

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630384

研究課題名(和文) 擬似心拍ストレス環境下でのインビトロ心筋形成技術の構築とバイオ人工心臓への展望

研究課題名(英文) Development of heart muscle creating technique by heartbeat stress, and prospective of bio-artificial heart

研究代表者

中島 雄太 (NAKASHIMA, Yuta)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：70574341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞に圧縮力学刺激を与え心筋細胞に分化誘導することを目指し、主としてフォトリソグラフィとシリコン樹脂のモールドイングによるマイクロマシニング技術を駆使して分化誘導用のマイクロデバイスを構築した。デバイスの培養面に細胞接着・非接着性を形成するために、一般的なマイクロマシニング技術を応用したゲルマイクロマシニング技術を開発した。開発したマイクロデバイス上に細胞を培養し、細胞に対して定期的に圧縮刺激を与え、分化誘導の様子を観察した。また、その際の分化誘導率を通常の培地内で培養した細胞と比較した。その結果、定期的な圧縮刺激は分化誘導を効率化するための因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research objective is to guide the differentiation to heart cell by applying compressive stimulation. To achieve this goal, a microdevice for differentiation guidance was fabricated by the micromachining technique using photolithography and silicone molding. Also, a gel-micromachining technique was development by applying to the general micromachining technique for creating the cell adhesiveness surface and cell non-adhesiveness surface to the culture surface. The differentiation behavior of cells that receives compression stimulation from the fabricated device was observed by optical microscope. The differentiation ratio of cells that receives compression stimulation was compared with the control test. As a result, we clarified that the cell differentiation efficiency is increased by applying the compression stimulation.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：分化誘導 細胞力学刺激 細胞バイオメカニクス BioMEMS

### 1. 研究開始当初の背景

心臓を形成し成熟した心筋細胞は、増殖する能力を失うため、心筋梗塞や重症心不全などの心疾患により心筋細胞が大量に脱落する病態において、失われた心筋細胞を自己再生することは極めて困難であり、現時点では心臓移植しか有効な治療法が存在しない。しかし、心臓移植はドナー数に限りがあるため、移植を希望する全ての患者への治療は不可能である。したがって、心疾患や心不全に対する心機能の回復や自己の細胞から形成した心臓組織の移植を可能とする技術の開発が求められている。

近年、筋芽細胞や間葉系幹細胞が心筋細胞に分化して心筋梗塞後の心機能の低下を改善するという報告がなされており、心臓の再生治療への期待が高まっている。心筋細胞は発生後すぐに拍動する機能を発現し、かつ活発に増殖する細胞であり、増殖・分化の過程で常に拍動による力学刺激を受けている。しかし、現在は遺伝子操作や培養液中に溶解した分化誘導因子によって細胞の分化を誘導する手法が主流であり、心筋細胞への誘導効率が非常に低く、細胞治療や移植に利用できる十分な機能をもつ心筋細胞に効率よく分化できる手法とは言えず、再生治療実現のボトルネックになっている。心筋細胞へと効率よく分化誘導するためには、生体内と同様に力学刺激を導入した分化誘導法への新たなアプローチが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、フォトリソグラフィとシリコン樹脂のモルディングを主とするマイクロマシニング技術を用いて構築した細胞圧縮刺激マイクロデバイスを改良して、筋芽細胞や間葉系幹細胞に対して動的な圧縮刺激を与えることが可能な細胞分化誘導マイクロデバイスを構築することである。また、構築したデバイスを用いて細胞に定期的な刺激を与えることによって人工的に心臓を創る技術を構築することを最終的な目的としている。

### 3. 研究の方法

細胞の分化誘導には、培養面への接着の有無や接着前後に受ける刺激のプロファイルなどが大きく影響するため、細胞の培養中に培養面の細胞接着性を変換できる技術を構築する。また、研究代表者がこれまでに構築した細胞圧縮刺激マイクロデバイスを改良することによって細胞分化誘導用デバイス(図1)を実現する。そして、細胞分化誘導用デバイスに培養面の細胞接着性を変換できる技術を組み合わせることによって目的のデバイスを構築する。

まずは、細胞の培養面に細胞接着・非接着パターンを形成する技術を実現する。具体的

には、細胞の接着を阻害するアルギン酸薄膜を基板上にパターンニングする技術を開発し、その基板上で細胞を培養することによって、細胞のパターンを形成できることを実証する。研究代表者はこれまでに、アルギン酸薄膜の基板上へのコーティングに成功しているが、目的のデバイスを実現するためには、デバイスの製作途中でアルギン酸薄膜のコーティングとパターンニングを行う必要がある。

