

## 平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		AKAIKE TOSHIHIRO					
①研究代表者 氏名		赤池 敏宏		②所属研究機関・ 部局・職			
		東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授					
③研究 課題 名	和文	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					
	英文	Design of Cell-Recognizable Nano-device and Application to Biosensing and Tissue-engineering					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		33,300	21,600	24,300	13,500	0	92,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
赤池 敏宏		東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授		生体材料工学 組織工学		組織培養システムを用いたナノ計測と評価 合成化学と遺伝子工学を利用した細胞認識素子の設計	
渡辺 敏行		東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・教授		有機フォトニクス		細胞接着基質のナノ微細加工 二光子励起法の改良	
原田 伊知郎		東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助手		生物物理学		顕微鏡下での細胞培養システム 培養基質の蛍光化と観察用顕微鏡の設計	
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究の目的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することである。さらに、二光子励起重合法を用いた微小加工をベースとした新しい細胞チップと計測技術の基礎を確立することである。その背景として近年、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的研究が活発に行われていながら、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・組織として再構築する必要性が高くなっていることがあげられる。</p> <p>換言すれば本研究では、生体外環境（<i>in vitro</i>）での細胞培養や組織再構成は何故生体内環境（<i>in vivo</i>）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、<i>in vitro</i>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<i>in vitro</i>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することである。CAMBとは、現在までその複雑さのゆえに困難であった三次元培養法を全く新しい方法で構築し、それをコンピューターのメモリー上で容易に解析できるシステムである。二光子励起法により、精密制御された格子状空間を骨格とし、多認識部位（マルチリガンド）を有するナノミセルを固定化したナノ環境制御された細胞環境を作成し、これに細胞を封じ込める。さらにその作成プロセスをコンピューター上にすべて記憶させた細胞機能の自動解析制御システムの構築を目指す。</p>							

**⑦これまでの研究経過**（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

プロジェクトの前期にあたる現在まで大きく3つの柱を軸として研究を進めてきた。それらは(1)遺伝子工学的手法を中心とする細胞認識性プローブ（素子）の設計とそれらをベースとした培養方法の確立(2)糖質高分子を中心とする各種合成高分子に対する培養細胞の親和性と接着細胞の機能評価(3)二光子励起法や光反応を用いたマイクロ（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）への応用である。

まず、本研究のもっとも基礎となる細胞認識性プローブであるが、本研究では各種細胞のレセプターのリガンドとなり得る分子ドメインを抗体Fcドメインと融合させたキメラタンパクの作成を中心に行ってきた。抗体Fcドメインは疎水性表面基盤に良く吸着することから各種合成高分子基盤に容易に吸着させることが可能である。この設計論に基づき、現在まで細胞—細胞間接着のレセプター・リガンドの関係にあるカドヘリン分子とのキメラ、増殖因子レセプターのリガンドとのキメラについて作成検討を行ってきた。その結果、我々が作成した各種キメラタンパクは、ポリスチレンシャーレ上に良く固定化でき、さらに細胞認識組織として細胞を吸着表面基盤に固定化及び培養出来ることが確認出来た。加えて、それらのキメラタンパクは単に細胞認識素子としてのみならずシグナル伝達を誘起するなど、生理活性を有しており、我々の提唱する細胞マトリクス工学の一翼を担う新しい接着基質になりうるものが確認できた（学術雑誌：19,20等、学会発表：3,6,18,19,21等）。

次に、細胞マトリクス工学のもう一方のカテゴリーに分類している各種合成高分子に対する培養細胞の親和性を検討したが、用いた合成高分子として我々が培養基質として現在まで多く発表してきたPVLA、poly-L-Lysin さらに今後の細胞微小環境制御に有用になりうると考えられる温度感受性高分子であるポリ N-isopropylacrylamide ゲルやポリ Acrylamide ゲルなどである。いずれの高分子ゲルについても細胞毒性はないが、高分子種によって細胞が分泌する細胞外マトリクスとの親和性が異なり、培養時間経過とともに細胞機能に異なる効果を及ぼす可能性が見出され、これらの点について今後さらなる検討を加える必要があると考えられた（学術雑誌：2,3,4,5,8,9,11等、学会発表：4,5等）。

