

研究種目： 展開研究

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

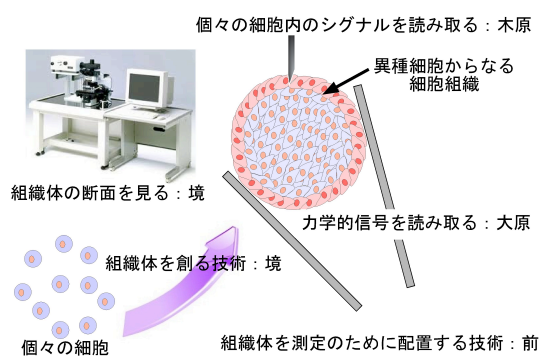
ラボ長

所属：物質創成専攻化学工学領域

氏名：境 慎司

研究成果（800 字程度、図表可）：

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ている。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ている。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指す。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 2 年間の研究を行っている。



各参画研究者の役割

【各参画研究者による要素技術の開発成果】

境：共焦点レーザー顕微鏡での観察に適した直径 200 μm 程度のガン細胞組織体および異種細胞層で覆われた組織体作製法の開発

アルギン酸ゲルを皮膜とするマイクロカプセル内でヒトすい臓ガンおよび肝臓ガン由来の細胞株を培養することで、球状の組織体を作製することができた。また、マイクロカプセルの中空洞サイズを制御することにより、直径 200 μm 程度のガン細胞組織とすることができた。さらに、マイクロカプセル表面を異種細胞で覆った後に、カプセル皮膜を分解することで目標とした異種細胞で覆われた組織体を作製することができた（図 1）。

これらに加えて、創薬支援ツールとしての有用性を評価するために、近年注目されているがん幹細胞の発現を示唆するマーカーをフローサイトメトリーを用いて調べたところ、本方法で作製されたガン細胞の球状組織体中に含まれる細胞には、通常の平板培養よりも多くのがん幹細胞マーカーを発現する細胞が確認された。次年度は抗ガン剤に対する応答性・遺伝子発現などを調べる。

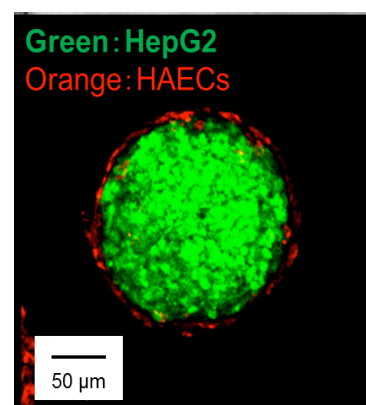


図 1. 血管内皮細胞で覆われた肝臓ガン細胞球状組織体の共焦点顕微鏡像。

前・大原：微小力センサ搭載 2 本指マイクロハンドによる組織体の自動配置技術の開発

計測を目的とした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。そこで、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。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たところ、表1に示すように自動把持成功率の改善を達成することができた。

表1. センサを用いた自動把持の成功率

直径(μm)	把持成功率(%)	
	力情報なし	力情報あり
55	50	80
25	40	80

木原：球状組織体を構成する個々の細胞から情報を取り出す技術の開発

蛍光相関分光法を用いてゲルおよび組織体内部における分子の拡散動態を評価する系を確立し、組織体内の状態に関する情報を取得することが可能であるかどうかを評価するために、細胞と同様に多量の水を含むヒドロゲルをモデルとして用いた評価を実施した。さまざまな分子量の蛍光物質および異なる状態のヒドロゲルを用いた検討の結果、図2に示すように良好に直線にて示されるような相関を得ることができていることを見出すことができた。次年度はこの方法を組織体に適用する。

