



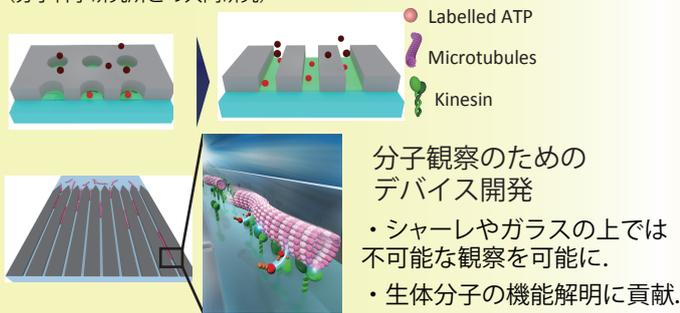
研究概要

研究室 HP へ

マイクロ・ナノ加工技術を分子から細胞スケールの生体材料と融合した**バイオメカニクス**および**再生医療研究**を展開しています。生体分子の機能解明のための生物物理学的な基礎研究から、各種臓器細胞を培養する微小流体デバイスの開発まで、マイクロ・ナノ加工技術の貢献する幅広い研究を対象としています。具体的には、①キネシン-微小管系モータータンパク質を利用した**ナノシステム**製作、および②オンチップ血管網と**ヒトiPS細胞**を利用した**Organ-on-a-Chip (臓器モデルチップ)**の創成と利用です。

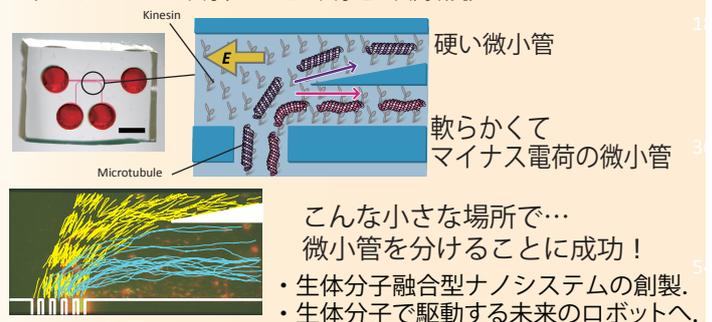


ZMWを用いた1分子計測
(分子科学研究所との共同研究)



電界中での微小管運動方向制御

(マサチューセッツ大学, ミシガン大学との共同研究)



微細加工技術を利用して
分子1つの運動を見る

生体分子の機能を使ったナノマシン

生体分子を
見る

生体分子を
使う

オンチップ
ナノバイオ
システム

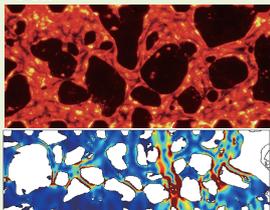
血管網を
作る

血管網を
つなぐ

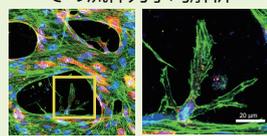
血管網ができる機構を解明する

Organ on a Chip (生体機能チップ)
体の中の組織を体の外で再現する

血管網のメカノバイオロジー

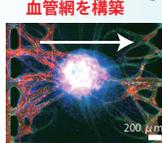
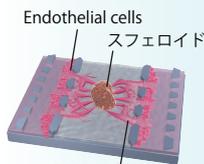
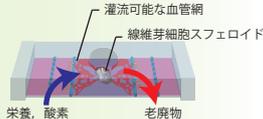


チップ内に作った血管網とその流体力学的解析



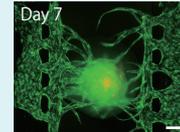
オンチップ血管新生

(九州大学, 熊本大学との共同研究)



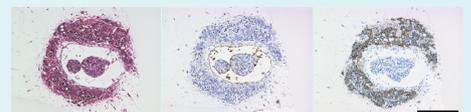
腎臓、脳組織のOrgan-on-a-Chip

(理化学研究所, iPS細胞研究所との共同研究)



がん組織への血管導入と薬剤評価

(薬学研究科との共同研究)



がん組織内に導入した血管網

マイクロデバイス内で血管ネットワークができた
・まだわかっていない血管機能の解明につながる。

スフェロイドに対して血管網を接続した
・疾患モデルとして、診断や創薬技術の開発に応用できる。

LZMW を用いた 1 分子計測

1 分子蛍光観察法:
生体分子の特性を個別分子のレベルで検討可能

見え方のイメージ 励起体積 濃度
~1 nM
~10 nM

落射蛍光
全反射蛍光法 (TIRFM)

