

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650102

研究課題名（和文） 時空間的分化パターン誘導による幹細胞群からの臓器機能構築システム

研究課題名（英文） Internal-organ functional construction system from stem cells by spatiotemporal pattern differentiation

研究代表者

齋藤 敬 (SAITO TAKASHI)

公立大学法人 秋田県立大学・システム科学技術学部機械知能システム学科・准教授

研究者番号：70418771

研究成果の概要（和文）：細胞分化の制御は再生医療の大きな課題であるが、臓器については再生の目処が立っていない。我々は光照射で制御可能な細胞膜穿孔法を発見、その応用による大規模細胞分化誘導システムの開発を試みた。細胞集団を処理可能な剣山状細胞膜穿孔体と細胞用光照射パターンニング機構の実証運用や、ガラスキャピラリー細胞膜穿孔体による膜穿孔基礎データ収集を行った結果、生化学的穿孔条件や機械的機能の要改良点に関する成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Although the control of cell differentiation is a major subject on regenerative medicine, but systematic reconstruction of internal organs is still unclear. We tried to develop a large-scale cell differentiation system based our unique high-performance cell membrane perforation method which is controllable by light irradiation. With a various brush or capillary-shaped cell membrane perforator and light patterning system, we could collect fundamental data about spatiotemporal pattern differentiation of cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：細胞改変技術・生体模擬ロボット

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器学・再生医工学・細胞治療・光化学・細胞・自己組織化材料・酸化・自動化

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分化の制御は再生医療の大きな課題であるが、分化が可能な組織は皮膚や角膜等の単純なものに限られ、多数かつ複数種の細胞群が系統的に機能している臓器については再生の目処が立っていない。これに対し我々は、局所的な光化学酸化反応により、細胞死を誘発しにくいサブミクロン径の細胞

膜穿孔法を発見、細胞集団を対象とした物質導入法として研究を進めていた。既に一細胞を対象とした光化学細胞膜穿孔法によって、細胞内に遺伝子や機能性タンパクを導入し、それらの機能が発現することを観察していた。この知見から、細胞集団に対して任意の時間的・空間的パターンで分化誘導物質を作用させるツールとして、光化学細胞膜穿孔法

を進展可能と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では光化学細胞膜穿孔法と自己組織化材料との組み合わせによって、大規模細胞分化誘導システムの開発を行う。また、細胞への物質導入は光照射によって誘発されるため、光照射パターンの制御により、細胞集団に任意の時空間的パターンで分化誘導を行う。このため光酸化反応を誘発できるナノ剣山状細胞膜穿孔体とその運用システムによって（図1参照）、シート状の細胞群の個々の細胞に対し、印刷的に任意のパターンで物質を導入する、大規模集積型の細胞分化誘導システムを開発する。

## 3. 研究の方法

実験対象として、培養・分化が容易なラット由来クロム親和性褐色細胞種 PC12 細胞を基本とした。その他、各種動物細胞を適宜使用した。細胞膜穿孔体については、剣山型はナノインプリント技術により、サブミクロン～ミクロン級の孔形や孔ピッチを有する多孔質シリコン基板（特注品、カンタム14）を鋳型に、シリコンポリマー(PDMS)に転写作成した。ポリマー内には光増感剤としてヘマトポルフィリン二塩酸塩、キャピラリー型については、市販のマイクロインジェクション用キャピラリー、あるいは同形状の自作ガラスキャピラリーの表面に、ヘマトポルフィリンをコーティングした。

穿孔体評価の基本プロセスとして、それらの穿孔体を使用した細胞穿孔の際に蛍光物質（マイクロインジェクション用 Alexa Fluor 594, Invierogen）を染み込ませ、その後細胞を洗浄し、細胞外の蛍光物質を除去する。

