

「幹細胞系バイオフィクロアクチュエータの開発」

理化学研究所生命システム研究センター集積バイオデバイスユニット

田中 陽

1 研究の背景と目的

ドラッグデリバリーなど、医療用生体埋め込み型デバイスの開発において、電源の使用が困難である生体内で恒常的に使えるポンプの開発は喫緊の課題である。一方で、申請者はこれまでに、MEMS (Microelectromechanical Systems)技術によるマイクロ構造体やデバイス作成技術と細胞を組み合わせ、血中グルコースのみで拍動する心筋細胞を用いたポンプを開発してきた (Tanaka *et al.*, *Lab Chip* 6, 362-368 (2006), 図 1 など)。これは、細胞という柔軟材料を用いているため生体適合性が優れている点、培地や血液中に通常常時含まれているグルコースのみで駆動するという点できわめて斬新なものであるが、動物の心筋細胞を要し、心筋細胞はほとんど増えないため、プライマリー細胞を用いる必要があり、常に動物を犠牲にするという点において医学的な用途に用いるためには実用的・倫理的な面においては致命的な欠点がある。そこで、本研究においては、近年開発が進んでおり、皮下組織を用いるため倫理的な問題も少ない幹細胞の一種である iPS (induced pluripotent stem)細胞を心筋細胞に分化させ、これをプライマリー心筋細胞の代わりに用いてポンプとすることを目的とする。iPS 細胞は医療応用に向けてはがん化の問題など臨床応用に向けた課題を抱えているが、アクチュエータの素子として用いる分には問題が少なく、現状の技術でも十分に使用できると考えられる。具体的には、分化心筋細胞の発生力の測定ならびにこれをもとにポンプを設計し、送液機能を実証する。

心筋細胞を用いたマイクロポンプの研究では、上記の実績に関して世界でも申請者が先行しており、同コンセプトの研究が最近報告されつつあるが、申請者の開発したポンプには性能面で全く至っていない。例えば、心筋細胞による歩行・遊泳ロボット (Feinberg *et al.*, *Science* 317, 1366-1370 (2007), Kim *et al.*, *Lab Chip* 7, 1504-1508 (2007)など)が開発されているが、ポンプ機能はなく、埋め込みデバイスとしては使えない。また、ダイアフラム上に直接心筋を培養してポンプとした報告もあるが (Park *et al.*, *Lab Chip* 7, 1367-1370 (2007)), ポンプ流量は上述の申請者のものよりも2桁低く、技術的には未だ追従途上である。国内でも、チューブ周囲に心筋細胞を巻きつけ、発生力を測定するあるいはポンプとして使うという試みもあるが (Horiguchi *et al.*, *IEEE Trans. Nanobioscience* 8, 349-355 (2009), Akiyama *et al.*, *Lab Chip* (2009)), いずれも申請者のものと比べれば桁違いに小さく、構造的に逆止弁の装着が難しいため、実際にポンプとして使用するには一段の改良が必要である。以上のように申請者の研究は分野自体を開拓・先導しており独創性・先端性が高く、生体埋め込み型デバイスとして展開可能な性能をもつ現状唯一のデバイスであるといえる。

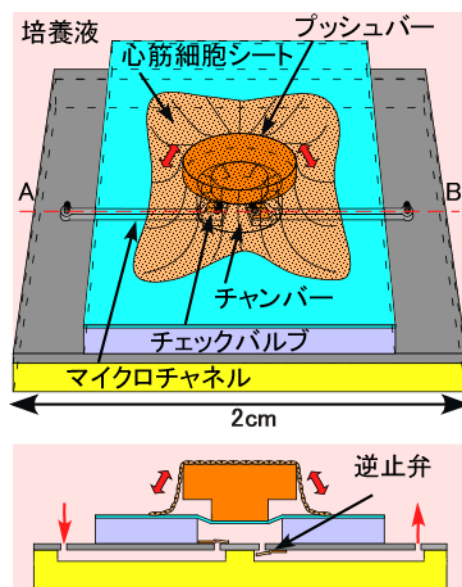


図1 心筋細胞駆動型ポンプ (上) 俯瞰図 (下) A-B での断面図

2 研究方法・研究内容

本項ではまず、本研究の土台となる申請者のこれまでの研究を具体的に示し、これに対する本研究の実施計画の大枠を示す。

分析や合成など様々な化学プロセスをマイクロ化学チップに集積化する研究が革新的な化学・生化学技術として世界的に注目されている(Whitesides, *Nature* 442, 368-373 (2006)など)が、マイクロチップをさらに飛躍的に高効率化するには、流路のみのサイズダウンでは限界があり、ポンプや電源をはじめ、外部デバイスを含めたシステム全体の集積化が急務であるが、現在の技術では高々ミリメートルサイズまでと、集積度に限界がある。