次に、細胞圧縮刺激デバイスを改良し細胞分化用デバイスを構築する。具体的には、細胞圧縮刺激デバイスの流路の一部にSU-8製の構造物を形成し、培養チャンバ部に細胞がトラップされやすくする(図1)。構築したデバイスに細胞を導入し、細胞に動的な刺激を与えることによって、本デバイスの有用性を実証する。

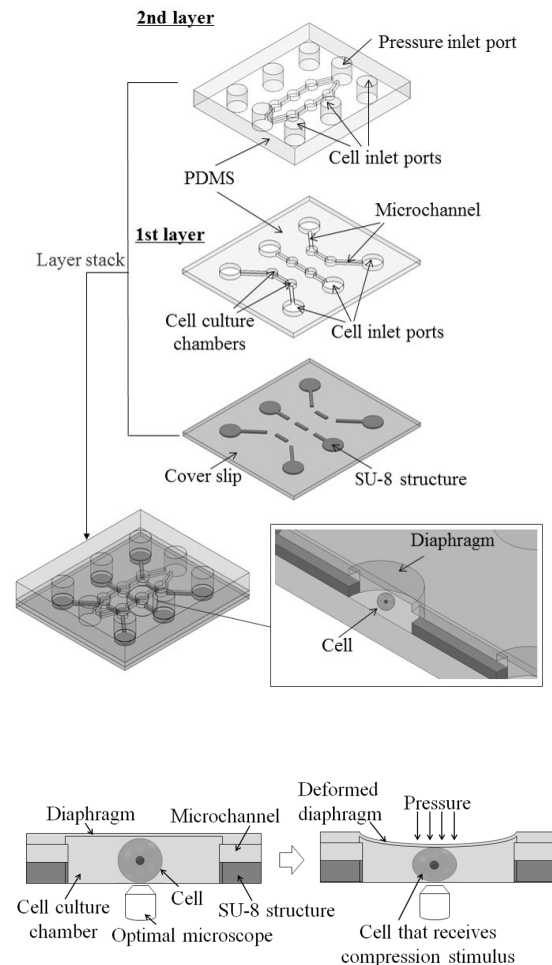


図1 細胞圧縮刺激マイクロデバイス

### 4. 研究成果

#### (1) 培養面の細胞接着・非接着パターンの形成

細胞接着・非接着パターンは、今後、マイクロデバイスの製作プロセス中に組み込む

ことを考慮し、一般的なフォトリソグラフィの技術と同様の工程でアルギン酸薄膜をパターンニングする手法を開発した。具体的には、スピコートにより基板上にアルギン酸ナトリウム水溶液をコーティングし、塩化カルシウム水溶液に浸漬することによってアルギン酸薄膜を形成した。その後、アルギン酸薄膜上にフォトレジストをコーティングし、露光・現像によりフォトレジストのパターンを形成した。フォトレジストのパターンをマスクとし、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で露出したアルギン酸薄膜をエッチングした後にフォトレジストを除去することにより、アルギン酸薄膜のマイクロパターンを形成した。これにより、培養面上に細胞の接着・非接着領域をそれぞれ形成することに成功した。このアルギン酸のマイクロパターン上に細胞を培養することにより、アルギン酸薄膜のパターンに沿って細胞のマイクロパターンを形成できることを実証した (図 2)。

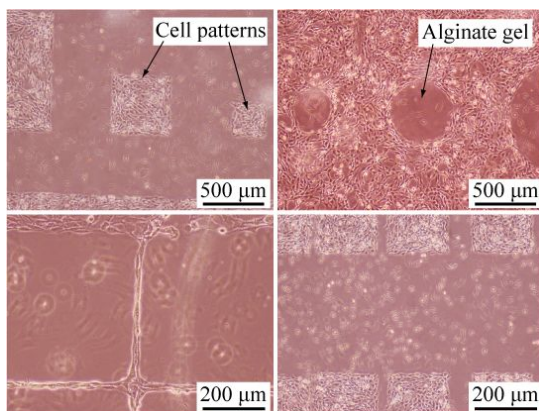


図 2 形成した細胞のマイクロパターン

### (2) 細胞分化誘導用デバイスシステムの構築

フォトリソグラフィとモールドイングにより製作した自己接着性を持つシリコン樹脂構造体の積層により、細胞分化誘導用マイクロデバイスを実現した (図 3)。本デバイスは、細胞外部からの圧縮刺激の制御により、細胞に刺激を与え分化を誘導することを目指したものである。構築したデバイスは、マイクロ流路、圧力印加ポート、細胞導入ポート、細胞培養チャンバ、圧縮刺激用ダイヤフラムで構成されており、全て透明材料で構築されているため、刺激に対する細胞の応答・挙動をリアルタイムで評価することが可能である。また、圧力印加ポートからの空気圧の調整により、圧縮刺激用ダイヤフラムの変位量をコントロールすることができるため、細胞に対して動的な刺激を与えることが可能である。

