

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560187

研究課題名(和文) マイクロピラーを実装した革新的細胞遊走性評価デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of novel microchannel device for cell migration with micropillar array

研究代表者

大橋 俊朗(Ohashi, Toshiro)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30270812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞遊走は損傷治癒部位への血管新生や癌の転移など様々な疾患の発達やその治癒に関わる非常に重要なプロセスでもあることからその運動メカニズムを力学的に解明することは極めて重要である。本研究課題では、細胞遊走時における細胞の力学的挙動の解析が可能な革新的マイクロチャネルデバイスを開発することを目的とする。研究期間内に、マイクロピラーを実装したマイクロチャネルデバイスを開発し、マイクロピラーの剛性を変化させたり、マイクロピラーの剛性に異方性を持たせることで細胞の遊走速度を変化させることができた。このように局所力学環境を正確に制御し、より詳細に細胞遊走と力学環境の関係を検討することができた。

研究成果の概要(英文)：Cell migration is known to play an important role in a number of physiological events in living body such as morphogenesis, wound healing, and tumor metastasis. It is therefore important to study the mechanism of cell migration from the viewpoint of mechanics. The objective of this study is to newly design and fabricate a multichannel device integrated with micropillar technology to evaluate cell traction forces during cell migration. The multichannel device has been successfully fabricated, which allows to modulate cell migration rate by changing the stiffness of micropillars and by giving the micropillars anisotropic properties.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス 細胞遊走 マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

細胞遊走は大きく分けて chemotaxis (細胞走化性因子の濃度勾配による遊走), haptotaxis (細胞活性因子の濃度勾配による遊走), そして mechanotaxis (力学因子による遊走) の3つに分類される. 近年のバイオメカニクス研究の発展により, 外部からの力学刺激および組織の局所的力学環境が様々な疾患の発生・発達に関与していることが分かり, それにともなう細胞遊走すなわち mechanotaxis に注目が集まっている. 研究協力者 (海外共同研究者) の Prof. Justin Cooper-White (The University of Queensland, Australia) は MEMS 技術を用いて細胞遊走を波の伝播のように観察することのできるマルチチャンネル遊走デバイスを開発した (Doran et al., Lab Chip, 9, 2364-2369, 2009). 本研究課題では, さらにこのデバイスを発展させ, MEMS 技術を用いてポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロピラー (微小な弾性列柱) を細胞遊走面に実装し遊走する細胞の牽引力を計測する (図 1). 細胞遊走時の牽引力計測は仏国の Prof. Ladoux らのグループによって報告されているが (Ghibaudo et al., Biophys J, 97, 357-368, 2009), 計測条件が限られ特に細胞骨格構造や細胞と基質の接着面に形成される接着斑のダイナミクスは検討されていない.

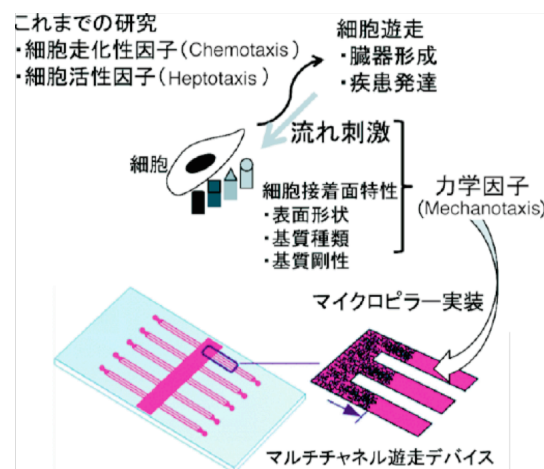


図 1 細胞遊走性評価デバイスの概略図

2. 研究の目的

細胞遊走は組織や臓器の発達と恒常性の維持に関わる細胞の基本的な機能であり, かつ損傷治癒部位への血管新生や癌の転移など様々な疾患の発達やその治癒に関わる非常に重要なプロセスでもある. 細胞遊走は細胞運動の一形態であり, 細胞が周囲の組織・組織に対して力を発生することで遊走を実現させていることからその運動メカニズムを力学的に解明することは細胞の基本的機能を理解し, さらに細胞遊走性の制御を試みる上で極めて重要である. そこで本研究課題では, 細胞遊走時における細胞の力学的挙動の詳細な解析が可能な革新的マイクロチャ

