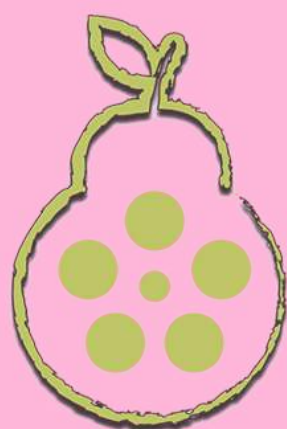


超高速バイオセンブラ

平成 23 年度研究成果報告書



PDFKIWI

文部科学省科学研究費補助金
新学術領域（研究領域提案型）

平成 23 年 8 月～28 年 3 月

領域番号：2305

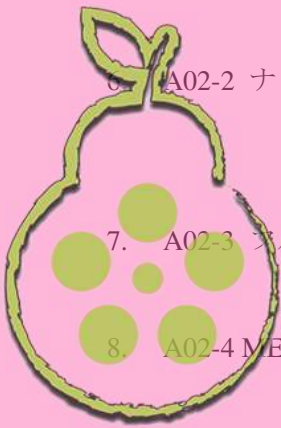
領域略称名：バイオセンブラ

領域代表者：新井健生

目次

ページ

1. 領域の概要 -----	1
領域代表 新井健生 (大阪大学・大学院基礎工学研究科)	
2. A01-1 超高速操作による細胞計測と自律誘導モニタリング -----	6
計画班代表 新井史人 (名古屋大学・大学院工学研究科)	
3. A01-2 超高速細胞システム特性計測-----	11
計画班代表 金子 真(大阪大学・大学院工学研究科)	
4. A01-3 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----	17
計画班代表 中内啓光 (東京大学・医科学研究所)	
5. A02-1 超高速微細操作技術を用いた3次元細胞システム構築-----	23
計画班代表 新井健生 (大阪大学・大学院基礎工学研究科)	
6. A02-2 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 -----	28
計画班代表 福田敏男 (名古屋大学・大学院工学研究科)	
7. A02-3 フルイディクスを駆使する高速細胞アセンブリ-----	35
計画班代表 関 実 (千葉大学・大学院工学研究科)	
8. A02-4 MEMS を利用した細胞の3次元組織構築-----	41
計画班代表 竹内昌治 (東京大学・生産技術研究所)	
9. A03-1 肝臓等複雑化組織の構築と機能解明-----	46
計画班代表 大和雅之 (東京女子医科大学・先端生命医科学研究所)	
10. A03-2 骨ミネラル化シンプロセスの解明と硬組織構築-----	51
計画班代表 鈴木 治 (東北大学・大学院歯学研究科)	



PDFKIWI

領域の概要

領域代表 大阪大学基礎工学研究科 新井健生

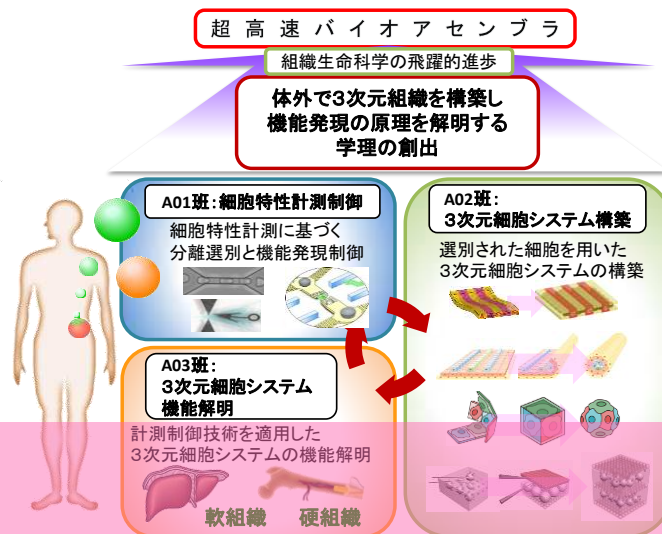
【本領域研究の目的】

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利用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解明を提案する。

