形状に PEG-Mag を配置し、他の種類の細胞を播種した。細胞の接着後、PEG-Mag を取り除くことにより、単層の細胞上で異種細胞のパターンニングを試みた。ターゲットの細胞として、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT、マウス筋芽細胞株 C2C12、マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 を用いた。

予め磁気ラベルした細胞を用いたパターンニング法の開発

MCL を 100 pg/cell の濃度で培地に添加し、24 時間培養を行うことで HUVEC 及び NHDF (正常ヒト皮膚線維芽細胞) を磁気標識した。磁気標識した NHDF 細胞を培養皿内に設置した円筒シリコンゴム (内径 17 mm) 内に 1.5×10^6 cells/dish で播種し、磁石 (4000G) を培養皿下に設置することで、培養底面に高密度に引き寄せ、NHDF 細胞シートを作製した。2 時間後、CAD を用いて作製した「M」「A」「G」の形状のパターン化磁石 (幅 200 μm) を培養皿下に設置し、蛍光標識した HUVEC を 1.0×10^4 cells/dish で播種した。播種 4 時間後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、さらに CD31 染色を行った。

(4) 複数種類の細胞を磁力で集積させて高度な三次元組織を構築する技術

混合三次元共培養シートは、MCL を添加した HepG2、3T3 細胞をそれぞれ 1×10^6 個/well ずつ混合したものを超低接着性培養皿に播種し、磁石を置いて 1 日培養した。二層状三次元共培養シートは、MCL を添加した 3T3 細胞を 1×10^6 個/well で播種して、磁石を置いて 1 日培養した後、MCL を添加した HepG2 を等量播種し、更に 1 日培養した。翌日、ピペティングにて形成した細胞シートを剥離・回収した。また、ヒトアルブミン ELISA 定量化キットを用い、培地中のアルブミン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入用レトロウイルスベクターの磁気操作

ウイルス粒子と複合体を形成した MCL を磁気分離した後、上清を除き、ペレットを 100 分の 1 量となるように培地で再懸濁した。磁気濃縮したレトロウイルスベクターを Neuro2a 細胞に感染させたところ、ウイルス力価は 3.6×10^8 IU/ml となった (Fig. 1)。これは濃縮前と比較して 55.9 ± 8.3 倍増加したことに相当する。さらなる磁気濃縮のスケールアップはウイルス溶液あたりの MCL 量を設定することにより調節することができる

と考えられる。

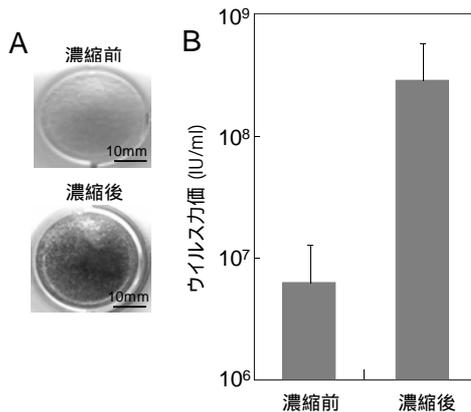


Fig. 1 (A) 磁気濃縮前後での X-gal 染色写真
(B) 磁気濃縮前後でのウイルス力価

さらに、細胞培養ディッシュ底面に細い形状の磁石を置き、MCL で磁気標識したレトロウイルスベクターを添加し、48 時間後に X-gal 染色を行ったところ、磁石の形状にウイルスベクターが感染しているのが見られたことから、MCL と磁場を制御することによりウイルスベクターの磁気濃縮および磁気誘導といった磁気操作に成功した。

(2) 共培養後の標的細胞の磁気分離法の開発

磁気分離前における懸濁液中の ES 細胞の精製度は 71.6%であったが、磁気分離を行うことで 96%まで向上し、回収率は 100%であった。ES 細胞を用いて胚様体の作製を試みたところ、磁気分離を行わなかったときには胚様体形成率は約 50%であり、磁気分離を行った ES 細胞での胚様体形成率は約 90%と有意に向上した。これらの結果と、作製した胚様体の組織観察の結果から、混在する STO 細胞が胚様体の形成を阻害していることが示唆された。