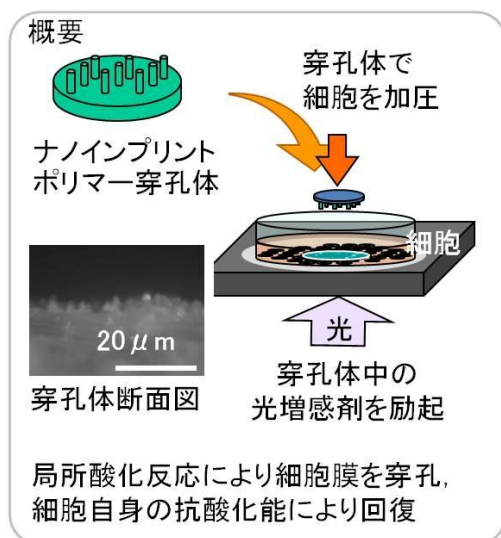


図1 剣山状細胞膜穿孔体の適用方法

この細胞膜穿孔前後で細胞の透過像、蛍光像を撮影、細胞膜の穿孔と回復が達成された場合のみ、細胞内に蛍光が観察されることになる。なおキャピラリー型については、細胞膜電位を計測する電気生理実験にも適用した。具体的にはキャピラリーに銀-塩化銀ワイヤを組み付け、塩化カリウム溶液を充たすことで電極化、既存の細胞計測アンプ(MultiClamp 700B, Molecular Devices)に接続して、膜穿孔機能を使用した際の細胞膜電位の計測状況から評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 平成22年度

同年度の実験においては、ディッシュ上のPC12細胞集団に、改良型穿孔体によって細胞膜不透過性蛍光色素を膜穿孔により細胞内に導入成功した。この際の光源は顕微鏡の水銀ランプであったが、一方でLEDアレイを光源としたものでは光量の不足のためか成功しなかった。このため今後の細胞パターンニング実験では、ハロゲンランプ光源プロジェクタが必要と見積もられた。なお細胞に対し、期間をおいて穿孔を複数回行う場合には、細胞密度に応じて穿孔時の細胞加圧を変化させる必要があった。このためHeLa細胞で成功していた画像からの細胞面積導出プログラムを基に穿孔制御への応用を試みたが、PC12細胞には形状の違いからそのままでは適用出来ず、平成22年度内にはプログラム修正が間に合わなかった。しかしながら、問題点の抽出の結果、翌23年度に実装に成功した。なお穿孔体成型時の残留気泡の除去や、成型時間の短縮、また成型精度の向上を達成し、以降の穿孔実験の定量的データ収集の基盤が出来た。

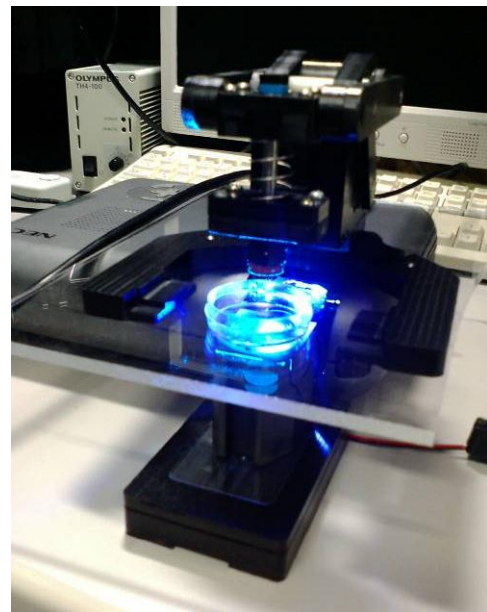


図2 光照射パターンニングシステム

## (2)平成23年度

細胞実験と装置構築を同時並行で進める予定を変更し、細胞実験の定量性を優先的に確保すべく装置に必要な技術要素を開発した。その結果、分化誘導システムの中核機構である加圧装置精度の向上、分化誘導因子を含む複数の液を交換可能な送液機構の開発、ハロゲンランプ光源とデジタルマイクロミラーデバイスによる光照射パターンニング機構といった装置の構築(図2参照)、そして様々な細胞膜穿孔体形状や細胞密度に対応した、運用ソフトウェア開発に成功した。

