

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560210

研究課題名(和文) オンチップ脂肪細胞培養によるプログラマブル培養・計測・制御システム

研究課題名(英文) A programmable system for culture, measurement, and control of fat cell behavior on a chip

研究代表者

小西 聡 (Konishi, Satoshi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：50288627

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)：オンチップ脂肪細胞培養によるプログラマブル培養・計測・制御システムの構築を目指した。特に、脂肪細胞培養デバイスチップおよびシステム化に関する研究を推進した。培養デバイスチップに関しては、MEMS技術を用いて培地供給機能、薬液投与機能を実現した。40mm角のデバイスチップに複数培養ウェルを配し、並列処理を可能とした。システムに関しては、培地および薬液注入制御機能を実現し、精密ステージによる薬液注入量の高精度制御や脂肪細胞の顕微鏡カメラ撮像等を可能とした。画像計測結果に基づき、パソコンのプログラムによる薬液投与制御が可能となった。実現したシステムを用いた脂肪細胞培養を通して動作検証にも成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to construct a system for programmable culture, measurement, and control of fat cell on a MEMS chip. We focused on development of the MEMS chip for fat cell culture as well as systemization. A MEMS chip was integrated with supply function of culture medium and chemical solutions. Three layers of polymers were bonded to form wells and channels in a chip. Several culture wells were prepared on a chip of 40mm square. A constructed system was equipped with a controller of supply of culture medium and chemical solutions. It has also become possible to capture microscopic images of cultured fat cell. Measurement results were feedback to control conditions of cultured fat cell through a computer. Real fat cell was successfully cultured and controlled by our system. As a result, developed efficient system for controllable cell culture will contribute to further investigation of fat cell.

研究分野：マイクロマシン

キーワード：ナノバイオシステム 脂肪細胞 バイオチップ

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、メタボ、代謝解析のための脂肪細胞を取り上げ(図1参照)その培養・計測・制御系構築を目的とする。研究分担者の橋本らは、培養脂肪細胞研究により、複数の脂肪滴表面タンパク質による脂肪分解制御機構を世界に先駆けて明らかにし、脂肪合成・分解の分子モデルを新規に提唱してきた。

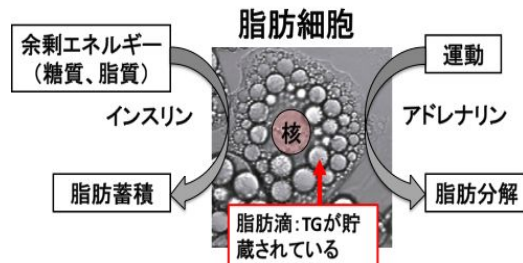


図1 脂肪細胞と脂肪の合成・分解

一方研究代表者の小西は、MEMS を専門とし、細胞とその集合体、ネットワークの挙動解析のための各種のバイオチップを研究開発してきた。細胞操作・固定、計測技術に関するMEMS 研究を展開している。

そこで本研究では、脂肪細胞分野への新技術導入により評価技術の飛躍的な向上に取り組むことにした。

バイオデバイス研究と脂肪細胞研究の連携により、脂肪細胞培養チップの実現にとどまらず、培養、計測、制御の観点から高度化するシステムの実現により、マニュアルでは困難であった高い制御性を活かした脂肪細胞研究が可能となる。脂肪細胞は細胞内の脂肪滴の表面で複数のタンパク質(脂肪滴表面タンパク質)が運動刺激や栄養状態に应答し、協調して脂肪の合成と分解を制御する動的な場である。さらに脂肪細胞は、運動・栄養等の外的刺激への应答だけでなく、時計遺伝子による脂肪の合成と分解のバイオリズムを有している。外的刺激の制御可能なシステムの実現によりバイオリズムを有する脂肪細胞の機能特性の変容現象の解明研究が可能となる。持続かつ緻密な脂肪細胞解析による研究成果創出を可能とする基盤技術を提供し、脂肪細胞研究が解決しようとしている抗メタボさらに広く人の代謝に関わる現象の理解へと発展する可能性を持っている。

