

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 新規組織再構成技術の開発と次世代バイオセンサーの創製

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

岡野 光夫 ((学)東京女子医科大学先端生命医科学研究所 教授・所長)

主たる共同研究者

春山 哲也 ((国)九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授)

谷口 彰良 ((独)物質材料研究機構細胞工学技術グループ グループ長)

尾笹 一成 ((独)理化学研究所 前田バイオ工学研究室 前任研究員)

3. 研究内容及び成果:

3-1. 研究課題全体

「新規組織再構成」と「次世代バイオセンサー」という2つのテーマからなる研究であり、更に再構成された細胞をバイオセンサーに応用しようというものであった。新規組織再構成技術においては、既に開発されていたナノメートルの厚みで制御された高分子固定化技術を深化させ、肝一内皮細胞の共培養を可能とし、且つ細胞シートとして回収できる培養皿の作製に成功している。この技術により、最終目的としている細胞間の情報伝達計測への道を拓いた。

バイオセンサー技術としては、従来技術にはなかった人工酵素を用いたバイオセンサーの開発に成功し、生体への影響の質を測定する「定質」バイオセンサーという新しい分析コンセプトを提起している。また、遺伝子組換え技術により新しいセンサー細胞を作製するとともに、従来の細胞毒性の測定方法より10倍程度高感度で測定時間も短縮できる毒性センサーを開発し、塩化カドミウムの毒性測定に応用して成果をあげている。

3-2. グループ毎

1) ナノドメイン材料および新規組織再構成技術の開発(岡野グループ)

岡野グループで既に開発されていた電子線重合によるナノメートルサイズの厚さに制御された高分子固定化技術を基盤とし、シラン化ガラス表面に PIPAAm(ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド))を固定化したものが、5nm 以下の場合には細胞接着性であるのに対し、その厚さを超えると細胞非接着性となることを見出した。この細胞接着から非接着に変わる PIPAAmの厚さは、ポリスチレンに固定化した場合に 20nm であり、これを大幅に下回るものであった。このような温度応答性表面の機能制御により、皮膚、心筋、角膜、膀胱、食道、肺、血管、肝臓などの組織・器官を対象とした新規組織再生技術の開発に成功している。また、ガラス基板上で培養した細胞シートの顕微鏡下での温度応答状況の観察にも成功している。さらにその応用として、キャピラリーカラムの内壁をリビングラジカル重合により PIPAAm で修飾すると、温度により分離特性が大幅に変化することも明らかにしている。

細胞単体ではなく、組織中でのみ観察される高度な細胞機能の発現には、組織中で共存する複数種の細胞の環境を再現する必要があるとの考えから、複数種の細胞を任意の位置に配置させるマイクロパターン化表面の開発を行い、肝細胞(HC)と血管内皮細胞(EC)の共培養により細胞シートを作成して、新しい組織構築展開への可能性を示した。単体から複数個になるに従って高度化し

ていくと思われる細胞間コミュニケーションの観測には、任意の数の細胞が培養できるマイクロパターンの作成が必要である。高度な設備を必要とするフォトリソグラフィーに代わって、多様なデザインにも対応可能なマイクロパターン作製手法として、液晶プロジェクタを改造したマスクレス光重合装置の開発に成功し、マイクロ流路中での細胞の挙動などの観測を行っている。最終的な目標はオンチップで機能制御した細胞の培養から刺激応答の高感度検出までを行うこととしており、そのための基礎技術が整いつつある。

また、温度応答性高分子鎖に細胞接着性ペプチドを分子配向や分子配列を制御して固定化する技術を開発し、無血清で細胞シートを培養する技術の開発を進めており、これが完成すると牛胎児血清を使うことによって発生する異種感染を完全に回避出来る重要な技術になってくるものと思われる。

## 2) 非侵襲性細胞応答検出技術の開発(春山グループ)

従来のバイオセンサーは、分子認識部位にタンパク質である酵素や抗体を用いているため、分子特異性があり測定対象や測定環境に限界がある。その限界を取り払うものとして、物質の機能(生体への影響や質)や構造の共通性を測定する「定質」という考え方を提唱している。その為にバイオセンサーの「分子認識」部位に換わるものとして「物質の共通構造認識」を目的とする人工酵素膜を、金属イオンとそれに配位する高分子および機能性官能基を有する高分子から構成し、これに電極を組み合わせることによって、リン酸エステルの高感度検出に成功している。このセンサーでは、生体エネルギー分子であるATP,ADP,AMP や GTP,CTP,TTP等の生体情報分子の他、2リン酸からテトラリン酸までも高感度に検出することが出来、今後の発展に期待したい。その他、シナプスモデルやFET/酵素センサーなどで成果をあげている。

