

機関番号：17104

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300161

研究課題名（和文） 神経幹細胞の分化誘導のための微量薬剤放出制御デバイスの構築

研究課題名（英文） Development of Chemical Release Controlling Devices
for Differentiation Induction of Neural Stem Cells

研究代表者

安田 隆 (YASUDA TAKASHI)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：80270883

研究成果の概要（和文）： 神経幹細胞の分化誘導を目指した薬剤放出制御技術を構築した。まず、培養チャンバ底面に微小孔アレイとマイクロバルブを4個形成し、バルブを開閉制御することで微小孔からの薬剤放出を制御した。次に、チャンバ直下のマイクロ流路中にシースフローを形成し、その流量制御により微小孔からの薬剤放出を制御した。さらに、64個のチャンバを8×8のマトリクス状にアレイ化し、チャンバ1列毎に別々のマイクロ流路を配置し、複数の薬剤の放出が可能なデバイスを構築した。

研究成果の概要（英文）： Techniques of chemical release control for differentiation induction of neural stem cells were developed. First, four nanohole arrays and microvalves were fabricated at the bottom of a cell-culturing chamber, and chemical release from the nanoholes was controlled by switching open/close of the microvalves. Next, a sheathflow was generated in a microchannel under a chamber, and chemical release from microholes was controlled by regulating flow rates of three fluids which form the sheathflow. Moreover, in order to permit multiple chemicals to be released on a single device, 64 chambers were arranged in an 8 x 8 matrix, and each of 8 microchannels was located directly under a row of chambers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：バイオ MEMS

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：マイクロ流体デバイス、マイクロ流路、微小孔、マイクロバルブ、
神経幹細胞、細胞刺激、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞を用いた中枢神経の再生医療は、疾病や外傷などで損傷した中枢神経組織を修復・再生する技術として注目されている。

現在までに、生体外で培養・増殖した神経幹細胞やそれを分化させて得られた神経系細胞を移植することで、中枢神経系の機能再生に成功した基礎研究成果が数多く報告されている。このような細胞移植治療において神

経幹細胞を所望の神経系細胞へと分化誘導する技術の確立は極めて重要であるが、いくつかの分化誘導経路が報告されてはいるものの、その詳細なメカニズムは明らかにされておらず、分化誘導の確実性や再現性も低い。

一般に、分化誘導因子の細胞分化への影響を評価するには、因子が均一に溶解した培養液中で多数の細胞に対して均等に因子を作用させる方法が採られる。しかし、個々の神経幹細胞には性質や状態に違いがあり、また単一の細胞の構造や機能にも極性が存在し、さらに分化後の神経細胞やグリア細胞は複雑で不均質なネットワークを形成しながらダイナミックにその形態や結合を変化させる。分化誘導技術の確立を目指すには、これらのことを考慮して、多数の細胞を均質な集団として扱うのではなく、個々の細胞やそのネットワークに対して局所的に因子を作用させ、それらの分化を制御することが可能な実験手法とそのためツールの構築が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、半導体加工を中心としたMEMS技術を駆使して、培養細胞に対して局所的な薬剤放出を可能とし、培養チャンバの2次元平面上において所望の薬剤濃度分布を形成し得るマイクロ流体デバイスを構築して、これを神経幹細胞の分化誘導技術へ応用することである。

具体的には、デバイスの培養チャンバの底面に薬剤放出用の微小孔を多数構築し、その直下に形成したマイクロ流路より微小孔を通じて培養チャンバへ薬剤放出を行う。その際に、マイクロ流路内の流体制御により、培養面内での薬剤放出制御と神経幹細胞及び分化後の細胞への化学的刺激制御を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養チャンバ直下に複数の微小孔アレイとマイクロバルブをアレイ化し、複数の独立した薬剤放出サイトを有するマイクロ流体デバイスを構築する(図1)。マイクロバルブは、親水性と疎水性の表面張力の違いを利用するものであり、外部圧力により開閉する。図2にマイクロバルブの動作原理を示す。初期状態において、液体は疎水面ではじかれて2つに分かれ、それぞれ親水面に留まっている。これがバルブが閉じた状態である。ここで、液体入口から圧力を加えると、入口側の液体が疎水面に浸入して他方の液体と結合する。これがバルブが開いた状態である(図2(a))。再びバルブを閉じるには、空気入口

