

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650075

研究課題名(和文) マイクロ流体制御を用いた時空間的視点からの幹細胞分化の解析と培養システム構築

研究課題名(英文) Development of microfluidic cell culture system and analysis of stem cell differentiation from the perspective of spatiotemporal control of molecule

研究代表者

前川 敏郎 (Maekawa, Toshiro)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：30415294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：一般的な細胞培養法は培養皿などを用いた一様な環境下での培養条件であるのに対し、本課題ではマイクロ流体技術を導入し、従来の方法では困難であった分子の時空間的な制御が可能な細胞培養システムを設計し構築した。蛍光色素を用いた時空間的制御の検証から、流路内の分子の時空間的分布を短時間で連続的に制御可能であることが確認された。また、マウスiPS細胞などを用いた細胞培養実験から、培養チャンネル内の分子の時空間的制御を行うことで連続的に変化する条件下での細胞培養が可能であることが実証された。これらのことから、本システムは細胞の分化メカニズムなどの詳細な解析へ応用が可能な培養デバイスであることが実証された。

研究成果の概要(英文)：Cell culture method using conventional cell culture dishes, plates, just offers the uniform condition of cell culture environment. In this study, we developed a microfluidic cell culture system that enables spatiotemporal control for signal molecule concentration dynamically in cell culture chamber.

Evaluation for spatiotemporal control of molecule in the microfluidic device was performed using fluorescence dye as a visible substitute for molecule. In addition, it was confirmed that the microfluidic device is able to culture mouse iPS cells under the condition of spatiotemporal control of undifferentiation factors. These results indicate that this microfluidic cell culture system can be applied to investigation of mechanism in stem cell differentiation, and cellular response to dynamic change of signal molecule.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：マイクロ流体デバイス 幹細胞 時空間制御 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

(1) ES細胞やiPS細胞等の幹細胞は、その多分化能から再生医療や創薬などにおいて注目されており、国内外において急速に研究が進んでいる。これらの幹細胞の分化あるいは未分化維持のメカニズムなどを詳細に解析することは、生物学的にも重要な課題でありこれまでに様々な研究がなされている。細胞はその周辺環境によって厳密に制御されており、細胞の特性・性質を詳細に調べるには培養環境を精密に制御することが重要である。幹細胞における分化の制御は、特に再生医療分野などでは極めて重要であるが、従来の培養皿などを用いた方法では一様な周辺環境しか再現できず、連続的に培養条件が変化するような状況下において細胞の性質を詳細に解析することは困難であった。

(2) 当研究室では、これまでにマイクロ流体デバイスに関する研究を行っており、細胞培養に用いるセルエンジニアリングデバイスの開発を進めてきた。これらのマイクロ流体制御技術を用いることで、マイクロ空間における特徴的な流れ現象である層流を用いてマイクロ流路内の物質濃度分布を制御する[1]ことが可能である。そこで、本研究課題ではマイクロ流体技術を用いた手法で、従来の細胞培養方法では困難であった培養条件を連続的に変化させて制御可能なマイクロ流体細胞培養システムの開発を目指した。

2. 研究の目的

(1) マイクロ流体制御技術を用いることで、マイクロ空間における特徴的な流れ現象である層流によって流路内の分子の分布を制御することや、流路内における拡散を利用し混合することで、流量比の変化に応じた分子濃度の制御が可能である。これらを組み合わせることによって、緻密な時間的、空間的な分子濃度のパターンの制御を連続的に行うことが可能となる。このような条件下で細胞培養を行うというアプローチで細胞培養デバイスを構築することを目的とし、分子濃度の時空間的制御を行うマイクロ流体細胞培養システムの開発を目指す。

(2) このような時空間的な視点からのアプローチで設計・構築した細胞培養デバイスを用いて、幹細胞などを培養し解析を行う。従来の方法では困難であった細胞の分化状態に関わる因子などを時間的・空間的に同時に制御することで、幹細胞における分化の制御メカニズムや細胞の分化に関わる因子などについて詳細な解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 分子の時空間的制御が可能なマイクロ流体デバイスの設計と構築を行い、マイクロ流体細胞培養システムを設計・構築した。分化誘導因子などの細胞培養条件に関わるに

分子について、時間的、空間的あるいは分子濃度を制御することが可能なマイクロ流体デバイス(図1)を設計・作成した。このマイクロ流体デバイスは、マイクロ流路内の物質の時空間的パターン制御[1]や、流路内における拡散を利用し混合[2]することで流量比の変化に応じた濃度の制御、あるいはこれらを組み合わせ分子濃度を時空間的に制御可能な設計とした。また、分化誘導因子を含む培地の送液は、高精度に制御可能な精密シリンジポンプにより同時に制御(制御用マイコンおよびPCを用いて制御)することで、マイクロ流路内の細胞培養エリアの時空間的・空間的な制御に加え、物質濃度を連続的に制御可能な培養システムとした。