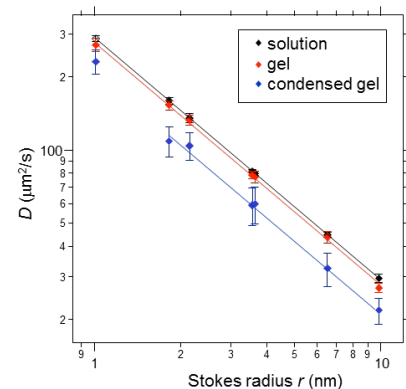


図2. 測定条件と検出される拡散係数の相関。

大原：マイクロピンセットを用いた組織体の強度測定技術の開発

これまでに開発していた直径20 μm 程度の個々の細胞の硬さを計測する装置では、直径200 μm 程度の組織体の硬さを評価することは、アームの可動幅の点などからできない。そこで、組織体の硬さ計測に特化した微小力センサおよびアームの改良を行い、図3に示すような、組織体の硬さを測定できる装置を作製することができた。ただし、本年度に開発した装置では、個々の組織体の計測に時間を要するため(3分/組織体)、次年度はこの時間を1/3程度に短縮し、短時間でより多くの情報を得ることができる装置への改良を目指す。

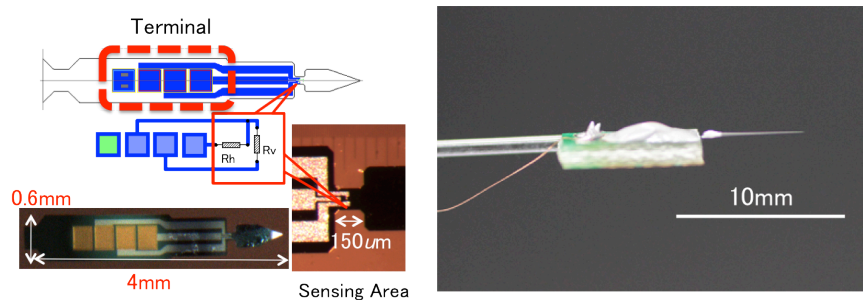


図3. 微小力センサ構造図(左)およびその写真(右)。

【参画研究者間の共同研究実施成果】

境 - 大原：マイクロピンセットを用いてカプセルを使って形成させた組織体の強度測定

本研究では各参画者が開発した技術を融合して、組織体から情報を取り出すことを目的としている。前述のように、境はマイクロカプセルを用いて球状組織体を作製することに成功し、大原は組織体の硬さの情報を測定可能なマイクロピンセット装置を作製した。そこで、実際にマイクロカプセルを用いて作製した組織体の硬さを、このマイクロピンセット技術を用いて測定を行うこと

を試みた。その結果、図4のように組織体をマイクロピンセットでつかむことにより、図5のように硬さを測定することに成功した。現段階では培養日数の変化に伴う硬さの変化が意味するところを理解するには至っていないが、次年度は遺伝子の発現等も測定し、信号として得られる硬さに含まれる情報の理解を目指した検討を行う。

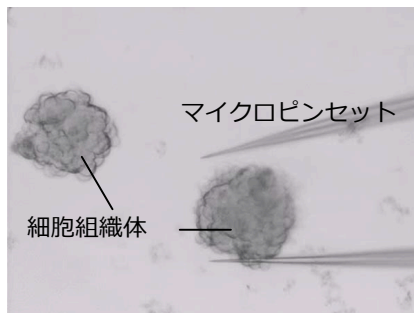


図4. 組織体をつかむマイクロハンド.

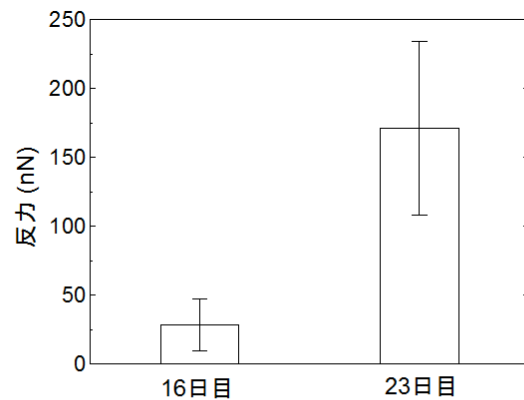


図5. 組織体を 100 μm 押し込んだときの反力.

