

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月15日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23760232
研究課題名（和文）	幹細胞の分化誘導のためのリアルタイム機械刺激応答評価マイクロデバイスの構築
研究課題名（英文）	Fabrication of a real-time mechanical stimulus response evaluation microdevice for stem cell differentiation induction
研究代表者	
	中島 雄太 (NAKASHIMA YUTA)
	山口大学・大学院理工学研究科・助教
	研究者番号： 70574341

研究成果の概要（和文）：本研究では、MEMS 技術を駆使して幹細胞の分化誘導を目指したリアルタイム機械刺激応答評価マイクロデバイスを構築した。まず、デバイスの設計や製作条件、プロセス条件などを確立し、提案したデバイスが製作可能であることを実証した。また、製作したデバイスの駆動特性を評価した。さらに、製作したデバイス上に実際に細胞を培養し、細胞に対して動的に機械刺激を与えた際の細胞の変形挙動や細胞内カルシウムイオン濃度の変化の様子をリアルタイムで観察した。また、刺激を受けた細胞の細胞内ひずみ分布を FEM 解析により評価した。

研究成果の概要（英文）： A real-time mechanical stimulus response evaluation microdevice for differentiation induction of stem cells was fabricated using MEMS technology. The device design, fabrication conditions, and process conditions were determined, and the validity of proposed design and fabrication process of the microdevice was proved. Also, the drive performance of the fabricated microdevice was evaluated. Moreover, deformation behavior and intracellular calcium concentration change of cells to receive the mechanical stimuli on the fabricated microdevice were observed in real time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：バイオ MEMS

科研費の分科・細目： 機械工学、知能機械学・機械システム

キーワード：機械刺激、リアルタイム評価、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞などの多分化能を有する幹細胞を目的の細胞（例えば、神経細胞、肝細胞、骨細胞など）へと分化誘導する技術の開発は、再生医療における重要な課題である。幹細胞の分化は細胞が外部から受ける刺激のタイミングや大きさなど細胞が生存する環境に大きく依存すると言われている。しかし、現在は細胞生存環境を制御して幹細胞を特定の細胞へと分化誘導する技術は確立されて

おらず、幹細胞が特定の機能を持つ細胞へと分化する詳細なメカニズムは明らかにされていない。

一方、細胞生物学やバイオメカニクスの分野においては、生体内で細胞が受ける様々な機械的刺激に対する細胞の反応や応答挙動を解析し、細胞の力学刺激受容機構や情報伝達機構を解明することの重要度が増しており研究が盛んに行われている。したがって、マイクロマシン技術を駆使して細胞の生存

環境を人工的に制御することができるデバイスを構築し、刺激に対する細胞応答をその場かつリアルタイムで観察することができれば、幹細胞を特定の機能を有する細胞へと分化誘導する技術や細胞の力学刺激受容機構を解明するツールになり得る。

2. 研究の目的

本研究では、機械刺激により幹細胞の分化を誘導する技術の確立を目指し、マイクロマシン技術を駆使して細胞への機械刺激を動的に制御できると共に、刺激に対する細胞応答をリアルタイムで観察評価することが可能なマイクロデバイスを構築する。具体的には、まずは、フォトリソグラフィによる製作条件やプロセス条件の最適条件を求め、デバイス設計や製作条件、プロセス条件の最適化を図る。これにより、デバイスを完成させるための各種条件や技術を確立する。そして、製作したデバイスの動作実験を行い、機械刺激を行うための機構の有効性を検証する。さらに、製作したデバイス上に実際に細胞を培養し機械刺激を与え、刺激を受けた細胞の形態や細胞内カルシウムイオン濃度のリアルタイム観察を行う。また、刺激を受ける細胞内に生じるひずみ分布をFEM解析により求め、刺激応答に関する定量的な評価につなげる。

