

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790076
 研究課題名 (和文) 流体の性質を利用した単一細胞を操作・解析するための
 新しいマイクロシステムの構築
 研究課題名 (英文) Fabrication of microsystem for microfluidic handling and analysis
 of individual single cells
 研究代表者
 枝川 義邦 (EDAGAWA, Yoshikuni)
 早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機構・准教授
 研究者番号：50303607

研究成果の概要：

本研究では、マイクロチップ上で単一の細胞を分離し、孤立させたまま効率よく捕獲・培養を可能とするデバイスと一連のシステムの開発を行った。システムの主要部にマイクロ流体デバイスをを用いることにより、微小な流れの中での種々の細胞種について非侵襲的に単一細胞の分離・捕獲を可能とし、捕獲部位における微小培養を実現した。さらに、微小培養した細胞のオルガネラなど関連対象物のイメージングが可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	300,000	2,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細胞生物学，マイクロ流体システム，単一細胞，微小培養

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム情報が明らかとされた現在，DNA などの遺伝情報が生体を形成する全ての分子の機能性を一義的に決定するという考えのもとに生物情報に関する研究が展開されてきている。例えば，細胞全体をひと

つのシステムとして捉えるセロミクス研究では，同一種の細胞は同一の挙動を示すことを前提にした「平均値」的な考え方に基づいて展開されようとしている。しかし一方で，多細胞系において各細胞が示す形態や機能性には，その細胞固有の「個性」と

もいべき特徴が見られることも分かっている。これは、細胞の成り立ちが遺伝子により規定されているだけでなく、外部要因が大きな影響力をもつことを示している。このような細胞の「個性」は、単一細胞を核として組織形成を行う再生医学分野においては、成果を左右するような要素となり得るのであるが、現在のところ、ひとつひとつの細胞に視点を向けての網羅的解析を行っている研究は殆どなく、知見は非常に乏しい。このような個々の細胞に視点を置いてハイスループットな解析を行うためには、既存の方法ではなく学際的な新しいテクノロジーを導入したシステムの開発が必要であると考えられる。最近では、マイクロチップ内で細胞を培養し、薬物への暴露を可能にする研究例が数例報告されており、マイクロテクノロジーを用いて構築した微小な空間において細胞を培養後、薬理的な解析へ展開することを期待できるようになってきた。しかしこれらの適用例では、細胞培養を行うために細胞の数や接着位置をコントロールできてはおらず、多数の細胞を集団として扱うか、偶然的要因が大きいまま行うに留まっている例が殆どである。逆に単一細胞を扱うためには、分離した細胞をひとつひとつマイクロピペットで移動させる必要があり、ハイスループットの解析を行うまでには至っていない。やはり、細胞の選別から培養・薬物投与などの一連の操作を実験者のコントロールのもとに、ひとつのマイクロチップ上で安定して自動的に行うことができるシステムの開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が既に開発を手がけているシステムを継続して発展させることにより、流体の性質を利用して、単一

細胞から数個の細胞がひとつのコミュニティーで生育する場をひとつのチップ内で形成し、単一細胞操作のためのマイクロ流体システムへの展開とそれを利用した細胞生物学的解析を行っていくことにある。

3. 研究の方法

半導体分野で頻用される微細加工技術を用いて、マイクロ流体デバイスを作製し、デバイス内での細胞孤立化と捕獲、培養を行う。また、デバイス内での培養細胞のイメージングなど形態学的・機能的な解析を施す。

4. 研究成果

本研究では、単一細胞を分離・培養を可能とするデバイスと一連のシステムの開発と最適化、それを用いた細胞生物学的・薬理的展開を行った。システムの主要構成は、マイクロ流体デバイスに汎用される polydimethylsiloxane により作製したレプリカをガラスディッシュ（直径 35 mm）にマウントしたものをを用い、デバイス内部のデザインが直線状のメインチャネル（幅 100 μm ）と細胞を取り扱う半円筒状のマイクロチャンバー（断面の直径 100 μm ）を配した構造のものとした。さらに、倒立型顕微鏡と簡易型インキュベータによる顕微鏡観察下での細胞培養や CCD カメラによる経時観察と組み合わせることにより、捕獲後の培養細胞の挙動を経時観察した。デバイスのデザインと条件設定の最適化を行った結果、細胞分散液および細胞培養液をメインチャネルに導入し、メインチャネルを流れる溶液の流量を調節し 2 液間のバランスを最適にすることによりマイクロチャンバーにおける単一細胞の孤立捕獲が可能となり、 10^5 個オーダーの細胞を含む細胞懸濁液から複数の単一細胞を効率

よく分離・捕獲し，捕獲場所における少なくとも1週間の比較的長期の培養が実現するに至った．さらに，増殖性の細胞では，微小空間における細胞増殖により多世代の細胞コミュニティ形成も可能となった．さらに培養細胞のオルガネライメージングとして，生細胞の核染色にはHoechst33342，ミトコンドリア染色にはMitotrackerを用い，アクチン染色には固定化後にPhalloidin染色を行った．PC12細胞を用いた検討では，神経成長因子の刺激に伴って細胞突起を伸長することが可能であった．また，本システムは流体を用いての細胞操作を行うので細胞培養液の流れ方向に沿った物理的なストレスが突起伸長方向を規定することが予想されたが，デバイス内における培養細胞においても必ずしもストレス因子のみが伸長方向を規定する訳ではないことが示唆された．さらに，マイクロ流体デバイス内での層流を利用して，細胞もしくは形成させた細胞コミュニティへの局所的な薬液投与システムの開発を試みた．

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8件)

1) 渡辺卓、大坪洋子、荒川貴博、庄子習一、山口佳則、枝川義邦，“Micropharmacological application of micro-culture device for single cells on microfluidic system”，第82回日本薬理学会年会，神奈川県横浜市，2009.3

2) Y Edagawa, T Arakawa, S Shoji, Y Yamaguchi, “Micro-culture of single cell on microfluidic manipulation system”，第31回日本神経科学学会，東京，2008.7

3) 枝川義邦，荒川貴博，庄子習一，山口佳則，“単一細胞を非侵襲的に捕獲し多世代培養を可能とするマイクロシステムの開発”，日本組織培養学会第81回大会，茨城県つくば市，2008.5

4) 大坪洋子，村上洋一，庄子習一，岩崎秀雄，山口佳則，枝川義邦，“マイクロ流体システムを用いた単一細胞操作：微小空間における細胞の単離・培養と分化誘導”，日本薬学会第128年会，神奈川県横浜市，2008.3

5) 浜田久義，荒川貴博，村上洋一，酒井清孝，庄子習一，武田直也，山口佳則，枝川義邦，“単一細胞を非侵襲的に捕獲し長期培養を可能とするマイクロシステムの構築”，第81回日本薬理学会年会，神奈川県横浜市，2008.3

6) Y Yamaguchi, T Arakawa, S Shoji, Y Edagawa, “Microfluidic manipulation system for single cell isolation and culture”，22nd International Symposium on Microscale Bioseparation and Methods for System Biology, Berlin, Germany, 2008.3

7) Y Edagawa, T Arakawa, H Hamada, K Sakai, S Shoji, Y Yamaguchi, N Takeda, “Multimodal manipulation for individual single cells on a micro-fluidic system”，37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2007.11

8) 山口佳則，荒川貴博，庄子習一，武田直也，枝川義邦，“細胞一個のマイクロ流路内での捕獲・培養デバイスの開発”，日本分析化学会第56年会，徳島県徳島市，2008.9

6 . 研究組織

(1)研究代表者

枝川義邦 (EDAGAWA YOSHIKUNI)

早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機
構・准教授

研究者番号 : 50303607