

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710133

研究課題名（和文）細胞培養のための微小環境を有する細胞増殖試験マイクロチップの開発

研究課題名（英文）Microenvironment array chip for cell culture environment screening

研究代表者

服部 浩二（HATTORI KOJI）

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・産総研特別研究員

研究者番号：60409670

研究成果の概要（和文）：細胞の接着、増殖、分化といった細胞動態は、培養環境に強く依存する。本研究課題では、マイクロチップ上で様々な細胞アッセイを実施するため、マイクロチャンバー内で異なる液性因子を含む培地と細胞外マトリクス（ECM）を組み合わせることで、マイクロチャンバー内に多様な培養環境を構築できる灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを開発した。併せて、マイクロチップ上の任意の微小領域にのみ ECM を固定化するため、物理マスキングによるマイクロパターン化法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Generally, cellular events (e.g., adhesion, extension, growth, apoptosis and differentiation) strongly depend on extracellular stimuli from surrounding environment composed of soluble factors and scaffolds (i.e., extracellular matrix (ECM)). In this research, we developed the “microenvironment array chip” as a new-type of the perfusion culture microchamber array chip, where cells are cultured in the discrete microchambers with the different environment composed of combination of ECMs and soluble factors. We present the high-throughput cell culture condition screening by the microenvironment array. In addition, modification of cell culture surfaces on microfluidic devices is a big issue in the field of MicroTAS. However, the micropatterning process of ECM spots on the bottom of the discrete microchambers is complicated. We developed a simple and scalable fabrication process for micropatterning of ECM in the microchamber array by O<sub>2</sub> plasma oxidation with physical masking. The fabrication process includes coating, O<sub>2</sub> plasma oxidation with physical masking, and subsequent sealing. All these process are enough simple to enable scalable production of microchamber array with ECMs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロバイオシステム、薬剤開発、細胞アッセイ、培養環境、Lab on a chip、タンパク質表面修飾、マイクロパターンニング

## 1. 研究開始当初の背景

我々は医薬品開発、治療・診断における細胞アッセイを効率化する灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを開発した。申請者はこのチップを抗癌剤のスクリーニングに利用したいと考えた。癌の性質は患者ごとに大きく異なるため、画一的な治療法では根治できないことが大きな問題である。臨床現場で患者から採取した癌細胞を培養し、その癌細胞に対する多数の抗癌剤の効果を網羅的に解析すれば、各患者の癌に最適な抗癌剤をスクリーニングできると考えられる。本研究ではこのようなテーラーメイド医療を実現するため、微小細胞培養環境を有する細胞増殖試験マイクロチップを開発する。

## 2. 研究の目的

細胞の接着、増殖、分化、アポトーシスといった動態は培養環境に強く依存するため、患者から採取した細胞を *in vitro* で培養するなど、様々なソースから入手した細胞をマイクロチップ内で培養するには、適切な足場因子と液性因子で構築された培養環境が必須である。以上の問題を踏まえ、申請者はマイクロチャンバーアレイ内に微小細胞培養環境を構築するための研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### (1) 平成 21 年度

ステンシルを用いた高分子マイクロパターン化技術およびグラフト重合技術により、マイクロチップの素材であるポリジメチルシロキサン (PDMS) に足場因子である ECM を固定化する方法を検討した。PDMS 表面にアクリル酸をマイクロアレイ状にパターン重合し、生成したポリアクリル酸アレイ上のカルボキシル基と ECM のアミノ基を脱水縮合させ、fibronectin, collagen の 3 種の ECM アレイを 1 枚の PDMS 平板上に固定化した。

