

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15426

研究課題名（和文）細胞間コミュニケーション分析に向けた多点細胞分泌物採取デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of a multi-point sampling device for secreted cellular molecules to analyze intercellular communication

研究代表者

太田 亘俊（Ota, Nobutoshi）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：60705036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞分泌物の簡便な定点経時測定を目指し、本研究ではキャピラリーを密に集めることで複数の領域から任意の回数の微量液体採取が可能なマイクロ流体デバイスを開発した。このデバイスは、キャピラリー先端位置と液体の流出入口を制御することで、導入液体で刺激する細胞と採取を行う細胞近傍液体の範囲を決定できる。このデバイスを通じて、培養皿上の培養筋芽細胞に対してトリプシン水溶液を導入し、最小で0.004平方mmの局所的な細胞剥離ができることを確認した。また、デバイスによりリポ多糖刺激の有無を制御して隣接する2つの培養マクロファージ群に与え、それぞれの細胞群で分泌物量変化が有意に異なることを経時測定から示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分泌物の採取は手作業で行われることも多く、一様に培養された細胞の中から特定の細胞の分泌物を狙って採取することは難しい。そのため通例、採取される細胞分泌物は培養容器中の全細胞に由来するものである。本研究のデバイスは、特定の細胞に由来する細胞分泌物を複数回にわたって採取することを可能とするため、細胞間で行われる細胞分泌物によるコミュニケーションの解析に使用できる。さらに、マイクロ流体制御を通じて特定の細胞に刺激を与えられるため、細胞パターンニングなどの細胞組織工学や、例えば初期がん細胞の発生のような細胞組織の初期発生研究に応用できる。

研究成果の概要（英文）：This study has aimed to develop a capillary-based open microfluidic device that can collect tiny amount of liquid from multiple regions with arbitrary number of sampling times, which promotes simple sampling and analysis of secreted molecules from multiple cell groups. By arbitrarily setting the positions of the capillary tips as well as assigning inlets and outlets, this device can determine the area of cells stimulated by introduced liquid and the range of liquid collected from vicinity of the cells. Cell removal through this device was performed by applying trypsin solution to confluent myoblasts on a culture dish. Minimum area of local myoblast removal was 0.004 square mm. In addition, the device showed its capability to make two adjacent groups of cultured macrophages that were stimulated or unstimulated by lipopolysaccharide, resulting in significantly different amount of secretion shown in time-course measurements.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：マイクロバンドルプローブ キャピラリー 微量液体採取 細胞分泌物 局所刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞分泌物に基づいた細胞間コミュニケーションは、生物細胞組織の機能や形態に関わる重要なプロセスである。神経組織等では、同一組織中の複数細胞が相互にコミュニケーションをとることで細胞組織の機能維持が行われる。また、正常な細胞組織中ががん細胞が発生すると周囲の細胞とコミュニケーションをとり、正常細胞のがん化を促すことが知られている。しかし、細胞分泌物採取はピペット操作等の手作業で行われることも多く、詳細な細胞間コミュニケーション分析を行う上で障害となる。

複数個所の細胞分泌物を比較する、もしくは同一個所での細胞分泌物の経時変化を追跡することを目的としたチップ型のマイクロ流体デバイスがこれまでに報告されている。チップ型デバイスは、デバイス上のマイクロ流路で細胞を培養し、流路を通じて細胞分泌物を含む液体を採取できる。しかし、細胞培養皿中の空間と比べマイクロ流路空間は細胞と壁面の距離が近いため、培養容器形状による遺伝子発現などの細胞挙動が変化することが知られている。また、細胞組織中の複数個所から細胞分泌物を採取するなどの高度な機能を実現するには、複雑な流路設計のマイクロ流体デバイスが必要であり、その作製には高度な技術が求められる。加えて、培養皿中の細胞から分泌物を得るには、デバイスを細胞に接近させる必要があるが、チップ型デバイスは培養皿と空間的に干渉するため培養皿中の細胞分泌物採取に適さない。

