

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21493

研究課題名(和文)遠心流路を用いた細胞への過重力負荷と力学刺激負荷細胞培養システムへの応用

研究課題名(英文)Cell growth in hypergravity using centrifugal microfluidic device and its application to cell culture systems

研究代表者

殿村 渉 (Tonomura, Wataru)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：50581493

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)：細胞に対して過重力の負荷を与えることができるマイクロ遠心流路の開発に取り組み、力学的な外部刺激に対する単一細胞や培養細胞組織の受容応答(メカノセンサ)評価系の構築を目指した。過重力環境下のマイクロ遠心流路を流れる微粒子挙動の定性的な解析、過重力環境下のマイクロ遠心流路を流れる微粒子挙動の定量的な解析、シリコン樹脂(PDMS)を用いたソフトリソグラフィ技術もしくはシクロオレフィンポリマー(COP)製フィルムを用いたナノインプリント技術により試作したマイクロ遠心流路による細胞(ブタ血液の血球)への過重力負荷およびその応答(変形能)評価を実施した。

研究成果の概要(英文)：Centrifugal microfluidic devices were developed in order to observe single-cell growth in environment of hypergravity. Qualitative analysis of microparticle behavior inside centrifugal microfluidic channels in environment of hypergravity, quantitative analysis of microparticle behavior inside centrifugal microfluidic channels in environment of hypergravity, and evaluation of deformability of single cell (blood cell) in centrifugal microfluidic channels, which was fabricated by soft lithography technique using silicon rubber or nanoimprint technique using COP film, were observed.

研究分野：機械工学

キーワード：マイクロ・ナノ流体デバイス メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

外部からの力学的刺激を感知する「メカノセンサ(力覚)」を有する「細胞」は、周囲の化学的な環境のみでなく力学的な環境にも依存し、自らの振る舞い(分化・成長・運動等)を決定することが明らかになってきている(Discher D.E. et al., *Science*, 310: 1139, 2005)。メカノセンサ機構を細胞レベルにおいて明らかにする研究は、細胞へ力学刺激を負荷する細胞培養システムの開発とともに精力的に行われている。例えば、シリコン膜製チャンバに播種した細胞に対して水平方向に伸展刺激を負荷する細胞培養システムにより、マウス骨芽細胞の細胞内カルシウムイオンが急激に上昇することを明らかにしている(Danciu T.E. et al., *FEBS Lett.*, 536: 193, 2003)。また、陰圧による薄膜変形を利用して骨芽細胞に伸展刺激を負荷すると、細胞分化が促進されることも報告されている(Koike M. et al., *J. Bone. Miner. Metab.*, 23: 219, 2005)。近年、肺や腸といった器官の機能を再現した「Organ-on-a-Chip」と呼ばれる細胞培養システムが注目されているが、メカノセンサ機構を系統的に理解するためには、複雑で動的な細胞周囲の微小環境を生体外で再現し、生化学的な応答現象を同時に評価しうるマイクロ流体デバイスの開発が必要となってくるだろう。

そのような中、過重力環境または宇宙環境に近い微小重力環境において細胞培養を可能とする装置も製品として存在しているが、異なる重力環境下で細胞培養を行うと、細胞の形態形成や機能発現にどのような影響を与えるのか明らかにすることを目的とした研究事例も報告されている。例えば、過重力環境下で細胞培養を行うことで、細胞の増殖、遺伝子発現、分化、骨格再構成などが評価されてきている(Tavakolinejad A. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464: 473, 2015)。しかしながら、力学的な刺激に対する受容応答(メカノセンサ)機構は解明されていない未知の部分が多く、複雑で動的な細胞周囲の微小環境を生体外で再現し、生化学的な応答現象を同時に評価できるマイクロ流体デバイスの開発が求められるだろう。

以上のような研究背景を踏まえ、本研究では、単一細胞や培養細胞組織への力学的な刺激に対する受容応答(メカノセンサ)機構を評価するため、細胞に対して過重力の負荷を与え、その生化学的な受容応答を同時に評価するマイクロ遠心流路を基本構造とした力学刺激負荷細胞培養システムの開発を目指す。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、生体外での培養細胞組織の構築および単一細胞・細胞ネットワー