また、デバイス内での細胞の長期培養と長期間の刺激実験を行うための培地の循環システムを構築した。このシステムは静水圧を用いてデバイスの中に培地を供給するもの

であり、流体により細胞に大きな流体力が加わることがなく、また、脈動することなく培地を循環できるものである。本システムの構築により、細胞周囲の培地を循環させ、細胞に十分な栄養と酸素を供給できるようになったため、基板への接着不良や培養途中の死滅を防ぐことができた。その結果、1 週間以上の期間で細胞を継続して培養することに成功した。本システムの構築により、長期的な刺激実験を行うことができるようになった。

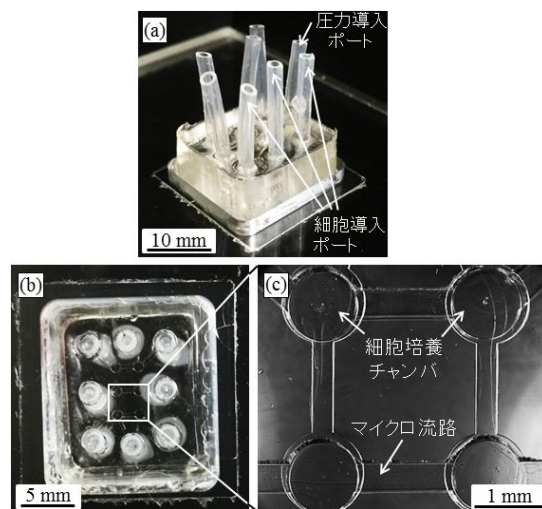


図 3 構築した細胞分化誘導用マイクロデバイス

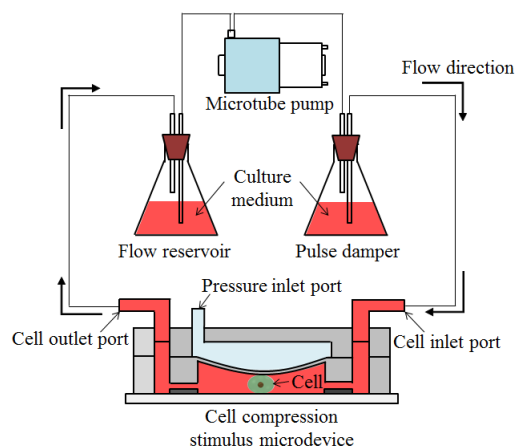


図 4 構築した培地の循環システム

### (3) 構築したマイクロデバイスを用いた細胞の圧縮刺激と分化誘導

構築したデバイスを用いて、単一細胞に対する動的な圧縮刺激実験を行った。デバイスから圧縮刺激を受ける細胞の様子を光学顕微鏡により観察した結果、細胞の変形挙動や細胞内カルシウム応答をリアルタイムで観察することに成功した。また、細胞に圧縮刺激を与えた際に細胞が受けるひずみと細胞内カルシウム応答との相関をとることによ

り、細胞が感知する圧縮刺激の閾値は、細胞のひずみが 14～17% の場合であることを求めた。細胞内のカルシウムイオンの分布は、初期の刺激を受けた際は細胞の中心（核）部分が最も大きい。圧縮刺激を大きくするにつれて、細胞の先端部分にもカルシウムイオンが集まることわかった（図 5）。

さらに、構築した培地循環システムと細胞分化誘導用マイクロデバイスを接続し、筋芽細胞に定期的な圧縮刺激を与えることによって、筋芽細胞の分化誘導実験を行った。筋芽細胞は、分化を開始すると周囲の細胞と融合し、多核化する細胞である。このため、1つの細胞体の中に複数の核が存在する細胞を分化した細胞である判断し評価した。細胞が受ける圧縮刺激は 2 kPa であり、12 時間に 1 回の周期でそれぞれ 10 分間の刺激を与えた。そして、3 日後と 8 日後の分化の状態を蛍光観察により評価した。比較対象として、培養ディッシュ内で通常培養した筋芽細胞を用いた。その結果を図 6 に示す。定期的に圧縮刺激を与えた場合でも刺激の量や刺激を与える期間によって分化の割合が異なることがわかった。具体的には、3 日間の培養日数では、定期的に刺激を与えた細胞と通常の培養法で培養した細胞共に融合率は約 16% であり、この程度の刺激量であれば文化に影響がないことがわかった。一方、8 日間の培養日数では、定期的に圧縮刺激を与えた場合の筋芽細胞が通常の培養方法で分化誘導を行った場合よりも効果的に分化し、機能を発現することがわかった。具体的には、デバイス上で刺激を与えながら培養した場合の筋芽細胞の融合率は約 44% であり、通常の方法で分化誘導を行った場合は約 25% の融合率であった。これらの結果より、定期的な圧縮刺激は分化誘導を効率化するための因子であることが示唆されたが、その大きさや期間によっても分化の状態は大きく変化することが明らかになった。今後、心筋細胞の分化誘導を行うためには、これらの最適条件を導出する必要があることがわかった。

