

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656187

研究課題名（和文） 非侵襲的なオンデマンド培養細胞脱離技術の構築

研究課題名（英文） On-demand and non-invasive cell detachment technology

研究代表者

福田 淳二（FUKUDA JUNJI）

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：80431675

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、顕微鏡観察下で任意の単一細胞を非侵襲的に脱離させる技術を確認することであった。そのために、透明な電極（ITO 電極）上に接着した細胞を、短時間で電気化学的に脱離させる手法を確認した。次に、この電極をマイクロアレイ化し、顕微鏡下で位置特異的に電圧を印加できるシステムを構築し、シングル細胞の解像度で細胞を順次脱離できることを示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to develop a technology for detaching specific cells being observed under a microscopy with single-cell resolution. We first demonstrated that cells on a transparent electrode (ITO electrode) can be rapidly detached by using an electrochemical reaction. We subsequently fabricated a microarray of the electrode so that an electrical potential can be separately applied to the electrodes. This electrode system can be used to detach individual cells one by one.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	2,400,000	0	2,400,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	240,000	3,440,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：医用化学工学、動物細胞培養、自己組織化単分子膜、透明電極、バイオ関連機器、細胞チップ、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞などの万能細胞の樹立に伴い、再生医療という新しい医療技術が注目されている。しかし、万能細胞は万能であるがゆえに様々な細胞が誘導される。つまり、細胞源として用いるためには、分化誘導プロセスにおいて、不要な細胞を培養系から除去し、特定の臓器細胞のみを得る技術が必要で

ある。そこで、顕微鏡観察下で特定した細胞を直接回収することができれば、幅広い分野で応用可能な強力なツールとなりうると考えられる。現状ではレーザーやUVを用いて任意の1細胞を回収する技術が検討され、様々な工夫がされている。しかし、光による細胞への障害性が避けられないことが根本的な問題となっていた。研究代表者らは、電

電気化学的細胞脱離法(Fig. 1)を用いて金基板上からの組織回収を行ってきたが、金基板を用いた方法では顕微鏡による細胞観察が困難であるといった問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、以上の背景を踏まえ、透明電極を用いることによる、位置選択的な細胞回収技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

電気的な細胞脱離と細胞の生存への影響

スパッタリングにより透明電極である ITO 薄膜を形成した。そして、その基板を 10-carboxy-1-decanethiol 溶液に一晩浸漬することで自己組織化単分子膜 (SAM) を形成した。次にカルボジイミド法により SAM のカルボキシル基末端に細胞接着性ペプチド RGD を結合した。ここへ線維芽細胞 (3T3 fibroblast) を接着させ、参照極に銀/塩化銀電極、対極を白金板として ITO 基板に -1.0 V (vs. Ag/AgCl) を一定時間印加した後、接着細胞数をカウントすることで細胞脱離挙動の定量的評価をおこなった。また、細胞を完全に脱離させた後、回収した細胞を再び 24 時間培養し、細胞の生存率を評価した。

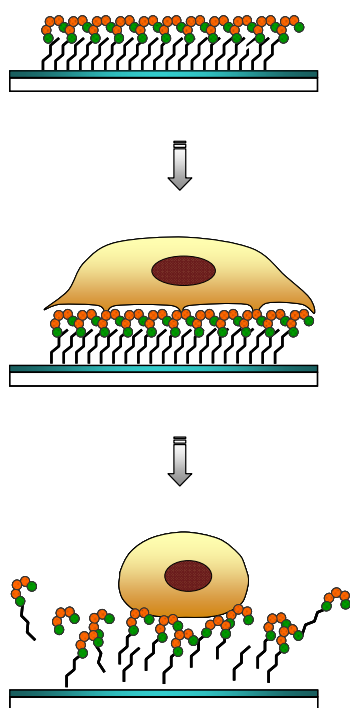


Fig. 1 電気化学的な細胞脱離

脱離過程における細胞形態変化の評価

SAM を修飾した ITO 基板上に細胞を播種し、 -1.0 V の電位を印加した。このとき、細

胞のアクチン線維と核を蛍光染色しておくことで、電位印加による形態変化の様子を共焦点蛍光顕微鏡によって蛍光観察した。また比較として、電位を印加しない場合と比較した。