最後に、本研究の最大テーマである、細胞以下のスケールによる微細加工技術と培養系への応用展開である。まず、微細加工として合成高分子上に細胞外マトリクスを1-5 $\mu\text{m}$ ほどのプリンティングした培養基盤を作成し、細胞の移動や細胞骨格などの微小計測の可能性について検討を行った。その結果、細胞は微細加工基盤上でも通常の培養とほぼ変わらない生理活性を示し、さらに、細胞の移動や増殖にともなう骨格系の微小変動の制御と計測が可能であることが示唆された。また、三次元細胞環境制御の目標として用いる二光子励起法によって作成された基盤上への培養と作成したフレームの観察の可能性について検討を行った。2光子励起重合により、ハイドロゲルを重合するための親水性の開始剤を合成した。従来の親水性開始剤はその2光子吸収断面積が100GM(1GM=10 $\cdot$ 50 cm<sup>4</sup>s/photonmolecule)程度しかなかった。これに対して我々が開発したアゾメチン誘導体の2光子吸収断面積は約500GMあることが判明した（学術雑誌：24,25,26学会発表：16,17等）。

2光子励起重合により、2-ヒドロキシエチルアクリレート(HEA)からなるマイクロニードルアレイを合成した。マイクロニードルアレイの太さは約0.8  $\mu\text{m}$ 、長さ7  $\mu\text{m}$ 、間隔は5  $\mu\text{m}$ であった。また、ポストの弾性率は架橋剤の導入率により3 $\times$ 10<sup>2</sup>Pa-7 $\times$ 10<sup>3</sup>Paの範囲で制御できた。このマイクロニードルアレイ上でSwis-3T3細胞を培養し、ニードルの曲がり方から、細胞が発生する牽引力を測定した。この時得られた牽引力はバルク平面基板上的細胞が発する牽引力の1/1000であった。また、ニードルアレイ上の細胞は代謝や細胞分裂が活発になった（学術雑誌：22,学会発表：13,14）。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

現在までの研究経過である(1)遺伝子工学的手法を中心とする細胞認識性プローブ(素子)の設計とそれらをベースとした培養方法の確立(2)糖質高分子を中心とする各種合成高分子に対する培養細胞の親和性と接着細胞の機能評価(3)二光子励起法や光反応を用いたマイクロ(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)への応用について、順に示す。

まず、細胞認識素子についてFcドメインと細胞認識ドメインのキメラタンパクの一つであるEカドヘリン-Fcキメラタンパクについて学術的にも応用面においても非常に興味深い結果が得られた。Eカドヘリン-Fcキメラタンパク上にマウス由来のES細胞の培養の検討を行ったところ、ES細胞とキメラタンパク吸着表面との親和性は非常に高く主としてES細胞表面に発現しているE-カドヘリンに仲介された機構に認識されているものと推定された。さらに、特記すべき点は、通常ES細胞は互いに強く結合し合い凝集したコロニーを形成するのに対し、本キメラタンパク上においては非常に良く分散し現在まであり得なかったES細胞の完全な単層培養系を確立することが可能となった。この結果は、現在まで凝集が原因で観察すら困難であったのに対して単細胞系の分化を阻止し、自己複製を促進する画期的な方法であるだけでなく、個々のES細胞の内部のシグナル伝達や運動を担うタンパク質の挙動などの解明が可能になるとともに、本研究の目的とする機能制御された細胞チップへの応用展開が期待できる(国内特許出願番号2004-85394、米国特許申請中)。

