

機関番号：32670

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710131

研究課題名（和文） 幹細胞コミュニケーション解析マイクロ流体デバイスの開発

研究課題名（英文） Microfluidic device for stem cell communication analysis

研究代表者

佐々木 直樹 (SASAKI NAOKI)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：30462691

研究成果の概要（和文）：

幹細胞は自身を複製する能力や種々の細胞へ分化する能力を有し、その機構解明は学術的見地からも再生医療等への応用面からも極めて重要である。本研究では幹細胞が同種・異種細胞間でおこなうコミュニケーションを解析するためのマイクロ流体デバイスの開発に取り組んだ。独自の流路構造と作製法を利用し、幹細胞と体細胞のマイクロ流路内配置を実証した。1 デバイス上に複数の流路を配置し、スループットの向上も実証した。

研究成果の概要（英文）：

Stem cells can replicate themselves and differentiate into various types of somatic cells. It is highly important to clarify such mechanisms from a scientific point of view and for the application in the area of regenerative medicine. We have developed microfluidic devices to analyze the communication between stem cells. Controlled pairing of embryonic stem cells with somatic cells has been demonstrated. An arrayed microfluidic device which has multiple microchannels has enabled high throughput operations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：マイクロバイオシステム

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は自身を複製する能力や種々の細胞へ分化する能力を有することから、その機構解明は学術的見地からも再生医療等への応用面からも極めて重要である。生体内では幹細胞が同種或いは異種の細胞と、種々の因子（タンパク質）を種々の機構で伝達して機能を制御していると考えられている。これら細胞間相互作用を理解するための従来の手

法として、バルクスケールでの共培養(図 1(a))がある。しかし、この系では同種・異種細胞間の相互作用が複雑に混在する。細胞培養後の馴化培地を他の培養系に添加する手法(図 1(b))では、ある細胞種が溶液中に分泌した因子を他の細胞種に一方的に作用させることができるが、間接的手法である。マイクロパターンを用いる共培養(図 1(c))では、細胞を μm スケールで精密に配置し相互作用

させることが可能になるが、同種・異種細胞間の相互作用が複雑に混在するという観点からはバルク共培養と変わらないという問題があった。

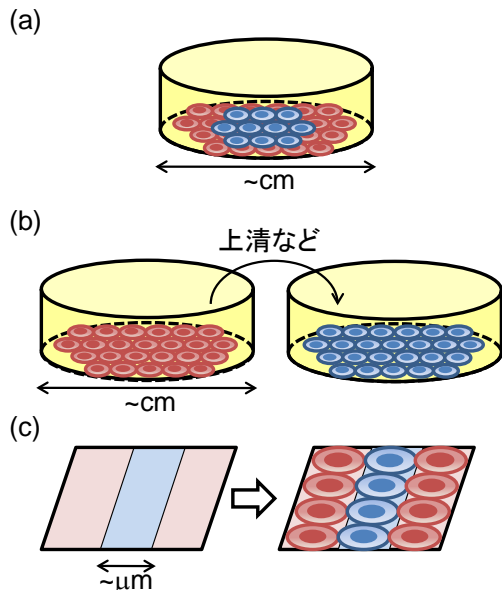


図1 種々の細胞間相互作用解析法. (a) 共培養. (b) 培地添加による刺激. (c) マイクロパターン上での共培養.

近年、微細加工技術により作製したマイクロ流体デバイスを用いる研究が盛んに取り組まれている。このデバイスの利点は、試料・試薬量の低減や高スループット化・自動化のみならず、流路構造を工夫することで細胞などの μm スケールの対象物を自在に配置でき、溶液流れによって物質移動を自在に制御できることにある。そこで研究代表者は、マイクロ流体デバイス中で細胞間相互作用の作用機構や方向、さらには細胞密度を積極的に制御することで、複雑な細胞間相互作用を単純化し、マクロ系では得られない新たな知見を得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、幹細胞が同種・異種細胞間でおこなうコミュニケーションを、細胞配置と溶液流れにより精密に制御して解析するためのマイクロ流体デバイスの開発を目的とし、特に細胞配置に重点を置いて進めることとした。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体デバイスはポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いソフトリソグラフィーにより作製した。マイクロ流路 (深さ $13 \mu\text{m}$) 内には細胞位置決めのための構造体を配置し、異種細胞を別々の入口から導入して配置可能な設計とした。

(2) 細胞導入・培養法の検討

細胞懸濁液を流路に吸引導入して目的の位置に配した。種々のデザインの流路を作製し、細胞配置条件を検討した。

(3) アレイ化デバイスの開発

1 デバイス上に複数の流路・構造体を作製し、スループットの向上について検討した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスの作製

細胞の接触状態を制御するための構造を新たに開発した (図2)。フォトマスク上で離れている二つのパターンを、露光時の光の広がりを利用してつなげることで、極めて幅の狭い流路を作製することに成功した (図3)。以下、この構造をマイクロスリットと呼ぶ。スリット幅は露光時間によって $2 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲で調節可能であった。

