

## ナノ制御された細胞認識素子の設計と生体計測・組織工学への展開

### Design of Cell-Recognizable Nano-device and Application to Biosensing and Tissue engineering

赤池 敏宏 (Akaike, Toshihiro)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授



#### 研究の概要

本研究では細胞認識性ナノプローブを新たに設計し細胞の動態計測や機能制御素子として用いることで細胞微小環境の制御を実現を目指してきた。さらに、二光子励起重合を用いた微小加工をベースとした新しい培養基盤の開発と計測技術の基礎を確立し新しい細胞チップモデルの基盤技術を目指してきた。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

総合領域／人間医工学 医用生体高分子・生体材料学／

組織工学・細胞認識・細胞外マトリックス・ナノファイバー・レーザー工学

#### 1. 研究開始当初の背景・動機

近年、胚性幹細胞 (ES 細胞)、骨髄細胞、羊膜細胞など全能性多能性の細胞を筆頭に各種臓器組織中に存在する幹細胞の培養を出発点とする再生医療の研究が活発に行われている。しかしながら、肝臓や腎臓の細胞社会としての解剖学的構築とシステム化された機能は複雑であり、人工臓器・組織として再構築して用いるためには、各種の細胞を三次元的に任意の場所に規則正しく固定し、細胞間のコミュニケーションとそのシンクロナイゼーションを誘起する必要がある。生体中から単離した細胞をまず増殖能を引き出し、引き続き分化を誘導するためには単に細胞の機能を促進するサイトカインなどを溶液状態で提供するだけで不十分であり、空間的のみならず時間的な情報の制御された生体内環境に近い細胞外マトリックス場を提供する必要がある。

#### 2. 研究の目的

生体外環境 (*in vitro*) での細胞培養や組織再構成は何故生体内環境 (*in vivo*) に迫れないのかを明らかにするために、まず第一にナノレベル (リガンドクラスターレベル) での微小環境をキャラクタライズする細胞認識素子 (プローブ) を設計し、*in vitro* 培養での細胞内外の一個レベルでのナノ微小環境を計測する。さらに、今までの *in vitro* 培養では困難なため殆ど考慮されていなかった規則的三次元的環境を実現し、ランダムな三次元ナノファイバーマトリックス培養と比較しながら細胞の再構成・組織化に関する基本的シナリオを確立する。さらに、ナノ制御された組織工学デバイスやシステム (臓器チップ・臓器関連チップ) の応用としての本研究の最終的な目標は人工ナノファイバーで構成された細胞外マトリックスを二光子励起法によって作成し、Computer-Aided Matrix Biology (CAMB) という我々独自のコンセプトを確立し、二次元／三次元的ゲル内培養に替わる新しい培養法を確立を目指してきた。

#### 3. 研究の方法

目的を達成するために、初年度より大きく3つの研究課題を設定し各々の軸によってそれらの独自性のある成果を期待するとともに、最終的な目標へ貢献できるよう研究を進めてきた。それらは (研究課題1) 細胞認識素子である認識性分子の設計、具体的な方法論として、遺伝子工学的手法を用いて固定化型が可能なキメラタンパクを創成し、細胞認識性プローブ (素子) の設計とそれらの応用展開の試み、(研究課題2) 光反応を利用した二光子励起重合法を用いてマイクロ (ナノ) パターンニング基質の作成と細胞培養 (形態・機能制御) への応用、(研究課題3) 細胞認識性ナノミセルを用いた細胞の動的挙動の解析システムの考案、である。これらを柱として相互に情報交換し、最終的に1つの細胞レベルを考慮し、新しい細胞計測技術を確立するとともに細胞チップへの基盤技術開発を進めた。細胞の動的挙動の計測のため主に購入した設備はカラー冷却 CCD カメラ、顕微鏡ステージ上細胞培養装置 (本研究にて開発・投資) 等である。