また、細胞特異的あるいは非特異的合成高分子と細胞の親和性の検討について、アポトーシス誘導性が無いことが明らかになったが、さらに興味深い点として、細胞が種々分泌する細胞外マトリクスが培養条件に依存して重要な役割を果たすという新しい知見を得ることが出来た。従来、細胞を培養するために事前にコートしておく基質(マトリクス)表面についてのみ細胞との初期接着相互作用が考察されてきたが、本研究では初期接着については各種の合成高分子の構造や分子認識性の違いに応じて異なるのみならず初期機構に大差がなくても、細胞が後から分泌する細胞外マトリクスとの親和性の違いによって培養経過とともに細胞機能変化が誘導される可能性が分子生物学的検討により明らかにされ新しいマトリクス工学の到来に一石を投じる結果となった。

さらに、困難が予想されていた二光子励起重合法について、予定を早めて基礎的研究を昨年度から開始した。現在まで二光子励起法による高分子溶融体の微細加工は多く報告されるようになってきたが、未だに二光子励起法による水溶性のハイドロゲルの重合の報告はほとんどない。しかし、昨年度中に重合に成功した2-ヒドロキシエチルアクリレート(HEA)からなるマイクロニードルアレイはその大きさと力学的強度 $3 \times 10^2 \text{Pa} \sim 7 \times 10^3 \text{Pa}$ の範囲という小ささにおいても画期的な結果であった。

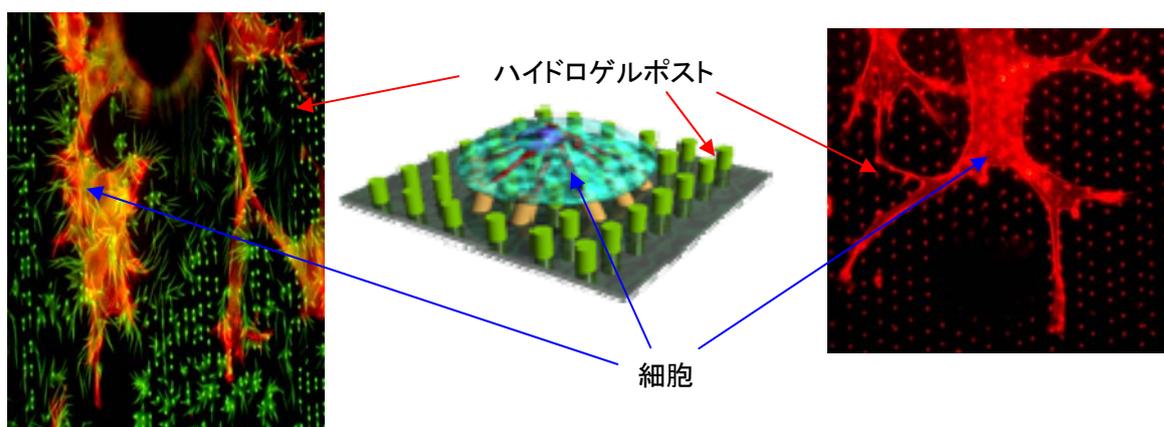


図 左:弾性率が 300Pa のポスト上での培養細胞 中央:テスト的に目標とした三次元構造をしたマトリクス上への細胞培養方法 右:弾性率が 7000Pa のポスト上での培養細胞。弾性率の可変によって細胞の形態の制御が可能になり、液中においても形状を維持するポストの林立が可能であることが分かってきた。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術雑誌