ネルデバイスを開発することを目的とする. マイクロチャネルデバイスはポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロピラー (微小な弾性列柱) を底面に実装し, 遊走する細胞の牽引力をマイクロピラーのたわみによって計測するものである. さらに, 本デバイスにより細胞遊走性に及ぼす細胞外物理環境の影響を併せて調べる事が可能である.

3. 研究の方法

本研究課題では, 細胞遊走解析における新しい実験技術として, 規則的に遊走する細胞の牽引力をリアルタイムで計測する革新的なデバイスを開発する. 細胞遊走底面に実装するマイクロピラーの剛性を変化させること, さらにマイクロフルイディクス技術により微小流れを発生させること等を通して, 細胞遊走性に及ぼす細胞外物理環境の影響を調べる. 平成 25 年度は, マイクロピラーを実装したマイクロチャネルデバイスを開発する. 平成 26 年度以降は, マイクロピラーのデザインを変化させる, 微小流れを負荷する等により細胞遊走性に及ぼす細胞外物理環境の影響を詳細に調べる.

【平成 25 年度】

(1) マイクロピラー実装マイクロチャネルデバイスの設計 (大橋, Cooper-White)

開発するデバイスの概略を図 2 に示す. 本デバイスはポリジメチルシロキサン (PDMS) により作製する. Prof. Justin Cooper-White が提案したマルチチャンネルデバイスを基盤にし, 細胞をコンフルエント状態まで培養させるために設けられた液溜め部, およびその片側に接続された細胞が遊走するための複数のマイクロチャネル (幅 200 μm , 高さ 50 μm を予定) により構成する. マイクロチャネルは 6 本で 1 ユニットを構成し, 一端が 1 つのシリンジポートに接続するように, 合計 4 ユニット 24 本のマイクロチャネルおよび 4 つのシリンジポートを設ける. この冗長性により同時に多くの実験が可能である. マイクロチャネルは底面にマイクロピラーが組み込まれていない参照用マイクロチャネルと底面にマイクロピラーを組み込んだマイクロチャネルを設ける. 典型的なマイクロピラーの寸法は高さ 8 μm , 直径 3 μm , 中心間距離 8 μm である.

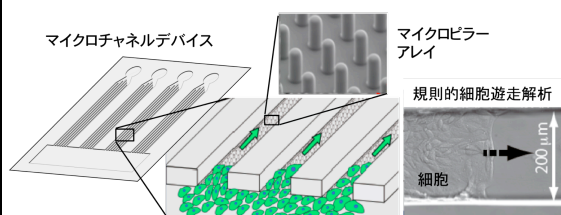


図 2 マイクロピラー実装マイクロチャネルデバイスの概要

(2) マイクロピラー実装マイクロチャネルデバイスの作製 (大橋, Cooper-White)

本デバイスはフォトリソグラフィ技術 (MEMS 技術) によりシリコンウエハ上にフォトレジストを成膜してマスターを作製した後, ソフトリソグラフィ技術により PDMS で型取りしてパターンを転写する方法により作製する. 本デバイスの構造は, マイクロチャネルの底面にマイクロピラーが組み込まれた複雑な構造を有する. フォトリソグラフィにおいては2枚のフォトマスク (1枚目はマイクロピラーに, 2枚目はマイクロチャネルに用いる) を用いてプロセスを実行する. マイクロチャネルの高さは 50 μm 程度を想定しているため, 厚膜フォトレジスト SU-8 を用いる. 続いて, ソフトリソグラフィにおいては1回目の型取りでネガティブモールドを作製し, 表面をシランコーティングして PDMS 同士の接着性を防止した後, 2回目の型取りで最終形状を得るという Double casting 法を用いる. 作製したデバイスの形状は形状測定レーザー顕微鏡や SEM を用いて観察し, 設計値との比較を行い適宜修正する.