から圧力を加え、疎水面に空気を流入させ、液体を2つに分ける(図2(b))。

本研究では、このデバイスを製作するプロセスを確立するとともに、複数のマイクロバルブを個別に開閉するために、外部圧力の印加条件を導出する。また、マイクロバルブの開閉により蛍光色素を微小孔から培養チャンバ内に拡散放出させ、デバイスの性能評価を行う。

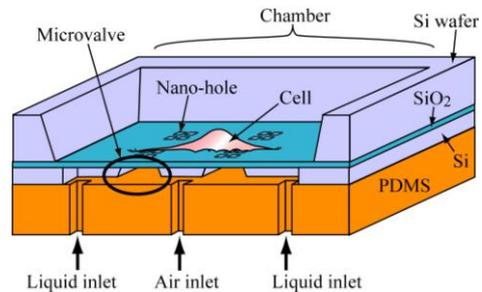


図1 微小孔とマイクロバルブをアレイ化した薬剤放出制御デバイス

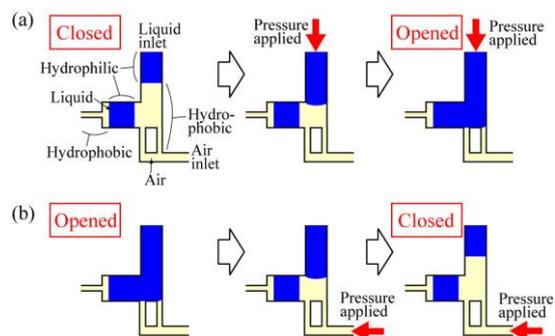


図2 マイクロバルブの動作原理

(2) 底面に微小孔を有する細胞培養チャンバの直下にマイクロ流路を配置し、この流路に3層流から成るシースフローを形成し、この3層流の流量比を制御することで、微小孔からの薬剤放出を制御するマイクロ流体デバイスを開発する(図3)。図4にその制御方法を説明する。刺激薬剤を含む流体を両側からバッファ液等で挟みシースフローを構成する。3個の流体の流量が等しい場合には、刺激薬剤が流路中央を流れ(図4(a, b))、微小孔アレイより薬剤分子が培養チャンバに拡散放出され、細胞が刺激を受ける(図4(c))。次に、片方のバッファ液の流量を増やして、他方のバッファ液と刺激薬剤の流量を減らすと、刺激薬剤は流路中央を流れなくなり(図4(d, e))、これにより微小孔アレイからの刺激薬剤の放出が止まる(図4(f))。また、刺激薬剤を含む流体の位置や幅を精密に制御すれば、細胞への局所刺激が可能となる。さらに、2種類の刺激薬剤でバッファ液を挟むようにシースフローを形成すれば、同様

の手法により2種類の刺激薬剤の放出を連続的に切り替えることも可能である。このようにして、本デバイスを利用すれば、細胞への薬剤刺激のプロファイルを時間的かつ空間的に制御することが可能となる。また、この手法によれば、細胞への薬剤放出が微小孔からの拡散のみで行われるため、細胞に対して流体力などの物理的な刺激が全く作用せず、これにより浮遊性の細胞に対しても薬剤刺激が可能となる。

本研究では、本デバイスを製作するプロセスを確立するとともに、蛍光色素を用いた実験により、シースフロー形成と薬剤放出の特性評価を行う。また、浮遊細胞である神経幹細胞をチャンバに培養し、刺激実験を行う。