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。

【本領域研究の内容】

マイクロ・ナノロボティクスを基盤として、in vitro 環境で機能する3次元細胞システムを構築する「バイオアセンブラ」の超高速計測操作手法と組織機能発現の原理を解明する。生体から取り出した細胞の物理的特性を超高速で計測し、細胞システム構築に有用な活性細胞を分離する「細胞特性計測制御」、複雑な形状の3次元細胞システムを成型し組み立てる「3次元細胞システム構築」、作製された3次元細胞システムの増殖・分化誘導・形態形成制御と移植応答を解明し、in vitro での機能解明と比較検証を行い再生医療への応用を図る「3次元細胞システム機能解明」の3つの研究項目を有機的に連携させ、医工学的に有用な形態と働きを持つ人工的な3次元細胞システムを創生する。



本新学術領域の基盤となる各研究項目では次の内容で研究開発を活発に行う。

1. 生体から取り出した細胞を増殖させ、この中から組織構築に有用な細胞を超高速に分離する技術を確認する。細胞が持つ多面的な特性を理解し、この特性に着目してマイクロ・ナノロボティクスを適用した世界最速の計測分離手法を提案する。
2. 組織として機能するための3次元細胞システム構築を解明し、複合組織系の構築から始め、最終的には酸素要求性の高い組織形成を視野に入れ、マイクロ・ナノロボティクスの操作技術を適用した画期的な3次元細胞システム構築技術を提案する。
3. *in vitro* 環境場で3次元細胞システムを構築する過程で、多細胞系が増殖・分化・形態形成を始めるために必要な動的環境場の特徴を解明し、3次元細胞システムが組織として機能する仕組みを解明する。

上記3項目を有機的にサイクルさせて、再生医療に有用な人工3次元細胞システムの創生と、そのためのマイクロ・ナノロボティクス応用計測制御技術を大幅に底上げしていく。

【領域研究で期待される成果】

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、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。

【平成 23 年度の成果】

総括班では、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からなる 3 つの研究グループを設定し，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 分野が有機的に連携し，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した。実施内容を次に示す。

- (1) 研究を潤滑に遂行するために，領域事務局を大阪大学大学院基礎工学研究科内に設置し，専門事務補助員を配置した。領域内での円滑な情報交換のためにメーリングリストを作成し，領域全体での円滑な情報共有を可能とした。
- (2) 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，領域の関係者全員が集まる全体会議を開催した。総括班会議を 4 回，全体会議を 1 回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 班の中で班長が中心となり，各班内の情報交換，討論を行った。
 - (イ) 第 1 回全体会議平成 24 年 3 月（仙台）
- (3) 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。
 - (ア) 平成 23 年 10 月第 1 回シンポジウム（東京：参加者 40 名）
 - (イ) 平成 24 年 3 月第 2 回シンポジウム（仙台：参加者 43 名）
 - (ウ) 平成 23 年 11 月第 1 回国際シンポジウムを，International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science(MHS2011)と共同開催（名古屋）
- (4) 若手研究者の成長支援として，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 を設置し，若手 WG 主催による若手シンポジウム開催の準備を進めている。
- (5) 他に領域内の連携推進を図るための研究拠点となる共同研究プラットフォームの立ち上げを行っている。
- (6) 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，これらを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。
- (7) 研究成果の国内外への発信，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 RSJ2011 での本領域に関連する OS の開催，ROBOMECH2012 での OS 企画，主要国際会議 ICRA2012, IROS2012 などにおいて，

ワークショップを企画している。

(ア) 平成 23 年 9 月：日本ロボット学会学術講演会にて OS 微細作業（東京：芝浦工業大学豊洲キャンパス），オーガナイザ：新井史人（名古屋大），谷川民生（産総研），新井健生（大阪大）

(イ) 平成 23 年 12 月：計測自動制御学会 SI 部門講演会にて OS ナノ・マイクロシステムとその応用—ナノ・マイクロロボット，システム細胞工学，超高速バイオアSEMBラー（京都：京都大学吉田キャンパス），オーガナイザ：新井健生（大阪大学），新井史人（名古屋大学），福田敏男（名古屋大学）