(2) 作製したマイクロ流体細胞培養デバイスは、時空間的パターンの制御を検証するため、蛍光色素を用いて条件検討および動作の実証実験を行った。また、実際にデバイス内で細胞培養を行い、細胞染色液を用いて時空間的な制御の評価を行った。さらに未分化維持因子の時空間的な制御条件下においてマウスiPS細胞を培養し、未分化状態を経時的に解析する実証実験を行った。

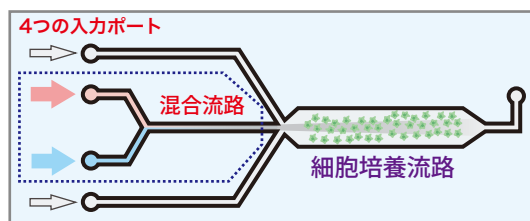


図1. 分子濃度を時間的・空間的に制御可能なマイクロ流体細胞培養デバイス

4. 研究成果

(1) 本細胞培養システムに用いるマイクロ流体チップは、polydimethylsiloxane (PDMS) とスライドガラスを用いて作製した。細胞培養用流路は細胞の培養・観察に十分な $1 \times 10^3$ 個程度の細胞を播種できるような幅 $500 \mu\text{m}$ 、高さ $100 \mu\text{m}$ とし、溶液の送液総流量は最大 $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$ とした。混合流路は、混合に必要な拡散距離が短く分子が混合流路を流れる間に混合が可能となるような幅 $20 \mu\text{m}$ 、高さ $100 \mu\text{m}$ 、長さ $10\text{mm}$ とし、高アスペクト比とすることで低流量においても混合可能な設計とした。また、混合流路の管路抵抗が入力ポートからの流路の管路抵抗より小さくなるよう設計し、流量比が大きく変化した場合において一方から他方へ逆流することがない流路設計とした。さらに、マイクロ流体デバイスで細胞培養を行う場合、特に低流量域においても安定的かつ精密な制御が要求される。そのため、低流量域でも高精度で制御が可能な精密シリンジポンプを採用し、自動シーケンス制御可能なマルチチャネルポンプコントローラと組み合わせ同期させて送液することで、高い分解能で流量を変化させることが可能

なポンプ制御システムを構築した (図 2)。

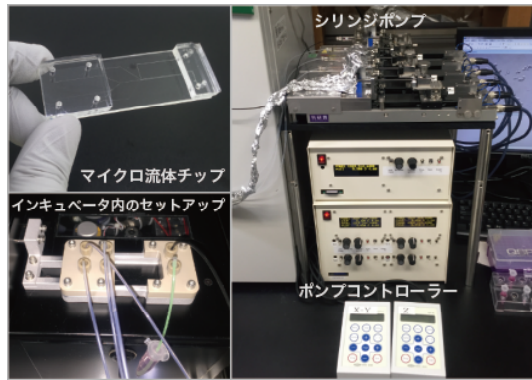


図 2. マイクロ流体細胞培養システムのセットアップ

(2) 本マイクロ流体デバイスにおいて時間的・空間的パターンの制御を検証するため、蛍光色素 (Rhodamine B isothiocyanate - Dextran) を用いて条件検討および動作の実証実験を行った。流路内の分子濃度の時間的・空間的分布について、4 台のシリンジポンプを 1 台のポンプコントローラーで同期させて送液し、蛍光顕微鏡像を撮影して評価を行った。その結果、マイクロ流路内の分子濃度の時間的な制御 (図 3 A. 高濃度から低濃度へ)、流路幅方向に濃度分布を形成する空間的な制御 (図 3 B. 流路幅方向へ領域が拡大) や分子を暴露する領域を移動させる空間的な制御 (図 3 C. 流れ方向に向かって中央から右側へ領域が移動) が可能であり、さらにこれらを同時に行うことで分子濃度の時間的制御と空間的制御を同時に行えることが確認された。

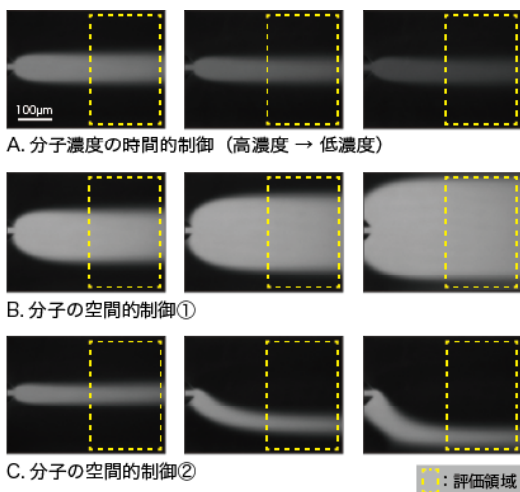


図 3. 流路内の分子濃度の時空間的分布の評価

(3) 本細胞培養デバイスでヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を培養し、Calcein AM 染色液を用いて細胞染色を行い、細胞培養中の時空間的な制御の評価を行った。HepG2 細胞を本デバイス内で前培養した後、①培養流路中央部のみに Calcein AM 溶液 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 15 分間流して染色を行い (図 4 左)、続い

