

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710145

研究課題名(和文) 誘電泳動を活用した真皮・表皮細胞からなる多階層マイクロ皮膚チップの創製

研究課題名(英文) Multilayered Cell Assembling Technology Using Dielectrophoresis and Construction of Multilayered Skin Tissue Array

研究代表者

宮田 昌悟 (MIYATA, Shogo)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：70376515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、交流電場下に細胞を配置することで細胞に泳動力を生じさせる誘電泳動現象に着目し、この現象を用いた細胞アセンブリ技術と試料液の導入の精細な制御システムを複合化することで、多段階での細胞の集積化を可能とする細胞アセンブリシステムを構築した。さらに、開発されたシステムを用いて真皮および表皮細胞の多階層集積化と細胞チップ化を実施した。この細胞チップを7日間培養したところ、多層を成す皮膚構造が再構築された。アルコールを用いた刺激試験に対しても、刺激応答性が確認できた。

以上、真皮・表皮細胞から構成される多階層培養皮膚エレメントの創製を実施し、薬効試験用の細胞チップとしての有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to reconstruct multilayered structure of micro organization using dielectrophoresis (DEP). DEP is a phenomenon in which a force is generated on a cell or particle when it is subjected to a non-uniform electric field. In this study, alginate-collagen micro-beads were developed for dielectrophoresis experiments and cell adhesive scaffold. Dermal and epidermal skin cells were assembled by DEP force to cover the beads and to construct multilayered structure. After the cell assembly, the cell-accumulated beads were cultured in vitro to reconstruct multilayered skin tissue. Finally, the cell viability and proliferation of the cultured constructs were maintained during 7 days culture.

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：多階層組織 真皮 表皮 誘電泳動 細胞チップ

1. 研究開始当初の背景

創薬や化粧品開発では、臨床応用までに動物実験による薬効評価試験が必要不可欠であるが、動物実験にはコスト面や倫理的側面から問題が多い。すでに EU 圏では 2007 年より化学物質規制法 REACH が実施されて企業負担の安全性評価が義務づけられており、新製品開発における評価に際して動物実験に代替する試験法が存在する場合は、その代替試験法の使用を求める規制がある。このような状況を鑑みて、動物実験の代替試験手法として生体外で細胞を用いて再生された培養組織を検査用のサンプルとする試験法に注目が集まっている。

申請者はこれまでに幹細胞や軟骨細胞を対象にして、電気的吸引力を用いて細胞を三次元的に集積した後に培養することで微小組織を再生する、マイクロ細胞アセンブリ技術の研究開発を行っている。このマイクロ細胞アセンブリ法の基本原理には誘電泳動現象を応用している。誘電泳動力は不均一な電界に置かれた微粒子に生じる力であり、電気泳動力と異なり交流電場での作用が可能となるため細胞の吸引力として至適である。

申請者はこれまでの成果として、軟骨細胞を培養担体となるコラーゲンゲルからなるマイクロビーズ周辺に集積化する技術を開発し、微小な細胞凝集体のアレイ化に成功して知財化も行っている(特願 2010-204989)。申請者は上述の研究成果を基盤にさらに発展させて、複数の細胞種を段階的に集積することにより生体組織に極めて近い階層構造を模擬し、かつ、微小な組織のアレイ化を行うことで、動物試験に代替する検査用細胞チップを創製するという着想に至った。

2. 研究の目的

本申請課題では、創薬、化粧品分野における動物実験に代替可能な検査用細胞チップとして多階層構造を有する培養皮膚マイクロアレイチップの開発を最終目標とする。

そのために、研究開発期間では、申請者の確立した誘電泳動によるマイクロ細胞アセンブリ法を基盤として、複数種の細胞を段階的に多階層構造をなすように集積する細胞アセンブリ技術の創製を目的とす。具体的な研究項目は、(i)真皮細胞、表皮細胞の段階的なマイクロアセンブリ技術の開発およびリアルタイムでのアセンブリモニタリング装置の構築、(ii)真皮・表皮からなる多階層細胞スフェロイドのアレイ化、を行った。