3. 研究の方法

まず、細胞に対して動的な機械刺激を与えることができ、その刺激に対する細胞の応答をリアルタイムで評価することが可能なマイクロデバイスを構築する(図1)。本デバイスは、細胞培養チャンバ、マイクロ流路、細胞刺激用ダイアフラムから成る1層目と、細胞導入ポートと圧力導入ポート、ガスケットから成る2層目で構成する(図1(a, b))。これら2層は自己接着性を持つPDMSの構造体であり、2層の積層によりデバイスを製作する。細胞刺激用ダイアフラムは細胞培養チャンバの真上に製作されているため、圧力導入ポートから任意の圧力を印加し、ダイアフラムをたわませることによって各チャンバに培養された細胞を直接圧縮し機械的刺激を与えることができる(図1(c))。デバイス上で培養・刺激された細胞をリアルタイムかつその場で高倍率観察・評価するために、顕微鏡上での細胞観察に用いられるカバーガラス上にデバイスを構築する。図2に細胞に圧縮刺激を与える際の動作原理を示す。細胞はマイクロ流路を通してチャンバ内に導入される。細胞の導入後、空気圧または静水圧により培養チャンバ上面のダイアフラムをたわませることによって、そのダイアフラムで細胞を直接圧縮し刺激を与える。細胞に与えられる圧縮刺激はダイアフラムの変形量を調整することによって動的に制御するこ

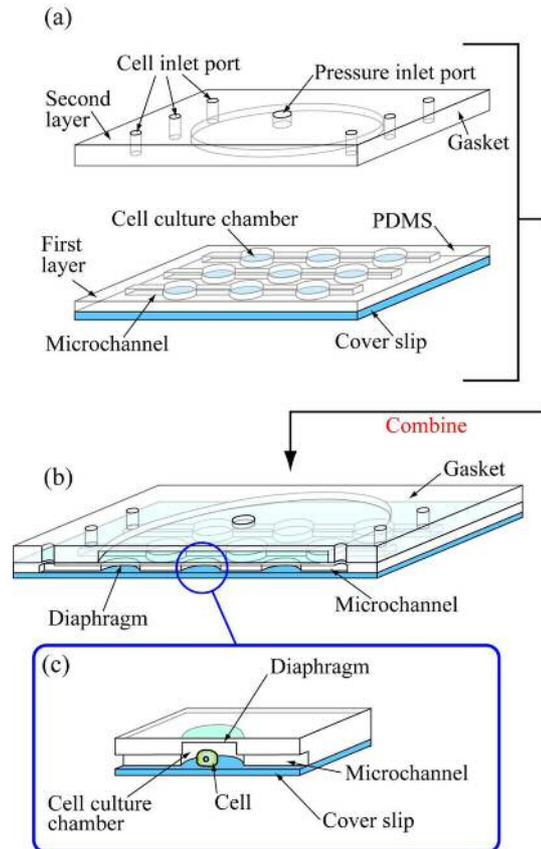


図1 リアルタイム機械刺激応答評価マイクロデバイス

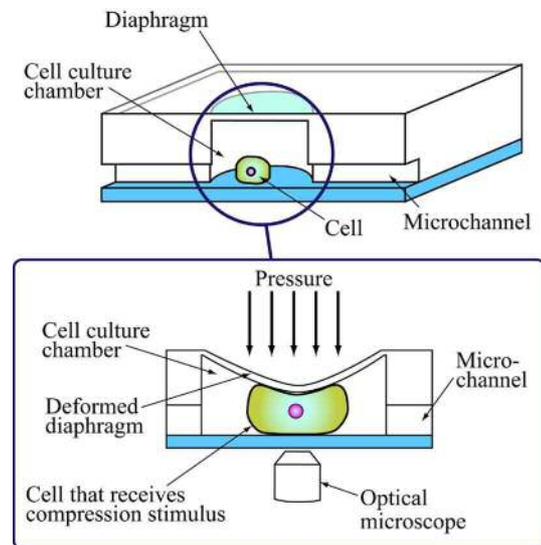


図2 細胞への機械刺激の動作原理

とができる。

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。次に、デバイスの基本特性を評価するために、静水圧を用いてダイアフラムに圧力を印加することによってダイアフラムを変形させた際の印加圧力に対するダイアフラムの変形量を計測する。そして、

製作したデバイス上に実際に細胞を培養し、機械刺激を与え、刺激中の細胞をリアルタイムで観察することが可能であることを実証する。また、細胞を蛍光染色し機械刺激を与えることによって、機械刺激を受ける細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の動態を評価するとともに FEM 解析により細胞内ひずみ分布を求め細胞内に生じるひずみ量を定量的に評価し実験結果との比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) デバイスの製作プロセス

