

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01374

研究課題名(和文) 表面に3次元培養表皮をもつことで内部の恒常性を維持するポータブル細胞培養デバイス

研究課題名(英文) Homeostatic portable cell culture device with 3D skin equivalent

研究代表者

二井 信行 (Futai, Nobuyuki)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10508378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞培養は微生物汚染に弱く、それが細胞培養が可搬性を損なっている一因である。我々は、デバイスに角化細胞を導入することで、それが放出する抗菌ペプチドが、細胞培養を微生物汚染に強くする可能性に注目したが、その効果を検証するためには、デバイスから得られる微量の培養液サンプル中の抗菌ペプチドを連続的かつ高感度に検出する必要がある。本研究では、20マイクロリットル程度の微量の培地に含まれる抗菌ペプチドLL-37を、LL-37のアプタマー、ならびに等速電気泳動(isotachopheresis: ITP)を併用することで高感度に検出できるシステムを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因未同定あるいは潜在的な健康問題・環境上の脅威を検出できる「細胞ベース」バイオセンサ、または、細胞を移植する医療(細胞医療)など、研究対象としての培養細胞を、医療・環境等の分野で広く応用するための技術に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Cell culture is vulnerable to microbial contamination, which is one of the reasons that cell culture is less portable. We focused on the possibility that the antimicrobial peptides released by keratinocytes that are introduced into the device could make cell culture robust against microbial contamination. To verify the effect, it is necessary to detect antimicrobial peptides with high sensitivity in a small amount of culture media sampled continuously. We developed a system that can detect the antimicrobial peptide LL-37 contained in a very small amount of medium of about 20 microliters with high sensitivity by selective LL-37 complex formation with an LL-37 aptamer, and separation of the complexes using isotachopheresis.

研究分野：生体医工学，マイクロ流体工学

キーワード：細胞培養 バイオセンサ 抗菌ペプチド 等速電気泳動 アプタマー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞培養とは、生体組織から分離した細胞を培養液中で増殖・維持することである。細胞培養は、複雑な生命現象を単純なモデルで再現できるモデルであり、有用な物質の産出にも用いられている。よく知られているように、細胞を体外で生存させるためには、適切な培養表面や足場を与えること、必要な栄養や成長因子を、培地を介して補給すること、培地の温度、pH、濃度を一定に保つこと、そして外部からの一切の微生物を遮断することなど、実に多くの必要条件がある。言い換えると、「細胞が自立できる最小の条件」の数は、いまだ非常に多い。

申請者は、細胞を工学的に便利に活用することを目指し、細胞培養の可搬性の向上に取り組み、CO₂ インキュベータ不要のモバイル細胞培養デバイスなど、細胞の自立条件の一部をなくす一定の成果を得てきた。しかし、現状では、デバイスを密閉し、化学平衡を用いて安定した CO₂/O₂ 分圧を得ているが、細胞の増殖や代謝に伴う経時的な過剰 CO₂ と O₂ 不足に対応できない。また、低密度・少数の細胞、特に初代培養の神経細胞を、デバイス内に生存させるのが困難である。マイクロ流体技術による対策の効果は限定的である。

2. 研究の目的

- ① 上記問題の解決のために、生体内外の境界にあつて、周囲の環境変化に耐えて生命を維持する役割を担う器官である皮膚の特性を表面に取り入れたデバイスの開発に思い至った。移植用の人工表皮・人工真皮、そして動物実験代替用の培養皮膚はすでに存在するが、皮膚により外界とデバイス内部を適度に連通させて内部の物理化学的条件を生理的に保ち、汎用的な細胞デバイス構築技術として確立する。具体的には、3次元培養皮膚が形成されたウェルインサートを組み込んだポータブルな共培養デバイスを作成し、細胞の生存と培養皮膚の健全性の指標である経皮抵抗(TER)値を評価した。さらに、培養皮膚と別種の細胞を共培養する際に問題になるのが培地である。そのため、培養皮膚用とそれ以外の汎用的な培地を使用した際の、培養皮膚の TER 値の変化もあわせて評価した。
- ② さらに、培養皮膚を用いて共培養デバイスを製作することに加え、皮膚細胞の恒常性維持への具体的な貢献である抗菌ペプチドの放出を頑強な細胞培養デバイスの実現に向けて最適化することにも注目した。まず、抗菌ペプチドの小型デバイス内における効果を検証するためには、まず、デバイスから得られる微量の培養液サンプル中の抗菌ペプチドを連続的かつ高感度に検出する必要がある。そこで、ヒト皮膚表面角化細胞が生産する抗菌ペプチドの一種である LL-37 に注目し、これを等速電気泳動(isotachopheresis: ITP) と qPCR を併用することで高感度に検出することを試みた。

