

# 平成 25 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：展開研究

研究期間：平成 24 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究課題名：細胞間相互作用を再現した創薬支援ツールおよびその評価法の開発

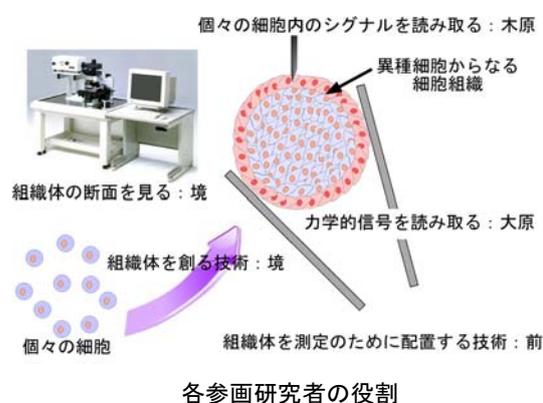
ラボ長

所属：物質創成専攻化学工学領域

氏名：境 慎司

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

【研究目的】本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで中心部の細胞の動態までも容易に観察可能な組織体を創薬時のスクリーニングにおいて汎用される複数の細胞から作製することを目指した。また、この組織体を各種測定時に利用するステージ上に精密に配置するための技術を確立し、ついで組織体の力学的特性に基づく組織体状態の検出法の開発を行うことも目的とした。さらに、個々の細胞の内部から薬剤にさらされた場合の応答のシグナルを検出する方法を開発することを目標とした。すなわち、「創る・見る・触る・引き出す・配置する」という観点から研究を行った。なお、平成 25 年度は木原（北九州大学へ異動）および大原（名城大学へ異動）が他大学に移動したことにより、境と前の 2 名で研究を実施し、以下の成果を得た。



【組織体を創る技術に関する成果】異種細胞を最外層に配置した組織体の有用性に関して評価するために、ガン組織への血管新生モデルを構築すべく、ヒト肝臓ガン由来細胞(HepG2 細胞)の組織体の外表面に血管内皮細胞層を付与した組織体を作製した。その後、血管新生阻害剤を含む培養液に浸し、共焦点顕微鏡を用いた細胞の動きの観察を行った。その結果、薬剤の有無によりガン細胞組織体内への血管細胞の動きが変化し、元来の効能として記載されている事項から予想される通り、その適用によってガン

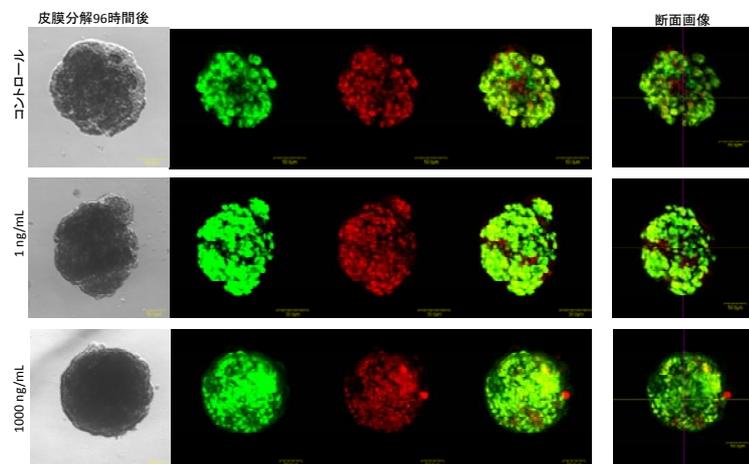


図 1. 血管内細胞層を最外層とする HepG2 細胞集塊を異なる濃度の VEGF に対する分子標的剤添加培地に浸して 96 時間後の細胞分布。緑: HepG2 細胞、赤: 血管内皮細胞。

組織内部への浸潤を抑制できることがわかった。この結果は、本検討で作製した組織体が、少なくとも血管新生阻害剤の評価ツールとして有用であることを示している。さらに、より簡単に同様の組織体を作製する方法の開発も行った。複数の酵素反応を同時に進行させる方法を開発したことにより、以前と比較して球状組織体の作製に