2. 研究の目的

本研究は、細胞分泌物による細胞間コミュニケーションの簡便な分析を実現するため、毛細管（キャピラリー）を密に集めることで、ピペット等では難しい複数個所からの微量液体採取を、任意の回数行うことができるマイクロ流体デバイス（マイクロバンドルプローブ。以下、デバイス）の開発を目的とする。培養皿中の細胞からの分泌物採取を行うため、本デバイスの形状は非チップ型とする。具体的には、細胞分泌物採取を顕微鏡下で行うことができるよう、細胞分泌物採取用の複数本のキャピラリー、キャピラリーと培養細胞の相対位置を決めるための位置制御機構、細胞分泌物を含む液体を任意の量と回数で採取するための液体採取機構を組み合わせることで作製する。このデバイスを開発することで、細胞近傍の液体採取が簡便になることと、細胞分泌物に採取位置と経時的な情報が付加されることで細胞間コミュニケーション解析の進展が加速されることを目指す。

3. 研究の方法

(1) マイクロバンドルプローブの開発

細胞分泌物採取に使用するキャピラリーの形状と材質、キャピラリーと培養細胞の相対位置の制御に適したホルダーと方法、細胞分泌物を含む液体を採取する方法をそれぞれ検討した。各要素を組み合わせることで本デバイスを開発し、キャピラリー位置が制御できること、培養皿に干渉することなく液体採取を行えること、複数個所からの液体採取が可能であることを検証した。

(2) 細胞近傍の流体制御

デバイスを用いた細胞分泌物採取を行うため、適切なデバイス 細胞間の距離、液体流出入口の位置、送液と吸液の流量を設定することで、特定細胞付近の液体が採取できる条件について調査を行った。流出入する液体に 200 nM のフルオレセインを入れることで、液体採取が行われる範囲を蛍光顕微鏡下で可視化した。流出入する液体の速度は、蛍光マイクロビーズを用いた粒子画像流速測定法で分析し、流体シミュレーションの結果と照らし合わせた。また、流出入する液体が細胞に触れていることを確認するため、培養皿上の筋芽細胞に対して細胞剥離効果のあるトリプシン水溶液を導入することで検証した。

(3) 細胞分泌物の採取と分析

本デバイスの細胞分泌物採取能力を検証するため、培養神経細胞と培養マクロファージを使用した。分泌物放出を促すため、グラム陰性細菌の構成成分であるリポ多糖を含む細胞培地をマクロファージに対して導入した。その際に回収された液体から、腫瘍壊死因子 (TNF α) を定量分析した。また、マイクロ流体を制御することで、同一顕微鏡視野内にリポ多糖刺激を受けない対照細胞群を作り、リポ多糖刺激の有無による TNF α 分泌量の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) マイクロバンドルプローブの開発

可視光透過性を持つガラス類、フッ素樹脂類、シリコンエラストマー類のキャピラリーを、キャピラリー位置制御ホルダーに装着して、その操作性と位置精度を評価した。デバイスに使用するキャピラリーの材質として、キャピラリー内径が変化しにくく、透過光および蛍光顕微鏡観察に適用しやすい石英ガラスを選択した。また、観察部位以外ではポリイミド被膜された石英ガラスを使用することで機械的な破損リスクを低減した。位置制御ホルダーは、キャピラリー先端のみを保持する先端制御式ホルダーとキャピラリーの3点に力をかけることで束ねる結束式ホルダーの2種類を作製した。培養皿の底面までキャピラリー先端が届くことと、キャピラリー装着時のキャピラリー先端位置精度から、先端制御式ホルダーをデバイスに採用した。キャピラリー間の縦横位置は、培養皿底面を基準にしたホルダーの高さで制御する(図1)。本項目の各図は、出版社の許諾を得て Ota et al. *Analytical Chemistry*, 2022 (<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.2c02815>)より抜粋し、翻訳・改変のうえ掲載する。