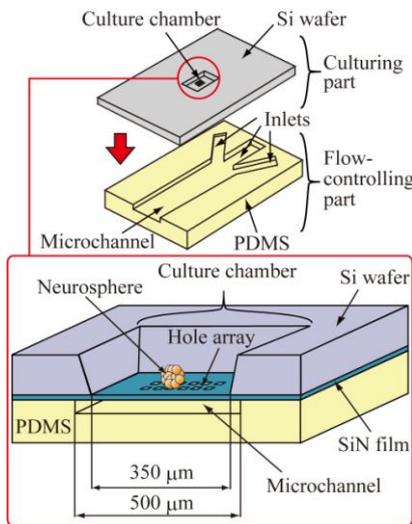


図3 微小孔とシースフローを利用した薬剤放出制御デバイスの概要

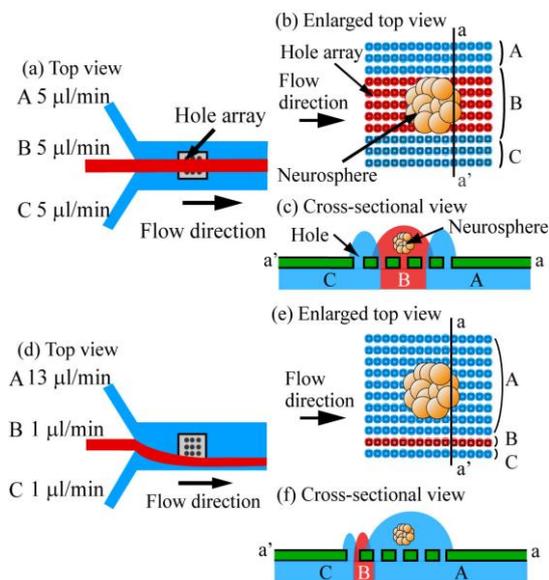


図4 薬剤放出制御の原理

(3) 底面に多数の微小孔を有する細胞培養ウェルをマトリックス状にアレイ化し、ウェル1列毎に別々のマイクロ流路をウェル直下に配置し、ウェル内に形成したニューロスフェア（神経幹細胞の球状凝集塊）に対して、マイクロ流路に導入した薬剤を微小孔より作用させる薬剤放出デバイスを構築する（図5）。それぞれのマイクロ流路に異なる刺激薬剤を導入すれば、1列毎に異なる薬剤で細胞を刺激することが可能となる。すなわち、単一のデバイス内で複数（マイクロ流路の本数分）の薬剤に対する細胞応答を解析することが可能となる。

細胞の播種から刺激までの手順は以下の通りである（図6）。まず、培地中にけん濁した神経幹細胞をある最適密度で播種する（図6(a)）。このとき、マイクロウェルをあふれる程度に十分な量の培地を導入する。この状態で2~3日間インキュベータ内に静置すると、個々のマイクロウェル内に単一のニューロスフェアが形成される（図6(b)）。次に、マイクロウェル内の培地の液面がウェル上面より下に位置するまで、余分な培地をピペットで吸引して取り去り、各ウェル内の培地をウェル間で分離する（図6(c)）。そして、インレットから薬液をピペットで導入すると、毛細管力により薬液が流路内に浸入し、微小孔を通じて流路内の薬液がウェル内の培地と接触した瞬間から薬剤が拡散によりウェル内に導入され、細胞刺激が行われる（図6(d)）。このとき、ウェル内の容積は薬液導入量に比べて極めて微量であるため、ウェル内の薬剤濃度が導入した薬剤濃度とほぼ等しくなることが期待される。

本研究では、本デバイスを製作するプロセスを構築するとともに、蛍光色素を用いた薬剤放出の特性評価を行う。また、実際に神経幹細胞を培養チャンバ内に播種する実験により、増殖・凝集しニューロスフェアを形成することを確認する。さらに、分化誘導因子をマイクロ流路から導入することで、微小孔を通じたニューロスフェアへの薬剤刺激を実施する。