必要なマイクロカプセルの作製に要する時間を約 1/2 に短縮できる方法を確立することができた (Ashida et al, *Biotechnol Prog*, 29:1528(2013))。

#### 【力学信号を読み取る技術に関する成果】

前年度に開発を行ったマイクロカプセルを用いて作製される組織体に関しては、マイクロハンドを用いた力学強度の測定が可能であることを確認していた。そこで、新たに開発したマイクロカプセルを用いて作製される組織体についても測定を試みた。結果、組織体の力学的強度の測定が可能であった。また、組織体の成長に伴う力学信号の変化を調べるために、カプセル内での培養期間の異なる組織体に関して測定を実施した。その結果、組織体形成後に一定期間が経過すると、組織体が脆くなっていくことを測定することができた。この詳細なメカニズムは不明であるが、これまでに報告されていない結果であり、本研究で開発した手法によりはじめて明らかとなった事象である。

また、本研究を推進するにあたり、非常に柔らかい対象物を計測する必要がでたため、マイクロハンドを用いた力計測システムの計測レンジを改善しなければならなくなった。そこで、通常使用していたニードル状のエンドエフェクタに代わり、板状のエンドエフェクタを作製し、これを用いて計測を行うことにした。計測においては、マイクロカプセルの作製技術を用いて柔らかい球状のサンプルを作製し、板状のエンドエフェクタの評価に用いた。その結果、板状のエンドエフェクタを用いると、ニードル状を用いた場合より検出される反力が 2-3 倍増加することが確認された。こ

この手法により、より柔らかいサンプルの計測を行えるため、より厳密に組織の状態を検出することが可能となった。

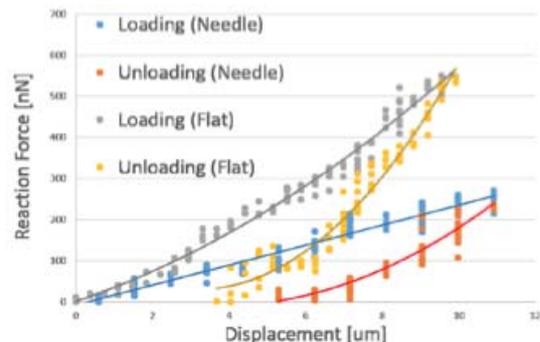
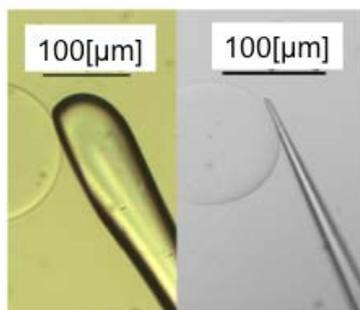


図2. 板状エンドエフェクタとニードル状エンドエフェクタを用いた把持の様子 (左) と反力計測の結果 (右)

#### 【組織体を配置する技術に関する成果】

組織体の自動配置のためには、安定した自動把持技術の確立が不可欠である。前年度は、安定した組織体の自動把持のための基礎検証として、ビジョンシステムと微小力センサを統合することによる物体の自動把持性能の改善を行った。このとき、2本のハンドに取り付けたセンサによって得られる細胞把持時の反力から把持状態を推定する方法を試みることで自動把持成功率の改善を達成していた。本年度は、本手法の改善を行うことで、把持成功率の向上を達成するとともに、実際に細胞組織体の把持・計測を行った。特に、自動配置への適用可能な技術である、自動剛性計測システムを開発し、計測を行った。図3は本システムを用いた計測の様子と結果である。この実験では、直径 150μm 程度の球形細胞組織体を用い、時間経過により細胞組織体が成長することで、どのように剛性が変化するかを計測した。この結果から、培養時間の変化に応じて細胞