多重露光による微小立体構造製作プロセスを用いた厚膜フォトレジストのフォトリソグラフィによる鋳型製作と PDMS のモールドイング、PDMS 構造体の積層により、リアルタイム機械刺激応答評価マイクロデバイスを構築した (図 3)。構築したデバイスの各寸法を計測した結果、マイクロ流路の幅は $200 \mu\text{m}$ 、深さは $50 \mu\text{m}$ 、培養チャンバの直径は 1mm 、深さは $150 \mu\text{m}$ 、細胞に圧縮刺激を与えるためのダイアフラムは培養チャンバと同じ直径 1mm 、厚さは $10 \mu\text{m}$ であり、設計通りのデバイスを製作することができた。

(2) デバイスの基本特性評価

図 3 (a) のデバイスに静水圧によって圧力を印加し、デバイスの基本特性を評価した。ダイアフラムに与える圧力を正負などの様々な圧力に調整した結果、ダイアフラムの変位量は印加される圧力に応じて素早く変形することがわかった。図 4 は、ダイアフラムに圧力を印加した際のダイアフラムの変位量を示したものである。この図から、ダイアフラムの変位量は印加圧力の増加に伴いほぼ線形的に増加することがわかり、印加する圧力によって細胞への刺激強度を制御できることがわかった。これらの結果より、本デバイスは圧力の印加に応じて操作性良くダイアフラムの変位量を制御することが可能であることが証明でき、静的圧縮刺激だけではなく、繰り返しの動的刺激にも適用できることを示した。

(3) 細胞の機械刺激応答評価

製作したデバイスのチャンバ内にマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を播種し、播種した細胞に対して圧縮刺激を与えた。この際の細胞の変形の様子を観察した。その結果、圧力を徐々に印加すると圧力の増加に伴ってダイアフラムが培養面に向かって変形し、ダイアフラムの変形量に応じて細胞が徐々に圧縮され刺激を受ける様子をリアルタイムかつその場で観察することができた (図 5)。

次に、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を観察するために蛍光試薬 (Fluo-3 AM) で細胞を染色し、染色された細胞に圧縮刺激を