1. Chowdhury E.H., Sasagawa T., Nagaoka M., Kundu A.K., Akaike, T. "Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: Effect of temperature and pH on precipitation." *Anal. Biochem.*, 314,316-318 (2003)
2. S. Hernandez, H. Miura, M. Beristain, T. Ogawa, T. Watanabe, S. Miyata, "Novel Diacetylene-containing Polymers for Second order NLO Applications: Effect of Main Chains and Structure Property Relationships", *Macromolecular Symp.* 192, 123-133 (2003)
3. Ishida K., Nagahara H., Kogiso T., Aso T., Hayashi N., Akaike, T. "Cell adhesion aside from integrin system can abrogate anoikis in rat liver cells by down-regulation of FasL expression, not by activation of PI-3K/Akt and ERK signaling pathway." *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 300.201-208 (2003)
- 4. Kim S-H., Kim J-H., Akaike, T. "Regulation of cell adhesion signaling by synthetic glycopolymer matrix in primary cultured hepatocyte." *FEBS Letters*, 553, 433-439 (2003)
5. Kim S-H., Hoshihara T., Akaike, T. "Effect of carbohydrates attached to polystyrene on hepatocyte morphology on sugar-derived polystyrene matrices." *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A, 1351-1359 (2003)
6. Kim W. J., Sato Y., Akaike, T., Maruyama A.: Cationic comb-type copolymers for DNA analysis. *Nature Mater.*, Vol.2.Dec.,815-820 (2003)
7. T. Watanabe "Molecular Design of Two-photon Chromophore and their application to Three Dimensional Lithography", *Shikizai Kyokai*, 76, 511-518 (2003).
- 8. S-H.Kim, T.Hoshihara, T.Akaike "Hepatocyte behavior on synthetic glycopolymer matrix: inhibitory effect of receptor-ligand binding on hepatocyte spreading" *Biomaterials*. 25, 1813-1823, (2004)
9. K.H.Park, T.Akaike "Visualization of the Specific Interaction of Sulfonyleurea-Incorporated Polymer with Insulinoma Cell Line MIN6." *J. Biochem.*, 135, 179-183 (2004)
10. Y.Takei, A.Maruyama, A. Ferdous, Y. Nishimura, S. Kawano, K. Ikejima, S. Okumura, S. Asayama, M. Nogawa, M. Hashimoto, Y. Makino, m. Kinoshita, S. Watanabe, T. Akaike, J. J. Lemasters, N.Sato "Targeted gene delivery to sinusoidal endothelial cells: DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx." *FASEB J.* 18, 699-701 (2004)
11. Ise, H., Nikaido, T., Negishi, N., Sugihara, N., Suzuki, F., Akaike T. Ikeda, U. "Effective Hepatocyte Transplantation Using Rat Hepatocytes with Low Asialoglycoprotein Receptor Expression." *Am. J. Pathol.*, 165, 501-510 (2004)
12. Chowdhury E.H., Kunou M., Nagaoka M., Kundu A.K., Hoshihara T., and Akaike T. "High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca-Mg phosphate" *Gene*, 341, 77-82 (2004)
13. Y. Lu, F. Hasegawa, T. Goto, S. Ohokuma, S. Fukuhara, Y. Kawazu, K. Totani, T. Yamashita, T. Watanabe, "Highly Sensitive Two-photon Chromophores Applied to Three Dimensional Lithographic Microfabrication: Design, Synthesis and Characterization Towards Two Photon Absorption Cross Section." *J. Mater. Chem.*, 14(1), 75-80 (2004).
14. Y. Lu, F. Hasegawa, Y. Kawazu, K. Totani, T. Watanabe, "Synthesis and their Two-Photon Absorption Measurement of Novel Push-Pull Fluorophores", *J. Lumin.*, 110, 1-10 (2004).
15. Y. Lu, F. Hasegawa, S. Ohkuma, T. Goto, S. Fukuhara, Y. Kawazu, K. Totani, T. Yamashita, T. Watanabe, "Highly efficient two-photon initiated polymerization in solvent by using novel two-photon chromophore and co-initiators", *J. Mater. Chem.*, 14(9), 1391-1395 (2004).
16. Y. Maeda, F. Chiba, K. Iida, K. Totani, K. Ogino, H. S. Nalwa, T. Watanabe, "Synthesis of Conducting Polymer Nanorods by Using Electropolymerization in Nanoporous Template", *Electrochemistry*, 72(6), 430-433 (2004).