そこで、申請者はシリコン・ガラスのようなハードマテリアルを用いた機械工学的発想から脱却し、化学・力学的機能が高度に集約されたソフトマテリアルである細胞の利用により飛躍的に集積度の高いポンプが実現可能と考え、東京女子医大・岡野研究室との共同研究の下、細胞シートという培養細胞を一層のシートとして回収する技術を用いて**図1**のような、ブドウ糖のみで駆動する電力不要心筋細胞ポンプを試作した。同様の技術を用いた血管組織の構築と回収(Tanaka *et al.*, *Biomaterials* 32, 2459-2465 (2011))など最近さらに展開・発展させている。

一方、先述のように、本研究ではこのようなデバイスの心筋細胞を幹細胞から分化させた心筋細胞を用いるが、幹細胞由来の心筋細胞で細胞シートを作製する技術はこれまでになく、細胞シートを使わない構造を新たに考える必要があるが、本研究では、デバイス材料としては、足場となる、柔軟で、微細加工に適している高分子エラストマーであるポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いてこれに細胞が接着する条件について検討し、さらに実際にポンプデバイスを作成してその駆動原理を実証した。

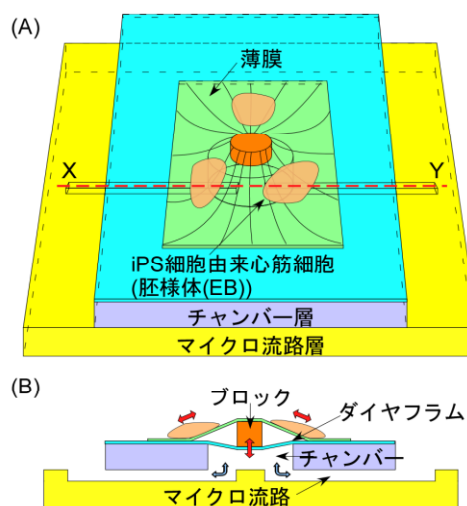


図2 iPS細胞によるポンプデザイン (A) 俯瞰図 (B) X-Yでの断面図

3 研究成果

【細胞接着条件の最適化】

デバイスデザインを**図2**に示す。細胞シートを使わないため、足場としてPDMSの薄膜(10 μm厚)を用い、この上にiPS細胞が心筋細胞に分化できる細胞様態である杯様体を接着させ、その動きで駆動させる。なお、胚様体は細胞の塊であるので目で見えるほど動きが大きく、流体を駆動するのに十分である。アクチュエータとしての性能を評価するため、逆止弁は装着していない。

これを実現するために、まず細胞の接着法を検討した。**図3**のように、PDMSの表面処理条件をA~Dの4種で変えて別の培養皿で培養を行い、EBを各皿に10個ずつ播種して1日後に接着個数を測定した。結果、未処理のものおよび胚様体細胞の接着に効果のあるゼラチンでコートしたのみのものは接着がみられなかったが、酸素プラズマ30分照射後ゼラチンコートしたものは通常の培養皿と同じく細胞が接着・進展している様子がみられ、100%の接着率となった。以上の実験より、表面処理の手法が最適化できたといえる。

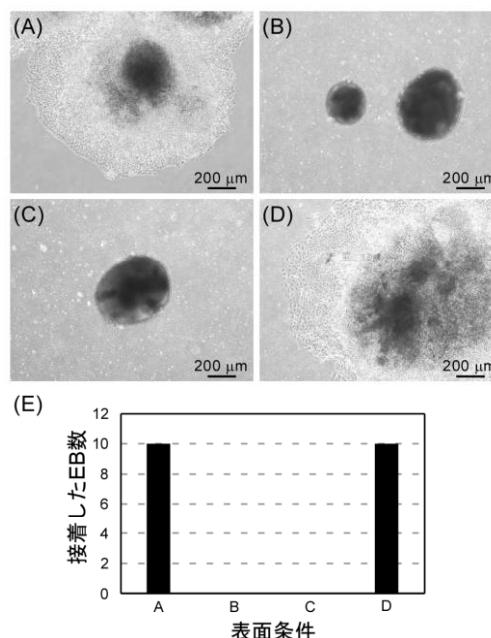


図3 iPS細胞の接着試験 (A) 培養皿 (B) 未処理 PDMS (C) ゼラチンコートしたPDMS (D) 酸素プラズマ処理後ゼラチンコートしたPDMS (E) 条件A~Dの細胞接着数比較