### (2) 平成22年度

マイクロチップ上のマイクロチャンバー底部へECMを組み込む手法を確立し、マイクロチャンバー内の微小培養環境を制御したチップ (培養環境制御チップ) の設計、作製と動作実証を行った。個々に独立したマイクロチャンバーアレイおよびマイクロ流路で構成されるマイクロ流路層と、異なる4種類の足場因子 (collagen, fibronectin, laminin, PDMS) で構成されるECMアレイ層を作製し、両層を接着してマイクロチップを作製した。このとき、マイクロ流路に細胞懸濁液を導入した時にマイクロチャンバー内に一定数の細胞が導入されるように、また培地を導入した時に培養に必要な栄養素、および酸素がマイクロチ

ャンバー内の細胞に適切に供給されるように、マイクロ流路およびマイクロチャンバーアレイを設計した。また、ECMアレイ層として3種のECMアレイを並べたPDMS板を平成21年度に確立した方法で作製した。このとき、ECMアレイをマイクロ流路層上のマイクロチャンバーアレイにちょうど重なる配置、かつマイクロチャンバーアレイよりも少し小さい寸法で形成し、流路の並びとECMアレイの並びが直交するように両層を接着することで、異なる液性因子を含む培地と足場因子の組み合わせによる培養環境の違いを一度の実験で一斉評価できる培養環境制御チップを作製した。

### (3) 平成 23 年度

PDMS を素材に用いたチップを組み立てる際には表面を酸素プラズマによって活性化し、流路をシールする。しかし ECM は酸素プラズマによって容易に分解するため、保護工程が煩雑だった。平成 21 年度に開発した ECM アレイ形成技術では、複数種の ECM を任意の微小領域に固定化することができたが、上記のような保護工程をいくつも経なければならず、培養環境制御チップを量産することは困難だった。そこでマイクロチップの作製を簡便化するため、新たな ECM マイクロパターンニング法を検討した。まず凹構造を有するマイクロチャンバーアレイとそれに接続する複数のマイクロ流路を有するマイクロチップの構成部品 (マイクロ流路層) のマイクロチャンバーアレイ全面に ECM の水溶液を接触させることで ECM を修飾した。次にマイクロチャンバーと物理的に寸法と配置が適合する凸構造の物理マスクを押し当て、プラズマ照射して物理マスク外の ECM を分解した。この工程を経ることで物理マスク外では ECM が分解された後、表面が活性化される。この活性化表面に PDMS 平板を重ねてマイクロチャンバーおよび流路をシールした。

## 4. 研究成果

### (1) 平成 21 年度

PDMS 上に ECM アレイを形成し、ECM アレイの形成状態を蛍光染色により評価した。その結果、マイクロチャンバーに収まる直径約 1.2 mm の円形スポットで構成される 2 列 x 8 段のアレイが、相互汚染なく作製できたことが示された (図 1)。

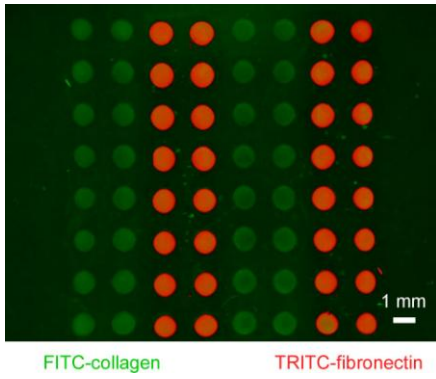


図1 ECM アレイチップ表面の蛍光画像

また、単なる PDMS 表面には接着しない CHO-K1 細胞を ECM マイクロアレイ上にて静置培養し、細胞形態の変化を観察した結果、CHO-K1 細胞は ECM を固定化していない部分には接着しなかったが、各 ECM アレイには接着した。加えて、ECM の種類によって細胞の形態は異なったことから、固定化した ECM の性質が細胞接着・増殖に寄与したと考えられる (図2)。

