

平成 26 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目： 研究期間：平成 26 年 10 月～平成 27 年 3 月
研究課題名：多細胞システム秩序理解のためのバイオフィラクトルフォーメーション
ラボ長
所属：大阪大学基礎工学研究科機能創成専攻生体工学領域
氏名：田中 信行

研究成果（当初の研究目的と得られた結果を記載してください。図表を含め 2 ページ程度）：

本研究では、組織工学的アプローチによって生体内の血管網や筋などの大きさと出現頻度がフラクタル関係となるような多細胞システムの理解を目指す。例えば、脊椎動物の循環器系は大血管、中血管、小血管、毛細血管というように血管の太さと長さが逆相関し、筋では、筋繊維（筋細胞）が複数集合して筋束を構成し、さらに筋束が複数集まって筋肉を構成しているような構造的階層と数的関係がある。このような生体现象において、（１）どのようなアルゴリズムでこのようなフラクタル構造を生成しているのか？、（２）アルゴリズムを規定する因子は何か？を明らかにするために、人為的にフラクタル構造を付与した細胞組織を作製し、力学的あるいは化学的な刺激が、血管等の上位構造形成にどのように影響するのかを解析する。本研究目的遂行のためには、（Ａ）細胞が数個から数十個集積した空間スケールが 100～1000 マイクロメートルの微小構造作製技術、（Ｂ）血管網のような空間スケールが 1～10 ミリメートル程度の大局的構造作製技術、（Ｃ）10 マイクロメートルオーダーの空間分解能を有する単一細胞化学的刺激技術が必須である。本年度は、（Ｂ）のミリメートルオーダーの組織形成手法に関する研究を実施した。

通常の細胞培養において、酸素や栄養素の供給あるいは老廃物の排出のため、細胞培養皿底面に細胞がまばらに接着した平面培養が基本的な培養法となる。平面培養では、培養皿底面全体を細胞が覆うようなコンフルエントと呼ばれる状態が最も細胞数が多くなるが、ミリメートルオーダーの組織はそのままでは作製できなかった。例えば、細胞組織の高さを増すために、コンフルエント時の細胞数を超える細胞を培養皿の中に投入しても、積み重なった細胞が酸素や栄養素、老廃物の輸送を妨げるため、最下層に位置する細胞が壊死してしまう。本研究では、物質輸送を改善することができれば、より厚い細胞組織を生体外で作製できるのではないかと考えた。

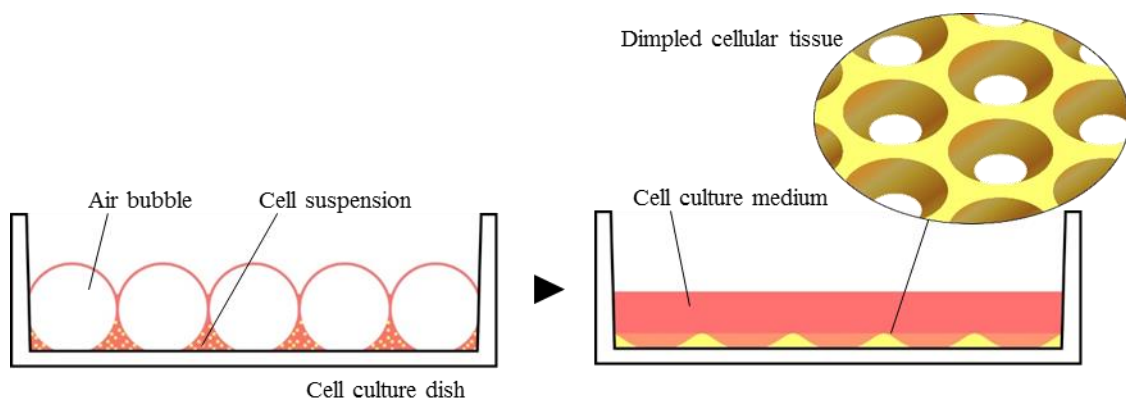


図 1 気泡を用いた細胞組織表面へのディンプル（凹凸）形成

図1に示すように、細胞懸濁液中の気泡には細胞が寄り付かないという性質があることから、細胞懸濁液の気泡を型として、細胞組織表面に凹凸を付与するという新しい細胞培養法を考案した。細胞懸濁液中の細胞が細胞培養皿底面へ沈降し接着するまでには2時間ほどかかるため、この間、気泡を安定的に存在させることが本手法の鍵である。

