

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600054

研究課題名(和文)膜マイクロマシニング技術を用いた胚様体自動培養システム

研究課題名(英文)Automated Embryonic Body Culture System by using Membrane Micromachining

研究代表者

池内 真志(Ikeuchi, Masashi)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：90377820

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)：幹細胞の分化誘導には、胚様体と呼ばれる細胞の凝集体を形成させる必要がある。我々は、膜マイクロマシニング技術を用いた胚様体自動培養システム(PASCL)を開発した。PASCLは手の平サイズのチップ内に、透明かつ柔軟な薄膜製の、0.5mm四方のマイクロウェルが高密度に配置されている。各ウェルは圧力により、平坦な状態から、深さ500 $\mu$ mの丸底ウェルまで形状を変化させられる。これにより各ウェル内に形成された胚様体を、個別に回収することができる。胚様体形成、分化誘導、観察、回収まで一連の操作が、人手を介さず、チップ内で完結する。ヒトiPS細胞の胚様体形成と、複数条件下での分化誘導、選択的回収に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have proposed and developed a “Pneumatically Actuated Spheroids Culture Chip (PASCL)”. PASCL has the ability to produce and culture EBs of defined size highly in parallel, and has a unique mechanism to collect a targeted EB selectively from the arrays of EBs. In detail, PASCL consists of three parts; top layer with fluid channels, a PDMS membrane and bottom layer with pneumatic actuation lines. The pneumatic actuation lines have square openings on the topside. By applying negative pressure in the pneumatic actuation lines, the PDMS membrane set between the top and the bottom layer is pulled into the openings to form concave microwells where EBs are produced. After EB formation and differentiation, a targeted EB is popped up into the fluid channel by applying atmospheric pressure in the pneumatic actuation line, and collected by flow. The prototype has microwells arrayed 10x10 in 1 cm<sup>2</sup>. By using human iPS, EB formation, differentiation and sorting were verified.

研究分野：医用マイクロ・ナノマシン

キーワード：胚様体 再生医療 PASCL 圧力駆動 自動培養

### 1. 研究開始当初の背景

近年、臓器移植や人工臓器に替わる新たな医療として再生医療が注目され、盛んに研究が行われている。再生医療の鍵となるのがES細胞やiPS細胞をはじめとする幹細胞である。幹細胞の分化誘導には、胚様体と呼ばれる3次元凝集体を形成させることが有効である。胚様体は未分化状態の幹細胞を浮遊状態で培養することで形成され、胚様体内では細胞間の相互作用が高まり、高い分化能力を示す。胚様体の形成後に、様々な分化因子を与えることで、筋肉や神経といった目的とする細胞へ誘導する。また、胚様体の大きさは幹細胞の分化に影響を及ぼす。そのため、再生医療では、均一な大きさの胚様体を大量に形成する必要がある。

### 2. 研究の目的

従来、胚様体を培養する手法としてハンギングドロップ法が用いられてきた。これは、培養シャーレの蓋の裏側に細胞懸濁液の水滴を吊した状態で培養する手法である。一つの水滴内では、一つの胚様体のみが形成されるため、均一なサイズの胚様体を作製することが可能である。しかし、一度に多くのサンプルを培養することは難しく、胚様体の回収や培養途中で溶液の交換は困難である。

また、細胞非接着性の表面処理を行った培養ディッシュを用いた胚様体培養手法もあり、細胞をディッシュに播種するだけで簡単に胚様体を形成することが可能である。しかし、この手法では、様々なサイズの胚様体がランダムに生成するため、回収後、選別する手間を要することや、最終的な形成効率が低い、という問題があった。

すなわち、従来の手法では、胚様体を低コストで、大量生産することができなかった。そこで、我々は、手のひらサイズのチップ内に、胚様体の培養から分化誘導までの工程を組み込み、人手を介さずに、低コストで大量の胚様体を作製できるシステムを実現することを目的に定めた。

### 3. 研究の方法

「圧力駆動スフェロイド培養チップ (Pneumatically Actuated Spheroid Culture Lab on Chip ; PASCL)」を考案した。PASCLは指先サイズのデバイス上で胚様体の培養、試薬導入、観察、回収を行う新概念のマイクロ流体デバイスである (図1)。PASCLは均一な