位置選択的な細胞回収

位置選択的な細胞回収を実現するために、エッチングによって電極アレイを形成した ITO 基板上に SAM を修飾した。続いて線維芽細胞を播種し、24 時間培養後、上述した三電極系を用いて個々のアレイ電極へ -1.0 V の電位を 5 分間印加した。これを順次繰り返すことで、位置選択的な細胞回収が可能かどうか評価した。

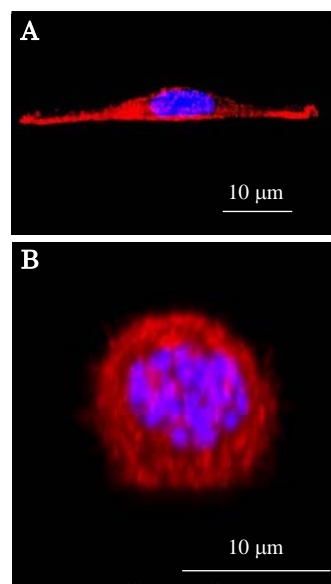


Fig. 2 電位印加による細胞形態変化

(A) 電位印加前、(B) 電位印加後

4. 研究成果

細胞脱離とその細胞への影響

線維芽細胞を接着させた SAM 修飾 ITO 基板に -1.0 V (vs. Ag/AgCl) を印加したところ、1 分以内に半数以上の細胞が脱離し、5 分後にはほぼ 100% の細胞が脱離した。これに対し、電位を印加していない場合や SAM を修飾していない基板では、細胞はほとんど脱離しなかった。また、電位印加により完全に脱離させた細胞を再培養したところ、細胞の接着、伸展、増殖が観察され、通常の培養ディッシュを用いてトリプシン処理する場合と比較して大きな違いはみられなかった。これにより、電位印加による細胞の生存状態や増殖能への悪影響は大きくないことが示された。

脱離過程における細胞形態変化 (Fig. 2)

線維芽細胞を SAM 修飾 ITO 基板に播種し、電位を印加した場合とそうでない場合の細胞の形態変化を比較した。電位印加前には伸

展していた細胞が電位印加後には細胞と基板との接着部位が外れ、収縮していく様子が観察された。このことから、細胞は SAM を介して基板に接着しており、電位印加による SAM の脱離に伴い、その接着部位が外れ、基板上から脱離することが示された。

位置選択的細胞回収 (Fig. 3)

任意のアレイ電極に電位を印加したところ、位置特異的に細胞を回収することに成功した。また、複数のパターンに電位を印加することで連続的な細胞回収を行うことが可能であった。