これらの結果から、予めフィーダー細胞に MCL を用いて磁気ラベルして、共培養後に分離する本手法は、その後の ES 細胞の分化誘導のプロセスである胚様体形成に対して、非常に有効であることが分かった。

(3) 細胞を磁力で配置するマイクロパターンニング法の開発

細胞接着ペプチド結合型磁性ナノ粒子を用いたパターンニング法の開発

CAD により作製した特定形状「M」、「A」、「G」のパターン化磁石と同じ形状に細胞をパターンニングさせることに成功した。RGD-MCL は細胞と静電的に結合し、さらに RGD ペプチドが細胞外マトリクスの分泌を促進すること

によって超低接着性の培養表面で細胞が接着・伸展し、特定形状に配列した (Fig. 2)。

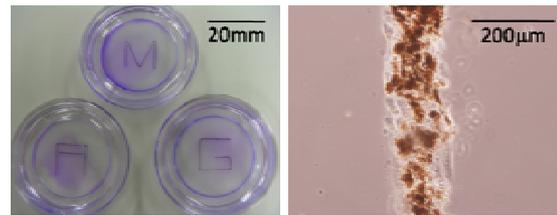


Fig. 2 (左) クリスタルバイオレット染色。
(右) 幅 200 μm に配列した細胞。

細胞非接着高分子結合型磁性ナノ粒子を用いたパターンニング法の開発

PEG-Mag をパターン化磁石により特定形状に配置させ、培養表面をマスクすることにより 2 種類の細胞のパターン化共培養系を構築することに成功した。また、培養表面だけではなく、コンフルエントの細胞上で他の種類の細胞をパターン化させることにも成功した。細胞上に磁性ナノ粒子を配置するためには、細胞内への過剰な取り込みを抑制するために PEG による修飾は有効であると考えられた。

予め磁気ラベルした細胞を用いたパターンニング法の開発

多層の細胞層からなる NHDF 細胞シート上へのパターンニングを試みたところ、パターン化磁石の幅と同程度の幅および形状に HUVEC をパターンニングすることに成功した (Fig. 3)。細胞の磁気パターンニングは CAD により設計されたパターン化磁石を用いて制御可能であり、より複雑な形状のパターンニングに応用可能な技術であると考えられる。

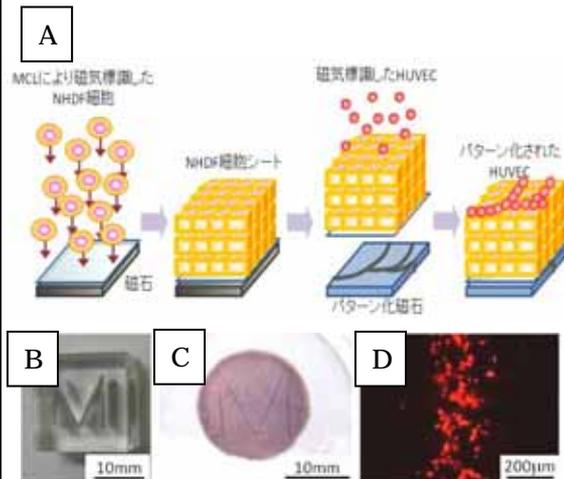


Fig. 3 (A) 実験手順
(B) パターン化磁石
(C) CD31 染色
(D) 細胞シート上にパターンニングされた HUVEC の蛍光顕微鏡画像

(4) 複数種類の細胞を磁力で集積させて高度な三次元組織を構築する技術

HepG2 細胞は、磁石に引き付けられて培養底面に均一に降り積もっていたが、強度がなく、剥離・回収できなかった。上皮系細胞である HepG2 は重層化構造にはなりにくいためだと考えられた。間葉系細胞である 3T3 は、磁石に引き付けられて培養底面に均一に降り積もり、やや収縮した細胞シートを形成した。3T3 の細胞シートは移送可能な強度を持っていた。この 3T3 細胞の培養細胞シートを利用して、HepG2 と 3T3 からなる三次元組織を作製したところ、混合三次元共培養シートおよび二層状三次元共培養シート (Fig. 4) を形成することができた。