以上のハード・ソフト合わせたシステム構築により、本研究の最終課題である前例のない高度な細胞分化誘導実験に向けた機材の準備は、予定をほぼ1年前倒しし、平成23年度に整った。

## (3)平成24年度

同年度には、計画の中核となる細胞用光照射パターンニング機構の実証運用を行った。いくつかの特許性のある成果が得られ、出願を進めている。ただし特許出願前には関連成果を公開出来ないことから、学会・論文発表については制限せざるを得なかった。それを補うべく、ガラスキャピラリー細胞膜穿孔体による基礎データ収集も行い、細胞膜穿孔-回復プロセスに関する成果が得られた。この成果については国際学術会議での発表が受理されている。なお過去に出願した本研究に関連する特許出願が1件、本研究成果等に基づく抗弁により平成24年度新たに成立した(特許第5053350号)。

細胞パターンニング装置の開発は成功したが、中核となる剣山状細胞膜穿孔体が外注部品の仕様変更の影響を受け穿孔性能が安定せず、十分な実証データが得られなかった。ただし特許性のある細胞改変成果は得られたこと、またこの間の遅れをガラスキャピラリー細胞膜穿孔体による細胞膜穿孔-回復の基礎データ収集に充て、成果が得られた。このことから全体としてはおおむね順調に進展したと判断した。

## (4)まとめ

大規模細胞改変システムについて、細胞膜穿孔体の細胞への接触状況など機械面の精度向上が重要になってきた。この点、本技術に興味を持つ企業との議論の中で、射出成形分野の精密金型技術が応用可能である旨が明らかとなり、この知見を反映した次世代機の設計に入っている。この新たな機材により細胞実験の再現性を向上し、細胞パターンニングに関する定量的な解析を行うことで、技術の

信頼性を高める。また研究開発資金も基礎研究予算から開発予算の獲得へとシフトし、企業とも連携して技術の実用化を急ぎたい。

その一方で、シート状の細胞に対する穿孔体の適用について、僅かな加圧の不均一さが物質導入効率を大きく左右することが判明した。また穿孔体の鋳型メーカーの製造プロセス更新の影響で、剣山状細胞膜穿孔体の成形不良が生じ、この問題は最終年度末に解決したが、計画の遅延を招いた。今後、より安定して細胞膜穿孔法を実施できるよう、機器面の改良が重要と考えられる。

## 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2件)

①M. Shibata, S.Kashiwazaki, T.K.Saito, Photodynamic Cell Membrane Perforation for Intracellular Electrodes, Proceedings of the 35th Annual International IEEE EMBS Conference. 査読有,2013, in press.

②W. Tonomura, T. Yamamoto, T.K.Saito, S. Konishi,” Chemically-Modified MEMS Probe Driven by Self-Alignment Mechanism for Photooxidative Cell Membrane Perforation”, Sensors and Actuators B: Chemical, 査読有,148, 2010, pp.29-33  
doi:10.1016/j.snb.2010.04.014

[学会発表] (計5件)

①齋藤敬、局所光酸化反応による大規模・高効率細胞膜穿孔法と細胞改変ロボットシステム、BioOpto JAPAN 2012、2012年9月25日、パシフィコ横浜、横浜市

②齋藤敬、本間悠介、中村砂織、柏崎脩平、簡易型大規模細胞改変システムの開発、ロボティクス・メカトロニクス講演会 2012 in 浜松、2012年5月29日、アクティ浜松、浜松市

③Takashi Kei SAITO,”How to combine real and artificial neural networks”, GenNext: 6th Biyani’s International Conference, 2011年9月23日, Biyani Girls College,Jaipur,India