本研究により、ITO 表面に修飾した SAM を介して細胞を接着させ、顕微鏡観察下で任意の電極に電位を印加することで特定の細胞を回収可能であることが示された。

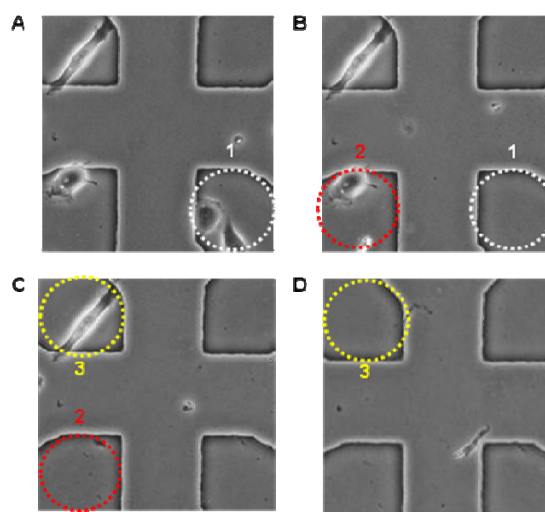


Fig. 3 位置選択的な細胞脱離

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件) すべて査読あり

1. N. Mochizuki, T. Kakegawa, T. Osaki, N. Sadr, N.N. Kachouie, H. Suzuki, J. Fukuda, Tissue Engineering Based on Electrochemical Desorption of an RGD-Containing Oligopeptide, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (IF=3.53), (2012) Doi: 10.1002/term.519
2. S. Kimura, J. Fukuda, A. Tajima, and H. Suzuki, On-chip diagnosis of subclinical mastitis in cows by electrochemical measurement of neutrophil activity in milk, *Lab on a Chip* (IF=6.26), 12 (7), pp. 1309-15 (2012) DOI: 10.1039/C2LC20952G

3. C.H. Kwon, I. Wheeldon, N.N. Kachouie, S.H. Lee, H. Bae, S. Sant, J. Fukuda, J.W. Kang, and A. Khademhosseini, Drug-eluting microarrays for cell-based screening of chemical-induced apoptosis, *Analytical Chemistry* (IF=5.87), 83 (11), pp. 4118-25 (2011) DOI: 10.1021/ac200267t
4. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, Spatio-temporal detachment of single cells using microarrayed transparent electrodes, *Biomaterials* (IF=7.88), 32(28), pp. 6663-9 (2011) DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.068
5. N. Sadr, M. Zhu, T. Osaki, T. Kakegawa, Y. Yang, M. Moretti, J. Fukuda, A. Khademhosseini, SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures, *Biomaterials* (IF=7.88), 32(30), pp. 7479-90 (2011) DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.034
6. F. Yanagawa, H. Kaji, Y.H. Jang, H. Bae, D. Yanan, J. Fukuda, H. Qi, A. Khademhosseini, Directed assembly of cell-laden microgels for building porous three-dimensional tissue constructs, *Journal of Biomedical Materials Research A* (IF=3.04), 97A (1), pp. 93-102 (2011) DOI: 10.1002/jbm.a.33034
7. J. Fukuda, and K. Nakazawa, Hepatocyte spheroid arrays inside microwells connected with microchannels, *Biomicrofluidics* (IF=3.90), 5, 022205 (2011) DOI: 10.1063/1.3576905
8. N. Kachouie, Y. Du, H. Bae, M. Khabiry, A. F. Ahari, B. Zamanian, J. Fukuda, and A. Khademhosseini, Directed assembly of cell-Laden hydrogels for engineering functional tissues, *Organogenesis*, 6(4), pp. 234-44 (2010) DOI: 10.4161/org.6.4.12650

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 福田淳二、掛川貴弘、望月直人、大崎達哉、鈴木博章、両性イオンペプチド分子層の還元脱離を利用した細胞組織の構築、電気化学会第 79 回大会、2012.3.29, アクトシティ浜松 (浜松市)
2. T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Surface Engineering for Rapid Cell Detachment by Using Electrochemical Desorption of a Zwitterionic Oligopeptide Layer, MRS Fall Meeting & Exhibit 2011, 2011.12.1, Boston, USA
3. 望月直人、大崎達哉、掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、電気化学的な細胞脱離技術を用いたティッシュエンジニアリン