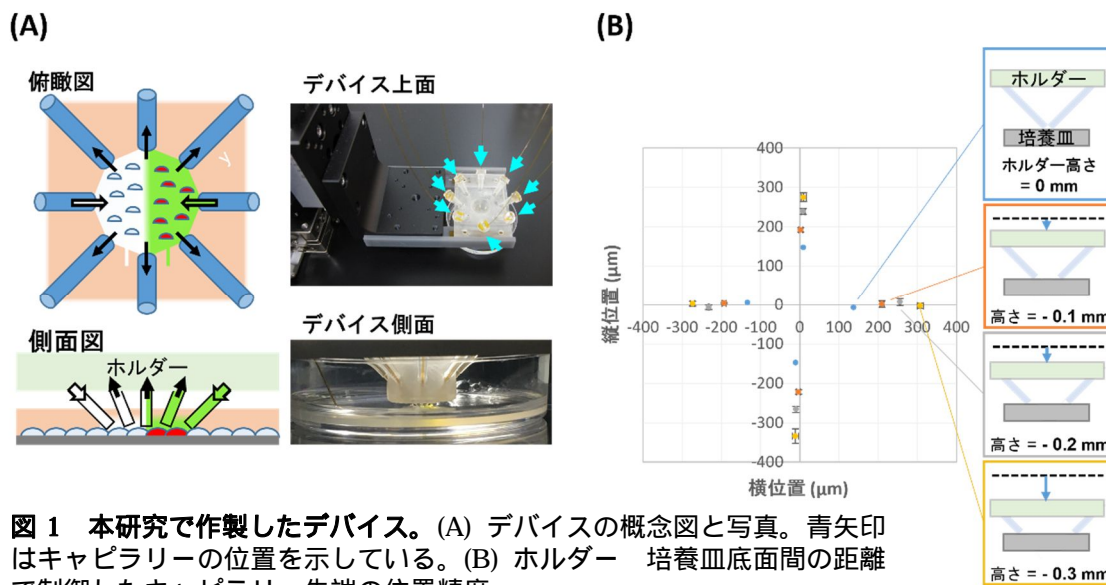


図1 本研究で作製したデバイス。(A) デバイスの概念図と写真。青矢印はキャピラリーの位置を示している。(B) ホルダー 培養皿底面間の距離で制御したキャピラリー先端の位置精度。

キャピラリーを通じた複数箇所からの複数回微量液体採取は、静水圧、シリンジポンプ、マルチチャンネルピペットによる三つの流体制御方式を検討した。静水圧方式とシリンジポンプ方式は、連続して液体採取を行うことができ、流量制御により液体採取速度を調整できる。複数回の液体採取は、液流を一時的に止めることで達成できる。液体試料を採取時間帯ごとに分ける場合は、液体保管容器を交換することで行う。静水圧方式は、キャピラリーごとに出入口の高低差を手動で調整することで、液体採取速度をキャピラリーごとに制御できることから、本研究では液体試料採取と排液制御に使用した。シリンジポンプ方式は、ポンプで同時に制御できるキャピラリー数の上限があることと、機械による精密かつ簡便な流量制御が可能なることから、本研究では細胞近傍への刺激物溶液の導入に使用した。ピペット方式は、一回当たり0.5~数十マイクロリットルの液体採取を任意のタイミングで実行できるため、分泌物成分変化のタイムラプス測定に有効であることが分かった。

(2) 細胞近傍の流体制御

本デバイスの流体制御能力を検証するため、フルオレセインによる液流の可視化を行った。キャピラリーの設置位置と液流の出入口によって、液流が特定の領域のみを通過することが確認された。図2では無色と緑色の液体を導入し、液体排出流量を適切に設定することで導入液体の拡散を防げることが分かった。また、液流に蛍光マイクロビーズを含めて液流を可視化することで、液流速の分布を測定した。図3Aに示すように、導入口の直線上と隣接する導入口と排出口を結んだ線上に比較的速い流速の領域が見られた。このような速い液流が導入液体の流域を限定することで、局所的な液体環境を操作することが可