## 3) 細胞を用いた毒性試験法の開発(谷口グループ)

細胞をインテリジェント材料として利用し、遺伝子の発現変化をリアルタイムに解析出来るセンサー細胞の創製を目的として研究を行った。ヒトHSP70B' 遺伝子プロモーターをストレス応答配列として利用し、これをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだプラスミドを培養細胞に導入することによって、毒性センサー細胞を作製し、塩化カドミウムの毒性の測定に成功している。加えて、ストレス応答配列をタンデムに並べることによって高感度化にも成功した。

作製したプラスミドをNIH3T3細胞に導入し、センサー細胞の株化にも成功するという優れた成果を上げている。このセンサー細胞は、塩化カドミウム添加後およそ12時間で蛍光強度が最大に達する。これによれば、従来の細胞毒性試験の約半分の時間で測定が可能になる。また、検出濃度限界が約 1/4に下げられることも判明しており、今後さらなる展開が可能になってきた。

## 4) 半導体表面の細胞インターフェイス化(尾笹グループ)

このグループは、培養細胞の半導体への適用という他のグループとは異なった角度から、このプロジェクトに参加している。このグループの担当は、半導体表面に細胞を培養し細胞インターフェイス化しようとする試みで、半導体としてAlGaAs/GaAs 系の2次元電子ガスFET(2DEG-FET)のゲート表面にTiO<sub>2</sub>薄膜を付けることで細胞を培養しながら計測が可能であることを見出した。この応用はまだ今後の課題であるが、細胞計測の分野で大きく貢献する可能性があり、さらに検討を進めることを期待したい。

## 4. 事後評価結果

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文	口頭	講演	その他	特許出願
----	----	----	-----	------

(原著)		(ポスター)				(著作など)			
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
68	6	117	231	59	139	17	79	1	3

論文、口頭発表共に国内外で精力的に行われているが、細胞培養に関する岡野グループの発表が中心であり、他のグループの発表がやや少ない印象がある。研究体制や進展の経過から考えて、ある意味で当然かも知れない。細胞シートについては、直接医療に結びつけやすいことから、新聞での紹介や招待講演も多く、この領域の存在を広く知らしめることに貢献したチームの一つである。

特許の取得にはあまり努力が払われなかったように見えるが、細胞培養が中心である「岡野グループ」が先行せざるを得なかったことがその原因の一つであろう。また、基本的な特許は既に出願済みでもあった。センサー関係では、もう少し積極的な特許出願が欲しかった。

「再生医工学」の分野において、岡野グループの技術は最先端を行くものであるが、異種の細胞を任意の数で接着させ、ナドメインとして培養する技術が完成したことによって、細胞間の情報伝達を観測する基本条件が整ったことになった。その後のセンサーの開発に弾みがついている。センサー開発ではユニークなシステムを構築し、「定質」概念の提案や塩化カドミウムの毒性検出などで、それらが有用であることを示しているが、十分にデータを蓄積するところまでは進んでおらず、今後の成果に期待するところも大である。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

「再生医工学」の分野では、多くの種類の細胞の培養に成功しており、細胞シートの角膜への移植などの臨床面での成果も得られている。また、企業化も進められているところである。臨床面での成果は当領域の成果ではないが、基礎の部分で貢献出来たと思われる。各種細胞の培養に使用出来る細胞シート作製技術は、各種細胞の実用的な利用の路を大きく広げるものであり、科学技術への貢献は大きい。

細胞や組織のナドメイン化については十分な成果が得られており、細胞を任意のサイズ、形にドメイン化する技術を完成した。さらに2種類の細胞を共培養することやマイクロ流路内で培養することなどにも成功している。これらの技術は、医薬のスクリーニングや安全性評価に利用出来る可能性が高く、この分野での今後の展開に大きく貢献するものと思われる。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本チームは、岡野チームが中心となって、発足以来月1回のミーティングを開催し、情報の共有化を図った。このため、チームの連携は優れており方向性のぶれも無かったうえに、迅速に他グループの成果を取り入れて、研究を進展させることができたようである。

人材の育成面では、助教授1名が教授に就任、博士研究員2名が大学助手、学生1名が助手、1名がポスドク、1名が米国のポスドクを経て助手に採用されている。

このチームの受賞には、以下に示すようなものがある。

- 岡野 光夫:江崎玲於奈賞(2005.12.17)茨城県科学技術振興財団  
「バイオナノインターフェイス設計によるマイクロパターン化細胞シート工学の創生」
- 津田 行子:大鵬賞(2005.12.17)つくば生体材料若手研究会  
「縮小投影型液晶プロジェクタによるマイクロパターン化培養表面の作製」
- その他:高木賞など、若手の受賞がある。