- グ, 第 49 回日本人工臓器学会大会, 2011.11.26, 都市センターホテル (東京都)
4. 望月直人、鈴木博章、福田淳二, 電気化学的な細胞脱離を利用した細胞シート回収技術, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011.11.2, 京都府民総合交流プラザ (京都府)
 5. 福田淳二、望月直人、掛川貴弘、鈴木博章, 自己組織化単分子膜の電気化学還元脱離を用いた細胞脱離技術, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011.11.2, 京都府民総合交流プラザ (京都府)
 6. T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell Detachment along with Electrical Cleavage of a Zwitterionic Oligopeptide Layer, Biofabrication 2011, 2011.10.8, 富山国際会議場 (富山市)
 7. S. Kimura, J. Fukuda, A. Tajima, H. Suzuki, Microfluidic system for mastitic diagnosis based on superoxide secretion activity of neutrophils, Biofabrication 2011, 2011.10.8, 富山国際会議場 (富山市)
 8. 榎本詢子、藤田聡史、長崎玲子、鈴木博章、福田淳二, 細胞遊走試験のためのトランスフェクションアレイチップ, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011.9.28, 東京農工大学 (府中市)
 9. 福田淳二, 微細加工技術を利用した細胞培養チップ, 第 63 回日本生物工学会大会 (招待講演), 2011.9.28, 東京農工大学 (府中市)
 10. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, On-demand Detachment of Single Cells Using Microarrayed ITO Electrodes, Asian Biomaterials Congress, 2011.9.17, Busan, Korea
 11. 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二, 光架橋性ハイドロゲルを用いた血管網構築の試み, 化学工学会第 43 回秋季大会, 2011.9.14, 名古屋工業大学 (名古屋市)
 12. T. Osaki, T. Kakegawa, H. Suzuki & J. Fukuda, Electrical Detachment of cells for Engineering Capillary-Like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel, International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2011.9.1, Boston, USA
 13. J. Fukuda, Y. Kameoka, H. Suzuki, Electrical Detachment of cells for Engineering Capillary-Like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel, TERMIS-AP 2011, 2011.8.4, Singapore, Singapore
 14. T. Osaki, T. Kakegawa, N. Sadr, A. Khademhosseini, H. Suzuki & J. Fukuda, Spatio-Temporal Cell Detachment from Culture Surface Using Microarrayed Transparent Electrodes, TERMIS-AP 2011, 2011.8.4, Singapore, Singapore.
 15. 福田淳二、掛川貴弘、望月直人、大崎達哉、鈴木博章, 自己組織化単分子膜の還元脱離を利用した細胞組織体の構築, 電気化学会第 78 回大会, 2011.3.31, 横浜国立大学
 16. 福田淳二、大崎達哉、掛川貴弘、望月直人、鈴木博章, 電気化学細胞脱離を利用した血管様構築の作製技術, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011. 3.2, 京王プラザホテル(新宿)
 17. 福田淳二, 電気化学細胞脱離を利用したティッシュエンジニアリング, 日本動物実験代替法学会 第 23 回大会, 2011, 3.2, 北里大学
 18. N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Fabrication of Thick Cell Sheet via Electrochemical Reactions on Porous Membrane Culture Substrate, 2010 MRS Fall meeting, 2010.11.29, Boston, USA.
 19. 望月直人、鈴木博章、福田淳二, 電気化学的原理に基づく細胞シート回収技術, 第 62 回日本生物工学会, 2010.10.29, 宮崎シーガイア
 20. N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Fabrication of Thick Cell Sheet via Electrochemical Reactions on Porous Membrane Culture Substrate, TERMIS-AP 2010, 2010.9.17, Sydney, Australia.
 21. T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell Detachment Along with Electrical Cleavage of a Zwitterionic Oligopeptide Layer, TERMIS-AP 2010, 2010.9.17, Sydney, Australia.
 22. 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二, 自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞接着制御, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010.9.8, 同志社大学
 23. 亀岡典哲、鈴木博章、福田淳二, ITO 電極を用いた電気化学的原理に基づく細胞脱離, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010.9.8, 同志社大学

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Cell culture method and device
 発明者 : J Fukuda, H Suzuki, N Mochizuki, T Kakegawa
 権利者 : University of Tsukuba
 種類 : PCT 出願
 番号 : PCT/JP2011/070533
 出願年月日 : 2011.8.9
 国内外の別 : 外国

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~szk_fkd_lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 淳二 (FUKUDA JUNJI)
筑波大学・数理物質系・講師
研究者番号：80431675

(2) 研究分担者

鈴木 博章 (SUZUKI HIROAKI)
筑波大学・数理物質系・教授
研究者番号：20282337