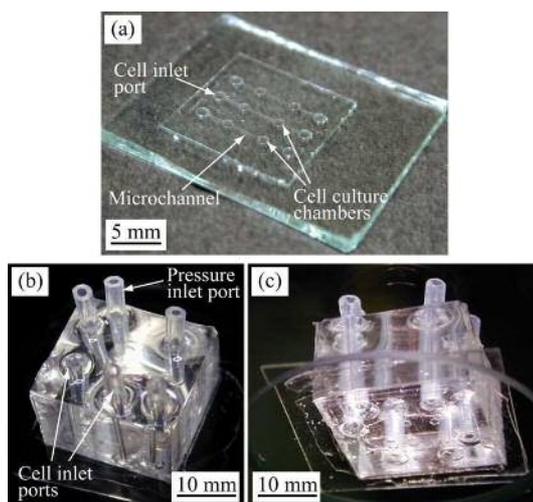


図 3 製作したリアルタイム機械刺激応答評価マイクロデバイス

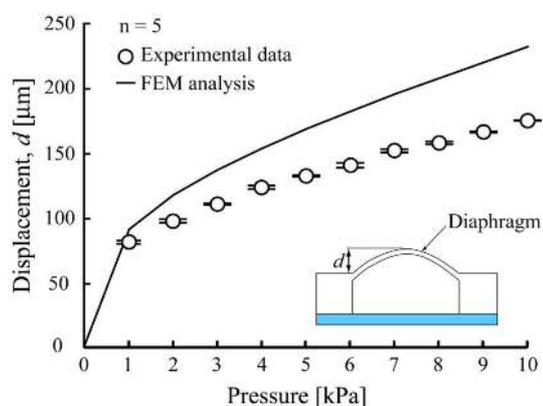


図 4 印加圧力とダイアフラム変位量の関係

与えることによって、細胞内カルシウム応答を観察した。細胞が刺激を受ける直前の位相差観察像を図 6(a) に示し、刺激を受けた直後の位相差観察像を図 6(b) に示す。また、それぞれの細胞内カルシウムイオンの蛍光観察像を図 6(c) と図 6(d) に、蛍光強度をそれぞれ図 6 (e) と図 6 (f) に示す。細胞の細胞内カルシウムイオン濃度は圧縮刺激を受けた直後に急激に上昇し蛍光強度が高くなった。取得した蛍光像を 2 値化し、0~255 までのグレースケールの階調で計測した結果、刺激直前の蛍光強度に比べて刺激直後の蛍光強度は約 2 倍になったことがわかった。このように、構築したデバイスを用いることによって刺激に対する細胞の初期応答を観察することに成功した。一方で、本実験では、細胞内カルシウム応答の起点となる部位の観察には至っていない。この理由として、観察倍率が低い点と観察画像の時間分解能が低い点が挙げられる。観察倍率については、本デバイス上では厚さ $0.12 \sim 0.17 \text{mm}$ のカバーガラス上で細胞を培養しており 60 倍や 100 倍の

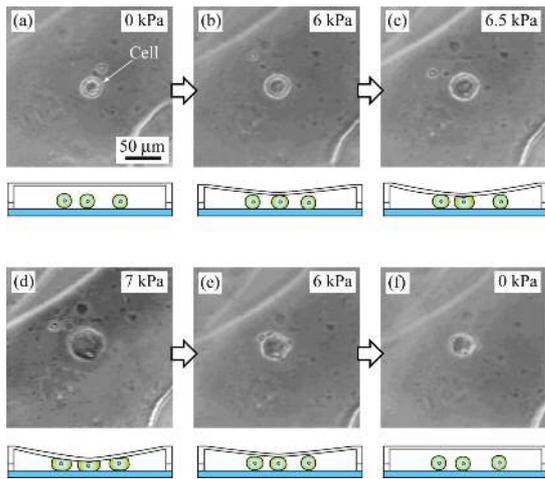


図5 動的圧縮刺激による細胞の変形

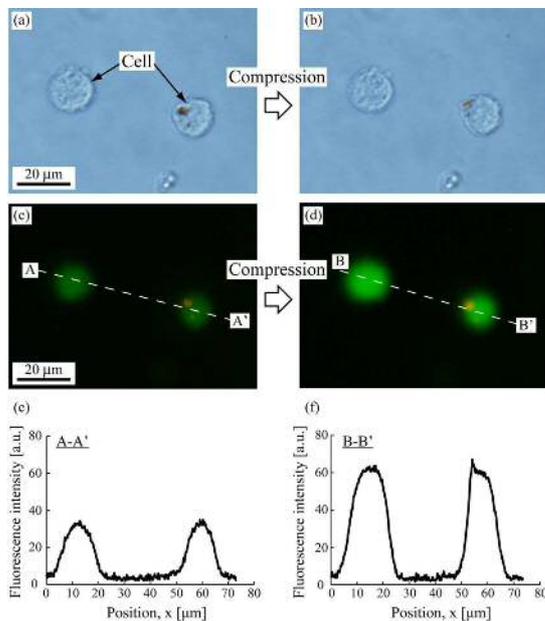


図6 圧縮刺激に対する単一細胞の応答評価

油浸レンズを使用することが可能であるため、これらのレンズを使用することによって解決可能である。また、取得画像の時間分解能についても実験で使用するカメラの問題であり、時間分解能の高いカメラを使用することによりカルシウム応答の起点を観察することが可能であると考えられる。

(4) 細胞内ひずみ分布のFEM解析

圧縮刺激を受けた細胞の内部に生じるひずみ分布を定量化するために、FEM解析ソフト(ANSYS Ver. 14.0)を用いて解析を行った(図7)。細胞のヤング率を4.2 kPa、PDMSのヤング率を3.23 MPa、ガラスのヤング率を66 GPaとして解析を行った。拘束条件は、ガラス基板をx、z方向に対して完全固定とし、PDMSダイアフラムをx方向のみ固定とした。また、細胞とPDMSダイアフラム、細胞とガ

ラス基板との各接点もx方向のみ固定とした。解析モデルは軸対称モデルであり、超弾性接触解析を行った。また、PDMSダイアフラムが細胞に対して十分に大きい事を考慮してダイアフラムを平板とみなしモデル化した。図8の解析結果に示すように、圧縮刺激を受ける細胞の内部では、細胞の中心部分が最も大きなひずみを受け、本解析条件下では約55%のひずみを受けることがわかった。また、x方向とz方向共にひずみが最大となる中心部から、細胞の外周に近づくにつれてひずみが小さくなるような分布であることもわかった。図6(f)の結果と照らし合わせると、細胞中心部の蛍光強度が最も高く、最も大きな刺激を受けていることが推測されることから、FEM解析と実験結果との間に相関が取れていることを実証できた。このように、構築したデバイスを用いたリアルタイム観察とFEM解析とを併用することによって、圧縮刺激を受けた細胞の内部に生じるひずみ量を定量的に表すことができた。また、細胞内部のひずみ分布も視覚化することができるため、刺激に対する細胞応答発生部位や発生した応答の伝播経路の特定など、細胞のバイオメカニクスを評価・解明する手法としての有用性を示すことができた。