クの定量解析を目指す細胞機能計測用マイクロデバイスの研究を推進してきた経緯を踏まえ、細胞に対して過重力の負荷を与えると同時にその生化学的な受容応答を評価することを可能とする遠心流路を基本構造としたマイクロ流体デバイスの開発に取り組む。マイクロ流体制御による細胞操作・培養・機能評価(*Biomedical Microdevices*, 17, 2015, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119: 212, 2015)において培ってきたマイクロ流路の流体解析や製作、細胞を扱った評価実験等を活かし、研究期間内において、細胞に対して所望の過重力負荷を与える遠心流路の最適設計指針を明らかにすることを最初に目指す。その後、最適設計した遠心流路を基本構造とするマイクロ流体デバイス内で細胞周囲の微小環境を再現することで、単一細胞や培養細胞組織への力学的な刺激に対する受容応答(メカノセンサ)機構を生化学的に明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

細胞に対して過重力の負荷を与え、その生化学的な受容応答を同時に評価するマイクロ遠心流路を基本構造とした力学刺激負荷細胞培養システムの開発を目指す。

(1) 過重力環境下におけるマイクロ遠心流路内の粒子(細胞)の定性的な解析について取り組む。過重力の環境下においてマイクロ遠心流路内の粒子(細胞)にどのような力が働いているのか(遠心力・コリオリ力等)を質点系のニュートン力学から定性的に明らかにする。複数の流路デザイン(一定の曲率半径を有する遠心流路、異なる曲率半径を組み合わせた遠心流路、流路断面形状を変化させた遠心流路)について定性的な解析を行い、所望の過重力負荷を粒子(細胞)に与える遠心流路の最適設計指針を示す。

(2) 過重力環境下におけるマイクロ遠心流路内の挙動の定量的な解析について取り組む。(1)で明らかにした定性的なニュートン力学の成果を踏まえ、流体解析ソフト(COMSOL)を用いた数値流体力学(CFD)解析により、定量的に明らかにする。複数の流路デザイン(一定の曲率半径を有する遠心流路、異なる曲率半径を組み合わせた遠心流路、流路断面形状を変化させた遠心流路)について定量的な解析を行い、所望の過重力負荷を粒子(細胞)に与える遠心流路の最適設計指針を示す。

(3) 最適設計したマイクロ遠心流路によるメカノセンサ細胞への過重力負荷およびその受容応答評価について取り組む。最適設計した各種マイクロ遠心流路(一定の曲率半径を有する遠心流路、異なる曲率半径を組み合わせた遠心流路、流路断面形状を変化させた

遠心流路)について、半導体微細加工技術を基盤とするマイクロマシニング技術(レーザー描画、フォトリソグラフィ、ドライエッチング、モールドイング、ナノインプリント等)を用いて試作する。試作した各種マイクロ遠心流路を用いて、メカノセンサ細胞(例:骨芽細胞、破骨細胞)への所望の過重力負荷とその生化学的な受容応答評価(例:カルシウムイオン変化量)を実施する。

(4) 最適設計したマイクロ遠心流路を基本構造とする力学刺激負荷細胞培養システムによる培養細胞組織への過重力負荷およびその受容応答評価について取り組む。最適設計したマイクロ遠心流路(一定の曲率半径を有する遠心流路、異なる曲率半径を組み合わせた遠心流路、流路断面形状を変化させた遠心流路)を基本構造とする力学刺激負荷細胞培養システムをマイクロマシニング技術を用いて製作し、培養細胞組織(例:骨組織)への所望の過重力負荷およびその生化学的な受容応答評価を実施する。骨を作る細胞(骨芽細胞)と骨を壊す細胞(破骨細胞)の働きが制御されることで、骨組織は形成と破壊を繰り返している(リモデリング)。骨リモデリングのメカニズムは明らかにされていない部分が多いため、力学刺激に対する受容応答機構を同時に評価できる系を構築する。