以上のように，領域全体の研究が活発になるように領域運営を行い，新たに得られる研究成果については，総括班で組織化された学会活動，広報活動によって広く社会・国民に発信した。また，計画研究を補完するための公募研究の募集を行った。各計画研究班では，研究計画調書に沿って研究設備，機器の整備を行った。また，計画研究を進めていく過程
順次共同研究の開始および展開への準備を行った。

【本領域研究の体制】

総括班

新井健生 大阪大学 大学院基礎工学研究科 教授（領域代表）

新井史人 名古屋大学 大学院工学研究科 教授

金子 真 大阪大学 大学院工学研究科 教授

中内啓光 東京大学 医科学研究所 教授

福田敏男 名古屋大学 大学院工学研究科 教授

関 実 千葉大学 大学院工学研究科 教授

竹内昌治 東京大学 生産技術研究所 准教授

大和雅之 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授

鈴木 治 東北大学 大学院歯学研究科 教授

前 泰志 大阪大学 大学院基礎工学研究科 准教授

評価委員

藤江正克 早稲田大学 理工学部 教授

片岡一則 東京大学 工学系研究科 教授

佐藤正明 東北大学 医工学研究科教授

松田武久 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所教授

計画班

研究項目 A01「細胞特性計測制御」

新井史人 名古屋大学 大学院工学研究科 教授 (A01 班班長)

金子 真 大阪大学 大学院工学研究科 教授

中内啓光 東京大学 医科学研究所 教授

研究項目 A02「3次元細胞システム構築」

新井健生 大阪大学 大学院基礎工学研究科 教授 (A02 班班長)

福田敏男 名古屋大学 大学院工学研究科 教授

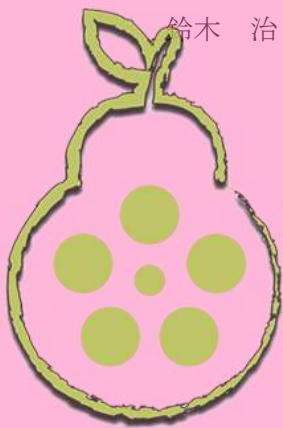
関 実 千葉大学 大学院工学研究科 教授

竹内昌治 東京大学 生産技術研究所 准教授

研究項目 A03「3次元細胞システム機能解明」

大和雅之 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授 (A03 班班長)

鈴木 治 東北大学 大学院歯学研究科 教授



PDFKIWI

A01-1 超高速操作による細胞計測と自律誘導モニタリング

研究代表者：名古屋大学工学研究科 新井史人

研究分担者：九州工業大学大学院生命体工学研究科 川原知洋

研究分担者：名古屋大学工学研究科 丸山央峰

1. 研究成果の概要

本計画研究では、超高速操作技術を利用して細胞特性をデータベース化し、細胞システムの活動を追跡し、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が目的である。H23年度は、フロー式細胞マルチパラメータ計測のための計測技術の基礎と実験的評価を実施した。細胞の力学的、化学的パラメータの高速計測を実現するため、細胞を変形させるための可動部を有するマイクロ流体チップを製作した。変位縮小機構を用いることで、可動部の位置決め精度を従来と比べて10倍程度向上でき、細胞の弾性と粘性を計測するための基礎を築いた。

また、A01班の金子らと共同で、可動部がなく細胞の硬さの指標を高速に計測可能なマイクロ流体チップを製作した。A03班の鈴木らと共同で、バイオミネラリゼーション制御のための骨形成材料固定化培養チップを作製した。

2. 研究の背景

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。そのため、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させるためには、実験条件の調整が容易なIn vitro系での組織構築技術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る。

- (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ないため、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。このため、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. 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。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の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させる。これまでほとんど計測されていない細胞固有の力学的、電気的パラメータをフロー方式で高速に計測する技術を確認することで、大量の細胞のデータベースを構築し、加えて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た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。