#### 4. 研究の主な成果

本申請の最も画期的な着眼点は、インテグリンレセプターに依存しないマトリックス設計という独自のコンセプトに基づき、全く新しいタイプの細胞認識性機能材料設計にある。そのために、遺伝子工学的手法によって基盤表面へ固定化が可能なりガンド分子を創成した。このコンセプトによって得られたキメラタンパク質はポリスチレン等の人工的基材 (ディッシュやナノファイバーなど) に安定にコートさせることが可能であり、いずれもそのまま二次元 (2D) あるいは三次元 (3D) 細胞接着基質として利用できることが見出され、細胞制御型細胞チップへの応用展開が可能であることが判明した。非インテグリン系接着基質の存在を立証することにより、他の新しい細胞接着マトリックスを提唱することができた。キメラタンパク質の設計コンセプトに基づき、E-カドヘリンや N-カドヘリン、様々な増殖因子と IgG の Fc ドメインとの融合タンパク質を設計した。これを利用して E-カドヘリ

ン固定表面による ES 細胞の非コロニー形成型の未分化増殖に成功し、また N-カドヘリンの固定表面による幹細胞の分化制御、LIF（白血球抑制因子）の固定化による ES 細胞の培養法の改善などを行った。

これらの細胞認識性分子を細胞制御・計測型のプローブへ応用展開するために細胞認識型遺伝子導入ナノ粒子として用いることと、もうポリスチレン粒子にこれらを固定化して細胞への局所的なシグナルを誘起する手法を確立した。炭酸アパタイトは、pH感受性を持ち、かつDNAとの結合能の高いナノ微粒子であり、このDNA/炭酸アパタイト複合体を改良して細胞を特異的に認識する高効率な遺伝子発現システムの開発に成功した。

さらに、固定化型サイトカインを直径1〜3 μmのポリスチレン粒子に固定化し細胞への局所的な刺激を誘導した実験においては、EGF 固定化型粒子によって細胞の走化性を特定の方向へ誘導することが出来ることが示された。さらに、その細胞の動的挙動を追従することができるようなシステムの確立も達成された（図1）。

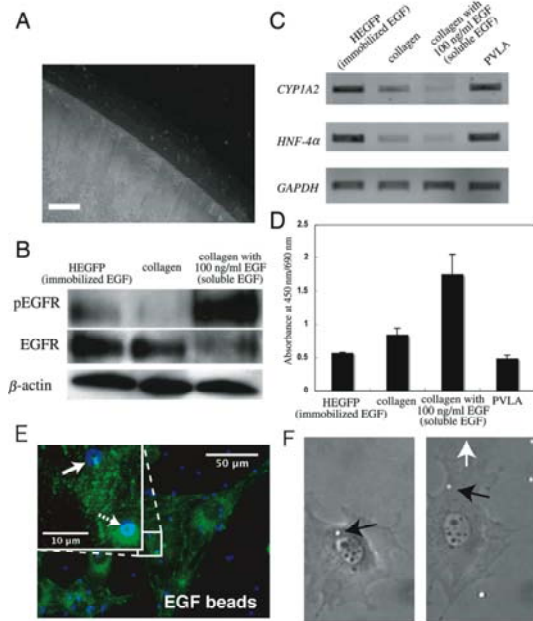


図1 共有結合型 FGF の開発 (A) 固定化の確認、(B)A431 細胞の EGF レセプターのリン酸化の確認、(C) 肝細胞のマーカー遺伝子の発現の確認。固相化 EGF のみ肝細胞の分化能維持が可能であった。(D) 肝細胞の増殖性への効果。(E) EGF 固定化したポリスチレン粒子による局所刺激の確認。粒子が細胞へ落下した周辺にレセプターのリン酸化を確認。(F) 同粒子による細胞走化性誘導の確認。粒子の落下した方向（黒矢印）の方向へ細胞が移動することを確認（白矢印）

