

公益財団法人 立松財団 御中
様式 2021A1,A2,B

2021 年 8 月 2 日

所属:豊橋技術科学大学

氏名:永井 萌土



2019 年度 助成 終了 報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	均質な細胞加工を行うための超並列単一細胞核内デリバリ技術の開発
研究の結果	<p>機能の失われた生体組織への再生医療や細胞治療の実用化が期待されている。これらの実現のためには、分化した細胞に対して初期化の加工(遺伝子導入)により、iPS細胞を作製する。最も進んでいる臨床応用では、理研が加齢黄斑変性症の患者への移植用に10^4個の網膜細胞からなるシートを加工培養している。その後の生体内移植では、目的外の細胞を10細胞以下のレベルに減らす高い安全性が求められる。その結果、1人の治療には10ヶ月と数千万円の費用を要するため、現在のままでは、普及が難しい。原因は、加工初期段階の細胞の品質が低いことにある。特に皮膚細胞からiPS細胞の作製時に、細胞核内へ導入する遺伝子量がばらつき、不均質な細胞加工になることが課題であった。</p> <p>これまでの課題は、作製したシリコンデバイス上に細胞を培養すると、衝撃波と気泡の発生箇所(開口)とが無関係に細胞が接着する点にあった。そこで細胞膜と核膜の穿孔を確実にするため、細胞接着の制限を利用して、細胞核を選択的に開口上へ配置する。</p> <p>そこでハイドロゲル(バイオレジスト)のパターニングにて、細胞の接着領域を制限して、ゲルのない部分に細胞核を配置した。この技術を利用し、細胞を開口上へμmレベルの精度で配置できた。</p> <p>光穿孔のために、光を吸収して衝撃波を発生させるためのSU-8とPR-254色素顔料を複合した直径数十μmのパターンを形成した。パターンを有した基板に対し、ヒト子宮頸がん細胞を培養し、基板上に接着させた。その後、5nsのパルス光を照射し、細胞を光で穿孔した。続けて拡散により蛍光色素と数kbpの蛍光タンパク質遺伝子を導入して、導入効率を評価した。1日以上培養して遺伝子を発現させ、蛍光顕微鏡観察にて、導入量に影響を与える因子を調査した。特にSU-8/PR-254パターンと細胞との距離が、細胞内デリバリの成否に影響を与えていることが分かった。</p> <p>今後はバイオレジストとSU-8/PR-254パターンを複合して、さらに均質な細胞内デリバリ技術へと進展させる。バイオレジストとSU-8/PR-254パターンの複合形成には成功しているが、歩留まりが30%であり、その歩留まりも向上させる。</p>
研究発表 (実績)	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Moeto NAGAI*</u>, Ryoga KOHARA, Tuhin Subhra SANTRA, Takayuki SHIBATA, "Electrolysis of selectively patterned Vorticella with pneumatic microchambers and electrodes," Mechanical Engineering Journal, Vol. 8(1) 20-00254, (2021) 査読有 2. L. Mohan, Srabani Kar, Ren-Hattori, Miho Ishii-Teshima, Parthasarathi Bera, Sounak Roy, Tuhin Subhra Santra, Takayuki Shibata, <u>Moeto Nagai*</u>, "Can Titanium oxide Nanotubes Facilitate Intracellular Delivery by Laser-Assisted Photoporation?" Applied Surface Science Vol. 543 pp. 148815 - 148815, (2021) 査読有 3. Mohan L., Srabani Kar, Nandhini B., Sathish Sundar Dhillip Kumar, <u>Moeto Nagai</u>, Tuhin Subhra Santra*, "Formation of nanostructures on magnesium alloy by anodization for potential biomedical applications" Materials Today Communications, Vol. 25 101403 – 101403, (2020) 査読有 4. Pallavi Shinde, Srabani Kar, Mohan Loganathan, Hwan-You Chang, Fan-Gang Tseng, <u>Moeto Nagai</u>, Tuhin Subhra Santra*, "Infrared Pulse Laser-Activated Highly Efficient Intracellular Delivery Using Titanium Microdish Device" ACS Biomaterials Science & Engineering Vol. 6(10) 5645 - 5652, (2020) 査読有 5. <u>Moeto Nagai*</u>, Keita Kato, Satoshi Soga, Tuhin Subhra Santra, Takayuki Shibata, "Scalable Parallel Manipulation of Single Cells Using Micronozzle Array Integrated with Bidirectional Electrokinetic Pumps," Micromachines, Vol. 11(4) 442, (2020). 査読有 6. <u>Moeto Nagai*</u>, Kohei Tanizaki, Takayuki Shibata, "Batch Assembly of SU-8 Movable Components in Channel Under Mild Conditions for Dynamic Microsystems: Application to Biohybrid Systems,"

- | | |
|----|---|
| | IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems, Vol. 28, (3), pp. 419-428 (2019). 査読有 |
| 7. | <u>Moeto Nagai*</u> , Takahiro Hirano, Takayuki Shibata, "Phototactic Algae-Driven Unidirectional Transport of Submillimeter-sized Cargo in a Microchannel," Micromachines, Vol. 10 (2) p. 130 (2019). 査読有 |
| 8. | <u>Moeto Nagai*</u> , Tokuma Miyamoto, Takeshi Hizawa, Takayuki Shibata, "Scalable Hollow Nanoneedle Array Using Stepper Lithography for Parallel Intracellular Delivery," Precision Engineering, Vol. 55, pp. 439-446, (2019). 査読有 |

提出期限：研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。
年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。