④柏崎脩平、山本隆寛、齋藤敬、汎用型大規模細胞改変システムのための装置及び細胞膜穿孔体の開発、第26回生体生理工学

シンポジウム、2011年9月21日、立命館大学、草津市

- ⑤ Takashi K. Saito, "Interdisciplinary Bio-Robotics Research Based on Disruptive Technologies", International Conference on Emerging trends in Engineering & Technology, 2010年11月26日, Jaipur, India

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

- ① 名称：細胞の特定部位穿孔技術  
発明者：軽部征夫、齋藤敬  
権利者：秋田県立大学  
種類：特許  
番号：特許第5053350号  
取得年月日：2012年8月3日  
国内外の別：国内

- ② 名称：膜の穿孔方法および装置  
発明者：齋藤敬  
権利者：秋田県立大学  
種類：特許  
番号：特許第4593857号  
取得年月日：2010年9月24日  
国内外の別：国内

[その他]

アウトリーチ活動情報

- ① 齋藤敬、細胞治療に向けた簡易型細胞膜穿孔システムの開発、口頭発表、平成24年度秋田県産学官連携促進事業・医工連携関係研究開発事業研究成果報告会、2013年3月15日、秋田地方総合庁舎、秋田市
- ② 齋藤敬、局所酸化反応による大規模・高効率細胞膜穿孔法と細胞改変ロボットシステム、技術展示と講演、**BIO tech 2012**、2012年4月25日-27日、東京国際展示場、東京都
- ③ 齋藤敬、バイオ研究者によるロボット開発～細胞改変ロボットから多脚歩行ロボットまで～、招待講演、**NIDays**、主催 (株)日本ナショナルインスツルメンツ、2011年12月1日、東京コンファレンスセンター品川、東京都
- ④ 齋藤敬、大規模・高効率細胞膜穿孔法による細胞改変ロボットシステム、招待講演、由利本荘テクノネットワーク、2010年11月22日、本荘由利共同研究センター、由利本荘市

- ⑤ 齋藤敬、大規模・高効率細胞膜穿孔法による細胞改変ロボットシステム、招待講演、秋田メディカルインダストリネットワーク平成22年度第2回医療ニーズ発表会、2010年11月9日、秋田ビューホテル、秋田市

- ⑥ 齋藤敬、大規模・高効率細胞膜穿孔法と細胞改変ロボットシステム、実用化に向けた技術プレゼンテーション、JST新技術説明会、2010年10月28日、JSTサイエンスプラザ、東京都

- ⑦ 齋藤敬、破壊的イノベーションによるバイオ・機械融合研究と産学連携～高効率細胞膜穿孔技術と生体模擬ロボット、技術展示・各種ロボットデモとプレゼンテーション、ビジネスマッチ東北2010、2010年10月27日、夢メッセみやぎ、仙台市

- ⑧ 齋藤敬、先端医療工学のための細胞改変システムと関連ロボット技術、招待講演、異分野交流フォーラム、主催：秋田県、2010年10月18日、ルポールみずほ、秋田市

- ⑨ 齋藤敬、大規模・高効率細胞膜穿孔法による細胞改変ロボットシステム、技術展示、産学官連携フェア2010みやぎ、2010年10月18日、仙台国際センター、仙台市

- ⑩ 齋藤敬、大規模・高効率細胞膜穿孔法による細胞改変ロボットシステム、技術展示・各種ロボットデモとプレゼンテーション、イノベーション・ジャパン2010、2010年9月29日-10月1日、東京国際フォーラム、東京都

ホームページ等

[http://www.akita-pu.ac.jp/system/mise/bio\\_intelligence/human\\_support/saitotk\\_lab/index.html](http://www.akita-pu.ac.jp/system/mise/bio_intelligence/human_support/saitotk_lab/index.html)

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=257>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 敬 (SAITO TAKASHI)

公立大学法人 秋田県立大学・システム科学技術学部機械知能システム学科・准教授  
研究者番号：70418771