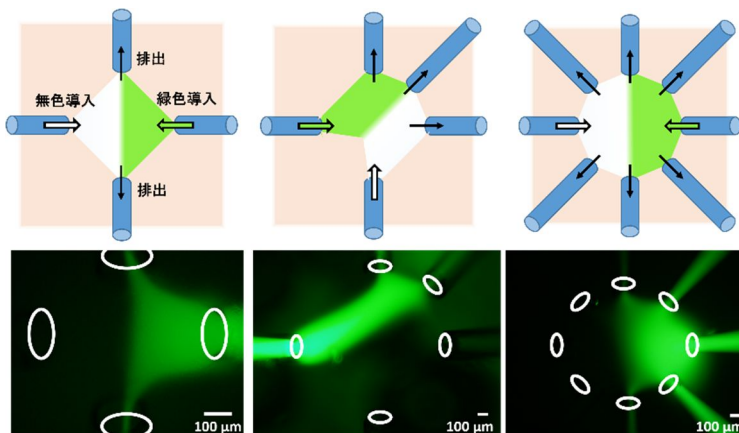


図2 特定箇所のみを通過するマイクロ流体。(上段)液体の導入および排出方向のイラスト。(下段)イラストと同じ方向に液体を流した結果。白丸はキャピラリー先端位置を示す。

能となった。同様の導入液体流域は、流体シミュレーションからも示された（図 3B）。また、培養皿底面では導入液体水位に比べて導入液体流域は大幅に増減せず、全体的に液流速が下がることが示された。そのため、細胞に過度の剪断応力が発生せず、本デバイスは物理的な刺激を抑えつつ、化学的な刺激を局所的な細胞に届けることができる。

さらに、液流が培養皿底面まで到達することを、培養筋芽細胞に対してトリプシン水溶液を導入することで検証した（図 4）。フルオレセインで可視化した流域とトリプシンによる細胞剥離が起きた領域はほぼ同じ面積だった。また、適切な流体操作により、刺激領域と非刺激領域を隣接して作り出すことができ、顕微鏡の一視野中で異なる化学刺激を受ける細胞群を作成することも確認された。その際、トリプシン導入流域とトリプシン阻害剤導入流域の境界面では、細胞剥離が境界面に沿って発生した。対して、トリプシン導入流域とトリプシン阻害剤を含まない流域が隣接する場合、トリプシンの拡散により液流の境界面より広い領域で細胞剥離が起きた（図 5）。加えて、一定の流量でトリプシン水溶液を導入した場合、デバイス 細胞間の距離が一定以上広がると細胞剥離が発生しないことも確認された（図 6）。そのため、複数層の細胞から細胞組織が構成されていた場合、デバイスと表面細胞層の距離を適切に制御することで、表面一層の細胞のみ剥離・採取するなど細胞組織工学の手法として応用できる。また、マイクロ流体操作特性を踏まえて本デバイスを数百万個程度の細胞がある培養皿上で使用した結果、最小で数個、最大で 3,000 個程度の細胞をトリプシン刺激できることが確認された。