【平成26年度以降】

初年度に設計・作製したマイクロピラー実装マイクロチャネルデバイスを用いて平成26年度以降では細胞遊走実験を行う. また必要であれば開発したデバイスの改良を行う. 細胞培養実験では, 以下の実験項目に掲げるマイクロピラーの剛性を変化させた実験およびマイクロフルイデックスを用いた微小流れ負荷実験に着手し, 細胞遊走性に及ぼす細胞外物理環境の影響を詳細に調べる.

(1) マイクロピラーの剛性変化 (大橋)

典型的なマイクロピラーの寸法は高さ 8 μm , 直径 3 μm , 中心間距離 8 μm である. マイクロチャネルの下流方向に対して, マイクロピラーの剛性を変化させる (直径を変化させる) ことで細胞の遊走性を制御できる. 高い剛性では遊走速度は速く, 低い剛性では遊走速度は遅いことが想定される. また, マイクロピラーの形状を円形から楕円形にすることで, マイクロチャネルの長手方向と直交方向に剛性の異方性を与えることができる. これにより細胞遊走性をマイクロチャネル下流方向へさらに整えられる可能性がある (整流作用).

(2) マイクロフルイデックスの実装 (大橋)

上記1の実験系に加えて, マイクロチャネル内にマイクロフルイデックス技術を用いて, 微小流れを負荷する. これは, 生体内流れ場 (血液, 間質液) を再現した実験系であり, 臨床と関連が深い血管内皮細胞の遊走や癌細胞の遊走を検討するものである. 微小流れはシリンジポンプにより実現し, 流れ場の計測は microPIV 法により行う. 流れ負荷刺激は, 間質液流れ数 mPa から血液流れ数 Pa を想定している.

(3) 細胞遊走実験 (大橋, Cooper-White)

正常細胞として, MDCK 上皮細胞や血管内皮細胞, 腫瘍細胞として血中腫瘍細胞 (CTC) 等を用いる. マイクロチャネル底面のマイクロピラー上面には予めマイクロコンタクトプリント法によりフィブロネクチン等の細胞外マトリクスをコーティングしておく. 細胞懸濁液を細胞液溜め部に播種した後, コンフルエント状態まで細胞培養を行う. シリンジポート (液溜め部の反対側のポート) から培養液を流し込むことでマイクロチャネル内への細胞遊走を引き起こす.

(4) 細胞遊走時の牽引力計測 (大橋, Cooper-White)

細胞は遊走する際に基質に対して摩擦力 (牽引力) を発生させながら前進する. したがって, PDMS 製マイクロピラーはこの牽引力によりたわみを生じるため, このたわみを計測することにより牽引力を推定することができる. 観察は倒立方顕微鏡下にて 30 分~1 時間毎に 24 時間まで行い, 細胞遊走に伴う, 牽引力ダイナミクスを評価する. また GFP-アクチンを予め導入することで細胞遊走時の骨格構造変化も追跡する. すなわち, 細胞牽引力, 細胞遊走速度, 骨格構造変化を経時的に評価することで細胞遊走の力学的メカニズムを考察するものである.

4. 研究成果

微細加工技術を用いて製作したポリジメチルシロキサン (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, USA) 製のマイクロピラー実装マルチチャネルデバイスの概略図を図 3 に示す. このデバイスは, 細胞をコンフルエント状態まで培養させるために設けられた液溜め部 (3 mm \times 15.8 mm), およびその片側に接続された, 細胞が遊走するための複数の微小流路 (幅 200 μm , 高さ 50 μm) により構成されている. 微小流路は 6 本で 1 組を成し, それら 6 本的一端が1つのシリンジポートに接続するように, 合計 4 組 24 本の微小流路および 4 つのシリンジポートを設けた. 図 1 内の拡大図に示すように, 微小流路 1 組内の 6 本の微小流路について左から順に流路 1~6 (Channel 1-6) とした. 流路 1 および 6 は底面にマイクロピラーが組み込まれていない参照用流路 (Reference channel) として用い, 流路 2~5 は遊走時の細胞牽引力が計測できるよう底面にマイクロピラーを組み込んだ. 流路ごとにパターンの異なるマイクロピラ