3. 研究の方法

本申請研究では、真皮細胞、表皮細胞から構築される多階層構造を有する培養皮膚を創製する。

(1) 細胞ビーズ封入法の確立

本研究では真皮細胞を包含し、かつ、表面に表皮細胞が接着可能な形態として、アルギン酸-コラーゲンゲルから構成されるマイ

クロビーズを開発した。具体的な作製手法を以下に示す。

アルギン酸マイクロビーズ溶液は、溶質にアルギン酸ナトリウムを用いて低導電性緩衝溶液 (Low Conductivity Buffer : LCB) に濃度が 1 %となるように調製した。細胞が懸濁されたビーズ構築用の溶液は、アルギン酸ナトリウムの濃度が 1 %となるように、LCB にマウス由来の真皮由来繊維芽細胞 (UV B16-1.1) とともに混合させて細胞懸濁ビーズ溶液とした。UV B16-1.1 細胞の濃度は 3.5×10^6 , 5.0×10^6 cells/ml とした。マイクロビーズは、シリンジポンプを用いて流量 0.05 ml/min でテーパを無くした 21 G 注射針から押し流し、窒素ガスを用いてスターラで攪拌したゲル化溶液に滴下することで微粒子化させた。ゲル化溶液は、塩化カルシウム溶液 (102 mM) を使用した。滴下されたゲル化溶液を複数種の口径のフィルタを通過させることで、約 80 μm の直径のマイクロビーズを回収し、LCB に懸濁して試料とした。マイクロビーズ作製方法を図 1 に示す。

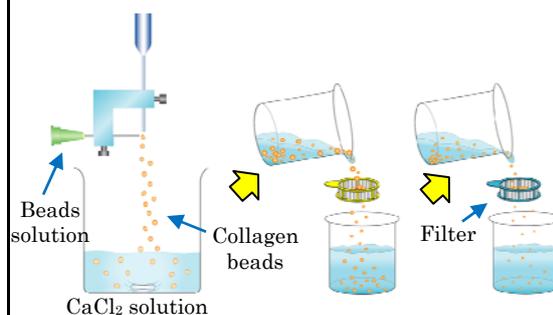


図 1. 細胞含有マイクロビーズ作製法

(2) 細胞集積用誘電泳動チップの開発

交流電圧を印加する誘電泳動チップは ITO (Indium Tin Oxide : 酸化インジウムスズ) 薄膜付ガラス 2 枚およびシリコンガスカート 1 枚を組み合わせて構成した。ITO の膜厚は 3000-3600 Å である。シリコンガスキットの厚さは 0.5 mm とした。チャンバの下側の ITO 薄膜には、MEMS 技術を用いて絶縁体である厚膜フォトリソ剤 (SU-8, Microchem, USA) を塗布し、ドット形状に電極を構築した。電極の直径は 50 μm 、電極間距離は 350 μm とした。電極の概略図を図 2 に示す。チップの電極構造は、上面が面電極、下面がドット形状の点電極であり、上下に交流電圧を印加して不均一な電界を発生させた。本研究では、電界強度の強い点電極上にビーズおよび細胞が集積される正の誘電泳動を活用した。

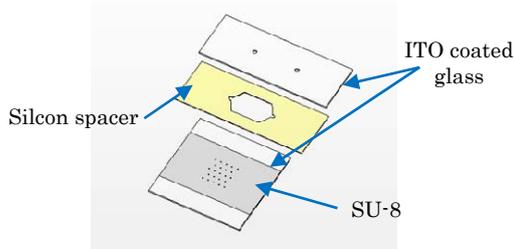


図 2. 誘電泳動用チップ

(3) 簡易型共焦点レーザー観測系の構築

正立型顕微鏡 (E600, Nikon) の光学系を改良し、レーザー光源 (OBIS 488nm, コヒーレント), ガルバノミラー, レゾナントミラー制御系, 光電子増倍管による蛍光強度観測系の組み込みを行い, 簡易型の共焦点レーザー観測系を構築した (図 3). なお, この光学系は誘電泳動を用いた細胞構築用のシステムが観察系に十分に収まるように対物レンズ周辺にクリアランスを確保してある.

また, 蛍光ビーズを用いた予備観察実験を実施し, 微弱な蛍光の観察が可能であることも確認している.



図 3. 簡易型共焦点レーザー光学系

(4) 多階層皮膚モデルのアレイ化 (細胞チップ開発)

実験にはマウス由来の表皮メラノーマ細胞 (B16F10), マウス由来の真皮繊維芽細胞 (UV B16-1.1) を使用した. 誘電泳動実験では B16F10 細胞は細胞濃度 2.0×10^6 cells/ml となるように LCB に懸濁した. また, UV B16-1.1 細胞は (1) に記述した方法でゲルビーズに包含した.