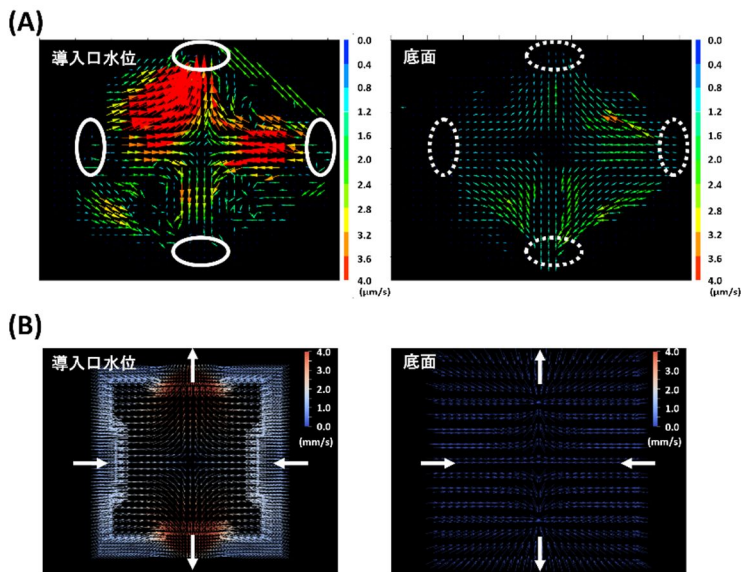


図 3 マイクロ流体の流速。(A) マイクロビーズによる流速測定結果。実線の白丸はキャピラリー先端の位置、点線の白丸はキャピラリー先端を底面まで下ろした場合の位置を示す。(B) 流体シミュレーションの結果。矢印は液流の方向を示す。

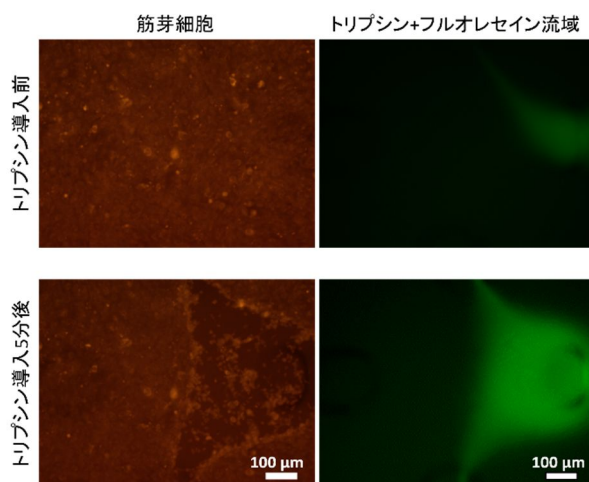


図 4 トリプシンの局所導入による細胞剥離。培養皿底面に万遍なく培養した筋芽細胞に対し、デバイスによる局所的なトリプシン導入により一部の筋芽細胞のみ剥離した。

(3) 細胞分泌物の採取と分析

作製したデバイスを用いて、細胞分泌物の採取と分析を培養神経細胞と培養マクロファージで行った。特にマクロファージは、リポ多糖刺激を開始してから数十分程度で $TNF\alpha$ の分泌量が増加し、ELISA 法によ

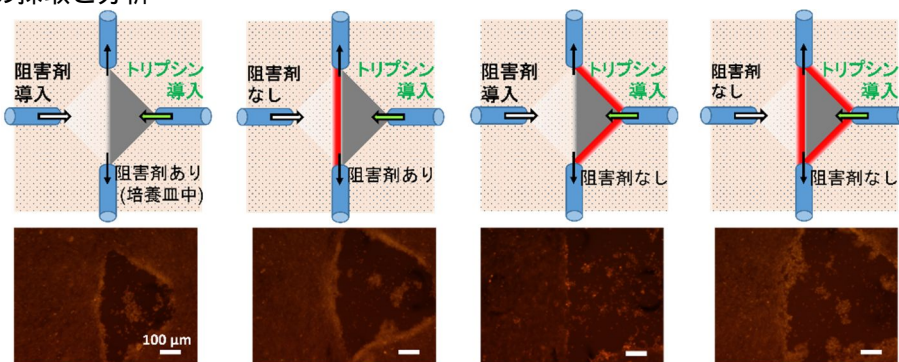


図 5 トリプシンとトリプシン阻害剤の局所導入による細胞剥離境界面の形成。イラストは導入流体と培養皿中の阻害剤の有無を示す。赤線はトリプシン拡散により曖昧な境界面が見られた部分を示す。