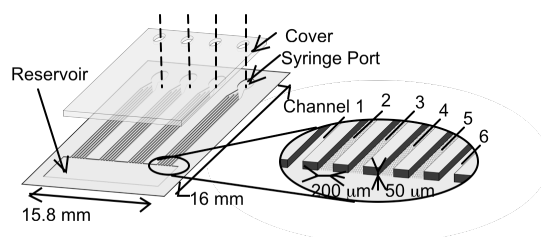


図 3 作製したマルチチャネルデバイス

ー (高さ $6.5 \mu\text{m}$, 直径 $2\sim 3 \mu\text{m}$, 中心間距離 $5\sim 8 \mu\text{m}$) を設け, 牽引力計測に加え, 細胞の接着基質の剛性およびマイクロピラー間の距離の違いが細胞牽引力および遊走速度に及ぼす影響も評価できるようにした. 流路 2 と 3 は直径 $2 \mu\text{m}$, 流路 4 と 5 は直径 $3 \mu\text{m}$ としたため, バネ定数はそれぞれ $17 \text{ nN}/\mu\text{m}$, $87 \text{ nN}/\mu\text{m}$ である. 細胞遊走実験の結果, 細胞同士が密に結合し合いながら組織的に遊走する様子が確認できた. バネ定数が高い流路 (流路 4 と 5) の方が細胞遊走速度は大きかった. 以上の結果から, 細胞は基質の剛性の違いを認識し剛性のより高い場合高い牽引力を発生させながら遊走することがわかる.

また, マイクロピラーに異方性を持たせたデバイスを作製した (図 4). マイクロチャンネル 2, 3 ではマイクロピラーの楕円断面の長軸方向がマイクロチャンネルと平行に, マイクロチャンネル 4, 5 では楕円断面の短軸の方向がマイクロチャンネルと平行になるように配置した. 長軸方向は $4 \mu\text{m}$, 単軸方向は $2 \mu\text{m}$, 高さは $7.5 \mu\text{m}$, スペーシングは $8 \mu\text{m}$, ばね定数は長軸方向 $89 \text{ nN}/\mu\text{m}$, 単軸方向 $22 \text{ nN}/\mu\text{m}$ である. マイクロピラー長軸方向をマイクロチャンネルに平行な方向に配置した場合, 推定遊走速度を算出したところ $8.47 \mu\text{m}/\text{h}$ であった (マイクロチャンネル 2, 3). 一方, マイクロピラー長軸方向をマイクロチャンネルと垂直な方向に配置した場合, 遊走速度は $3.97 \mu\text{m}/\text{h}$ であった (マイクロチャンネル 4, 5). 牽引力計測の結果 (遊走 12 時間後), マイクロピラー長軸方向をマイクロチャンネルに平行な方向に配置した場合, 牽引力はマイクロチャンネルの方向に大きく発生していたが, マイクロピラー長軸方向をマイクロチャンネルに垂直な方向に配置した場合, 牽引力はマイクロチャンネルと垂直な方向に大きく発生していた. すなわち, 楕円断面の長軸方向がマイクロチャンネルに平行か垂直かにかかわらず, 牽引力は楕円長軸方向に大きく発生している傾向が見られた. 以上の結果から, 基質の剛性に異方性が存在する場, 細胞群全体としても基質の剛性の違いを認識し剛性のより高い方向へ高い牽引力を発生させながら遊走することがわかる.

以上のように, 本デバイスにより細胞遊走性に及ぼす細胞外物理環境の影響を詳細に調べることが可能となり, 細胞遊走における力学環境のより深い理解が期待できる.