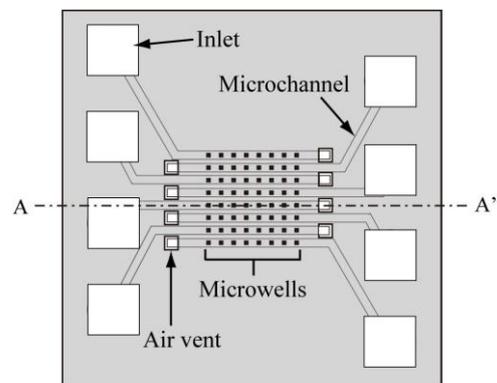


図5 ウェルアレイを有する薬剤放出デバイス

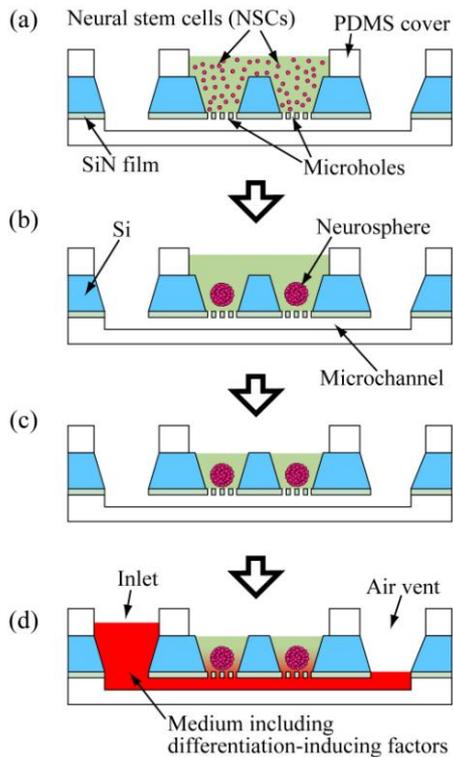


図 6 細胞刺激の手順

4. 研究成果

(1) SOI 基板を両面より微細加工することで、細胞培養チャンバ直下に内径 500nm の微小孔のアレイとマイクロバルブを 2 個×2 個にアレイ化し、4 個の独立した薬剤放出サイトを有するマイクロ流体デバイスを構築した (図 7)。まず、シリコンの結晶異方性エッチングとプラズマエッチングを用いて SOI (Silicon on Insulator) 基板を両面から微細加工し、支持基板層側に 1 個の培養チャンバを、活性層側に複数のマイクロ流路を構築した。次に、培養チャンバとマイクロ流路に挟まれた厚さ 500nm のシリコン酸化膜に、集束イオンビームによるエッチングを利用して内径 500nm のナノホールを多数開け、培養チャンバとマイクロ流路がこのナノホールのみで通じるようにした。そして、親水性のシリコン酸化膜と疎水性の自己組織化単分子膜をマイクロ流路の壁面上にパターンニングすることで、圧力を印加すると親水性和疎水性の表面張力の違いを利用して開閉するマイクロバルブを形成した (図 8)。

4 個のマイクロバルブを個別開閉するために、それぞれ個別の液体入口と 1 個の共通の空気入口に印加する外部圧力の制御方法を実験により導いた。図 9 は液体入口圧と空気入口圧を決定したときに、マイクロバルブが取り得る状態を表わしたものである。この図から、空気入口圧を 10kPa に固定し、液体入

口圧を 0kPa、10kPa、20kPa に設定することで、それぞれバルブ閉、バルブ状態保持、バルブ開の動作を決めることができることが分かった。これにより、4 個のマイクロバルブを独立に開閉可能となった。さらに、マイクロバルブの開閉により蛍光色素ローダミン B をナノホールから培養チャンバ内に拡散放出し、その際の培養チャンバ内における蛍光強度変化を計測した。これにより、マイクロバルブを個別に時間差をおいて開閉した場合と同時開閉した場合の薬剤濃度分布の時間的及び空間的な変化を評価した。