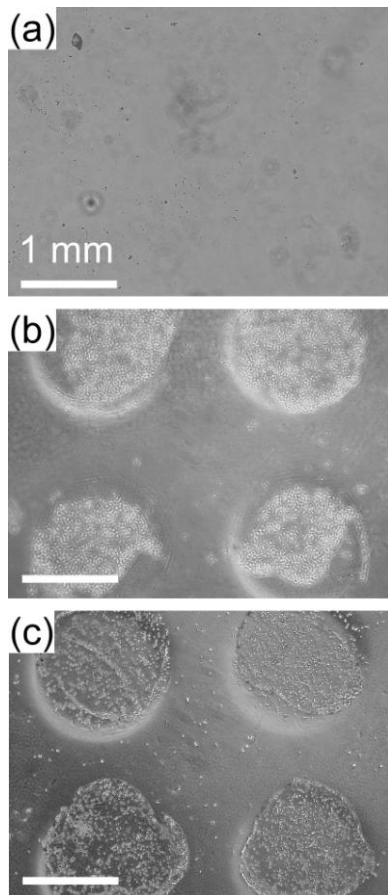


図2 ECM アレイ上での細胞培養  
a) PDMS, b) collagen, c) fibronectin

本 ECM 固定化法は細胞接着・進展・増殖が可能な足場を、アレイスポッターなどの高

価な機材なしで PDMS 上に簡便に構築できるため、マイクロチャンバーアレイ内に微小培養環境を構築するのに有用な手法として Biotechnology Journal 誌に掲載されている。

(2) 平成 22 年度

培養環境制御チップ上のマイクロチャンバーアレイでは 4 種の液性因子と 4 種の足場因子を組み合わせることが可能で、 $4 \times 4 = 16$  通りの異なる培養環境を構築できた。これらの環境下で CHO-K1 細胞を灌流培養した結果、CHO-K1 細胞の培養に適切な環境が構築されたマイクロチャンバー内でのみ、CHO-K1 細胞が接着・増殖することが確認された。以上の結果から、異なる複数の培養環境の中から適切な培養環境をスクリーニングできる培養環境探索チップの試作品が完成した (図3)。本研究結果は、マイクロチャンバー内の環境を任意に制御できる機構をもつマイクロチップを世界に先駆けて提案したもので、当該分野の一流誌である Lab on a Chip に掲載されている。

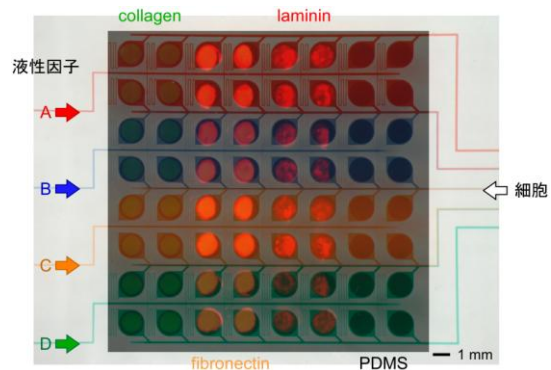


図3 培養環境制御チップ

(3) 平成 23 年度

開発した物理マスクと酸素プラズマによる ECM マイクロパターンング法によって、培養環境制御チップの量産化を検討した。本手法によって、collagen をマイクロチャンバーアレイ上にパターンングした結果、底部にのみ collagen が残っていた (図4)。条件を調整すれば fibronectin もパターンングが可能で、本法は ECM の種類に依らず適用可能なことが示された。

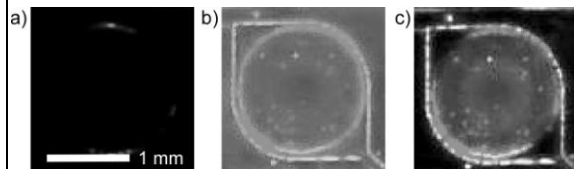
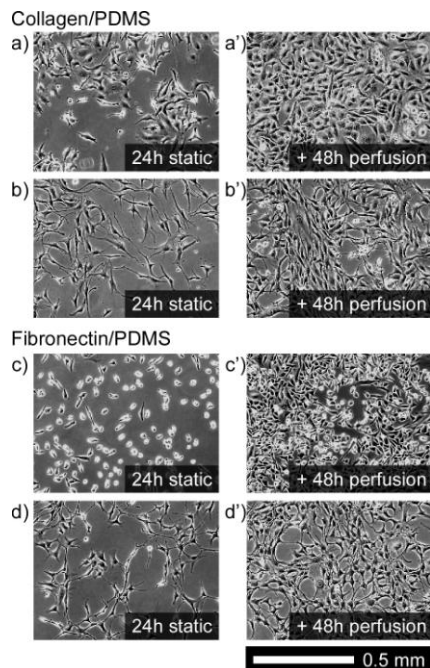