組織体からの反力が変化していることが分かり、細胞組織体の成長による剛性変化を計測できたと考えられる。また、10 サンプル計測するのに要した時間は15分

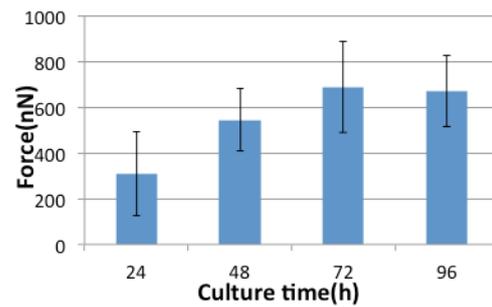
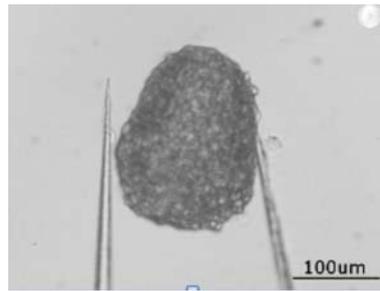


図 3. NIH3T3 のスフェロイドの時間経過による剛性の変化を自動計測した。エンドエフェクタを 30µm 押し込んだ時の反力情報から計測対象の剛性を評価した。右は自動計測の様子、左グラフは剛性計測結果を示している。

程度であり、本システムを用いた剛性計測の自動化により、剛性計測の高速化を実現した。また、本システムは、把持後のリリース過程も組み込まれているため、自動配置システムへ転用することが可能である。

#### キーワード：

ドラッグスクリーニング、マイクロカプセル、マイクロハンド、創薬、抗ガン剤

#### 研究経費（H25 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	1,053,989 円	364,630 円	76,955 円	0 円	1,500,000 円

#### 共同研究者等

- (1) 共同研究者（氏名・所属）
  - 前 泰志・システム創成
- (2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））
  - 芦田知明・物質創成・D2
  - 藪垣博之・システム創成・M2
  - Nyamdorj Khangai・システム創成・B4

#### 発表論文等（平成 26 年 3 月 31 日現在）

[雑誌論文]

T. Ashida, S. Sakai, M. Taya; Competing two enzymatic reactions realizing one-step preparation of cell-enclosing duplex microcapsules, *Biotechnology Progress*, 29:1528-34(2013).

S. Sakai, T. Ashida, S. Ogino, M. Taya; Horseradish peroxidase-mediated encapsulation of mammalian cells in hydrogel particles by dropping, *Journal of Microencapsulation*, 31:100-4(2014).

[著書]

[学会発表]

T. Ashida, **S. Sakai**, M. Taya; One - step preparation of cell - enclosing microcapsules with hollow core via competitive enzymatic reactions, International Conference- MiMe-Materials in Medicine(Faenza, Italy) (October, 2013).

Hiroyuki Yabugaki, **Kenichi Ohara**, Masaru Kojima, **Yasushi Mae**, Tamio Tanikawa, Tatsuo Arai: "Automated Stable Grasping with Two-Fingered Microhand using Micro Force Sensor", 2013 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2013), 2756-2761, (Karlsruhe, Germany) (May. 2013)

藪垣博之, **大原賢一**, 小嶋勝, 洞出光洋, 神山和人, **境慎司**, 木原隆典, 前泰志, 谷川民生, 新井健生: "微小力センサ搭載型マイクロハンドによる自動細胞剛性計測", 第14回システムインテグレーション部門講演会, (2013年12月)

[その他]

受賞) Best Poster Presentation (1<sup>st</sup> Prize):International Conference- MiMe-Materials in Medicine(Faenza, Italy): One - step preparation of cell - enclosing microcapsules with hollow core via competitive enzymatic reactions, T. Ashida, **S. Sakai**, M. Taya

**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)**

- ・ A-STEP シーズ探索 (平成 24 年度第 2 回公募採択) の資金により研究を実施 (代表 境慎司)
- ・ 2013 年度 岸本基金研究助成に採択 (代表 境慎司)
- ・ 2014 年度 倉田記念日立科学技術財団研究助成に採択 (代表 境慎司)

**参考となるHP等**