### 2. 研究の目的

抗メタボリックシンドローム(以下メタボ)代謝解析のための脂肪細胞培養・計測・制御システムの構築を目的とする。これまで、MEMS が専門の研究代表者とバイオ特に脂肪細胞研究が専門の研究分担者らが連携し、オンチップ脂肪細胞培養への MEMS 技術の応用を検討してきた。その過程で、実験者判断で培地や薬液をマニュアルで投入し挙動を解析する現状の実験手法を高度化するシステ

ム構築の構想に至った。培養デバイスチップ、各種入出力系により培養デバイスチップと連結した計測および制御機構、これらの指令系を有したシステムとする。指令系のプログラム変更により様々なシステムを実現する。培養系には、脂肪細胞研究では他に類を見ない試みとなる MEMS 技術を適用し、高効率でコンパクトなシステム実現を目指す。脂肪細胞解析のための高い時間分解能を有した新たな基盤技術とし、抗メタボさらに広く人の代謝に関わる現象の理解の促進への貢献を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、MEMS 研究者とバイオ研究者が連携し、研究大項目として

- ・脂肪細胞培養デバイスチップ
- ・培養、計測、制御システム

を設定して以下のように研究を推進することにした。

(1) MEMS 技術により脂肪細胞培養デバイスチップを実現し培養系を確立する。まず、培養系評価を優先させ、計測・制御機構は既存装置を組み合わせて構成し、トータルシステムの構成準備を進める。

(2) 培養系に加え、準備を進めておいた計測、制御機構の開発を本格化させ、システムを構築する。脂肪細胞を用いた実験評価を繰り返し実施し、システムの改良、課題の対策に取り組む。

以上の方法により実現を目指すシステム構成の概要を図2に示す。

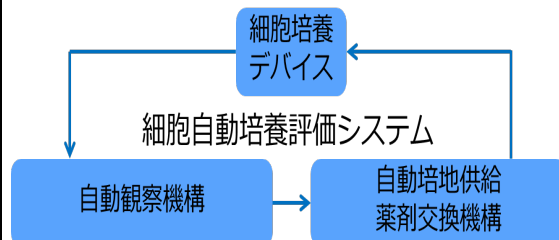


図2 システム構成図

### 4. 研究成果

本研究の研究大項目として設定した

- ・脂肪細胞培養デバイスチップ
- ・培養、計測、制御システム

の各々についてその研究成果を述べる。さらに、構築したシステムを用いた検証結果についても述べる。

#### (1) 脂肪細胞培養デバイスチップ

オンチップ脂肪細胞培養を可能とするデバイスチップの実現に取り組んだ。デバイスチップの機能として、培地供給機能、薬液投与機能に着目して研究を進めた。

培地の供給に加え、薬液の濃度を変化させ、様々な培養モデルで細胞に刺激を与える機能をもつデバイスを設計した。マイクロチャネル内の流れによる拡散を利用した薬液濃

度制御が可能な細胞培養デバイスを設計し、並列化（6 ウェル）も行った。脂肪細胞の培養に関して、デバイス材料の生体適合性や封止技術について研究を進め、ポリスチレン基板とシリコンラバー（PDMS）製の流路層および封止層を、シランカップリング剤を用いて接合封止する手法によりデバイスチップを実現した。図3および図4に培養デバイスチップの構成図と製作結果を示した。40 mm角のデバイスチップには6個の培養ウェルを配し、2つのインレット（図4左側）から異なる液体を供給することができるようになっている。以上により、図2に示した自動培地供給、薬液注入に関するデバイスチップ側の機能を実現することができた。