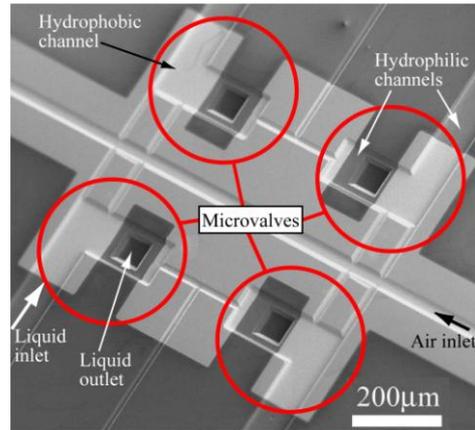


図 7 マイクロバルブ・アレイの SEM 写真

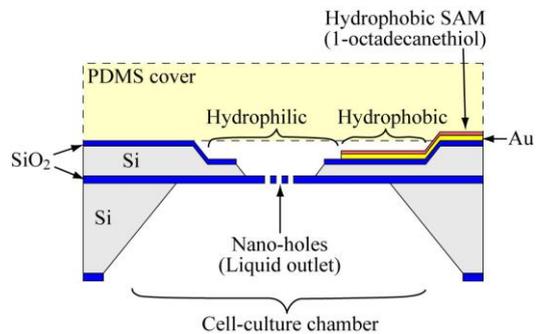


図 8 マイクロバルブ周辺の断面図

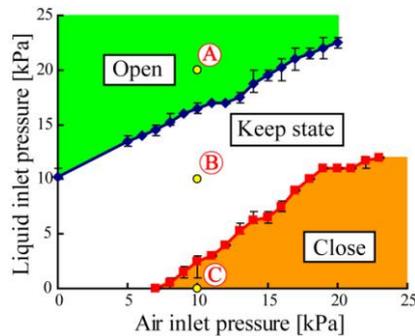


図 9 印加圧力とバルブ開閉状態の関係

(2) 底面に微小孔を有する培養チャンバの直下にマイクロ流路を配置し、この流路中に

形成したシースフローの制御により、微小孔からの薬剤放出を制御するマイクロ流体デバイスを構築した。培養チャンバはシリコン製であり、その底面を厚さ $1\mu\text{m}$ の窒化シリコン薄膜で製作し、内径 $2\mu\text{m}$ の微小孔を 24 個 \times 24 個形成した。

本デバイスでは、微小孔からの薬剤放出は薬剤分子の拡散のみで行われることが理想であった。しかし、実際には流量や流出口高さが変化することで流路内の圧力が変わり、これにより微小孔内に流れが発生することが分かった。そこで、微小孔内の流れを抑制するのに必要な流路出口の圧力条件を実験により導出した。図 10 に示すように、流路出口の圧力を下げると微小孔内にチャンバから流路への流れが生じ易くなり、流路出口の圧力を上げると流路からチャンバへの流れが生じることが分かった。微小孔内の流れを止めるのに必要な流路出口圧力はシースフローの総流量によって異なることも分かった。例えば、シースフローの総流量が $15\mu\text{l}/\text{min}$ の場合に、微小孔内の流れを止めるには流出口高さを -50mm にする必要があることが分かった。