ゼロモードウェイブガイド (ZMWs) μM オーダーの蛍光分子が使用できる。

● 標識 ATP ● キネシン・微小管系の観察に適した Linear-shaped ZMWs (LZMWs) を作製

電子線描画を用いたスリットの加工

A Glass 100 nm B Aluminum LZMW

幅・高さが 100 nm 程度のスリットを安定して作成

LZMWs 内における電場分布の計算

励起光分布 蛍光の伝播

キネシンを固定したスリット内で標識ATPを蛍光観察

ナノスリット キネシン

連続画像撮影条件
Alexa Fluor 647 標識ATP: 500 nM
通常ATP: 5 μM

500 nM の標識ATPを1分子観察できることを確認
全反射顕微鏡法の10倍の濃度を使用可能

ATP とキネシンの同時 1 分子観察
赤: 標識 ATP, 緑: GFP 融合キネシン

Time trace of ATP signal at pointed area

開発した LZMW を用いて、生体内に近い条件で ATP とキネシンの相互作用を 1 分子観察できた。

電界中での微小管の運動方向制御

生体内 (in vivo) **生体外 (in vitro)**

細胞核 微小管
細胞内物質 ATP ADP
キネシン 微小管
プラス端 マイナス端

ガラス基板 微小管 キネシン
運ばたい分子 (バイオマーカーなど) マイナス端
プラス端 カバーガラス

キネシンを固定した基板の上で微小管を動かす。

キネシンによって駆動される「分子シャトル」を構築。

目的: 微小管分離システムの構築
微小管の運動方向制御 (Bottom-up) + マイクロ流路の設計 (Top-down)

PDMS デバイス | 微小管固定, 整理, 分離流路

流路高さ: 10 μm 5 mm 幅 固定流路 50 mm

微小管固定 整理 分離

電場 E

硬い微小管 分離効率 ~85%
柔らかくてマイナス電荷の微小管

Y-position, mm X-position, mm

微小管の特性制御とデバイス設計によって、2 種類の微小管の高效率な分離を実現した。

オンチップ血管新生

生体内

- 血管新生は組織修復や病態形成に関与する。
- 剪断応力が血管新生に影響を与える。

血管内皮細胞 血流 剪断応力 新生血管

自己組織化法 血管内皮細胞

目的: 自己組織化によって形成した 3D 血管網を用いて、より生体内に近い環境で血管新生とせん断応力の評価を行う。

灌流システム **血管網構築**

シリンジポンプ 培地入れ 微小流体デバイス 3D 血管網

ピラー間距離 (p): 100 μm
チャンネル幅 (w): 700 μm
チャンネル高さ: 100 μm

● HUVEC ● EGM-2 ● Vasculature
● hLF ● Fibrin-Collagen gel

Day 0 Day 2 Day 6

血管網の経時変化 赤: GFP-HUVEC

0h 24h 300 μm

先端細胞の確認
青: Nucleus, 緑: F-actin

シミュレーションによる流体力学的解析

流速 圧力 せん断応力

せん断応力と血管新生の関係

- 特定のせん断応力で血管新生を観察。
- 生体内で血管新生が促進されるせん断応力の値と一致。

灌流可能なオンチップ 3D 血管モデルでせん断応力と血管新生の関係を評価できた。

がん組織への血管導入と薬剤評価

生体内

Theranostics, 4, p.81, 2014.

腫瘍

がん腫瘍

- 血管新生を誘発
- 血管を介して栄養の獲得や転位をおこなう
- 薬剤は血管を介して作用

目的: 還流可能な血管網を有するがん腫瘍モデルを構築する。

Mechanical pressure 腫瘍血管

デバイスデザイン

細胞播種前
培養液 Fibrin-collagen
スフェロイド 導入
HUVECs スフェロイド 導入
Angiogenic sprouts
培養 (7 ~ 14 days)

灰: マイクロチャネル部 (polydimethylsiloxane (PDMS) 製)
デバイスは通常のソフトリソグラフィーで作製, 底面はカバーガラス or PDMS 膜

灌流可能な血管網 線維芽細胞スフェロイド

栄養, 酸素 老廃物

HE 染色 (細胞質) CD31 染色 (血管)
緑: 血管網
赤: ビーズ
E-cadherin 染色

薬剤評価に使用可能な、血管を有するがん腫瘍モデルを作成できた。