誘電泳動による細胞操作はファンクションジェネレータ, アンプを用いて安定した交流電圧を誘電泳動用チップに印加することで実現した. チップに印加される電圧はオシロスコープによりモニタリングした.

具体的な手順は, 真皮線維芽細胞を包含するマイクロビーズに B16F10 細胞を誘電泳動力によって集積する方法を採用した (図 4). 集積条件は, マイクロビーズは印加電圧を $25 V_{p-p}$, 泳動周波数を 500 kHz, 平均流速 0.67×10^{-2} m/s, 1.3×10^{-2} m/s, B16F10 細胞は印加電

圧を $20 V_{p-p}$, 泳動周波数を 500 kHz, 平均流速 0.67×10^{-2} m/s とした. さらに, 集積後に余分な細胞微粒子を取り除くために LCB の注入を集積後に実施し, このときの条件は印加電圧を $20 V_{p-p}$, 泳動周波数を 500 kHz, 平均流速 0.67×10^{-2} m/s とした.

細胞の階層構造を観察, 評価するために蛍光染色を集積作業前にあらかじめ実施した. 染色は, B16F10 の生細胞を赤色に染色する Calcein-Red Orange 溶液 (濃度 $50 \mu\text{g/ml}$), 細胞懸濁ビーズの生細胞を緑色に染色する Calcein-AM 溶液 (濃度 $2 \mu\text{g/ml}$) に懸濁して, 37°C で 5% CO_2 , 湿度 95 % の環境下で 45 min 静置することにより行った. 多階層の集積実験の後に, チャンバに 488 nm (G 励起) の励起光を当て, 蛍光顕微鏡により細胞懸濁ビーズを観察した. Calcein-AM による蛍光染色の後, 535 nm (B 励起) の励起光を当て, Calcein-Red Orange の染色が施された B16F10 細胞を蛍光顕微鏡により観察した.

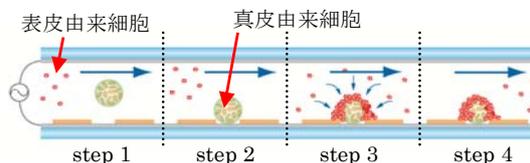


図 4. 誘電泳動チップによる多階層細胞集積

さらに, 多階層細胞集積ビーズを培養し, 培養後に蛍光染色による生存性と組織再生の評価を実施した. 具体的な手法を以下に示す. 三次元培養は, 37°C で 5% CO_2 , 湿度 95 % の環境下で培養を行った. 培養液は, 抗菌・抗生物質 (Antibiotic - Antimycotic) を添加した培養液 DMEM/F-12 + Antibiotic-Antimycotic + 10% FBS を使用した.

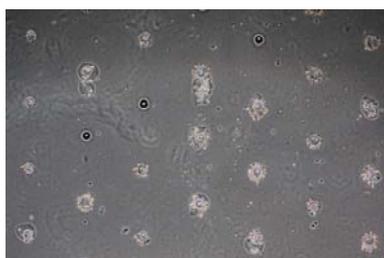
培養後の蛍光染色は, 生細胞を緑色に染める Calcein-AM (濃度 $2 \mu\text{g/ml}$), 死細胞を赤色に染める PI (濃度 $4 \mu\text{g/ml}$) を使用した. 蛍光染色溶液を, シリンジポンプを用いて平均速度 4.7×10^{-6} m/s で細胞チップに注入した. 蛍光染色溶液を注入した後, 37°C で 5% CO_2 , 湿度 95 % の環境下で 60 min 静置した. 静置後, チャンバに 488 nm (G 励起) の励起光を当て, 蛍光顕微鏡により細胞を観察した. Calcein-AM による蛍光染色の後, 535 nm (B 励起) の励起光を PI で染色されたチャンバに当て, 蛍光顕微鏡により細胞の観察を行った. 撮影された蛍光画像を, 画像解析ソフトを用いて画像処理を施し, 生死判定を行った.