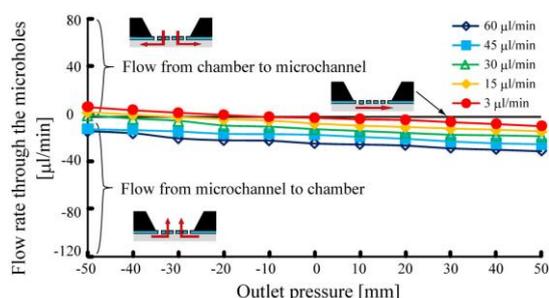


図 10 流路出口圧力と微小孔内流量の関係

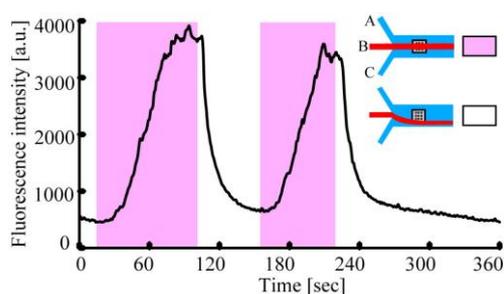


図 11 蛍光色素の放出制御

次に、蛍光色素 FITC 溶液を両脇から純水で挟んだシースフローを形成し、その流量比を変更することでチャンバ内への蛍光色素放出を制御する実験を行った (図 11)。これにより、本デバイスが細胞刺激制御に必要な薬剤放出性能を有していることを確認した。

さらに、カルシウムイオン・イメージング

試薬で染色したニューロスフェアをウェル内に培養し、グルタミン酸溶液を純水で挟んだシースフローを流路内に流し、グルタミン酸で刺激した際に生じる細胞内カルシウムイオン濃度の増加を蛍光強度変化として観察した。その結果、グルタミン酸による刺激の間に蛍光強度が上昇することが分かった (図 12)。

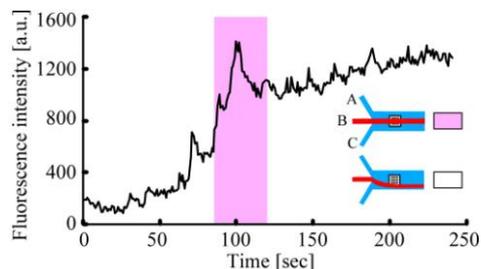


図 12 神経幹細胞刺激実験

(3) 底面に多数の微小孔を有する細胞培養ウェルを 8×8 個のマトリックス状にアレイ化し、8 本のマイクロ流路をウェル直下に配置し、流路に導入した薬剤を微小孔よりウェル内に放出させるデバイスを製作した。各ウェル底面は厚さ $1\mu\text{m}$ の SiN 膜でできており、一辺約 $350\mu\text{m}$ の正方形の各底面内に 24×24 個の微小孔を形成した。微小孔の内径を約 $2\mu\text{m}$ とした (図 13)。

薬剤導入直後における各ウェル内の薬剤濃度変化を確認するために、蛍光色素 FITC 溶液を流路内に導入して流路 1 本分の 8 個のウェル内の蛍光強度を計測したところ、120 分程度で各ウェル内の濃度がほぼ均一になることが分かった。実際の薬剤刺激は数日間に渡るため、薬剤濃度の均一化にこの程度の時間を要しても問題ないと思われる。

1 個のマイクロウェル当たり 2000 個の細胞密度でマウス由来の神経幹細胞を播種して培養を行った。培養開始から 12 時間後に、ウェル内で小さなニューロスフェアが多数形成され、その後徐々に 1ヶ所に密集して 1 つの大きなスフェアに成長するとともに、スフェアの寸法が次第に大きくなった。培養後 36 時間以後では、ニューロスフェアの直径が全てのウェル内でほぼ均一となった (図 14)。さらに、分化誘導因子であるウシ胎仔血清 (FBS, fetal bovine serum) により細胞刺激を行った。8 本のマイクロ流路に 8 種類の濃度 (0, 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20 %) の FBS 溶液を導入し、微小孔を通じて薬剤刺激を行ったところ、濃度 10% の FBS 刺激において、ニューロスフェアの外周部の神経幹細胞が扁平化し、接着性の神経系細胞へと分化した (図 15)。他の濃度においては、これより分化速度が遅いか、ほとんど分化が起こらなかった。以上により、本研究で開発したデバ