17. S-J.Seo, T.Akaike, Y-J. Choi, M. Shirkawa, I-K. Kang, C-S.Cho “Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment”, *Biomaterials*, 26, 3607-3615 (2005)
18. 赤池敏宏、長岡正人、村上哲平、赤野恭子、太田宗宏、後藤光昭、石原義久 “バイオ人工肝臓をめざす細胞マトリックス工学—肝細胞機能の制御—Cellular-matrix Engineering for Bioartificial Liver-Control of Hepatocyte Functions—” *細胞*37(2), 13-17, (2005)
19. 赤池敏宏、荻原一隆、長岡正人 “バイオハイブリッド工学の新展開—再生医療をめざす細胞マトリックス工学— New Trend of Bio-hybrid Technology-Cellular-matrix Engineering for Regenerative Medicine—” *Bio Industry*, 22(3), 25-33 2005
20. 荻原一隆、長岡正人、赤池敏宏 “材料表面修飾とティッシュエンジニアリング—キメラタンパク質を用いた細胞接着応答の制御” *ティッシュエンジニアリング*2005 日本医学館 p 77-83 (2005)
- 21. M.Nagaoka, T.Akaike “Single amino acid substitution in the mouse IgG1 Fc region induces drastic enhancement of the affinity to protein A” *Protein Engineering* 16, 243-245 (2003)
22. N. Kimura, K. Totani, T. Watanabe, I. Harada, A. Oguni, T. Akaike, “Fabrication of elastic substrates for tissue engineering by two-photon initiated polymerization”, *Nonlinear Opt.*, in press
23. M. Tsubouchi, K. Totani, T. Watanabe, K. Kamata, Y. Iwase, K. Kondo, K. Kataoka, “Photo dynamic therapy of cancer by photo-sensitive nano-particles”, *Nonlinear Opt.*, in press
24. S. Kanai, K. Totani, T. Watanabe, T. Ogawa, “Effects of main chain of NLO polymers on second-order nonlinear optical properties”, *Nonlinear Opt.*, in press
25. T. Iwata, Y. Lu, K. Totani, F. Hasegawa, T. Watanabe “Characterization of novel two-photon chromophore for two-photon initiated polymerization”, *Nonlinear Opt.*, in press
26. T. Watanabe, K. Totani, F. Hasegawa, T. Yamashita, J. Kim, K.-S. Lee, “Highly efficient photo initiator for two-photon initiated polymerization and application to micro fabrication of polymer”, *J. Nannosci. NanoTech.*, in press

#### 学会発表

1. E. H. Chowdhury, T.Akaike, “Carbonate apatite - an efficient tool for gene delivery to mammalian cells.” *Miami Nature Biotechnology Winter Symposia Florida,USA ,2/ 1-5* (2004)
2. E. H. Chowdhury, Nagaoka, M., Maruyama, A. and Akaike, T. “PH-sensitive nano-crystals of carbonate apatite for efficient gene delivery and expression in mammalian cells.” *The 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia, 5/17-21* (2004)
3. K. Ogiwara, M. Nagaoka, T. Akaike “Study of the cellular adhesion functions regulated by immobilized EGF” *7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia 5/17-21* (2004)
4. T. Hoshiba, K. Mochitate, T. Akaike “Establishment of mouse primary hepatocyte culture based on various matrices or pharmacokinetical analysis” *2nd Pharmaceutical Science World Congress, Kyoto, Japan, 5/30-6/3* (2004)
5. T.Akaike “Bionanofiber World for Biomedical Engineering” *1st International Congress on Nanofiber Science & Techonology-Aim for the Practical Application Tokyo,Japan,6/28*(2004)
6. T.Akaike, “Bionanofiber World for Tissue Engineering” 2004 *Taiwan-Japan Advanced Biomaterials Symposium, Taipei, Taiwan 10/4-5* (2004)
7. T. Watanabe, Y. Lu, F. Hasegawa, F.Chiba, N. Kimura, M. Tsubouchi, K. Totani, “Microfabrication of polymers for opto-electronics and biomedical application”, *225 th ACS National Meeting, Colloidal and Molecular Elctro-optics*, New Orleans, USA, March 26, (Invited) (2003).