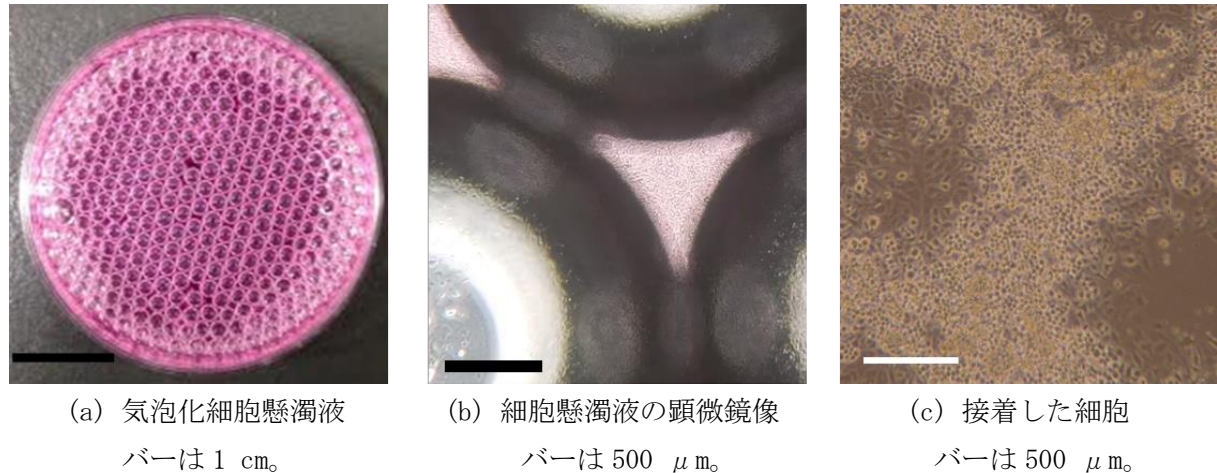


図2 細胞懸濁液の気泡化による細胞の集積

図2(a)に示すように細胞懸濁液をピペットにより起泡すると、気泡が六角格子状に整列し、2時間程度維持されることが確認できた。図2(b)に示すように気泡と気泡の間に細胞が集積している様子がわかる。培養2時間後、図2(c)に示すように集積した細胞がその分布を維持したまま、細胞培養皿底面に接着していることが観察された。気泡が存在した領域は細胞が疎であり、気泡間には高密度に細胞が積み重なり、全体としてディンプルが形成されている。

平面培養においてコンフルエントの10倍に相当する細胞濃度である 1×10^6 個/ cm^2 となるように調製された細胞懸濁液を用いて、平面培養（コントロール）とディンプル付与培養をそれぞれ行った。24時間培養を行ったところ、コントロールでは10%を超える死細胞率であったのに対して、ディンプル付与培養においては、5%以下の死細胞率であった。通常のコフルエントに満たない平面培養での死細胞率は数%であることから、ディンプル付与により、コンフルエントをはるかに超える細胞濃度であっても細胞の生存性を維持できることが分かった。以上のように、今後の研究遂行に欠かせない重要な知見を得ることができた。

キーワード：組織工学、フラクタル、ディンプル、細胞生存性

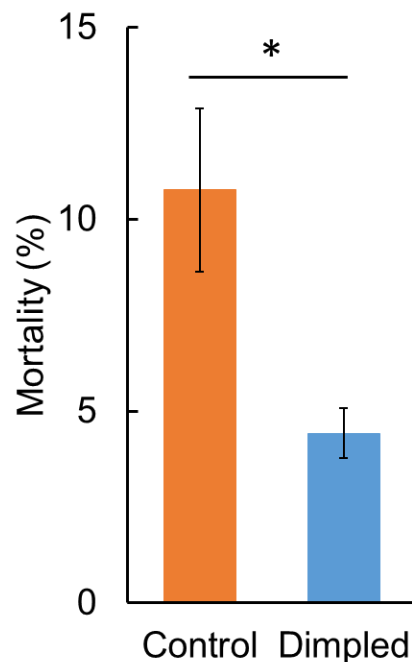


図3 細胞濃度 1×10^6 個/ cm^2 における培養24時間後の死細胞率。棒グラフとエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を示す(n=3)。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。