【デバイスの作製】

上記の条件をもとに、**図 4A** のような手順で実際のデバイスを作製・細胞培養を行った。マイクロチップは一般的な微細加工法であるフォトリソグラフィーで作製した鋳型に PDMS 原液を流し込んで固めてモールドィングする手法で作製した(**図 4A**)。 **図 4C** に示すように、テント状のスロープ上に細胞を接着させる必要があるため、細胞が接着前に転げ落ちることを防ぐため、直径 5 mm の穴 (プール) を開けた PDMS ウェルシートでデバイス中央部を囲った。ここに EB を 4 個/デバイスで播種したところ、およそ 3 個/デバイスで接着した。接着後、ウェルシートを除去し、心筋細胞に分化させるために Leukemia Inhibitory Factor (LIF) なしの培地で培養を続けた(**図 4D, E**)。播種 2 週間後、EB が拍動していることが確認された。また、心筋マーカである Anti-cardiac myosin heavy chain antibody および Anti-cardiac troponin I antibody を蛍光染色し、確かに心筋に分化していることを確認した(**図 4F-H**)。

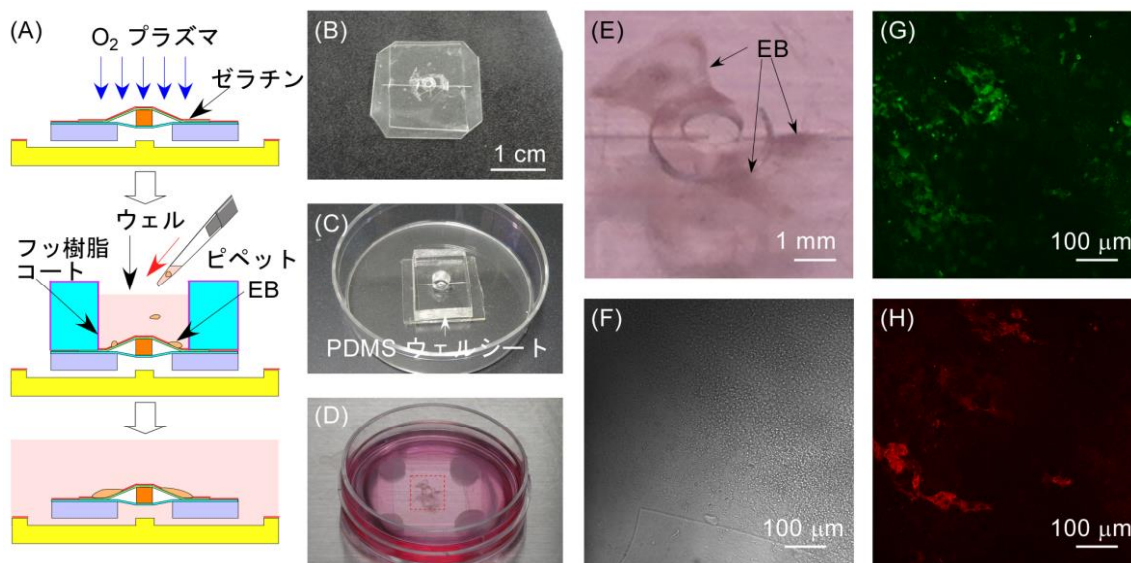


図 4 実験プロトコルとデバイス写真 (A) デバイスへの細胞接着法 (B) マイクロチップ写真 (C) PDMS ウェルシートを装着したチップ (D) 細胞播種・PDMS ウェルシート除去後のチップ写真 (E) 接着した EB の拡大写真 (F) EB の明視野画像 (G)(H) F の部位における心筋マーカ染色後の蛍光観察写真 (G: Anti-cardiac myosin heavy chain antibody, H: Anti-cardiac troponin I antibody)

【デバイスの動作実証】

作製したデバイスがポンプとして機能させることが可能かどうかを検証するため、流体可視化用ポリスチレン微粒子 (直径 1 μm) の懸濁液をマイクロ流路に流し込んで流体が iPS 細胞由来の心筋細胞の動きに同期して駆動するかどうかを観察する実験を行った(**図 5A**)。本実験では、再現性が得られるのかも同時に検証するため、同じデザインのデバイスを 10 個作製したが、そのうち 2 個で粒子の拍動がみられた (**図 5B** デバイス#1 と#2)。流路内のすべての粒子が同時に動いており、また実際の細胞の拍動数とも同期していたことから、これは流体の流れ、すなわち細胞の駆動によるものと考えられる。**図 5C** に粒子挙動の様子を示す。デバイス#1(赤)、#2(青)ともに拍動数約 0.5 Hz、最大変位は約 5 μm となり、逆流や抵抗のない理想的な逆止弁を装着した場合の理論流量は 6.9 nL/min と計算される。これは、ラット心臓から摘出したプライマリー心筋細胞を用いた場合の理論流量(Park *et al.*, *Lab Chip* 7, 1367-1370 (2007))とほぼ同じであり、iPS 細胞でプライマリー細胞を代替できることが証明された。

なお、本研究の成果は当分野において権威のある国際学術誌 *Sensors and Actuators B* に原著論文として採択され、すでに掲載されている(Tanaka and Fujita, *Sens. Actuators B, Chem.* 210, 267-272 (2015))。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の成果により、これまで難しかった心筋細胞デバイスが比較的簡単に作成できるようになり、生物・生体への応用が進み、バイオハイブリッド型埋め込み型デバイスの発展・展開につながると期待される。さらに、このような細胞駆動型のデバイスは一種の再構築組織ともみなせるため、再生医学の領域においては、マイクロ・ナノデバイス工学との融合分野である生体組織工学の発展にも貢献でき、心臓や血管など循環器系の体外での再構築と体内への埋め込みといったことが iPS 細胞を用いて可能となることが期待され、iPS 細胞そのものの研究の進展と平行して再生医療が大きく展開していく可能性を秘めた、医工連携の要となる研究である。

ヒト iPS 細胞の研究においては、その最初の発見(Takahashi and Yamanaka, *Cell* 126, 663-676 (2006))からこれまでの間、様々な細胞への分化が確認されており、心筋細胞への分化も報告されている(Zwi *et al.*, *Circulation* 120, 1513-1523 (2009))。現在、この分野の研究対象は、いかに高効率に iPS 細胞を生成するか、さらには、いかにがん化を抑えるかといった医学的課題に向いており、デバイスとしていかに活用するかという発想はこれまでになく、かつ直接的な再生医療や臨床応用といった純粋な医学応用に比べれば敷居が低いため、現状の技術をベースとしても十分に成果があがることが期待され、将来的には iPS 細胞分野の展開先のひとつとしての展望もみえてくる。

このように、本提案は、細胞デバイス工学と発生・再生医療分野の融合研究であり、医療デバイスを根本的に変える技術となり、このような異分野融合・技術集積により世界最先端医療研究拠点を目指している神戸ポートアイランド内医療クラスターを発展させるための模範的な研究課題となりえ、研究成果以上に産業・医療に対する波及効果を期待できる。

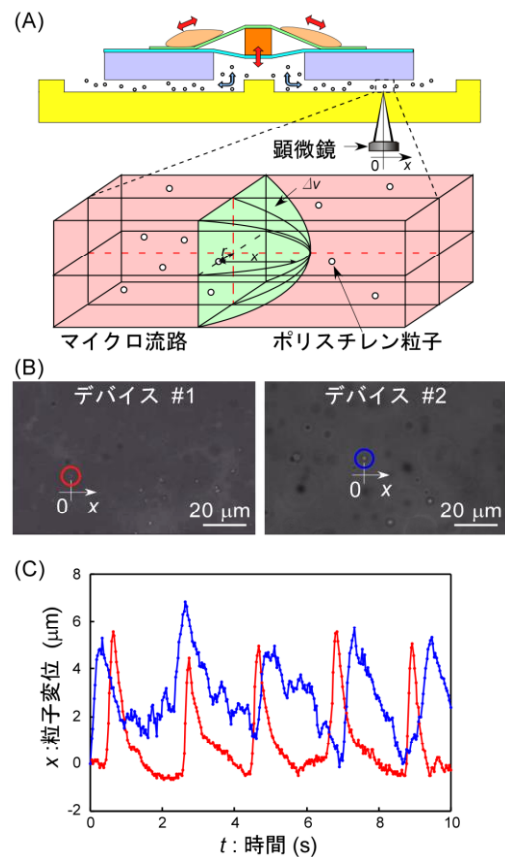


図5 デバイス動作実証実験 (A) 測定法とパラメータ (B) 流路内写真と観察粒子 (C) デバイス#1 と#2 の粒子変位