て②培養流路上部のみ Calcein AM 溶液 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 15 分間流して染色を行い (図 4 右)、蛍光画像を撮影して両者の比較を行った。流路中央部を細胞染色した蛍光強度 (図 4 左) と比較して、流路上部の細胞染色の蛍光強度 (図 4 右) は低くなっており、比較的短い時間オーダーにおいても分子の時空間的制御が可能であり、本細胞培養デバイスではこのような時空間的制御下において細胞を培養することが可能であることが実証された。

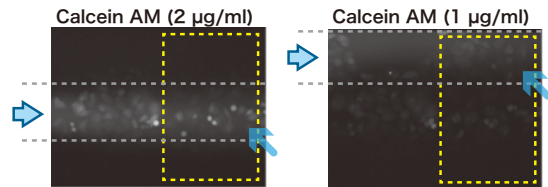


図 4. マイクロ流体デバイス内で培養した HepG2 細胞の Calcein AM 染色による評価

(4) 作製した細胞培養マイクロ流体デバイス内において、Nanog-GFP マウス iPS 細胞の培養を行い、未分化維持因子 (2i と LIF) について時空間的に制御して培養を行う実証実験を行った。未分化マーカーである Nanog の発現を GFP の蛍光でモニターし、マウス iPS 細胞の未分化状態の経時的な観察を行った。まず、未分化維持条件 (2i/LIF(+)) で前培養を行い、培養流路内でコロニーを形成した後に、未分化維持因子を含まない培地 (2i/LIF(-)) を同時に送液することで流路内の未分化維持因子の空間的な分布を制御し培養を継続した。

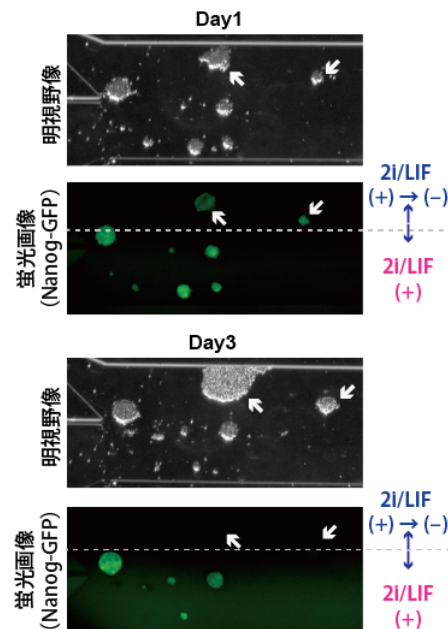


図 5. マウス iPS 細胞を用いた未分化維持因子の時空間的制御

その結果、1 日目において GFP の発現が見られたコロニーのうち、未分化維持因子を含まない培地 (2i/LIF(-)) の領域にあるコロニーは GFP の発現が減少していた (図 5 上)。

一方で、未分化維持因子を含む培地 (2i/LIF(+)) の領域のコロニーでは、培養3日目においても GFP の発現が見られ、時間経過とともに未分化維持因子の空間的分布に対応して GFP の発現が変化していることが確認された(図5下)。この結果から、本デバイスでは未分化維持因子の時空間的制御下において、分化状態の異なるマウス iPS 細胞の培養が可能であることが実証された。

本マイクロ流体細胞培養デバイスは、これまでにない精密かつ迅速な分子の時空間的制御が可能な細胞培養デバイスであり、分子の時空間的制御という視点から、細胞の分化や機能維持に関わる要因のより詳細な解析への応用が期待される。また、幹細胞だけではなくその他の細胞の機能(例えば肝特異的であるアルブミンの産生や CYP の発現など)の長期維持培養や厳密な誘導の制御といった、創薬分野に応用可能な培養システムへの発展も期待され、将来的には本デバイスを用いた連続的な培養条件の変化を制御可能な新しい細胞培養解析手法へと繋がっていくことが期待される。

#### <引用文献>

- [1] Kawada, J. et al.: Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation. Lab Chip, 12(21):4508-4515 (2012).
- [2] Hong, CC. et al.: A novel in-plane passive microfluidic mixer with modified Tesla structures. Lab Chip, 4(2):109-113 (2004).

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

発表者名: 前川敏郎, 木下晴之, 藤井輝夫  
発表標題: マイクロ流体細胞培養システムを用いた分子濃度の時空間的制御  
学会名等: 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第32回研究会 (32nd CHEMINAS)  
発表年月日: 2015年11月26日~2015年11月27日  
発表場所: 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

前川 敏郎 (MAEKAWA, Toshiro)  
東京大学生産技術研究所・特任研究員  
研究者番号: 30415294