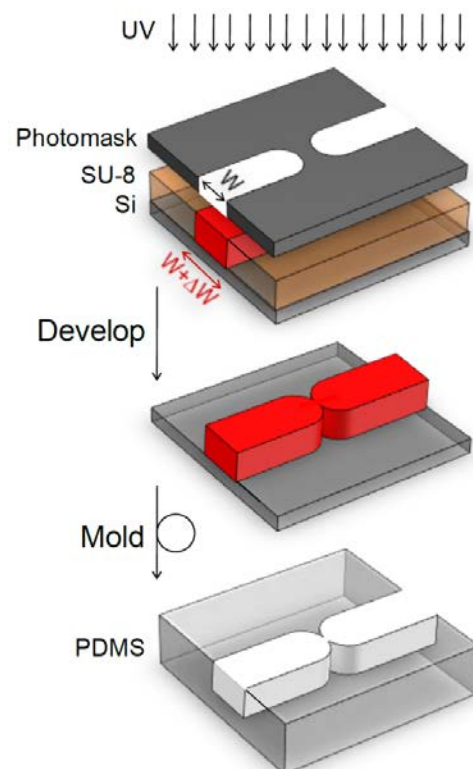


図2 マイクロスリットの作製法.

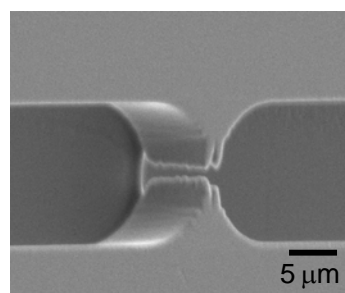


図3 マイクロスリットの電子顕微鏡像.

(2) 細胞導入・培養法の検討

項目(1)で開発した構造に細胞を配置する手法を検討した。単純に吸引配置した場合は細胞が容易に変形したほか、配置する細胞数の制御が困難であった。そこで図4に示す手法を開発した。スリットの両側に細胞と同程度の大きさの細胞トラップを作製し、ここに細胞を配置することにした。余剰の細胞はトラップされずに下流に流れ去るようにした。さらに流路形状を工夫することでトラップ後の細胞にかかる機械的刺激を減らし、変形等なく長時間の細胞保持が可能であり、また溶液がスリットに対して対称に流れるために細胞がスリット越しに正対可能なデザインとした。ES細胞としてマウス B6G2 細胞、体細胞としてマウス 3T3 細胞を用い、異種単一細胞対の形成に成功した。スリット幅により細胞の接触面積を制御することもできた(図5)。

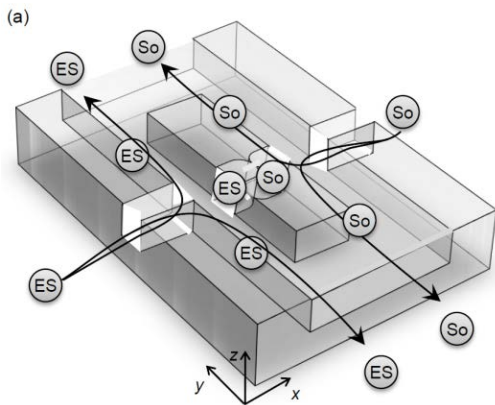


図4 細胞配置の模式図.

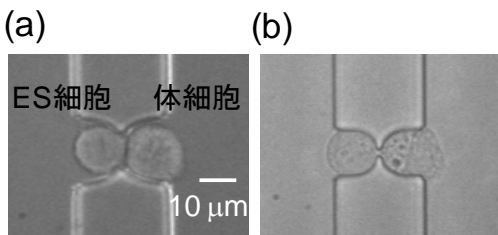


図5 細胞配置結果。(a)接触面積大。(b)接触面積小.

配置後の細胞培養について3T3細胞を用いて検討した。導入後3時間程度で細胞が流路底面に接着し、一晩後には増殖している様子が観察された。しかし時間経過と共に細胞の位置が変化し、細胞位置を維持したままでの実験は困難であった。今後、表面パターンング等との組み合わせにより、長時間にわたる細胞位置の維持が期待される。

(3) アレイ化デバイスの開発

1デバイス上に32か所の細胞配置部を有す

るデバイスを開発した。図4に示した流路の並列化は、幾何学的制約により二次元平面上では実現できない。そこでデバイスを三層構造とし、貫通穴を有する基板を利用することで流路を三次元的に配置することとした(図6)。下層に溶液や細胞懸濁液の導入用流路と細胞配置部、中層に貫通穴、上層に排出用流路を作製した。下層及び上層では枝分かれ構造により導入口及び排出口を集約し、また各流路の長さを揃えることで流路抵抗を等しくした。

作製したデバイスの光学像を図7に示す。下層及び上層はソフトリソグラフィにより作製し、中層は機械加工で作製した。各層はPDMSの自己接着性を利用して接合した。顕微鏡下で位置合わせすることでデバイスは容易に作製できた。また直径1 μmの蛍光微粒子を用い、単位時間当たり各流路を通過するビーズ数を測定した。この結果をヒストグラム化しポアソン分布と比較した結果、両者はよく一致し、作製したデバイス上で各流路に溶液が均等に流れている事が確認できた。

