

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13911

研究課題名(和文) ヒトiPS由来の細胞の分離・精製する直行型マイクロ流体システムの開発

研究課題名(英文) On Chip Purification of hiPSC-derived Cells Using a Fishnet-like Microfluidics

研究代表者

劉 莉 (Liu, Li)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：50380093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト幹細胞由来の細胞製品を用いた再生医療技術において、残存する未分化細胞や目的以外の細胞の混在等の問題が存在し、それらの細胞を除去せず移植へ用いると、腫瘍の形成や、目的細胞の機能低下の恐れがある。しかし、現在、細胞分離法として、細胞への光学的・機械的ダメージが課題である。本課題は、マイクロ流路における細胞へのダメージを世界に先駆けてヒトiPS細胞由来の細胞に対して明らかにし、ヒトiPS由来細胞の機械的特性は他種類の細胞と異なることを考慮したデバイスの内部構造の最適化を実現し、細胞にダメージを与えない非侵襲的かつ高効率に細胞を選別・精製・回収可能な分離原理を考案する。

研究成果の概要(英文)：Human induced pluripotent stem cells (hiPSC) can be differentiated at high efficiency into cells of a targeting type but the resulted cell population has to be of high purity to avoid teratomas for clinical therapies. Herein we report a microfluidic device with integrated and surface functionalised fishnet-like structures for specific cell capture. With the help of a flow derivation surface pattern, cells in solution are forced to cross the fishnet-like structure, resulting in high efficiency and selective retention of a chosen cell population. A suspension of hiPSCs spiked in culture medium or hiPSC derived cardiomyocytes (CMs) containing medium was used for devices function validation. We found a hiPSC capture rate as high as 80% and a remarkable increase of the CM population rate in the recovered suspension without affecting the cell viability.

研究分野：幹細胞、組織工学

キーワード：幹細胞 マイクロ加工 ナノファイバー 組織 細胞純化

1. 研究開始当初の背景

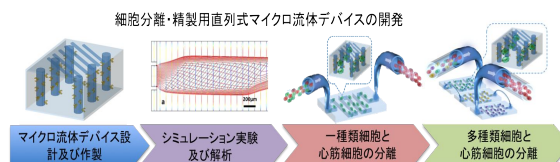
ヒト幹細胞由来の細胞製品を用いた再生医療技術において、残存する未分化細胞や目的以外の細胞の混在等の問題が存在し、それらの細胞を除去せず移植へ用いると、腫瘍の形成や、目的細胞の機能低下の恐れがある。しかし、現在、細胞分離法として、フローサイトメトリーが広く利用されているが、高速流体内で細胞にレーザーを当てることから、細胞への光学的・機械的ダメージが課題である。また、近年マイクロ流体デバイスを用いた細胞処理が多く提案されているが、細胞へのダメージに関しては明らかになっておらず、細胞を研究する研究者からはマイクロデバイスに対する疑問もある。簡易型細胞にダメージせず目的細胞を純化する新規デバイスの開発が迫っている。

2. 研究の目的

本研究課題は、マイクロ流路における細胞へのダメージを世界に先駆けてヒト iPS 細胞由来の細胞に対して明らかにし、その知見を元に流体中の細胞挙動を解析する連成解析を用い、ヒト iPS 由来細胞の機械的特性は他種類の細胞と異なることを考慮したデバイスの内部構造の最適化を実現し、細胞にダメージを与えない非侵襲的かつ高効率に細胞を選別・精製・回収可能な分離原理を考案する。

3. 研究の方法

マイクロ流路内構造における細胞へのダメージを明らかにし、その知見を元に、細胞・流体連成解析理論の構築と構造最適化理論を構築する。そして、ヒト iPS 由来の実細胞（他種類細胞とは異なる機械的特性を有する）の解析を元に、ダメージの無い内部構造を検討する。具体的にヒト iPS 細胞由来の心筋細胞に未分化細胞や線維芽細胞などを混合して、4 種類の細胞集団の分離を実現する (Fig.1)。



4. 研究成果

(1) マイクロ流路内構造における細胞へのダメージを明らかにするとともに細胞と流体の連成解析ソフトウェアを用いて、デバイス中の細胞軌跡のシミュレーションを行い、流体デバイスの内部構造をダメージが無く、実際のヒト iPS 細胞由来の目的細胞と混在する細胞を回収・分離できるように最適化する。具体的に流体デバイスの長さ、幅、高さなどの検討；ピラーのサイズ、ピラーのスペースなどの検討；メッシュ構造の検討；一方通行モードと循環モードの比較をした。その結果、各種細胞に適合デバイスの作製条件を見出した (Fig.2)。