4. 研究の方法

本研究では、大きく分けて A) 細胞のマルチパラメータ計測と評価、B) 細胞と環境の相互作用の解析、の 2 つのアプローチにより研究を進める。

- A) 細胞のマルチパラメータ計測と評価は、オンチップロボティクスを適用したフロー式細胞マルチパラメータ計測システムを用いて行う。オンチップロボティクスに必要な、ナノビーム、ナノ電極、三次元ナノ加工の技術基盤を確立し、マイクロ流体チップに物理的操作技術を導入したロボチップを作製する。ロボチップに搭載された可動部を用いて細胞を変形させることで、細胞の硬さや電気的パラメータ等のマルチパラメータの高速計測を行う。また、A01 班の金子と共同で、可動部がなく、より高速に計測可能なマイクロ流体チップを作製する。
- B) 細胞と環境の相互作用の解析は、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作製し細胞と環境の相互作用を解析する。ロボチップを用いた特定細胞の高速分離と流体制御による細胞の培養環境制御を統合し、細胞システムの調整制御を行う。

5. 研究成果

H23 年度は、フロー式細胞マルチパラメータ計測のための計測技術の基礎と実験的評価を目的として、オンチップロボティクスを適用したロボチップの作製と評価を行った。作製したロボチップを用いて卵子の硬さ計測を行い、ロボチップを用いた細胞パラメータ計測の検証実験を行った。以下に各成果について示す。

1) 変位縮小機構を有するフロー式細胞力学パラメータ計測システムの構築と評価

図 A01-1-1 にフロー式細胞力学パラメータ計測システムと作製したロボチップを示す。チップはシリコンのドライエッチングで作製した。ロボチップを用いた細胞力計測には、細胞を変形させるプローブだけでなく、細胞からの反力を計測するための力センサが必要となる。本計測システムは 3 つのパートから構成され、細胞の変形量を計測するための光学系と CCD カメラからなるセンシングパート、チップ内のプローブを非接触駆動するための永久磁石が配置された電動ステージからなる駆動パート、プローブとオンチップ力センサを有するオンチップインピーダンスアナライザ(OCIAN: on-chip impedance analyzer)のディスプレイサブパートから成る。プローブによる物理操作で細胞を変形させ、CCD で細胞の変形量を計測し、力センサの出力から細胞の反力を計測する。これらの情報を基に細胞の力学パラメータを計測する。細胞の力学パラメータを計測するための可動部には、mN オーダの操作力と数百 nm の操作分解能が必要であり、我々は図 A01-1-2 に示す変位縮小機構を導入し、ハイクラスかつ高精度な可動部の駆動を実現した。駆動ポイントの変位(梁 A の変位)は縮小機構の幾何学的パラメータを適切により任意の縮小率で操作ポイントの変位(梁 B の変位)に変換される。グラフ中のプロットは繰り返し精度の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。操作ポイントでの繰り返し精度は数 100 nm オーダであり、従来の磁気駆動マイクロツールに比べ、約 10 倍の高い繰り返し精度を実現した。以上より、フロー式に細胞の機械的パラメータを計測するためのシステムを構築した。

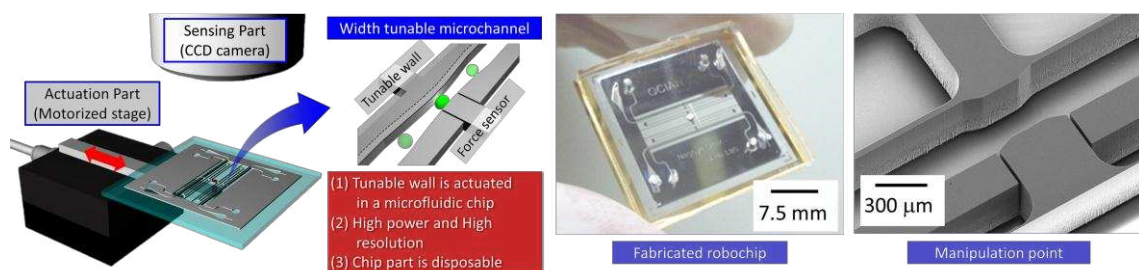


図 A01-1-1 オンチップインピーダンスアナライザ (OCIAN)