4. 研究成果

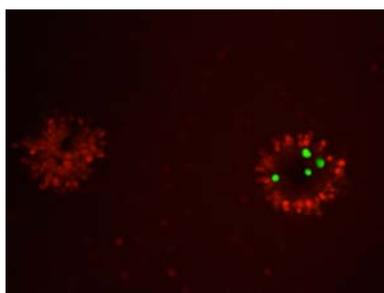
(1) 誘電泳動による細胞の多階層集積および蛍光染色

真皮細胞を包含するビーズを用いた皮膚由来細胞の多階層集積実験では, 複数の個所で同時に真皮由来細胞を包含するビーズが単体でトラップされ, その後にビーズの周囲

に表皮由来細胞を集積させることができた (図 5a). 特に電極の直径よりもマイクロビーズの径が大きくなるようにすることで, 真皮由来細胞を包含するゲルビーズを1個ずつ電極にトラップすることができた. しかしながら, マイクロビーズの周囲全体を細胞が覆うように集積させることはできず球体の下側半分を覆うような集積形態となった. 細胞に蛍光染色を施して実験を行うことで, 真皮由来細胞を包含するビーズの周囲に表皮由来細胞が集積できたことがわかった (図 5b). 誘電泳動およびマイクロビーズを利用することで, 細胞の多階層アセンブリが可能であることが示唆された.



(a)



(b)

図 5. 誘電泳動による二層細胞集積. (a) 位相差画像, (b) 蛍光染色画像.

(2) 三次元培養および蛍光染色による生存性評価

培養実験では, 培養期間が4日を経過しても, 表皮由来細胞はそのほとんど誘電泳動用チップ表面に接着することなく, 真皮由来細胞が包含されたビーズの周囲に留まっていることがわかった (図 6). 集積された表皮由来細胞数は培養が進むにつれて, ビーズの周囲に三次元的に接着して増殖していることが示唆された (図 7). 培養後, 二重蛍光染色を施すことで, 細胞の生存性が保たれた状態で多階層的に培養ができていたことがわかった. 死細胞はほぼ確認されなかった. 今後は培養日数を増やすことで, 細胞懸濁ビーズを覆うように表皮由来細胞が伸展し, 真皮・表皮組織からなる微小な皮膚組織エレメントのアレイ化が実現できると期待される.

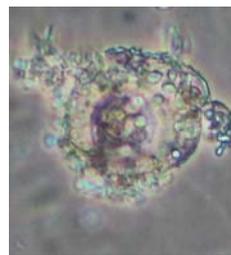


図 6. 培養4日目の真皮・表皮由来細胞からなる複合エレメント

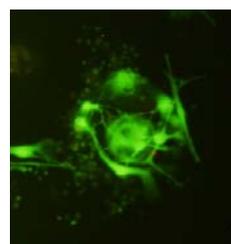


図 7. 培養4日目における蛍光染色による生死判定 (Calcein-AM および PI による二重線色)

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 山崎慎也, 宮田昌悟, 組織・細胞共培養モデルにおいて滑膜細胞の炎症反応が関節軟骨の力学特性に与える影響, 日本機械学会論文集, 査読有, Vol. 80, No. 812, 2014, p. BMS0108
DOI: 10.1299/transjsme.2014bms0108
- ② 奥田祐也, 小西励, 宮田昌悟, 周期的圧縮刺激培養が再生軟骨組織の異方性に与える影響, 日本機械学会論文集 C 編, 査読有, Vol. 79, No. 801, 2013, pp. 1736-1743
DOI: 10.1299/kikaic.79.1736

[学会発表] (計 12 件)

- ① Kaori Shikano, Shogo Miyata, Effect of Tension on Human Skin Fibroblast in Collagen Gel Simulating Wound Healing Process, 7th World Congress of Biomechanics, July 6-11, 2014, Boston (USA).
- ② Yuta Ojima, Shogo Miyata, Combined effect of compression and electrical stimuli simulating in vivo condition on material properties of tissue engineered cartilage, The 12th International Conference on Biomedical Engineering, Dec. 4-7, 2014, Singapore.
- ③ Toshifumi Ohi, Shogo Miyata, Cell culture device for mesenchymal stem

cells and control of differentiation to regenerate an interface of two tissues in a single-phase hydrogel, The 12th International Conference on Biomedical Engineering, Dec. 4-7, 2014, Singapore.

- ④ Yuwa Takahashi, Shinya Takeuchi, Shogo Miyata, High Throughput Cell Sorting Device Using Dielectrophoresis and Fluid-Induced Shear Force, Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2013 35th Annual International Conference of the IEEE, July 3-7, 2013, Osaka (Japan).
- ⑤ Minami Yamashita, shogo Miyata, Shinya Takeuchi, Hajime Inoue, Separation method of blood constituents using dielectrophoresis and flow-induced shear force, Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2013 35th Annual International Conference of the IEEE, July 3-7, 2013, Osaka (Japan).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.miyata.mech.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 昌悟 (MIYATA, Shogo)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：70376515

(2) 研究分担者

該当なし.

(3) 連携研究者

該当なし.