アルブミン分泌濃度は混合三次元共培養シート > 二層状三次元共培養シート > HepG2 三次元単培養シート > HepG2 二次元単培養 > 3T3 三次元細胞シートとなった。これは HepG2 細胞が 3T3 細胞と接触することで生じる相互作用により、アルブミン分泌能が促進されたためと考えられる。

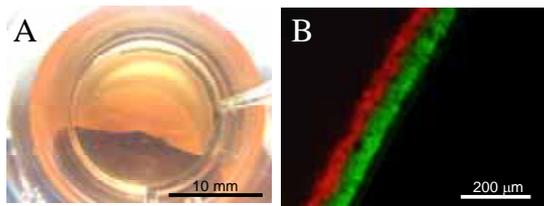


Fig. 4 (A)二層状三次元細胞シート概観
(B)二層状三次元細胞シート断面
の蛍光顕微鏡画像。

緑: NIH3T3 細胞、赤: HepG2 細胞

これらの結果から、間葉系細胞の NIH3T3 を HepG2 と共培養させることで、上皮-間葉系三次元組織が誘導された。さらに、異種細胞間相互作用により HepG2 の機能を亢進することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Akiyama H, Ito A, Kawabe Y, Kamihira M. Cell-patterning using poly (ethylene glycol)-modified magnetite nanoparticles. J Biomed Mater Res A. in press (2009) 査読有り
2. Akiyama H, Ito A, Kawabe Y, Kamihira M. Fabrication of complex three-dimensional tissue architectures using a magnetic force-based cell patterning technique. Biomed Microdevices. in press (2009) 査読有り

3. Ito A, Jitsunobu H, Kawabe Y, Ijima H, Kamihira M. Magnetic separation of cells in coculture systems using magnetite cationic liposomes. Tissue Eng Part C Methods. in press (2009) 査読有り
4. Ito A, Takahashi T, Kameyama Y, Kawabe Y, Kamihira M. Magnetic concentration of a retroviral vector using magnetite cationic liposomes. Tissue Eng Part C Methods. 15: 57-64 (2009) 査読有り
5. Ito A, Kiyohara T, Kawabe Y, Ijima H, Kamihira M. Enhancement of cell function through heterotypic cell-cell interactions using E-cadherin-expressing NIH3T3 cells. J Biosci Bioeng. 105: 679-682 (2008) 査読有り
6. Ito A, Jitsunobu H, Kawabe Y, Kamihira M. Construction of heterotypic cell sheets by magnetic force-based 3-D coculture of HepG2 and NIH3T3 cells. J Biosci Bioeng. 104: 371-378 (2007) 査読有り
7. Ito A, Akiyama H, Kawabe Y, Kamihira M. Magnetic force-based cell patterning using Arg-Gly-Asp (RGD) peptide-conjugated magnetite cationic liposomes. J Biosci Bioeng. 104: 288-293 (2007) 査読有り

[学会発表](計5件)

1. 井藤 彰 他、マグネタイトカチオンリポソームを用いた共培養系からの細胞の磁気分離法の開発、化学工学会 第74年会、2009年3月20日、横浜
2. Ito A, et al、Enhancement of hepatocyte function through heterotypic cell-cell interactions using E-cadherin-expressing NIH3T3 cells、the 20th JAACT meeting、November 26, 2008、Fukuoka
3. Ito A, et al、Magnetic manipulation of a retroviral vector using magnetite cationic liposomes、MHS2008、November 8, 2008、Nagoya
4. 井藤 彰 他、磁力を用いた三次元組織構築法の開発、第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋
5. 井藤 彰、機能性磁性ナノ粒子を用いたティッシュエンジニアリング技術の開発、第73回化学工学会年会、2008年3月19日、浜松

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002906/index.html>

6. 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
研究者番号：60345915

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：