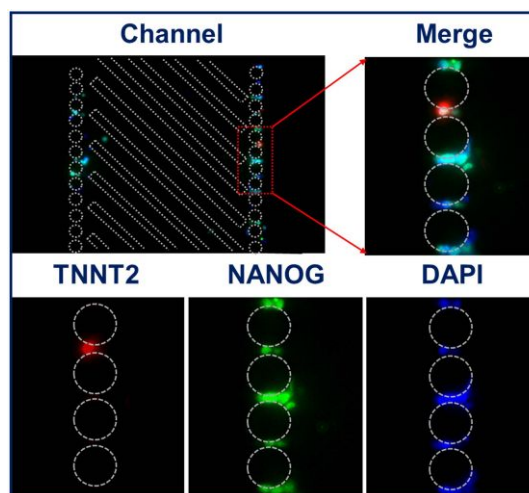


Fig.2 流体デバイスの中にドラップされた細胞 (緑：hiPS 細胞；赤：心筋細胞)

(2)最適化条件で作製したデバイスを用いて、実際に未分化細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などを用いて、それぞれ個別にヒト iPS 由来心筋細胞と混在し、分離実験を実行した。トラップと回収率の測定及び効率向上させる方法を最適化した (Fig.3)。

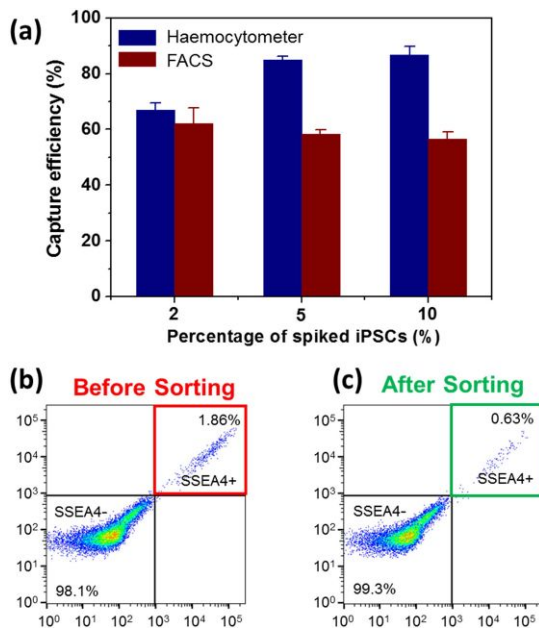


Fig.3 回収された目的細胞の回収率

(3) さらに、ダメージに弱いヒト iPS 由来の実細胞の解析を元に、ダメージの無い内部構造を検討した結果、高い生存率が示されていた。最適化条件で作製したデバイスの安定性と再現性を確認して、デバイスの改善を行った。今後この新規細胞単離装置への実用化を期待している(Fig.4)。

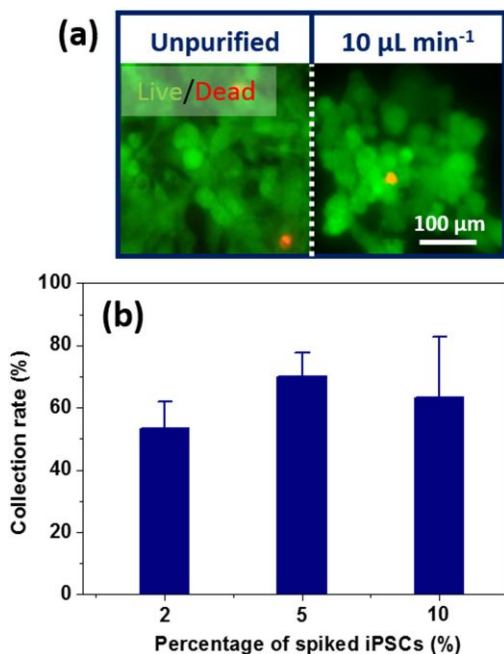


Fig. 4 回収され心筋細胞の生存率

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3件)

- 1) Y. Tang, L. Liu, et al., Effective Monitor Neuron Differentiation of hiPSCs on a Patch Made of Crosslinked Monolayer Gelatin Nanofibers, **J. Materials Chem. B**, 2016,
- 2) X. Li, L. Yu, J. Li, I. Minami, M. Nakajima, Y. Noda, H. Kotera, L. Liu*, Y. Chen*, On Chip Purification of hiPSC-derived Cardiomyocytes Using a Fishnet-like Microstructure, **Biofabrication**, 2016, 8, 035017-035026,
- 3) J. Li, F. Zhang, L. Yu, N. Fujimoto, M. Yoshioka, X. Li, J. Shi, H. Kotera, L. Liu*, Y. Chen*, Culture Substrate Made of Elastomeric Micro-tripod Arrays for Long-term Expansion of Human Pluripotent Stem Cells, **J. Materials Chem. B**, 2017, 5, 236-244.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

劉 莉 (LIU Li)

大阪大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究者番号：50380093

(2)研究分担者

南 一成 (MINAMI Itsunari)

大阪大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究者番号：40362537

(3)連携研究者

小寺 秀俊 (KOTERA Hidetoshi)

京都大学工学研究科 教授 (当時)

研究者番号：20252471