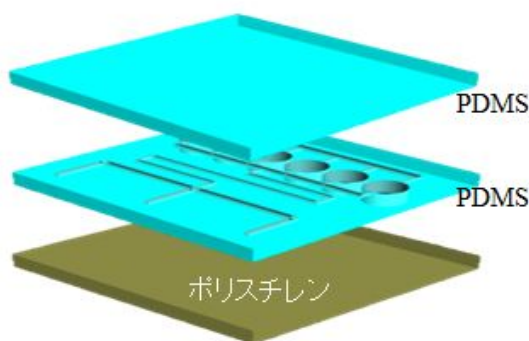


図3 培養デバイスチップ構成図

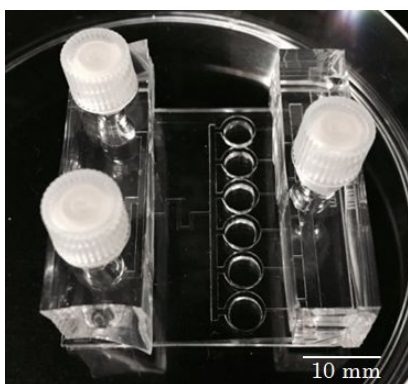


図4 培養デバイスチップの製作結果

### （2）培養、計測、制御システム

前述の培養デバイスチップ側機能に関する成果に対して、システム側の成果について述べる。培地および薬液注入制御、投与する薬液の選択が可能な自動培地供給・薬液刺激機構の構築を行った。薬液注入はシリンジの押子をX軸ステージにより移動させて制御することにした。X軸ステージ制御用コントローラにはパソコンから制御指令を与えるようにシステムを構成した。シリンジと培養デバイスチップとはチューブで接続した。これらにより薬液投与のための流量制御について高い精度を実現することに成功した。

脂肪細胞の挙動計測には顕微鏡カメラ取得画像を用いることにした。画像取得カメラ

の機能安定化については種々取り組んだ。カメラについても焦点調整機能の付与などを行った。図5にシステムが取得した脂肪細胞の画像の一例を示す。さらにカメラ取得画像は、コンピュータによる画像解析プログラムを用いて処理し、その後の薬液投与量を決定する制御性の高いシステムを構築した。挙動計測結果に基づき、パソコンのプログラムを通して薬液投与の制御を行うことが可能となった。

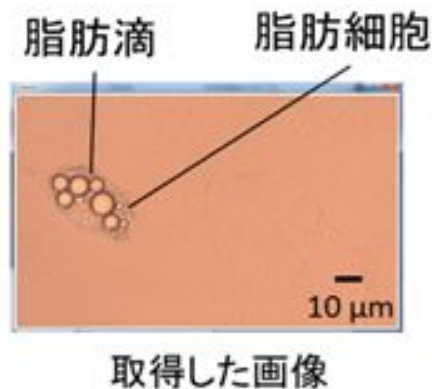


図5 脂肪細胞の画像取得結果

（3）脂肪細胞を用いたシステム機能検証  
次に、構築したオンチップ脂肪細胞培養によるプログラマブル培養・計測・制御システムの機能の検証を行った。

脂肪細胞は、インスリンを投与すると脂肪滴が増大する特性をもつ。この特性を用いて、構築システムによる薬液刺激制御機能の検証を行った。通常の培養法で培養した脂肪細胞（A群）、製作した培養器により手動で培地交換した脂肪細胞（B群）、製作した培養デバイスチップにより構築システムにより培地交換し培養した脂肪細胞（C群）を比較することにした。比較評価には、細胞数で補正した脂肪細胞内のトリグリセライド濃度を測定し、多重比較検定により比較した結果、A、B、Cの3群間に有意差はなく、構築システムにより従来と同じ結果が得られることが確かめられた。

以上の成果により、インスリン濃度の制御による脂肪細胞の成長状況への影響を評価することが可能となってきており、システムを当初設計通り動作させることに成功している。

脂肪細胞の培養、準備には一定の期間が必要なため、さらに複雑な評価に関しては、さらに時間をかけて研究を進め、多くのデータを蓄積する必要がある状況となっている。本研究期間中に、細胞挙動のばらつきや計測精度への要求仕様、データ処理のポイントなどがわかってきており、萌芽研究の成果として得られた内容をさらに展開していく計画である。引き続き研究分担者と密に内容を検証し、実現したシステムにより脂肪細胞研究への応用展開を深めていく予定である。

5．主な発表論文等  
特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

小西 聡 (KONISHI, Satoshi)  
立命館大学・理工学部・教授  
研究者番号：50288627

(2)研究分担者

橋本 健志 (HASHIMOTO, Takeshi)  
立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授  
研究者番号：70511608

岩中 伸壮 (IWANAKA, Nobumasa)  
立命館大学・立命館グローバル・  
イノベーション研究機構・研究員  
研究者番号：80584002