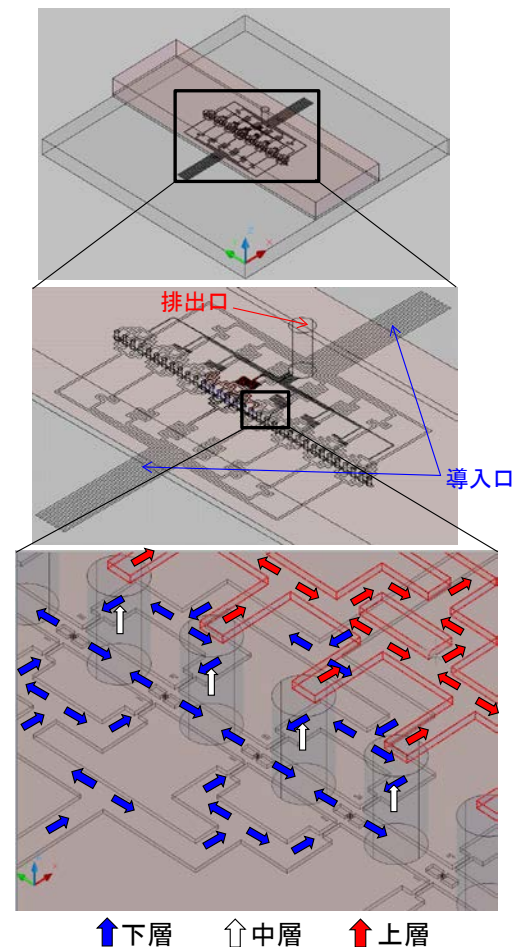


図6 アレイ化デバイスの設計.

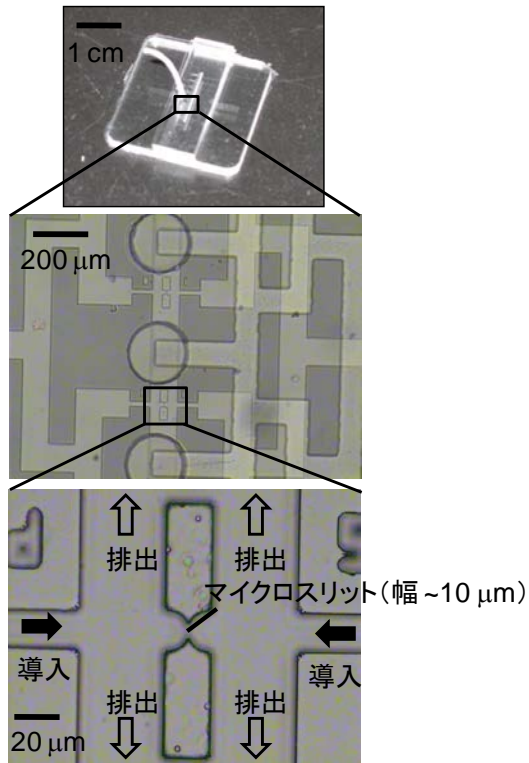


図7 アレイ化デバイスの光学像.

作製したデバイスに B6G2 細胞と 3T3 細胞の懸濁液を導入し、送液時間とデバイス上に形成された細胞対数の関係を調べた (図 8)。送液開始後 2 分で 15 ± 2 対の細胞対が形成され、時間を長くしても細胞対数に大きな変化は見られなかった。確率論的には時間経過と共に増加するはずであるため、送液中の細胞凝集など、違う現象が影響している可能性がある。アレイ化していないデバイスでは平均 0.8 対の細胞対が形成されていたため、流路並列化によるスループットの大幅な向上が示された。今後、長期培養や薬剤刺激等を組み合わせることで、幹細胞の細胞間相互作用の解明に本法が大いに役立つものと考えられる。

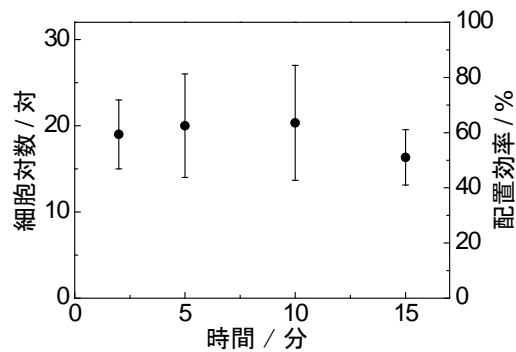


図8 送液時間と細胞対数の関係. N=3.

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 3 件)

1. 佐々木直樹, 流れを利用する異種細胞配置・融合用マイクロ流路のアレイ化, 第 22 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 平成 22 年 11 月 17 日, 名古屋大学医学部附属病院(名古屋)

2. Naoki Sasaki, Pairing and fusion of heterotypic cells in a microchannel, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 平成 22 年 10 月 5 日, フローニンゲン(オランダ)

3. 佐々木直樹, マイクロ流路内異種細胞配置・融合法の開発, 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 平成 22 年 6 月 11 日, 東京大学小柴ホール(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 直樹 (SASAKI NAOKI)

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号: 30462691