本プロジェクトの最終目標である Computer-Aided Matrix Biology (CAMB) というコンセプトに基づき、人工ナノファイバーで構成された細胞外マトリクスを二光子励起重合法によって二次元/三次元的ゲル内培養に替わる新しい培養基盤の作製を行った。新しい培養基質上の細胞は伸展・移動を活性に行い通常の培養条件と同様の生理活性を示すとともに細胞と ECM の相互作用を動画解析システムによって解析するまでに至った。2光子励起重合により作製した培養基盤の微細加工技術は、太さは約1 μm 以上、長さ10 μm のアスペクト比10以上のものを数マイクロオーダーでアレイ化させることが可能であり、一細胞内における接着点の空間分とその強度を計

測することが可能になった（図2）。

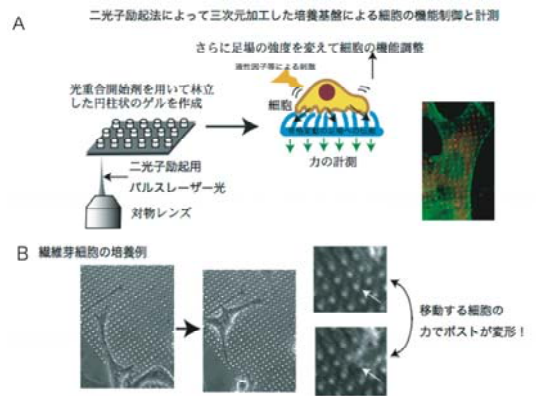


図2 二光子励起法を用いて作製している刷毛型ポストアレイゲル培養基盤作製。(A) ポストの太さは細胞側のシグナル分子等の集積制御になりポストのかたさ調整は細胞の張力制御から機能制御、および計測システムとしての利用可能であることが示された。(B) 個々のポストを認識し相互作用する。その相互作用の大小も定量的に計測可能であることが確認できた（矢印）

## 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本プロジェクトは（細胞外）マトリクス工学に基づき学際的にも新しいコンセプトによって計測物理学、生体材料設計論を融合させ再生医療分野へのアプローチをねらうものであった。Computer-Aided Matrix Biology は申請者らの提案になる独創的なものであり、“人間ドック”の細胞版とも言うべき高精度な細胞-マトリクス間、細胞-細胞間相互作用等の解明により、*in vivo* 生物学に迫るものであった。本研究での技術は、世界的に見ても殆ど例がなく、知的資産の上からも世界市場を独占できる可能性を秘めている。さらに、本研究によって確立した基盤技術によって、細胞培養技術、細胞移植技術、細胞保存技術、細胞輸送技術、移植患者の管理システムなど様々な技術が、今後飛躍的に再生医療分野において貢献するものと考えている。

## 6. 主な発表論文

（研究代表者は太字、研究分担者には下線）

- T. Hoshiba, H. Nagahara, C-S. Cho, Y. Tagawa, **T. Akaike**; Primary hepatocyte survival on non- integrin- recognizable matrices without the activation of Akt signaling. *Biomaterials*. 28, 1093-1104, (2007)
- **赤池敏宏**, 長岡正人 E. H. Chowdhury, 原田伊知郎 : 接着分子の利用による細胞制御—細胞生理学/遺伝子工学/材料工学/物理学間の学際的融合による細胞認識材料設計とその再生医療への展開 *材料の科学と工学* 44, 6-12, (2007)
- C-S. Cho, T. Akaike : Nanotechnology in synthetic glycopolymers. *Nanotechnology in Carbohydrate Chemistry*, Hideya Yuasa Eds TransWorld Research Network, 103-125,(2006)
- K. Ogiwara, M. Nagaoka, C-S. Cho, **T. Akaike**; Effect of photo-immobilization of epidermal growth factor on the cellular behaviors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 255-259, (2006)
- M.Nagaoka, U. Koshimizu, S. Yuasa, F. Hattori, H. Chen, T. Tanaka, M. Okabe, K. Fukuda, T. Akaike.; E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS ONE*, 1, e15, (2006)