前 - 大原 - 木原：基板上に固定化した細胞の力学的特性解析

組織体に含まれる細胞の情報を取り出す際に、短時間で多くの組織体を処理するためには対象となる組織体は溶液中に浮遊しているよりも、基板上に固定化されている方が望ましい。そこで、細胞膜にアンカリングする分子を修飾した基板を木原が開発した。この基板上に固定化した細胞には、AFM のカンチレバーや上述のマイクロピンセットを用いて触れることが可能であった。次年度には固定化された細胞と浮遊の細胞の硬さの違いなどに関して評価を行い、固定化法の最適化や基板上に存在する細胞の高さ方向の情報を自動で取得する技術の開発を行う。

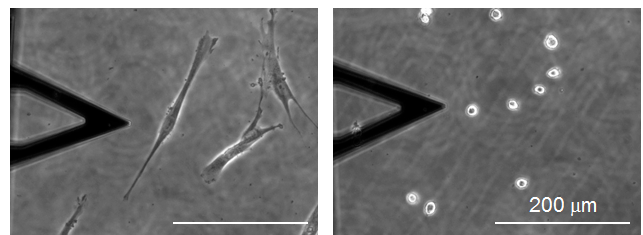


図6. 基板上に固定化した細胞に AFM のカンチレバーで触れている様子.

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（H23 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	1,838,270 円	109,730 円	0 円	52,000 円	2,000,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

木原 隆典・機能創成

前 泰志・システム創成

大原 賢一・システム創成

(2)研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

稲本 和也・物質創成・M2

発表論文等（平成 24 年 3 月 31 日現在）

〔雑誌論文〕

1. **S. Sakai**, H. Inagaki, K. Inamoto, M. Taya; Wrapping tissues with a pre-established cage-like layer composed of living cells, *Biomaterials* 33:6721-7, 2012.
2. **S. Sakai**, Y. Liu, M. Taya; Enzymatically-gelled amylopectin-based substrates enable on-demand harvesting cells with preserving cell-to-cell connection using saliva, *J Biosci Bioeng*, 112: 462-5, 2013.
3. **S. Sakai**, Y. Liu, E.J. Mah, M. Taya; Horseradish peroxidase/catalase-mediated cell-laden alginate-based hydrogel tube production in two-phase coaxial flow of aqueous solutions for filament-like tissues fabrication, *Biofabrication*, 5: 015012(8 pp), 2013.
4. Y. Liu, **S. Sakai**, M. Taya; Impact of the composition of alginate and gelatin derivatives in bio-conjugated hydrogels on the fabrication of cell sheets and spherical tissues with living cell sheaths, *Acta Biomater*, in press.
5. S. Shinohara, **T. Kihara**, **S. Sakai**, M. Matsusaki, M. Akashi, M. Taya, J. Miyake; Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, *J Biosci Bioeng*, in press.

〔著書〕

なし

〔学会発表〕

1. 稲本和也, **境 慎司**, 田谷正仁;がん細胞株のがん幹細胞マーカー発現挙動に与えるマイクロカプセル化の影響, バイオマテリアル学会年会 2012 年 10 月.
2. **境 慎司**, 稲本和也, 田谷正仁; マイクロカプセル内で培養した PANC-1 細胞のガン幹細胞マーカー発現挙動, 日本再生医療学会 2013 年 3 月(発表予定).
3. 篠原翔, **木原隆典**, **境 慎司**, 田谷正仁, 三宅 淳; ゼラチンゲルを基質として用いた血管様構造体の構築, 第 64 回日本生物工学会大会 2012 年 10 月
4. 伊東潤里, **木原隆典**, 三宅 淳; 生体環境構築過程における分子拡散動態, 第 64 回日本生物工学会大会 2012 年 10 月

〔その他〕

- ・本研究に関するテーマが A-STEP シーズ探索(平成 24 年度第 2 回公募)に採択された。

「細胞間相互作用存在下で評価可能かつ再現性に優れる薬効評価ツールの開発」

研究責任者：境 慎司

- ・本未来ラボの共同研究の内容に関する中学生(松原市立松原第 3 中学校 約 40 名)向け説明会・見学会を広報・社会学連携オフィス広報課広報係からの依頼により 2 月 15 日に実施した。
- ・本未来ラボの共同研究の内容に関する中学生（米子市弓ヶ浜中学校）向け説明会を広報・社会学連携オフィス広報課広報係からの依頼により 4 月 18 日に実施することになっている。