3. 研究の方法

- ① ガラスボトムで、培地導入口と培養カップ挿入用の穴をもつ透明 PMMA 製リザーバをもつ培養容器を製作した。3次元皮膚モデル(JTEC EPI-MODEL24)を含む培養カップを上記の穴に挿入し接着した。
デバイスの培地導入口から CO₂ インキュベータ内(37°C 5%CO₂)で 30 分静置平衡化したアッセイ培地(3次元皮膚モデル付属の培地)、ウシ胎児血清(FBS)+アスコルビン酸添加 DMEM、または皮膚培養に適しているとみられるウシ新生児血清(NBCS)アスコルビン酸添加 DMEM を加えた。デバイス底面をサーモプレートにより 37°C に加温した状態と、CO₂ インキュベータ内に静置した状態とで、デバイス内培地の pH と経皮抵抗(TER)の変化を測定し記録した。さらに、細胞(COS-7)をゼラチンコーティングしたデバイス表面に導入した。これを、前節と同様にサーモプレート上と CO₂ インキュベータ内とでそれぞれ培養し、倒立位相差顕微鏡(Leica DMi8)にて位相差像を観察した。測定液として 154 mM MgSO₄ 水溶液を用いた。
- ② 抗菌ペプチド LL-37 と、LL-37 特異的な DNA アプタマー(40 nt)を緩衝液中で混合し、サンプルとした。透明シリコン(PDMS)製のオープンマイクロ流体デバイスに導入した。このマイクロ流体デバイスには、あらかじめ 1%アガロースゲルと、2種類の緩衝液(Tris-HCl と Tris-HEPES 緩衝液)を導入し、白金電極を用いて電圧を印加することで、そのゲル状で等速電気泳動(ITP)を行えるようになっている。ITP 開始前のサンプルには、LL-37、LL-37-アプタマー-DNA 複合体、未結合アプタマー-DNA が存在する。ITP 開始後、それぞれ等速かつ異なる移動度でアプタマー-DNA と複合体は陽極側、LL-37 単体は陰極側に泳動する。泳動後、複合体のピークを含んだゲルを抽出し、LL-37-アプタマーをテンプレートとして qPCR を行い、増幅曲線、C_q 値(PCR 副産物がある一定量に達した時のサイクル数)を得ることで、LL-37 の濃度を間接的に求める。また、qPCR を使用するかわりに、電気泳動後の未結合アプタマーと複合体ピークを蛍光染色し、輝度を測定し相対輝度から LL-37 の濃度を推定することも試みた。

4. 研究成果

① 図 1 に、CO₂ インキュベータ内に静置または、インキュベータ外のサーモプレートで底面を加温されただけのデバイスにおける培地 pH とその時間変化を示す。図 3A に示すように、CO₂ インキュベータ外で加温されたデバイスの培地 pH が上昇していることがフェノールレッドの色からもわかる。図 3B 及び 3C に、pH 計にて計測されたデバイス内培地 pH と TER の時間変化のグラフを示す。インキュベータ内のデバイスは pH が低く、TER の値は大きい、インキュベータ外のデバイスは pH が高く、TER の値は小さいという結果になった。また、CO₂ インキュベータ内とインキュベータ外に置かれたデバイス内でそれぞれ培養された COS-7 の、培養開始後 12h, 18h, 24h 経過時点での画像を図 4 に示す。COS-7 は、少なくとも 24h 時点では、インキュベータ内外で共に生存が確認され、細胞が時間経過に連れて増殖する様子も観察できた。

インキュベータ外で加温されたデバイスの培地 pH は、CO₂ インキュベータ内に置かれたデバイスのそれよりも上昇した。その要因は、培地内の CO₂ が皮膚内を拡散して放出されたためであると考えられる。これは、細胞密度が高くなると有利にはたらく可能性があるが、培養開始時には好ましいとはいえないが、いずれのケースにおいても COS-7 は死滅していなかったことから、細胞の生死に関わるほどの影響ではなかったと考えられる。

図 3 に、各条件により培養した 3 次元皮膚モデルの TER 値を示す。3 次元皮膚モデルを完全死滅させるため、3 次元皮膚モデルをエタノールに 15 分浸けその後 PBS に 1 時間浸した。1 時間 PBS に浸した後の TER 値は 557Ω であった。そこで、3 次元皮膚モデルのバリア性の可否を仮に完全死滅させた 3 次元皮膚モデルの TER 値 (557Ω) で判断することになると、図 2 に示したすべての培養条件について、3 日間は正常なバリア性を保っているものと考えられる。ただし、TER 値とその下降の速度には差がみられるため、メーカー推奨条件に近づけるべく検討する余地はあるものと考えられる。なお、共培養している皮膚モデルより共培養していない皮膚モデルのほうが TER 値は大きくなった。

以上、3 次元皮膚モデルを組み込んだ“皮膚をインターフェースにもつデバイス”を作製し、pH の上昇、TER の低下は見られながらも、細胞の 48 時間の培養及び増殖が可能であることが確認できた。デバイス上部に水分や CO₂ を発生させられる機構を追加することができれば、pH の上昇や TER の低下を緩和し、より安定した長期の培養ができる可能性がある

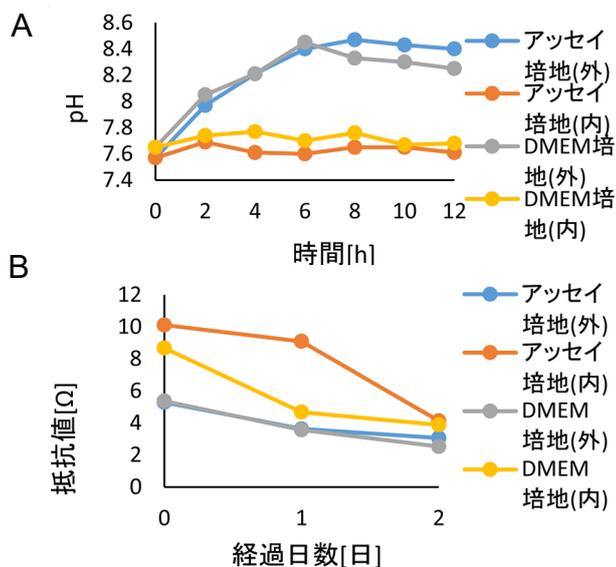


図 1. A) CO₂ インキュベータ内外および異なる培地種におけるデバイス内 pH の時間変化. B) CO₂ インキュベータ内外および異なる培地種における TER の時間変化

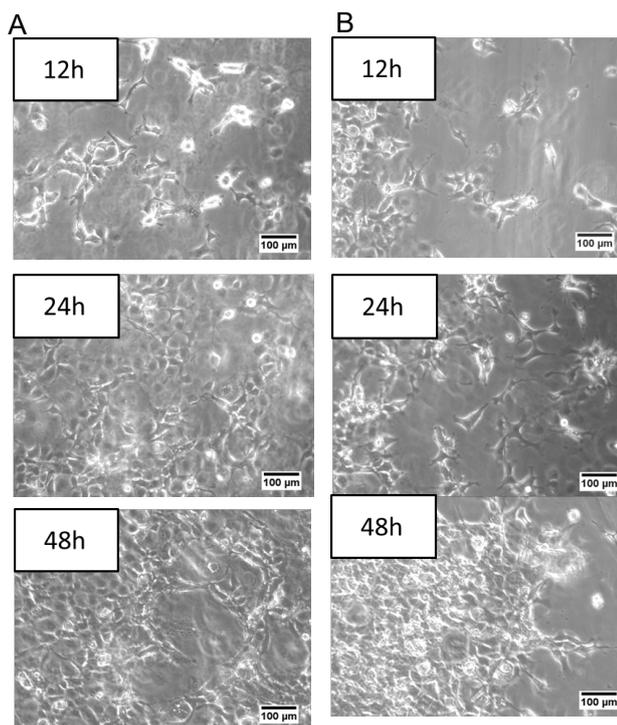


図 2. A) CO₂ インキュベータ内、B) インキュベータ外のデバイス内で 3 次元皮膚モデルと共培養された COS-7 細胞の培養開始後 12h, 24h, 48h 経過時点での位相差顕微鏡像。

考えられる。これらの課題を解決することで、インキュベータを使用しない環境下でも細胞培養が行えるデバイスが実現できると期待している。

- ② 図4に、複合体とアプタマーのITPによる分離の結果を示す。6.5mmの分離用アガロースゲルのほぼ末端にマーカーが到達した時点で、複合体とアプタマー単体を間隔約2mmで分離できた。スペーサー分子としてMESを導入したことで、手動で複合体を抽出できる程度のバンド間隔を確保することができた。アプタマーとマーカー、ならびに複合体とマーカーの相対移動度はそれぞれ $R_f=0.989$, $R_f=0.681$ となった。分解能はアプタマー2.43, 複合体4.12となった。バンドの目視や画像処理による自動検出に十分な程度の値となった。

分離抽出した LL-37-アプタマー複合体をテンプレートとして qPCR を行った結果、LL-37 アプタマー複合体は増幅を示した。0.41 μ Mの LL-37 サンプルから得られた複合体の増幅における Cq 値は平均 8.32 となった。よって Cq=30 を正常増幅における上限とした場合、理想的な検出可能限界は 0.12pM となる。培地中の典型的 LL-37 の濃度が 10 μ M オーダー以上であることを考えると十分でこの検出可能限界は培養液中の LL-37 を検出するうえで十分な値であるといえる。

一方、qPCR をもちいる検出方法は操作が煩雑かつデリケートであり長時間を要するというデメリットがあった。よってより簡便に LL-37 を検出することができる手段として、それぞれのピークの輝度から相対輝度を算出する手法を用いた。相対輝度と LL-37 濃度の検量線を図5に示す。アプタマーに対する複合体の相対輝度と LL-37 濃度は比例関係にあり、ITP とこの検量線を用いることで LL-37 濃度を測定できると考えられる。しかし相対輝度からわかる通り、アプタマーに対して複合体の輝度がかなり小さい。したがってアプタマーと LL-37 の結合が弱いと考えられる。結合をより強くするにはアプタマーを最適な配列にすることが必要である。

以上、等速電気泳動を用いて複合体をアプタマーから分離・抽出することができた。また、qPCR を用いた増幅曲線から LL-37 の検出は可能であったが、本研究では相対輝度から導出される検量線により LL-37 の検出をする方法のほうが、操作の簡便性の観点から最適であると考えられる。

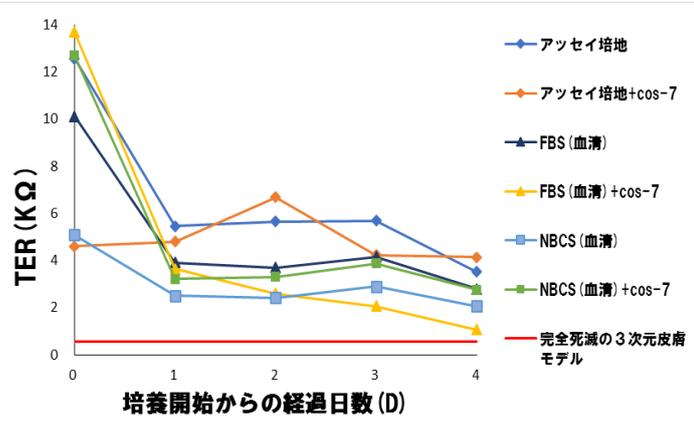


図3.各種培地中で培養された3次元皮膚モデルの経上皮電気抵抗値(TER)の時間変化

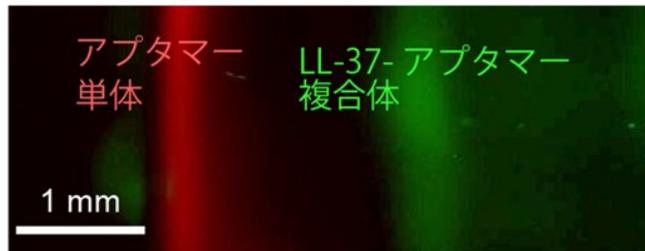
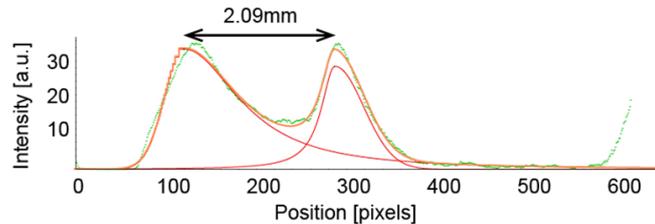


図4. 等速電気泳動により分離された複合体(右側バンド)と単体アプタマー(同左)。

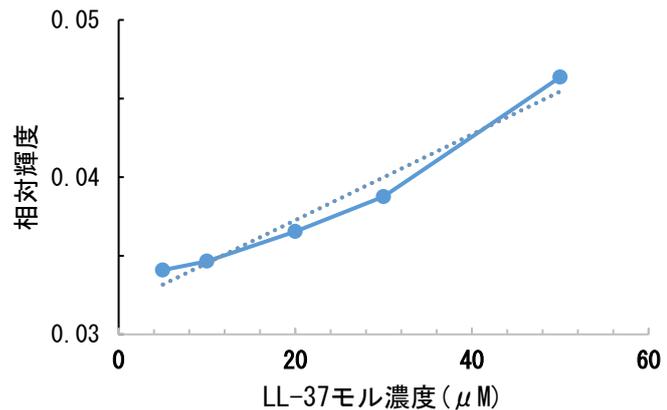


図5. LL-37 モル濃度とアプタマーに対する複合体の相対輝度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Olmedo-Suarez, M. A. Sekiguchi, T. Takano, A. Canizares-Macias, M. D. P. Futai, N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Integrated On-Chip 3D Vascular Network Culture under Hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11050475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Futai, N. Tamura, M. Ogawa, T. Tanaka, M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Microfluidic Long-Term Gradient Generator with Axon Separation Prototyped by 185 nm Diffused Light Photolithography of SU-8 Photoresist	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi10010009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Futai, N. Fujita, K. Ikuta, W.	4. 巻 134
2. 論文標題 Reconfigurable Microfluidic Channel with Pin-discretized Sidewalls	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 e57230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ono, M. Yamaguchi, K. Rasyid, A. Takano, A. Tanaka, M. Futai, N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Reconfigurable microfluidic device with discretized sidewall	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 34103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.4983148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 A. Ramachandran, N. Futai, J. G. Santiago
2. 発表標題 Multiplexed target enrichment for rapid and lower-cost molecular diagnostics using isotachopheresis
3. 学会等名 2018 American Electrophoresis Society (AES) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. Futai, A. Ramachandran, C. Hogan, K. Murugesan, N. Banaei, J. G. Santiago
2. 発表標題 Cell-free DNA enrichment for rapid and lower-cost molecular diagnostics for tuberculosis using isotachopheresis
3. 学会等名 4BIT Summit USA 2018, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月健汰, 二井信行
2. 発表標題 等速電気泳動とqPCRによる抗菌ペプチドの検出
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井 里帆, J. G. Santiago, 二井 信行
2. 発表標題 アガロースゲル等速電気泳動によるDNAの分離と分解能の評価
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生物微小流体工学研究室HP
<http://www.cd.mech.shibaura-it.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----