図4 マイクロチャンバーへの collagen のパターンング, (a) collagen 固定化前, (b) 全面固定後, (c) パターンング後

作製したマイクロチップに 20kPa 程度の圧力印加によって培地を送液したところ一切のリークなく、十分な耐圧性を有していた。また作製されたマイクロチップ内では様々な株化細胞を培養することが可能で、本法適用後も ECM の細胞接着活性が維持されていることが示された (図5)。

図5 ECM 固定化マイクロチャンバー内に



おける細胞培養, (a), (c) CHO 細胞 (b), (d) NIH3T3 細胞の静置培養, (') 灌流培養。

本法によりマイクロチャンバー底部にのみ ECM を修飾し、同時にマイクロ流路をシールするために必要な接着面の活性化を一工程で達成できることを示した。本法は ECM のマイクロパターニングと接着面の活性化を一工程で達成できるため、培養環境制御チップの量産化技術としての応用できる。

#### 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 8 件)

- ① Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Scaffold fabrication in a perfusion culture microchamber array chip by O<sub>2</sub> plasma bonding of poly(dimethylsiloxane) protected by a physical mask, *Biomicrofluidics*, 査読有, Vol. 5, 2011, pp. 022204. 1-11, DOI: 10.1063/1.3576933
- ② Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Microenvironment array chip

for cell culture environment screening, *Lab on a Chip*, 査読有, Vol. 11, 2011, pp. 212-214,

DOI: 10.1039/C0LC00390E

- ③ Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, High-Throughput Cell Culture Condition Screening by Microenvironment Array, *Micro Total Analysis Systems 2010*, The proceedings of conference, 査読有, CD-ROM (DOI: 無), 2010, pp. 178-180,
- ④ Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, On-chip cell culture on a microarray of extracellular matrix with surface modification of poly(dimethylsiloxane), *Biotechnology Journal*, 査読有, Vol. 5, 2010, pp. 463-469, DOI: 10.1002/biot.201000021
- ⑤ Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Microenvironment array: cell culture condition control in perfusion culture microchamber array, *Micro Total Analysis Systems 2009*, The proceedings of conference, 査読有, CD-ROM (DOI: 無), 2009, pp. 469-471,

[学会発表] (計 8 件)

- ① 服部浩二、吉満亮介、杉浦慎治、丸山篤、大沼清、金森敏幸、酸素プラズマと物理マスクによる細胞外マトリクスのマイクロパターニング、第 23 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2011 年 6 月 11 日、千葉大学 (千葉市)
- ② 服部浩二、杉浦慎治、金森敏幸、灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを用いた培養環境探索法の開発、第 39 回医用高分子シンポジウム、2010 年 7 月 26 日、東京大学 (東京都)
- ③ 服部浩二、杉浦慎治、金森敏行、培養環境を制御した灌流培養マイクロチャンバーアレイチップの開発、化学工学会第 41 回秋季大会、2009 年 9 月 18 日、広島大学 (東広島市)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: マイクロチップの製造方法、物理マスク、及びマイクロチップ

発明者: 服部浩二、杉浦慎治、金森敏幸

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2011-107592

出願年月日: 2011/5/12

国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://unit.aist.go.jp/scrc/ci/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 浩二 (KOJI HATTORI)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞

工学研究センター・産総研特別研究員

研究者番号：60409670