8. T. Watanabe, N. Kimura, Y. Kazama, Y. Lu, F. Hasegawa, K. Totani, S. Kuebler, S. R. Marder, J. W. Perry, "Microfabrication of hydrogel and liquid crystalline polymers by two-photon initiated polymerization", The Seventh International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'7, Sorak, Korea, November 4-8, (2003).
9. K. Totani, Fumiko Chiba, F. Chiba, Y. Maeda, T. Watanabe, "Fabrication of rod-like conducting nano polymers from anodized porous alumina plate", The Seventh International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'7, Sorak, Korea, November 4-8, (2003).
10. F. Hasegawa, J.Y.Kim, T.Watanabe, "Two-photon microstructure-polymerization initiated by a novel D-pi -D structures" The Seventh International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'7, Sorak, Korea, November 4-8 (2003).
11. T. Watanabe, N. Kimura, Y. Lu, K. Totani, I. Harada, T. Akaike, "Stimulus-responsive micro-actuator for biomedical application", ISSP International Workshop 5 th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSympo2003), Kashiwa, Japan, November, 18-21, (2003).
12. M. Yoshikawa, H. Furukawa, T. Watanabe, K. Horie, "Photoreaction-induces control of network structure in polymer gels study with scanning microscopic light scattering" ISSP International Workshop 5 th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSympo2003), Kashiwa, Japan, November, 18-21, (2003).
13. N. Kimura, Y. Lu, T. Watanabe, K. Totani, A. Oguni, I. Harada, T. Akaike, "Microfabrication of hydrogel by using two-photon initiated polymerization", ISSP International Workshop 5 th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSympo2003), Kashiwa, Japan, November, 18-21, (2003).
14. N. Kimura, K. Totani, T. Watanabe, I. Harada, A. Oguni, T. Akaike, "Fabrication of elastic substrates for tissue engineering by two-photon initiated polymerization", The Eighth International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'8, Matushima, Japan, March 7-11. (2005).
15. M. Tsubouchi, K. Totani, T. Watanabe, K. Kamata, Y. Iwase, K. Kondo, K. Kataoka, "Photo dynamic therapy of cancer by photo-sensitive nano-particles", The Eighth International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'8, Matushima, Japan, March 7-11. (2005).
16. T. Iwata, Y. Lu, K. Totani, F. Hasegawa, T. Watanabe "Characterization of novel two-photon chromophore for two-photon initiated polymerization", The Eighth International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'8, Matushima, Japan, March 7-11. (2005).
17. K. Totani, Y. Kazama, H. Hayashi, T. Watanabe, "Novel polarizer based on anisotropic light scattering", The Eighth International Conference on Organic Nonlinear Optics ICONO'8, Matushima, Japan, March 7-11. (2005).
18. 赤池敏宏 「再生医療・バイオ人工臓器における細胞マトリックス工学の新展開」第24回人工臓器学会 東京 10/5-7 (2004)
19. 赤池敏宏 「細胞を認識して機能を制御する高分子設計の面白さ-再生医療/ティッシュエンジニアリングを目指す細胞マトリックス工学-」日本化学会「化学イノベーションシンポジウム」(第2回) 東京 10/30, (2004)
20. 赤池敏宏 「臓器特異的デリバリーを目指した炭酸アパタイトからなるナノ粒子による高効率遺伝子導入方法の確立」静岡がんセンターセミナー 静岡、10/21、(2004)
21. 赤池敏宏 「再生医療をめざす細胞マトリックス工学」富士裾野 21世紀フォーラム 静岡、1/21、(2005)