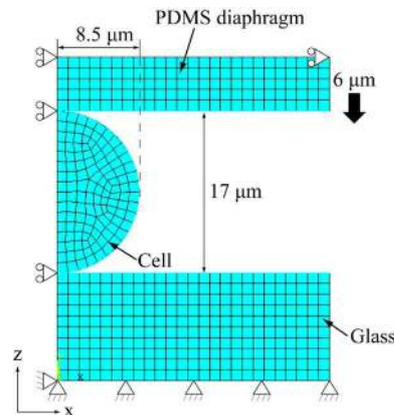


図7 有限要素法解析の解析モデル

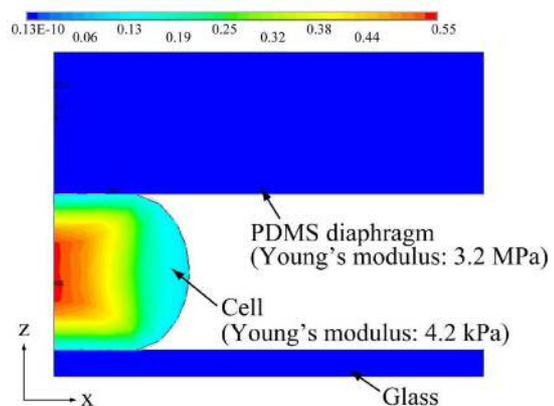


図8 FEM解析による細胞内ひずみ分布

本研究により構築したマイクロデバイスを
用いることによって動的な圧縮刺激に対
する細胞応答をリアルタイムで評価する
ことが可能であり、実験による評価とFEM
解析とを併用することによって細胞の力
学刺激受容機構の解明や細胞内情報伝
達経路の解明に応用可能であることが
示唆された。また、本デバイスは、外
部刺激による幹細胞の分化誘導技術
の開発にも寄与できるものと考えられ
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1件)

- ① Yuta Nakashima, Yin Yang, and Kazuyuki
Minami, “Development of a Micro Cell
Compression Stimulator for Evaluating
Real-time Cellular Responses,” Review
of Scientific Instruments, 83, 055004
(2012); doi: 10.1063/1.4717683(査読有)

[学会発表] (計4件)

- ① 楊寅, 中島雄太, 南和幸, “細胞への圧縮
刺激負荷マイクロデバイスの製作と細胞
応答観察,” 第29回「センサ・マイクロ
マシンと応用システム」シンポジウム,
pp. 680-684, 2012年10月22-24日, 北
九州国際会議場(北九州).
- ② Yin Yang, Yuta Nakashima, and Kazuyuki
Minami, “Design and Fabrication of a
Micro Cell Mechanical Stimulator for
Cell Differentiation Induction,” The
3rd International symposium on Digital
Manufacturing, pp. 65-70, Nov. 29- Dec.
2, 2011, Rihga Royal Hotel Kokura
(Kitakyushu).

- ③ Yuta Nakashima, Yin Yang, and Kazuyuki
Minami, “Fabrication of a Dynamic
Compression Stimulus Microdevice to
Cells for Evaluating Real-time Cellular
Response,” 2011 IEEE International
Symposium on Micro-NanoMechatronics
and Human Science, pp. 174-179, Nov. 4-7,
2011, Nagoya University (Nagoya).

[図書] (計1件)

- ① Yuta Nakashima, Katsuya Sato, Takashi
Yasuda, and Kazuyuki Minami, “Cell
Differentiation Induction Using
Extracellular Stimulation Controlled
by a Micro Device,” Pheochromocytoma
- A New View of the Old Problem, 2011,
164 pages, pp. 47-62.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 雄太 (NAKASHIMA YUTA)
山口大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号: 70574341

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: