

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14232

研究課題名(和文)細胞の動的3次元パターンニングによるオンチップ臓器へ挑戦

研究課題名(英文)Dynamic three-dimensional cell patterning toward organ-on-a-chip

研究代表者

秋山 佳丈(Akiyama, Yoshitake)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：80585878

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):動物実験を代替する手法として、マイクロ流体デバイスにおける微小組織構築(Organ-on-a-chip)が注目されている。しかし、そのためには、マイクロ流路内での細胞や微小組織を操作するための技術が必要である。本研究では、マイクロ流路内での高度な3次元微小組織構築に向けて、研究者の提案する「ラベルフリー磁気アセンブリ法」の有用性を検証した。特に、磁石アレイを用いた細胞パターンニングおよび電磁石デバイスを用いた微小組織の操作を実証した。

研究成果の概要(英文):As an experimental-animal substitution method, micro-tissue construction in microfluidic devices (Organ-on-a-chip) has been attracted much more attention. Achievement of Organ-on-a-chip requires to development a manipulation method for cells and micro-tissues in the microchannel. In this study, the label-free magnetic assembly method that the author proposed was assessed. We demonstrated label-free cell patterning using a magnet array and label-free magnetic manipulation of micro-tissues using an electromagnetic device.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：細胞パターンニング マイクロ流体デバイス 組織工学 磁気アルキメデス効果

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は、個体 - 器官系 - 器官 - 組織 - 細胞という階層構造を成している。しかし、現在、創薬スクリーニングにおいては、最下層である細胞レベルの評価が中心となっており、個体レベルの実験動物およびヒトでの治験結果との隔たりが問題となっている。この問題の解決に向けて、微細加工技術により作製したマイクロ流体デバイスが注目を集めている。培養環境を微小化することで、単純に高価な細胞や試薬の使用量が削減でき、システムの集積化が容易になるだけでなく、レイノルズ数の低下により層流条件となるため細胞周辺環境の精密な制御が可能となる。このようなマイクロ流体デバイスでの細胞培養に関する研究は、近年急激な発展を遂げており、高度な流体制御技術や複雑な微小構造を組み合わせることで、細胞から機能や構造を持つ微小组織を構築するに至っている。さらに、Shuler 教授により、1つの基板上に複数の組織や器官を作り上げる Organ on a chip または Human on a chip と呼ばれるコンセプトが提案され、現在最も注目される研究分野の1つとなっている。これまでに機能や構造を持つ微小组織の構築が報告されているが、閉鎖空間であるマイクロ流路内での細胞の操作は困難であり、生体同様の複雑かつ多機能な組織を構築するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、Organ-on-chip における最終ゴールであるマイクロ流路内での高度な3次元微小组織構築に向けて、著者の提案する「ラベルフリー磁気アセンブリ法」の有用性を検証する。具体的には、ラベルフリー磁気アセンブリ法により、磁石アレイを用いた細胞パターンニングおよび電磁石デバイスを用いた微小组織の操作を実証する。

3. 研究の方法

(1) ラベルフリー磁気アセンブリ
溶液中の粒子に作用する磁力 F_m は以下の式(1)で表すことができる。

$$F_m = \frac{(\chi_p - \chi_m)V}{2\mu_0} \nabla B^2 \quad (1)$$

ここで、 χ_p : 粒子の磁化率、 χ_m : 溶液の磁化率、 V : 粒子の体積、 μ_0 : 真空の透磁率、 B : 磁束密度である。溶液中の粒子に磁場を印加しても磁化率に差がないため、粒子は磁場からの影響を受けない。また、溶液中に磁性粒子が含まれる場合、 $(\chi_p - \chi_m)$ は正となるため、粒子に対して引力が働く。一方、正の磁化率を持つ溶液中に粒子が含まれる場合は、 $(\chi_p - \chi_m)$ が負となるため、粒子は相対的に反磁性体として振る舞い、粒子は磁場から斥力を受ける。その結果、粒子は磁力の弱い場所に凝集する。

(2) 細胞パターンニング装置概要
実験装置の概要を図1に示す。パターンニング

に必要な磁場は、横方向に磁化されたネオジム磁石(幅1mm,高さ5mm,奥行き30mm)を15個並べ、間にスペーサとしてアルミニウム(幅0.1mm,高さ3mm,奥行き25mm)をはさんだ磁石アレイにより作製した。磁石アレイの上に、ガラスボトムディッシュに枠を貼り付けることで作製したチャンバを設置し、その中でパターンニング実験を行った。チャンバは、縦10mm,横10mm,高さ5mmとした。

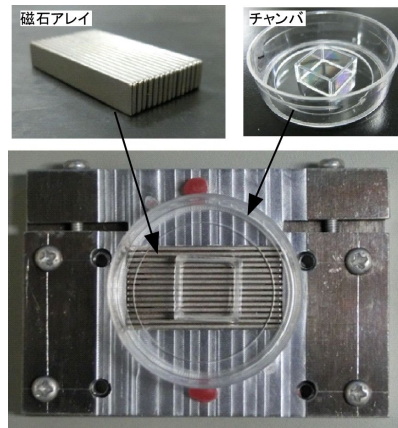


図1 磁石アレイの上に設置したチャンバ。

(3) 蛍光ビーズのパターンニング実験
細胞と物理的性質の近い直径15 μ mの蛍光ポリスチレンビーズを使用して実験を行った。DPBS(-)に常磁性化合物(Gd-DOTA)を40mM、蛍光ポリスチレンビーズを 4.1×10^4 個/mL添加して蛍光ビーズ懸濁液を作製した。この懸濁液を560 μ Lをチャンバに導入し、常温で1時間半静置した後撮影を行った。チャンバは、底面の厚み0.14mmのものを使用して実験を行った。

(4) 細胞パターンニング実験
マウス繊維芽細胞(3T3)を用いて、蛍光ビーズと同様の実験を行った。細胞懸濁液は、Gd-DOTA 40mMを添加した培地 Hank's MEM (10%FBS, 1%AB)に、PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma Aldrich)で染色した3T3細胞を 4.1×10^4 個/mLになるように懸濁することで作製した。

(5) 細胞上への細胞パターンニング実験
チャンバへ PKH26 で染色した細胞を播種し、3日間培養した。培地を取り除き、PKH67で染色した細胞を含む細胞懸濁液を560 μ L導入し、1時間半静置した。チャンバは底面の厚みが0.11mmのものを使用して実験を行った。

(6) 電磁石デバイス
本研究で使用する電磁石デバイスの概要図を図2に示す。本デバイスは、2対のヨークとコイルで構成されており、各コイルに電流を印加することで各ヨークの先端から磁場が発生する。発生した磁場はヨークの先端からチャンバの中央に向かって磁束密度勾配を生成する。

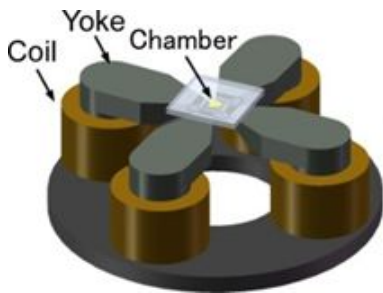


図2 電磁石デバイスの概要.

4. 研究成果

(1) 蛍光ビーズのパターニング

実験開始から1時間半後の様子を図3aに示す。また、得られた画像を元に画像処理ソフトImageJにより背景の減算をした後2値化し、Adjustable Watershedで分割した上で水平方向の座標を算出した。スペーサの中心を0としたときのビーズの水平方向の距離を横軸、ビーズの数を縦軸にプロットしたグラフを図3bに示す。約80%のビーズが141 μm の幅に収まっていた。以上から、本手法により、パターニングが可能であることが確認できた。

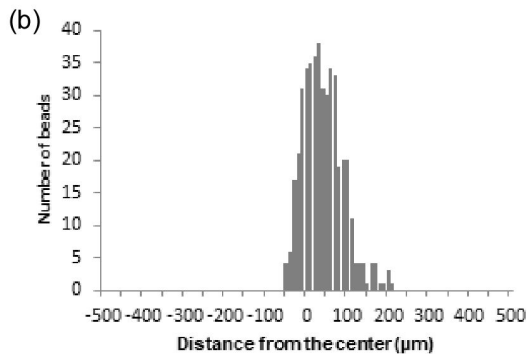
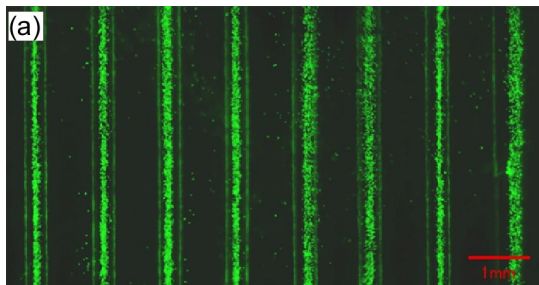


図3 蛍光ビーズのパターニング。(a)蛍光顕微鏡像。(b)画像解析によるビーズの分布。

(2) 細胞のパターニング

実験開始から1時間半後の様子を図4に示す。図中で緑色の点が細胞、赤い部分がスペーサのアルミニウムを示す。画像解析の結果、パターニング幅(約80%の細胞が収まる幅)は、402 μm と蛍光ビーズの結果の2倍以上となった。原因としては、細胞と蛍光ビーズの磁化率の違いや細胞は底面までたどり着くと、接着してしまうことが挙げられる。

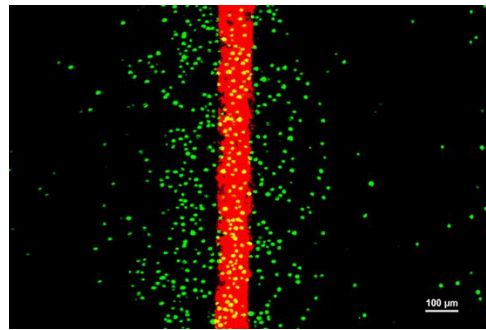


図4 パターニングされた細胞の蛍光像。

(3) 細胞上への細胞パターニング

実験開始から1時間半後の様子を図5に示す。写真中で赤色の点が1層目の細胞、緑色の点が2層目の細胞である。パターニング幅は256 μm であった。以上から、細胞もポリスチレンビーズと同様にパターニングできることが確認できた。

従来の細胞接着分子のパターニングによる細胞パターニングでは困難であった細胞上への細胞パターニングに成功した。また、チャンバ底面を厚みを0.14 mmから0.11 mmと薄くすることでパターニング幅を256 μm と狭くすることに成功した。今後、より薄いガラスや樹脂フィルムを底面とすることでパターニング幅をより狭くすることが可能であると考えられる。

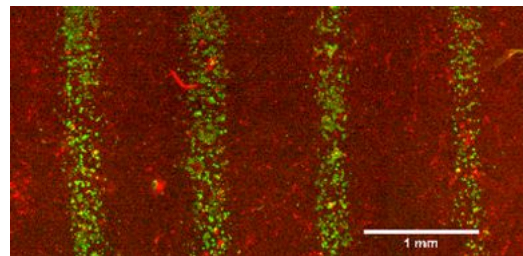


図5 細胞上にパターニングされた細胞。

(4) 電磁石デバイスの磁場解析

電磁石デバイスにおいて、各コイルに印加する電流の大きさを制御することで、ヨークの中心に設置したマイクロチャンバ内の磁束密度の分布が変化させることができる。例えば、各コイルに位相を $\pi/2$ ずつずらした正弦波電流を印加すると、図6に示すような磁束密度が最小である点が回転するような磁場を生成することができる。その結果、スフェロイドはチャンバの中心を回転中心とした円運動をする。

汎用 FEM 解析ソフトウェア (COMSOL Multiphysics 5.1) を用いて印加電流の振幅と角度を変化させた時の磁束密度分布を解析した。印加する電流の概要と各条件における磁束密度分布を図6に示す。

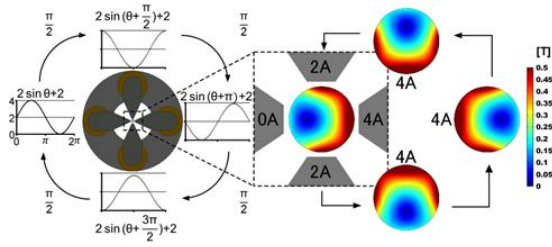


図 6 各ヨークに印加する電流と磁束密度分布 .

(5) マイクロ流路内での微小组織の操作

微小组織（スフェロイド）を予めチャンバに導入し、チャンバ中央に配置した。3 時間置くことで、チャンバ底面に細胞を接着させた。接着後、新たなスフェロイドを流路に導入した。コイルに電流を印加し、チャンバ中央に固定したスフェロイドに 0 度、90 度、180 度、270 度の方向から、スフェロイドを接着させた（図 7）。固定したスフェロイドに対して、0 度、90 度、180 度、270 度の方向からスフェロイドを融合させることに成功した。

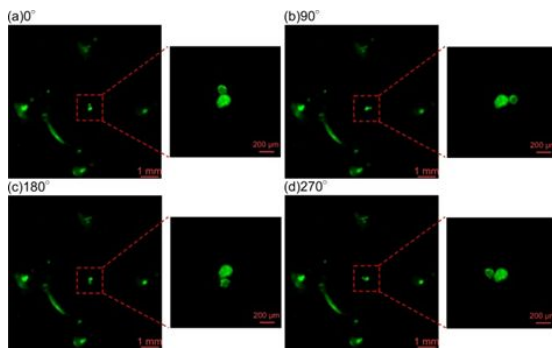


図 7 各方向からのスフェロイド操作 .

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

秋山佳丈, 逆転の発想で, 細胞を磁場であやつる, 生物工学会誌, 査読無, 2018, 96, p. 143.

秋山佳丈, 磁気を使って細胞を任意形状に配置, ケミカルエンジニアリング, 査読無, 2017, 61, pp. 35-41.

〔学会発表〕(計 10 件)

菱田豊, 秋山佳丈, “磁気アルキメデス効果を用いた磁気走査型細胞パターンング—3 次元磁気走査システムの構築とその評価—,” 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017.

H. Suenaga, J. Sugihara, M. Horie, Y. Akiyama, “Direct Bioactuator Formation on Microstructure by Quasi-diamagnetic Assembly,” The 21st International

Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会) .

Y. Akiyama, A. Watanabe, “Label-free Electromagnetic Spheroid Manipulation Based on the Magneto-Archimedes Effect,” 27th 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2016) (国際学会) .

Y. Akiyama, J. Sugihara, “Direct muscle tissue formation between micropillars by label-free magnetic cell assembly,” The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016) (国際学会) .

秋山佳丈, “ラベルフリー磁気アセンブリによるオンチップスフェロイド形成と融合” 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 34 回研究会.

渡辺彬生, 秋山佳丈, “閉鎖空間内における電磁石を利用した微小生体組織のラベルフリー磁気操作” 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 33 回研究会.

秋山佳丈, 柴田健吾, 秋山義勝, 大和雅之, “磁気走査型細胞パターンングデバイス開発に向けた基礎的検討” 第 15 回日本再生医療学会総会.

Y. Akiyama, “Assessment of electromagnetic device for label-free magnetic cell assembly,” International Conference on Biofabrication 2015(国際学会) .

秋山佳丈, “ラベルフリー磁気細胞アセンブリによる微小構造体上への直接的 3 次元組織構築,” 日本機械学会 2015 年度年次大会.

Y. Akiyama, “Three-dimensional Biofabrication toward Biohybrid Microdevices,” The 15th International Union of Materials Research Societies, International Conference in Asia (IUMRS-ICA) (国際学会) .

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 三次元造形体及びその製造方法
発明者: 秋山佳丈, 鈴木大介, 湊逢香
権利者: 国立大学法人信州大学

種類：特許
番号：特願 2018-059892
出願年月日：平成 30 年 3 月 27 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://biohybrid.chips.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

秋山 佳丈 (AKIYAMA, Yoshitake)
信州大学・学術研究院繊維学系・准教授
研究者番号：8 0 5 8 5 8 7 8