4. 研究成果

候補となる複数のマイクロ遠心流路設計に対し、マイクロ遠心流路内を流れている単一微粒子にどのような力が作用するのかについて質点系のニュートン力学および数値流体力学解析により定性的および定量的に評価した。シリコン樹脂を用いたソフトリソグラフィ技術により試作した各種マイクロ遠心流路内に、細胞の大きさを想定した直径6マイクロメートルのカルボキシ基表面修飾ポリスチレン微粒子溶液を流体圧力制御機器により送液し、その微粒子挙動を高速度カメラで観測した。その結果、目標とする微粒子への過重力負荷値まで到達できなかった。

初年度までに得られた成果を踏まえ、引き続き、本研究の主要課題である力学的な刺激に対する細胞の受容応答(メカノセンサ)機構を評価するマイクロ遠心流路を基本構造とした評価系の開発を目指した。当初の次年度計画である、最適設計したマイクロ遠心流路を基本構造とする力学刺激負荷細胞培養システムによる、培養細胞組織(例:骨組織)への所望の過重力負荷およびその生化学的な受容応答評価の実現に向けて推進したが、単一細胞をターゲットとした評価系の構築を優先的に進めた。これまでに検証を進めた複数のマイクロ遠心流路設計(曲率半径一定、異なる曲率半径の組み合わせ、流路断面形状

変化)に対し、マイクロ遠心流路の再設計・再評価および所望の過重力環境が得られない場合は界面動電現象を用いた流体ポンプの導入も含めて検証を進め、細胞への過重力負荷評価を推進することとした。

以上の経過を踏まえ、細胞に対して過重力の負荷を与えることができるマイクロ遠心流路の開発に取り組み、力学的な外部刺激に対する単一細胞や培養細胞組織の受容応答(メカノセンサ)評価系の構築を目指した。具体的には、過重力環境下のマイクロ遠心流路を流れる微粒子挙動の定性的な解析、過重力環境下のマイクロ遠心流路を流れる微粒子挙動の定量的な解析、最適設計したマイクロ遠心流路を用いた細胞(ブタ血液の血球)への過重力負荷およびその応答(変形能)評価を実施した。

マイクロ遠心流路の候補として、複数の微小遠心流路設計(曲率半径一定、異なる曲率半径の組み合わせ、流路断面形状変化)に対し、マイクロ遠心流路内を流れている単一微粒子にどのような力が作用するのかについて質点系のニュートン力学および COMSOL を用いた数値流体力学解析により定性的および定量的に評価した。シリコン樹脂を用いたソフトリソグラフィ技術もしくはシクロオレフィンポリマー(COP)製フィルムを用いたナノインプリント技術により試作した各種マイクロ遠心流路内に、細胞の大きさを想定した直径6マイクロメートルのカルボキシ基表面修飾ポリスチレン微粒子溶液を流体圧力制御機器により送液し、その微粒子挙動を高速度カメラで観測・評価した。また、ブタ血液の血球(細胞)を各種マイクロ遠心流路内に導入し、所望の過重力負荷における血球変形能について観測・評価した(図1)。力学的な外部刺激に対する単一細胞や培養細胞組織の受容応答(メカノセンサ)評価系への応用を可能にする成果と考えられる。

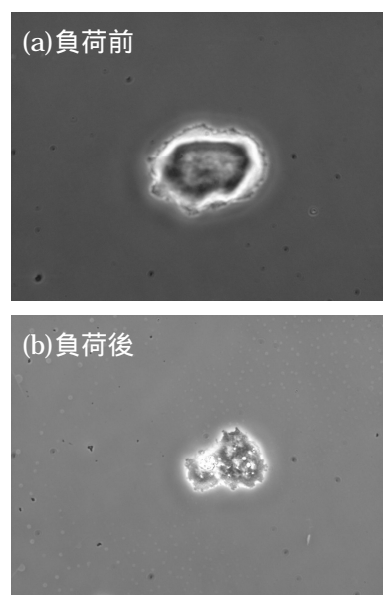


図1 過重力負荷における血球変形能

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Wataru Tonomura, Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, Akihide Arima, Masateru Taniguchi, Tomoji Kawai, "Dual-height fluidic-channel-integrated micropore sensor for high-throughput single-particle detections", The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2017), pp.663-664, Savannah International Trade & Convention Center, Savannah, Georgia, USA, October 22-26, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

<http://www.bionano.sanken.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

殿村 涉 (TONOMURA Wataru)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：50581493