研究経費（H26 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	575,822 円	215,820 円	0 円	208,358 円	1,000,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

境 慎司・大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域准教授

小嶋 勝・大阪大学大学院基礎工学研究科システム創成専攻助教

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

アディバ アマリア イスティクラリ・大阪大学大学院基礎工学研究科・博士 1 年

森 章也・大阪大学大学院基礎工学研究科・修士 2 年

吉田 拓士・大阪大学大学院基礎工学研究科・修士 2 年

吉村 愛菜・大阪大学大学院基礎工学研究科・修士 1 年

喜澤 由佳・大阪大学基礎工学部・学部 4 年

筒川 和樹・大阪大学基礎工学部・学部 4 年

柳本 舎那・大阪大学基礎工学部・学部 4 年

発表論文等（平成 27 年 3 月 31 日現在）

〔雑誌論文〕

Nobuyuki Tanaka, Aina Yoshimura, Yuji Haraguchi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, and Jun Miyake, “Rapid cell-sheet detachment system with shaking without cell damage,” *BioTechniques*, (*submitted*).

Nobuyuki Tanaka, Yuji Haraguchi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, and Teruo Okano, and Jun Miyake, “A bubbling cell-culture system for creating cell-void pattern,” *Biofabrication*, (*under review*).

〔著書〕

〔学会発表〕

1. 田中 信行、原口 裕次、清水 達也、大和 雅之、三宅 淳、逆スキヤフォールドを利用した多孔質細胞組織作製法、第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 20 日.
2. 安藤 太一、田中 信行、金田 忠裕、三宅 淳、顕微鏡組み込み型流体パンタグラフによる精密位置合わせ、第 15 回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会、2014 年 12 月 17 日.
3. 田中 信行、安藤 太一、金田 忠裕、三宅 淳、流体パンタグラフを用いた顕微鏡下紫外線精密照射システム、第 15 回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会、2014 年 12 月 15 日.
4. N. Tanaka, M. Kondo, H. Sugiyama, M. Yamato, T. Okano, and J. Miyake, Surface-tension Microscopy by Noncontact Meniscus-manipulation, 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Nov. 11, 2014.

5. N. Tanaka, Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano and J. Miyake, High-throughput Cell-patterning with a Self-assembled Bubble-raft, 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Nov. 11, 2014.

〔その他〕

1. 田中信行、「バイオユーザーフレンドリーな流体活用システム」、横浜市立大学 学内セミナー、2015年3月18日。
2. 田中信行、「表面張力顕微鏡の創成と幹細胞マーカー解析への応用ー液体親和性を可視化するー」、株式会社池田理化主催 再生医療分野 若手研究者交流会、2015年1月31日。
3. 田中信行、「高品質再生医療のための細胞シート移植デバイスと品質評価技術」、JST 主催ライフイノベーション新技術説明会、2015年1月20日。
4. Nobuyuki Tanaka, “Bio-Medical Application of Fluid Interface Manipulation,” Profes, Riken, Dec. 17, 2014.
5. 田中信行、「流体を活用したバイオメディカルインタフェース」、日本機械学会東海学生会主催 第201回講演会、鈴鹿工業高等専門学校、2014年11月13日。
6. 田中信行、「流体を活用した再生医療支援技術」、第5回次世代医療システム産業化フォーラム2014、大阪商工会議所、2014年11月10日。
7. 田中信行、「表面張力顕微鏡の創成と幹細胞マーカー解析への応用」、リバネス研究費池田理化賞、2014年10月30日。

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

受給中

田中信行（研究代表者）、「表面張力顕微鏡の創成と幹細胞マーカー解析への応用」、リバネス研究費池田理化賞、500千円、2014年10月30日。

申請中

田中信行（研究代表者）、「マイクロボイド細胞操作と多孔質組織創成への応用」、総額5,000千円、科学研究費補助金 若手研究（B）。

参考となるHP等

<http://t.nbyk.info/>

<http://miyake.bpe.es.osaka-u.ac.jp/>

<http://www-arailab.sys.es.osaka-u.ac.jp/>

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/sakai/>