イスを用いて、微小孔を通じた薬剤刺激と多項目の薬効解析が可能であることを実証した。

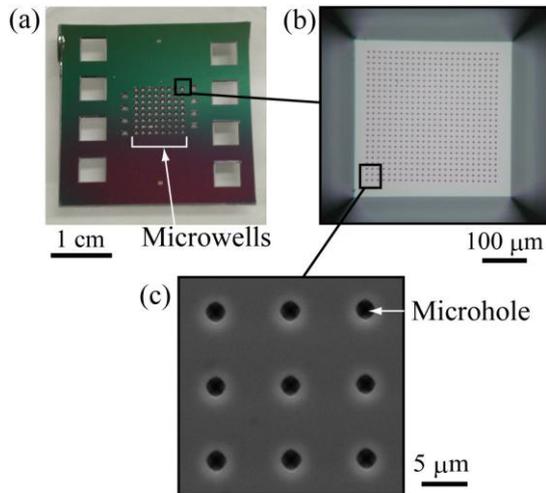


図 13 マイクロウェルと微小孔の写真

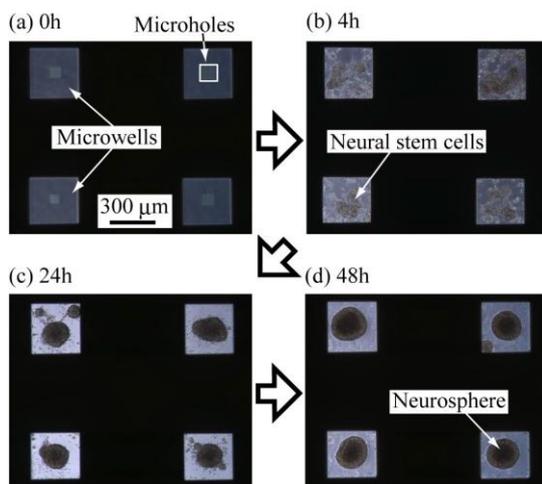


図 14 ニューロスフェアの形成

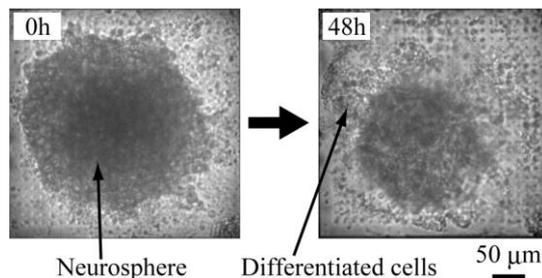


図 15 FBS による分化誘導

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 4 件)

- ① Takashi Yasuda, Katsutoshi Ishizuka, and Mika Ezoe, A Superhydrophobic Microvalve for Manipulating Microliquids Containing Biological Molecules, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, Vol. 3, pp. 290-296, 2008, 査読有
- ② Yuta Nakashima and Takashi Yasuda, Cell Differentiation Guidance Using Chemical Stimulation Controlled by a Microfluidic Device, Sensors and Actuators A, Vol. 139, pp. 252-258, 2007, 査読有

[学会発表] (計 23 件)

- ① Takashi Yasuda, Tatsuhiko Tsujihashi, Kwang Young Jung, and Yuta Nakashima, Chemical Stimulation of Cultured Cells through Microhole Array, The 49th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, Osaka, June 27, 2010.
- ② Yuta Nakashima, Naoki Mimar, Tatsuhiko Tsujihashi, Tomoko Tamura, Kanji Yahiro, and Takashi Yasuda, Chemical Stimulation of Neurospheres through Microholes Opened in Microwell Bottoms, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2009), Jeju, Korea, November 3, 2009.
- ③ Takashi Yasuda, Tetsunari Yamami, and Hidetsugu Yano, Pressure-driven Microvalve Array for Controlling Chemical Release to Cultured Cells, The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2007), Paris, October 9, 2007.

[図書] (計 3 件)

- ① 安田隆, マイクロ流体デバイスによる培養細胞への薬剤投与制御, シーエムシー出版, 細胞分離・操作技術の最前線, pp. 354-361, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 隆 (YASUDA TAKASHI)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：80270883