

## 再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームの創製

### Development of a Nano-Micro Platform for Tissue Engineering Applications

生田 幸士 (IKUTA KOJI)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授



#### 研究の概要

生体外で3次元的な組織を再生することを目指し、幹細胞に生化学的および機械的刺激をピンポイントで与え、分化誘導を制御することのできる再生医療用プラットフォームの概念を提案し、独自開発してきた。すでに、3次元ナノ加工プロセス、細胞操作ナノロボット、ナノファイバークプセル等の要素技術を開発し、これらのシステム化に取り組んでいる。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用マイクロ・ナノマシン

#### 1. 研究開始当初の背景

再生医療研究は、世界的に猛烈なスピードで進められている。しかし、それらは幹細胞の樹立や、培養、分化誘導手法など、細胞レベルでの研究に集中している。この先、再生医療が移植応用など、臨床で役立つものとなるには、細胞レベルではなく、組織・臓器レベルの再生技術の開発が必要不可欠である。しかし、mm オーダーの厚みを持つ3次元的な組織の再生は、未だ困難である。

#### 2. 研究の目的

我々は、最先端工学分野から、再生医療へ貢献することを目指し、独自に開発してきた3次元ナノ加工プロセス、マイクロアクチュエータ、微小力センシング、ナノ機能材料等の要素技術を統合し、細胞に生化学的および機械的刺激をピンポイントで与え、分化誘導を制御することのできる再生医療用プラットフォームを開発する。さらに、医学系研究者との連携により、再生させた機能組織を動物へ移植し有効性を実証する。

#### 3. 研究の方法

本研究で開発する再生医療用プラットフォームは、nm、 $\mu$ m、mm オーダーの3段階の階層から構成される。最も大きな階層は、1センチ四方程度の培養チップであり、培養チャンバー、培地供給用の流路、温度制御モジュール、CO<sub>2</sub> 制御モジュールを内蔵する。中段階の階層は、前記の培養チャンバー内を縦

横に走るマイクロ流路網である。マイクロ流路によって、3次元培養に必須の物質交換が行われると共に、遺伝子導入や液成因子による分化誘導が行われる。最小レベルの階層は、細胞にピンポイントで刺激を与えるナノアクチュエータである。これにより機械刺激による分化誘導や、細胞の配置をサブミクロンオーダーで自在に調整することが可能となる。以上の3段階の階層構造によって、単一細胞レベルから組織レベルに至る全てのスケールで制御された分化誘導・3次元組織培養を実現する。

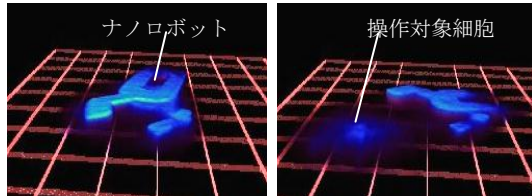
#### 4. これまでの成果

##### ナノファイバースキャフォールドの開発

細胞の足場材料として、独自に発見、開発してきた「ナノメッシュカプセル」は、①表面が微細な多孔質で覆われていること、②中空構造であること、③生分解性であること、という特徴を持つ。従来用いられてきたナノファイバーと比して、連続的な繊維ではなく粒子であるため、微細な3次元パターンニングができる。また、ナノファイバーと異なり、球状の中空構造を持つため、高い空孔度を持った厚みのあるスキャフォールドが作製できる。微細加工した導電性鋳型を相分離支援エレクトロスプレーの対電極とすることで、立体スキャフォールドの作製を実証した。さらに、予めポリマー溶液に薬剤を混合することで、薬剤徐放性ナノメッシュカプセルの生成にも成功した。

### 細胞操作ナノロボットシステムの開発

プラットフォーム内で細胞を操作するため、共焦点顕微鏡と光トラップ光学系を干渉せず統合した新光学系を考案した。顕微鏡の対物レンズを動かす代わりに、共役位置においたレンズペアを駆動して、共焦点3次元像を取得する。光トラップによって駆動する細胞操作ナノロボットを3次元空間で自由に操作しながら、ロボット及び細胞の位置や変形を、任意の方向から、リアルタイムで3次元操作・観察・録画できるハードウェア及び専用ソフトウェアを開発した。