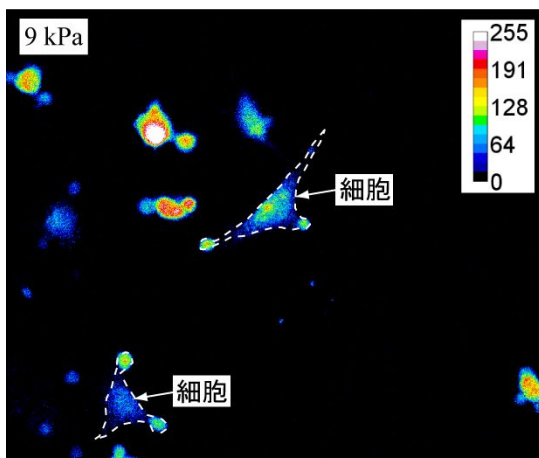


図 5 圧縮刺激（9 kPa）を受けた細胞のカルシウムイオンの分布

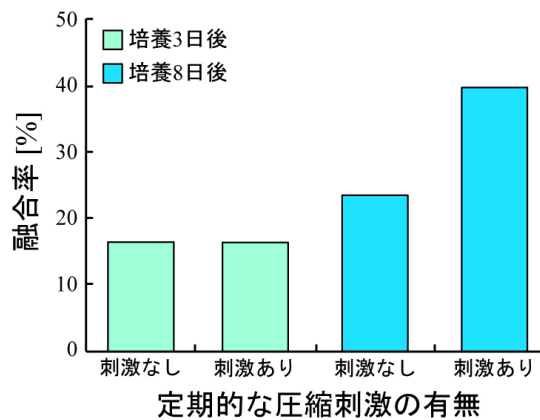


図 6 定期的な圧縮刺激の有無と細胞の融合率

## 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 3 件)

Tairo Yokokura, Yuta Nakashima, Yukihiro Yonemoto, Yuki Hikichi, and Yoshitaka Nakanishi, Measurement of cell mechanical properties by cell compression microdevice, Proceedings of 2015 IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 査読有, 2015, 120-122  
DOI: 10.1109/MHS.2015.7438339

Yuta Nakashima, Yin Yang, Ryo Monji, Kazuyuki Minami, Katsuya Sato, and Yoshitaka Nakanishi, Monitoring of cellular behavior to receive mechanical stimulation controlled by microdevice, IEEE PEMC, 査読有, 2014, 761-766  
DOI: 10.1109/EPEPMC.2014.6980568

中島雄太, 楊寅, 南和幸, 細胞圧縮刺激応答評価マイクロデバイスを用いた細胞応答のリアルタイム観察と評価, 電気学会論文誌 E, 査読有, 133 巻, 12 号, 2013, 358-364  
DOI: 10.1541/ieejsmas.133.358

〔学会発表〕(計 18 件)

横倉泰郎, 中島雄太, 米本幸弘, 引地勇気, 中西義孝, 細胞圧縮機構を有するマイクロデバイスを用いた細胞の機械的特性の評価法の確立, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会, 2015 年 11 月 26-27 日, 北九州

Yuta Nakashima, Yuki Hikichi, Tairo Yokokura, Yusuke Yamamoto, and Yoshitaka Nakanishi, Evaluation of cell differentiation efficiency by

cell-cell/cell-substrate adhesion using microwell having convertible culture surface, International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2015 年 10 月 25-29 日, Gyeongju, Korea

Yuki Hikichi, Yuta Nakashima, Tairo Yokokura, and Yoshitaka Nakanishi, Cellular response to compression stimulus operated by microdevice, Japan-the Netherlands Symposium on Soft-Tribology; New Era of Open Innovation in Interface Science, 2015 年 9 月 10-13 日, Kumamoto, Japan

Yuta Nakashima and Yoshitaka Nakanishi, Microfluidic device for controlling cell living environments, Japan-the Netherlands Symposium on Soft-Tribology; New Era of Open Innovation in Interface Science, 2015 年 9 月 10-13 日, Kumamoto, Japan

Yuta Nakashima, Yuki Hikichi, Kohichi Tsusu, Kazuyuki Minami, and Yoshitaka Nakanishi, Experimental verification of cell adhesion effect to cellular function expression, The 8<sup>th</sup> Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2015 年 10 月 16-19 日, Hokkaido, Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 雄太 (NAKASHIMA, Yuta)  
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号: 7 0 5 7 4 3 4 1

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし