

【領域番号】 2305	【領域略称名】 バイオアセンブラ
-------------	------------------

【領域代表者（所属）】 新井健生（大阪大学・基礎工学研究科・教授）

【全体の進展状況】

最終目標である「体外で3次元組織を構築し機能発現の原理を解明する学理の創出」に対して、中間評価時までの期間前半では「計測特性制御、3次元細胞システム構築、及び機能解明の3つの項目間の連携を進展させ、それぞれの有望な方法論の確立」を目指した。この目標を達成するために、研究対象(2)に対応する計画研究を中心とした領域内での工学とバイオ/医学の分野連携を図り、細胞特性計測・分離、細胞システム組立、細胞システム観察と評価の新たな方法論を探索した。また、公募研究には計画研究を補完するものを中心に、その分野で目立つ超独創的、あるいは超チャレンジングな研究を推進させた。研究対象(3)に対応して若手研究者を中心に再生医療応用を視野に入れた領域内外の異分野との連携も進展させるとともに、製薬や化学、機械など他分野への波及成果も上げることにより研究対象(4)への対応を図った。なお、各研究対象の連携における位置付けは次の通りである。**研究対象(2)：主に領域内の工学、バイオ、医学系の連携。****研究対象(3)：広く領域外の工学、理学、医学系の連携。****研究対象(4)：主に産学連携を目指した共同研究。**

目標	H23年度～H25年度前半			H25年度後半～H27年度		
	領域内外の異分野・多様な研究者との連携による有望な方法論の確立			モデル細胞システム構築と検証によるバイオアセンブラ学理の確立		
達成状況 実施予定	対象(2)	対象(3)	対象(4)	軟組織モデルタスクフォース、硬組織モデルタスクフォースの設置による領域の集中化。各要素の高度化と併せてバイオアセンブラの体系化を図る。	<p>計測制御 軟モデル 硬モデル 機能解明 構築</p>	
	A01	5件 (6件)	1件 (12件)			7件 (8件)
	A02	4件 (11件)	5件 (12件)			2件 (4件)
A03	4件 (10件)	17件 (30件)	5件 (6件)			

(*数字は共同研究者が連名で発表した論文等の成果の件数を、また括弧内は同様の口頭発表の件数を示す。)

※以下の文中の【数字】は項目8. 研究成果の公表状況(18頁)における論文番号に対応する。

【A01班：細胞特性計測制御】

【研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進展しているのか】

A01班では、超高速マイクロ・ナノロボット技術を用いて細胞特性を計測し、3次元細胞システム形成に有用な活性細胞や希少細胞を超高速に分離することを目的としており、細胞を計測して分離する方法論を「細胞ソート工学」として体系化することを目指している。細胞の超高速計測技術としては、計画研究A01-01班の新井(史)Gと計画研究A01-02班の金子Gが浮遊細胞を対象として進めている。公募研究A01-P1班の岡嶋Gによる超高速AFMを用いた細胞レオロジー計測技術が加わり、接着細胞の細胞レオロジーの標準偏差(個性)を定量化できるようになり、多様な細胞ソースに対応できるめどがたった。

浮遊細胞を計測対象とする方式では、金子Gは数 μm から数十 μm の細胞の硬さを細胞ソータとの接続を意識し、1000個/秒で細胞の硬さが評価できる計測システムの構築を目指している。マイクロ流体チップ内の細い流路を赤血球が通過する際の通過時間を計測して評価することで、細胞内の粘性効果を排除し、硬さだけを評価する方式を提案した。マイクロ流体チップに関しては新井(史)Gとの共同研究成果である[4]。これまで、大きさ6 μm から8 μm オーダの赤血球を用いて最大400個/秒で硬さが評価できる計

測システムを構築し、実験的検証をおこなった。本システムの評価には計画研究 A01-03 班の中内 G が加わり共同研究を進めている。中内 G はこのシステムを用いて、マウス骨髄有核血球細胞は赤血球と異なり、その細胞種にかかわらず細胞径と通過時間に線形の相関がある結果を得た。一方、いくつかの腫瘍細胞株は細胞径、通過時間も正常有核血球細胞とは離れた分布を呈することが示唆され、効率のよい分離法の実現可能性を示した。

金子 G の方式は細胞の力学的特性の超高速計測が売りであり、細胞のパラメータ計測を目的としていない。一方、計画研究 A01-01 班の新井 (史) G は、単一細胞の力学的パラメータの連続計測を目的とし、マイクロ流体チップ内にマイクロロボットを組み込んだロボット統合型マイクロ流体チップ (磁気駆動方式) により、流路中を流れるウシ卵子の粘弾性パラメータを連続して計測することに成功した。また、計測速度の高速化を目指し、静電駆動方式によりロボットを高速駆動するシステムを構築した。今後、金子 G の超高速細胞計測システムのキャリブレーション技術として応用する。

金子 G、新井 (史) G のシステムでは超高速カメラを用いており、公募研究 A01-P2 班の石井 G の成果を適用できる。石井 G は、マイクロ流路内で変化する細胞位置・形状及び流れ分布の高速実時間計測を実現したフレームストラドリング型 PIV/PTV システムを実現した。これは細胞変形の実時間処理にも適用できる。

分離技術に関してはマイクロ流体チップ内で細胞特性を計測後に個別に分離する手法を新井 (史) G が進めている。公募研究 A01-P3 班の安川 G は、誘電泳動セルを用い、セル内の様々な位置に細胞パターンを作製できる技術を確立し、細胞群の中から目的抗原を発現した細胞を分離・回収できることを示した。安川 G の分離技術は組織構築における細胞特性の影響を調査する上で重要な役割を担う。

【研究の対象に照らしてどのような発展したか】

A01 班では、超高速マイクロ・ナノロボット技術を用いて細胞特性を計測・分離する研究が順調に進んでいる。独創的な方式が提案されており、細胞ソート工学の基盤技術が活発に研究されている。A01 は計画研究と公募研究がそれぞれのミッションを計画通りに進めており、適切に連携を促進し、班および領域の発展に貢献している。今後は iPS 細胞の力学的特性を測り、未分化状態と分化状態を比較するなど行う予定である。また、細胞計測、分離、組織構築をつなぎ、総合評価に向けて他の班とも連携して研究を進めていく。

研究対象 (2) : 積極的に連携し共同研究を推進することで、細胞ソート工学の基盤を築いている [3][6][7][9]。

研究対象 (3) : 領域外の研究者と連携することで、計測・構築・医療に向けた研究を進めている。新井 (史) G、益田 G は積層細胞の構築(大阪大学: 明石、松崎 G)、血管組織の構築(横浜市立大学 横山 G)を推進した。また、新井 (史) G はオンチップマイクロロボットを用いた単一細胞の刺激応答計測(理研 BSI 宮脇 G)[1]、ゲルアクチュエータ(富山工業技術センター 横山 G)[4]、細胞計測・分離チップ(理研 渡邊)に関する研究を推進した。安川 G はナノデバイスにバイオ機能を付加したバイオハイブリッドデバイスの開発(東北大学 西澤 G)、バイオ LSI の応用展開(東北大学 末永 G)、誘電泳動による細胞配列と細胞融合(三重大学 富田 G)、バレルスパッタにより金属被覆した微粒子の誘電泳動解析(富山大学 阿部 G)を進めている。

研究対象 (4) : 金子 G、新井 (史) G が受動的細胞挙動計測に関して、製薬会社と [4]、石井 G が高速ビジョンを用いた実時間マイクロ流れ分布計測に関して、高速度カメラメーカーと、安川 G が超高感度電気化学計測法の開発に関して、企業との共同研究へと発展している。

【A02 班: 3次元細胞システム構築】

【研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進展しているのか】

超高速マイクロ・ナノロボット、フルイディクス、MEMS 技術を用いて多様な 3次元細胞システムを組み立て構築する画期的な技術を提案・開発し、「3次元細胞システム設計論」を確立することを目的とする。

これまでに線状・面状・立体状成型を適用した 3 次元構築手法を提案し、多様性を持った構築法の実践評価を行った。その結果、高速高精度な 3 次元細胞システム構築に向けた要素技術・方法論の創出を体系的に達成した。

In vitro における組織構築実現のためには、細胞のアセンブリによる細胞パーツ、単位組織モデルの構築後、パーツのアセンブリを行う必要がある。細胞のアセンブリにおいて、関 G ではフルイディスクを用いた多様なゲルファイバ・スフェロイド・足場材料形成方法を提案、他班（新井(健)G、福田(敏)G、鈴木 G）に供給した[14]。既にファイバを並列化したシート形成や血管様の環状構造など単位組織モデルの形成にも成功している。竹内 G では細胞を微小なプレート（直径 50 μ m）上へ細胞ずつ自律的に播種する方法を提案し、本手法を発展させ、折り紙手法による 3 次元細胞パーツ形成・十字型プレートによる神経回路の形成を実現させた。

一方、細胞パーツのアセンブリにおいては、新井（健）G では細胞パーツの組み立てに必要な高速二本指マイクロハンド開発に取り組み、従来手法よりも 10 倍高速な 1 秒程度での細胞操作を達成した。特に二本指マイクロハンドを用いた 3 次元細胞パーツ組み立てを上記、関 G、竹内 G らと連携して行い、高速かつ多様な組み立てを可能とした。また、ロボット技術を導入した細胞ファイバ、環状スフェロイド、細胞シート形成が可能なシステム開発も行ない、細胞パーツアセンブリに貢献した。福田（敏）G では、関 G と共同でロボット技術によるハイドロゲルファイバの足場への自動集積技術を提案し、細胞を含んだファイバの環状足場への高速集積を実現した。また、光硬化性樹脂による細胞含有パーツ生成とフルイディスクを用いた自律的構造体の形成に成功し、環状構造の高速形成方法を提案した。

細胞パーツのアセンブリにより、大型の組織モデル構築を実現するには血管構造が必須となる。福田(淳)G では電気化学的細胞剥離法を用いることで、環状構造の足場中に細胞播種を行う手法を開発した。本手法によりモールディングによる血管構造形成に成功し、毛細血管が成長していることを確認した。これは大型の組織モデル形成の基礎となりうる成果である。吉川 G では細胞集団が自律的に分化し血管を含む構造体を形成できる条件を足場固さの制御という視点から見いだした。本条件を用いて固さを制御した足場でパターンを描くことにより、自在な形状の血管を含む 3 次元細胞システムが実現される。

評価モデル系としての 3 次元細胞システム構築という視点から、関 G では癌の浸潤評価モデルとしてのハイドロゲル細胞複合体を提案し、癌細胞浸潤の評価を行い、疾病評価系としての 3 次元細胞システムが利用可能であることを示した。また、福田（敏）G では、iPS 細胞分化の巨核球からの血小板産生デバイスを中内 G、新井史人 Gr らと共同で構築し、血管内構造を模したデバイスを用いることで、血小板産生過程の可視化に成功すると共に血小板産生量の増加を確認し、その有用性を実証した[17]。松井 G では癌の浸潤を妨げることを最終目的として癌の遊走制御を試みており、薬剤の効果から、癌の浸潤に関わる遺伝子を明らかにした。3 次元細胞システムを本実験系に取り入れることで、より詳細な結果を得られると期待される。

杉浦 G は新規光解離型架橋剤を合成し、これを用いた自在にパターンニングが可能な足場形成法を提案・実現した。本技術は 3 次元細胞システム形成における基礎技術であり、他班の研究を補完・加速する。

【研究の対象に照らしてどのような発展したか】

A02 班では、In vitro における組織構築を実現する「3 次元細胞システム設計論」の確立に向けて、細胞のアセンブリによる細胞パーツ・単位組織モデルの構築、細胞パーツのアセンブリ、それぞれの段階における要素技術の開発、方法論の創出を各班の連携のもと着実に推し進めている。今後はさらに連携を進め、体系化した方法論を組み合わせ、融合することにより、3 次元細胞システム構築を軟組織、硬組織において実証する。

研究対象(2) : マイクロスケールの計測制御による組立は福田(敏)G[18]、微細操作ベースの成型は新井(健)G[14-15]、またフルイディクスベースは関 G[21]、MEMS ベースは竹内 G が担当し、ここに公募班を加えて積極的に連携し、「3次元細胞システム設計論」の確立に向けて共同研究を推進している。

研究対象(3) : 新井(健) G は細胞間相互作用を再現した創薬支援ツールと評価法の開発(大阪大学 境 G)、福田(敏)G は毛細血管の腎臓血管モデルとしての応用展開(名古屋大学 丸山 G)、関 G は微細加工技術を利用した細胞模倣リポソームの作製(東京大学 豊田 G)に関して共同研究を行っている。竹内 G は寄生虫の侵入に関する一細胞観察(慈恵医大 嘉糠 G)、粘菌細胞の相互作用(東京大学 澤井 G)、リニアモーターの一分子観察(東京大学 矢島 G)に関する共同研究を進めている。公募班においても多数の領域外共同研究が推進されている(吉川 G : 海外を中心に 4 件)、(杉浦 G : 1 件)、(福田(淳) : 2 件)。領域内研究を基盤として領域外の研究者と連携することで、計測・構築・医療に向けた研究を飛躍させた。

研究対象(4) : 関 G がフルイディクスを利用した細胞分離の研究に関して、化学メーカーと共同研究へと発展している。

【A03 班 : 3次元細胞システム機能解明】

【研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進んでいるのか】

A03 班では、新規組織構築技術を用いて作製された肝臓、骨等の複雑化組織の機能評価をおこない、複数種の細胞からなる組織が示す高度な機能発現の分子機構を解明することを目的としている。生体の組織、臓器は複数種かつ数多くの細胞がお互いに作用しあうことで生体組織、臓器の機能が発現、維持されている。生体の組織、臓器の高度な機能を模倣するためには、単にその構造を模倣するだけでは限界があると考えている。1細胞やオリゴ細胞群さらには細胞集団レベルで個々の細胞機能がどのように協調しあい、機能を発現するメカニズムを明らかにする『細胞社会学』とでも呼ぶべき新学問の創成を目指している。

A03 班大和 G では、これまでに、精密マイクロコンタクトプリンティングシステムやマスクレス露光装置の応用により、肝臓の規則的構造を模倣したパターン化温度応答性細胞培養表面の作製と評価を行った。また、マイクロ流路デバイスを活用し細胞シート工学によって作製した3次元組織構体に血管網を付与する技術開発にも成功した。A03 班やまと鈴木 G では、骨再生に理想的な細胞足場である octacalcium phosphate (OCP) を駆使し、OCP によって誘発される骨芽細胞の活性化と破骨細胞への分化機構に関して研究を行い、OCP が骨組織細胞の分化調節に有効であることを示した。また、ゼラチンやコラーゲンと OCP の複合化により、骨再生が促進されることも確認している。他班と連携しながら高酸素透過性を有する細胞培養開発や細胞-基材間の相互作用評価用デバイス開発にも着手し、細胞培養から3次元組織化への効果的なデバイスおよび手法を確立しつつある。

【研究の対象に照らしてどのような発展したか】

生体様組織構造体を模倣、作製する技術は確立しつつある。一方、公募班が中心行っている作製組織体の新たな評価方法も実験データが蓄積されてきた。これらの研究は **proof of concept** のステップから始まった研究が多く、本領域内外の研究連携も加わり、従来の手法では評価が困難であった3次元細胞システムの構造特性、機能特性を捉えることが可能となりつつある。また、他班が作製した3次元細胞システムの評価、解析を準備するべく、領域外研究機関との共同で次世代シーケンサによる遺伝子の網羅解析にも着手した。

公募班との連携により当初の計画以上の進展と大きな成果を上げることができた。たとえば公募班の武部 G は、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝実質細胞とヒト血管内皮細胞、ヒト間葉系幹細胞を最適化した共培養条件に供することにより *in vitro* で作製した肝原基をマウスに移植することで宿主血管系に接続する毛細血管網を有するミニ肝臓を再生させることに成功している(Nature、in press)。その評価を目的として、独自のライブイメージング技術の開発にも成功した。班間の共同研究も順調に進んでおり [33]、そ

れぞれがもちよった技術のシナジー効果が出ていると認識している。

公募班の参加および他研究者との共同研究により、細胞社会としての組織、臓器の重要な構成要素である複数種の細胞、細胞-細胞間接着、細胞外マトリックス、細胞・組織機能の力学的制御、バイオインフォマティクスを駆使した網羅的遺伝子発現解析等の研究手法の確立に大きな進展を見せた。

研究対象(2)：「細胞社会学」の環境構築のための連携として A01 班 金子 G、A02 班 新井(健) G、関 G、竹内 G らと連携し、作製した組織構造体の機能、構造特性や評価について共同で研究を行った[21]。また、「細胞社会学」のメカニズム解明に向けた連携として A03 武部 G と連携し、血管新生を通じた組織、臓器の機能維持、再生について議論を行った。

研究対象(3)：阪大 西田 G、慈恵医大 小島 G、長崎大 江口 G、カロリンスカ・インスティテュートと連携し、ヒト由来細胞から作製した細胞シートの角膜、中耳、食道組織再生のヒト臨床応用を国内外で展開、推進している。

研究対象(4)：大和 G は金子 G と組み、企業と共同で細胞シート移植デバイスの製品化を検討している[7]。大和 G はオリンパス株式会社と生体アフィニティを利用した培養皿開発を共同で実施している。また、武部 G が軟骨の 3 次元自動培養に関する共同研究に関して、企業との開発へと発展している。