細胞操作ナノロボットのリアルタイム3次元共焦点観察像(左)と、操作対象の細胞にナノロボットが接近する様子(右)

### 胚葉体形成特化型プラットフォームの開発

幹細胞の分化誘導では、3次元細胞凝集塊である胚様体を作製し、細胞間相互作用により分化を促進させる。胚様体の作製手法としては、浮遊培養法、ハンギングドロップ法などが存在する。浮遊培養法は、細胞非接着処理を施したディッシュに細胞を播種して、胚様体を作製する手法で、一度に多量の胚様体を容易に作製することが可能であるが、サイズ制御や、個別の胚様体の分化誘導を行うことはできない。ハンギングドロップ法はディッシュの蓋の裏に細胞の入った液滴を吊り下げて胚様体を作製する手法で、サイズの制御は可能であるが、職人芸が必要で、培地交換や分化試薬導入が不可能である。

このように、胚様体の作製、分化誘導、解析、回収の全ての工程をシームレスに行う装置は存在せず、幹細胞の分化誘導や、組織形成を高効率・低コストで行うことを困難にしていた。開発したプラットフォームは、手の平サイズの自動培養装置で、大量の胚様体の形成、分化誘導、観察が可能である。また、均一なサイズの胚様体を、一括形成した後、複数の系列に分化誘導し、さらに、大量に形成・分化誘導された胚様体から、特定の胚様体を選択的に回収できるという利点を持つ。



胚様体形成特化型プラットフォーム(左)と、形成した幹細胞胚葉体群(右)

### 5. 今後の計画

開発した要素技術を統合し、再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームを完成させる。これにより、3次元組織培養と分化誘導が可能になる。プラットフォーム内で幹細胞を増殖させた後、流路からの液性因子及びナノロボットによる機械刺激による分化誘導を実証する。並行して、プラットフォーム内で、膜流路及びナノファイバースキャフォールドを用いた3次元組織構築を行う。

最終的には、プラットフォーム内で、厚み1mm程度の3次元培養組織を構築した後、3次元組織の局所的分化誘導を行い、血管網を有する組織を得る。さらに、再生した組織をマウスに移植し、マウス血管系と組織内の血管網を、並行して開発している遠隔微細手術ロボットを用いて、マイクロサージェリにより接続し、組織を生着させることに挑戦する。

### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む) 主な論文・特許

M. Ikeuchi, R. Tane, K. Ikuta, "Electrospray Deposition and Direct Patterning of Poly(lactic Acid) Nanofibrous Microcapsules for Tissue Engineering", *Biomedical Microdevices* 14(1), pp. 35-43, 2012

M. Ikeuchi, T. Nishijima, K. Ikuta, "Pneumatically Actuated Spheroid Culturing Lab-On-A-Chip for Combinatorial Analysis of Embryonic Body", *Proc. IEEE MEMS*, pp. 92-95, 2012

H. Yukawa, H. Noguchi, S. Hayashi, "Embryonic body formation using the tapered soft stencil for cluster culture device.", *Biomaterials* 32(15), pp. 3729-38, 2011

M. Ikeuchi, K. Ikuta et al., "Multifunctional Optically Driven Microrobot for Realtime 3D Bio-Manipulation and Imaging", *Proc. IEEE MEMS*, pp. 29-32, 2011

生田幸士, 池内真志, 3次元共焦点観察用装置及び観察焦点面変位・補正ユニット, 特願 2010-208971

生田幸士, 井上佳則, 池内真志, 樹脂構造体の生体適合化処理方法, 生体適合化処理された樹脂構造体, 特願 2010-171467

生田幸士, 池内真志, 3次元ポリマー-金属複合マイクロ構造体, 及びその製造方法, 特願 2010-143724

### 受賞

M. Yasui, M. Ikeuchi, K. Ikuta, "Best oral paper award", *The Hamlyn Symposium on Medical Robotics*, 1 July 2012, London

安井真人, 池内真志, 生田幸士, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門 ROBOMECH賞, 2012

生田幸士, 紫綬褒章, 2010年秋

ホームページ等

<http://www.micro.rcast.u-tokyo.ac.jp/>