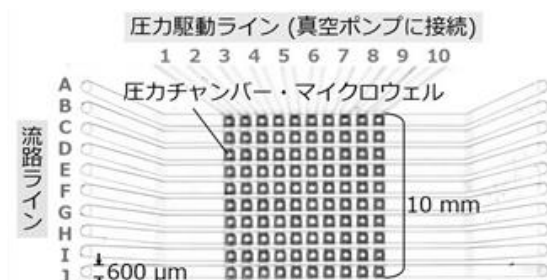


図1. PASCL プロトタイプ

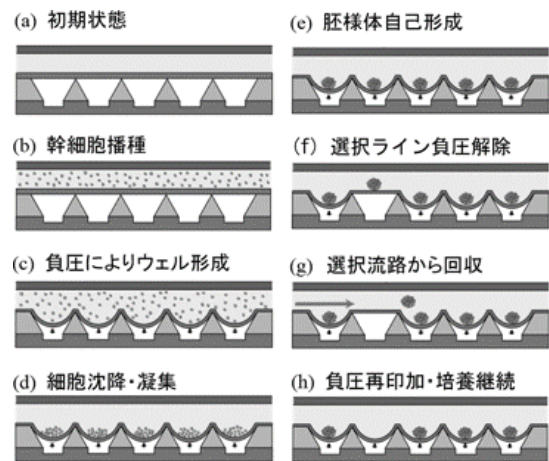


図2. PASCLによる胚様体生産手順

大きさの胚様体を同時に多数培養することが可能で、さらに培養された多数の胚様体の中から選択的に胚様体を回収できる機構を備える。細胞培養部分は、PDMS製の柔軟な薄膜と空気圧駆動ラインから成る。PDMS薄膜の上部には流路が取り付けられている。空気圧伝達ラインには正方形の開放部を備えており、負圧を印加することで上部のPDMS薄膜が開放部に沿って凹み、胚様体を培養するためのマイクロウェルを形成する。胚様体の形成と分化誘導後、1本の空気圧駆動ラインの負圧を大気圧に開放することで、マイクロウェルは平坦に戻り、動作した空気圧駆動ライン上の胚様体も同時に持ち上げられる。そして1本の送液ラインに流れを与えることで、空気圧駆動ラインと送液ラインの交差点に位置する、目的の胚様体だけが回収される (図2)。

### 4. 研究成果

試作したPASCLを用いて、胚様体形成の実証実験を行った。各送液ラインに  $1.15 \times 10^6$  cell/ml の濃度の細胞懸濁液を  $20 \mu\text{l}$  注入した。2日間の培養の結果、各マイクロウェルにおいて均一な胚様体の形成を確認した。さらに、生細胞染色による蛍光観察の結果、細胞の生存を確認した (図3)。これにより、PASCLによる胚様体の形成と培養を実証した。

次に、培養した胚様体の選択的回収を検証した。1本の空気圧駆動ラインの負圧を大気

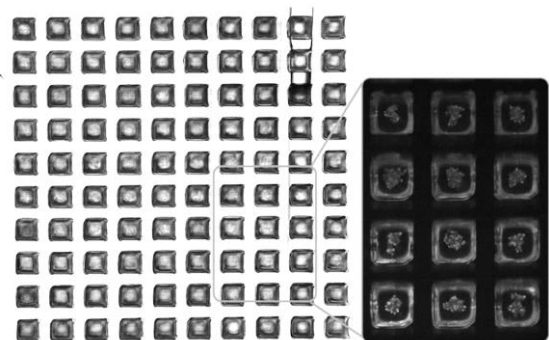


図3. PASCL内の胚様体全体像 (左) と生細胞染色後の拡大蛍光像 (右)

圧に開放すると、PDMS の薄膜は平坦に戻り、同時に胚様体も上に押し上げられた。そして、空気圧駆動ラインに垂直に交差している 1 本の送液ラインに流れ(5ml/min)を与えることによって、他のマイクロウェル内の胚様体は移動させることなく、目的の胚様体のみ回収することに成功した。

プロトタイプは、各々10本の圧力駆動ライン、及びマイクロ流路からなる合計100個の培養用マイクロウェルを備えるが、原理的には100本ずつのラインを交差させて1万個の胚様体を同時に生産することが手のひらサイズで実現可能である。これにより、幹細胞の種類や、分化誘導条件の異なる複数の胚様体を用いた実験が、1チップで同時に実行できるシステムの基盤を確立した。

##### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, "Spheroid Formation and Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device", Cell Medicine, accepted
2. Y. Miyamoto, M. Ikeuchi, H. Noguchi, T. Yagi, S. Hayashi, "Three-Dimensional in vitro Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device", Cell Medicine 7(2), pp. 67-74, 2015