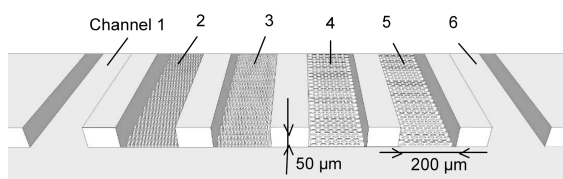


図 4 異方性マイクロピラーを有するマルチチャンネルデバイス

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)

[学会発表] (計 14 件)

1. T. Ohashi, Development of Bio-MEMS devices for cell culture study, The 18th East Asia Round Table Meeting&International Symposium, 2015年11月2日~2015年1月3日, 武漢 (中国)
2. T. Ohashi, Development of microdevices for mechanical characterization of cells, International Congress on Science, Technology and Interdisciplinary Research 2015, 2015年9月22日~2015年9月24日, Bandar Lampung (Indonesia)
3. T. Ohashi, Traction force measurement of migrating fibroblasts using microchannel device, 15th International Congress of Biorheology, 2015年5月24日~2015年5月28日, ソウル (韓国)
4. T. Ohashi, Bio-MEMS devices for mechanical characterization of cells, International BioMedical Engineering Conference, 2014年11月20日~2014年11月22日, 光州 (韓国)
5. T. Ohashi, Bio-MEMS devices towards high throughput cell analysis, JSPS 中国支部大会, 2014年10月8日, 重慶 (中国)
6. 大橋 俊朗, 細胞物理環境の制御および計測実験のためのバイオ MEMS デバイスの開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第30回研究会, 2014年10月2日, 北海道大学 (札幌市)
7. T. Ohashi, Development of Bio-MEMS devices for cell culture study, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 2014年9月1日~2014年9月4日, 志摩観光ホテル (伊勢市)
8. T. Ohashi, C. Shaoy, J. Cooper-White, Traction force microscopy-based mechanical characterization of cell migration using microchannel device, 7th World Congress of Biomechanics, 2014年7月6日~2014年7月11日, Boston (USA)
9. 大橋 俊朗, マイクロデバイスを用いた細胞バイオメカニクス解析, 数学・数理科学と諸科学・産業との協働によるイノベーション創出のための研究推進プログラム, 2014年2月26日~2014年2月28日, 明治大学 (東京)
10. 大橋 俊朗, 菅原 章人, Justin Cooper-White, マイクロチャンネルデバイスを用いた細胞遊走観察と牽引力計測, 日本機械学会 M&M2013 材料力学カンファレンス, 2013年10月11日~2013年10月14日, 岐阜大学 (岐阜市)
11. T. Ohashi, Microdevices for mechanical characterization and mechanical responses of cells, 日本化学工学会 70 回記念大会, 2013年9月28日~2013年9月30日, 東北大学 (仙

台市)

12. 大橋 俊朗, 菅原 章人, Justin Cooper-White, マイクロチャネルデバイスを用いた細胞遊走観察と牽引力計測, 日本機械学会 2013 年度年次大会, 2013 年 9 月 9 日～2013 年 9 月 11 日, 岡山大学 (岡山市)

13. T. Ohashi, A. Sugawara, Traction force measurement during collective cell migration by multichannel micropillar device, ASME 2013 11th International Conference on nanochannels, microchannels, and minichannels, 2013 年 6 月 16 日～2013 年 6 月 19 日, 北海道大学 (札幌市)

14. 大橋 俊朗, 菅原 章人, Justin Cooper-White, マイクロチャネルデバイスを用いた細胞遊走時の牽引力計測, 第 36 回日本バイオレオロジー学会年会, 2013 年 6 月 6 日～2013 年 6 月 8 日, 九州大学西新プラザ (福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋 俊朗 (OHASHI, Toshiro)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号 : 30270812

(2)研究協力者

Prof. Justin Cooper-White (The University of Melbourne, Australia)