る定量分析が可能である。そこで、デバイスの細胞分泌物採取機能を分泌 $\text{TNF}\alpha$ の定量解析を通じて検証した。トリプシン導入の実験と同様に、リポ多糖刺激領域と非刺激領域を隣接して作り出し、顕微鏡の一視野中で異なるリポ多糖刺激を受けるマクロファージ細胞群を作成した。マクロファージの細胞分泌物は90分間連続で採取し、30分ごとに異なる容器で保存して $\text{TNF}\alpha$ 分泌量の経時変化を分析した。同時に、リポ多糖が拡散して培養皿全体の細胞を刺激する可能性もあわせて検証した。その結果、非細胞刺激群と培養皿全体の細胞から得られた $\text{TNF}\alpha$ 分泌量に有意な差はみられず、非刺激細胞群と比べて刺激細胞群には $\text{TNF}\alpha$ 分泌量に有意な増加が見られた(図7)。以上から、本研究で開発したデバイスが、複数個所から複数回の細胞分泌物採取に使用できることが確認された。また、培養皿上の一様な培養細胞群に対して、本デバイスによる化学刺激を利用して特定の細胞の分化を促すことで、任意の細胞パターンが作成できる。これは、例えば初期がん細胞の発生のような細胞組織の初期発生研究への応用が期待できる。

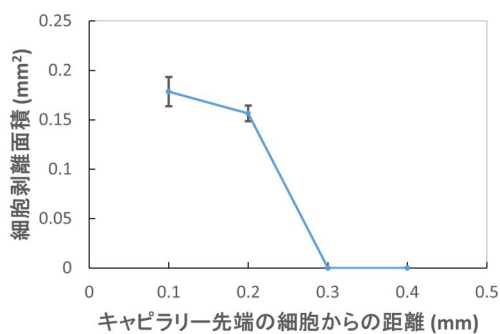


図6 デバイス 細胞間の距離に応じた細胞剥離面積の変化

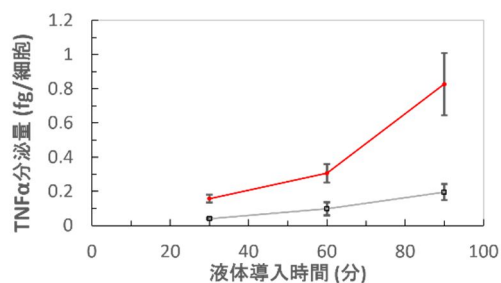
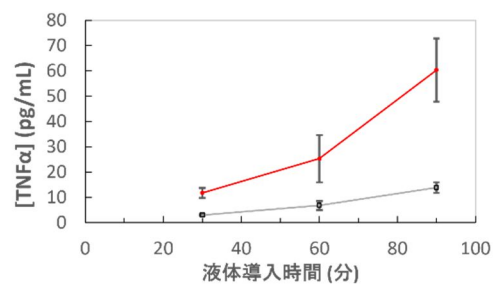


図7 リポ多糖刺激によりマクロファージから分泌された $\text{TNF}\alpha$ 分泌量の経時変化。赤線がリポ多糖刺激あり、黒線がリポ多糖刺激なしのマクロファージから分泌された $\text{TNF}\alpha$ を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nobutoshi Ota, Nobuyuki Tanaka, Asako Sato, Yigang Shen, Yaxiaer Yalikun, Yo Tanaka	4. 巻 94
2. 論文標題 Microenvironmental Analysis and Control for Local Cells under Confluent Conditions via a Capillary-Based Microfluidic Device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 16299-16307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.2c02815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nobutoshi Ota, Nobuyuki Tanaka, Asako Sato, Yigang Shen, Yaxiaer Yalikun, and Yo Tanaka
2. 発表標題 A high-density capillary device to stimulate less than 10 cells in a dish of confluent cells
3. 学会等名 MicroTAS 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田亘俊、佐藤麻子、田中陽
2. 発表標題 神経細胞分泌物測定のための多点分取デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------