〔学会発表〕(計 17 件)

1. A. Yasukawa, T. Nishijima, M Ikeuchi, K. Ikuta, "Integrated micro culture device for fully automated closed culture experiment of embryonic body", Proc. IEEE MEMS 2014, 181-184, 2014 (Oral)
2. M. Ikeuchi, S. Hayashi, K. Ikuta, "Mass-production and prolonged undifferentiated state of embryonic bodies by using a semipermeable tapered microwell array", Proc. IEEE MEMS 2014, 2014
3. M. Ikeuchi, S. Hayashi, K. Ikuta, "Co-cultured Cluster Formation and Self-organization of Cells in Hydrophilic Tapered Microwell Array", 9th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2014
4. M. Ikeuchi, K. Ikuta, "Membrane Microchannel Made of Collagen with Self-Assembled Microfibril Structures for Tissue Engineering", Proc. Transducers 2013, 641-644, 2013 (Oral)
5. M. Ikeuchi, Y. Koyata, K. Ikuta, "Sealless 3-D microfluidic channel fabrication by sacrificial caramel template direct-patterning", Proc. IEEE MEMS 2013, 931-934, 2013
6. M. Ikeuchi, K. Ikuta, "Centrifugal

imprinting during vitrification (CIV) of collagen hydrogel for highly biocompatible 3D membrane scaffold", Proc. IEEE MEMS 2013, 291-294, 2013

7. M. Ikeuchi, A. Yasukawa, K. Ikuta, "Combinatorial differentiation induction of embryonic bodies in "PASCL (Pneumatically Actuated Spheroids Culture Lab-on-chip)", Proc. IEEE MEMS 2013, 311-314, 2013
8. M. Ikeuchi, K. Ikuta, "Fabrication of Membrane Microchannel by Using Vitrified Collagen for Regeneration of Thick Tissues in Vitro", 35th Annual International IEEE EMBS Conference, 2013
9. A. Yasukawa, T. Nishijima, M. Ikeuchi, K. Ikuta, "Fabrication and Differentiation of Embryonic Bodies in "PASCL (Pneumatically Actuated Spheroid Culturing Lab-On-A-Chip)", 35th International IEEE EMBS Conference, 2013
10. 安川あかね, 池内真志, 生田幸士, "胚様体実験のためのオールインワン細胞培養デバイスの開発", 第13回日本再生医療学会総会, 2014
11. 安川あかね, 西島拓弥, 池内真志, 生田幸士, "再生医療研究のための全自動胚様体培養チップの開発", 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2014
12. 安川あかね, 西島拓弥, 池内真志, 生田幸士, "再生医療のための全自動胚様体大量培養デバイスの開発", 第53回日本生体医工学会大会, 2014
13. 池内真志, "ポリマー薄膜を用いた3次元マイクロデバイスの作製と評価", 第31回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2014
14. 池内真志, 林衆治, 生田幸士, "ES/iPS細胞胚様体形成・分化用マイクロアレイの開発", 日本機械学会第5回マイクロナノ工学シンポジウム, 2013
15. 安川あかね, 西島拓弥, 池内真志, 生田幸士, "再生医療用新概念培養デバイスによる胚様体分化誘導の実証", 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2013
16. 安川あかね, 西島拓弥, 池内真志, 生田幸士, "新概念細胞培養デバイスによる胚様体分化誘導の実証", 第31回日本ロボット学会学術講演会, 2013
17. 安川あかね, 西島拓弥, 池内真志, 生田幸士, "再生医療用細胞培養デバイスによる胚様体分化誘導の実証", 第22回日本コンピュータ外科学会大会, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 細胞培養装置および細胞培養方法

発明者：池内真志，林衆治，豊田悠司  
権利者：池内真志  
種類：特許  
番号：特願 2014-232224  
出願年月日：2014/11/14  
国内外の別： 国内  
名称：細胞培養装置およびこれを備える細胞  
培養試験観察システム  
発明者：池内真志，生田幸士，安川あかね  
権利者：東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-151084  
出願年月日：2014/7/24  
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.micro.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池内真志 (Masashi Ikeuchi)  
東京大学・先端科学技術研究センター・助  
教  
研究者番号：90377820

### (2) 研究分担者

宮本義孝 (Yoshitaka Miyamoto)  
独立行政法人国立成育医療研究センタ  
ー・生殖・細胞医療研究部・研究員  
研究者番号：20425705