

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700458

研究課題名(和文) Cell-to-Cell バイオチップを用いた3次元培養法による細胞間相互の応答

研究課題名(英文) Cell-cell interaction in 3D cell culture using a original biochip

研究代表者：

益田 泰輔 (MASUDA TAISUKE)

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：30431513

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞-細胞間の3次元相互作用に着目し、3次元状態を構築しようとしているその場を提供しうる独自のバイオチップの開発を行った。また、そのバイオチップを用いて細胞間相互作用の検討を行い、3次元組織構造体の再構築を目指した基盤研究を行った。その結果、本研究で提案する3次元培養方法がより生理的環境に近いこと、未分化軟骨細胞の分化促進効果が示され、より生理的環境下に近い状態であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have paid attention to cell-cell interaction, developed an original biochip. Moreover, the cell-cell interaction was examined by using this biochip. And, it aimed at the restructuring of three-dimensional tissue. As a result, it was shown that the effect of the differentiation promotion of chondrocyte to method of three-dimensional culture proposed in the present study, and nearing to a more physiological environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

細胞を取り巻く周辺環境や細胞相互のコミュニケーションは細胞の増殖・分化・死の制御・調節をつかさどっている。in vitroにおいて最適な組織再生(細胞培養)を行う場合、この生体内環境を模倣することが1つの手段である。次世代培養方法として注目される3次元培養は、これまでもコラーゲンゲル包埋培養、遠心培養、スフェロイド形成培養、3次元担体培養など多数提案され、その必要性の高さがうかがえる。しかし、いずれの培養方法においても細胞の3次元状態がどのような位置や配向を示すのかを定義したものではなく、研究者によって細胞の3次元化に対する捉え方は異なっている。本研究は、細胞-細胞間の空間的なインタラクションを細胞自身にて補填し、3次元相互作用(いわゆるCell-to-Cell Contact)を構築する細胞培養方法の着想に基づいている。

細胞-細胞間の空間的なインタラクションを細胞自身にて補填し、3次元相互作用(いわゆるCell-to-Cell Contact)を構築する細胞培養方法の着想に基づいている。

2. 研究の目的

(1) 生体内環境を模倣した Cell-to-Cell バイオチップの作製

単層培養した2つの基板を用意し、一定期間培養後にサブミクロンの空隙間距離を維持して培養面同士を水平に重ね合わせる。上下方向に細胞外基質を誘導し細胞接着・増殖により細胞間のインタラクションを補填し、3次元の位置情報を備えた培養環境を提供

する。これにより細胞-細胞間の接着因子の生理的な意義はもとより、隣接する細胞同士のコミュニケーション、シグナル伝達経路が過敏になり細胞間相互作用が著しく活性化され、3次元効果が期待される。

(2) 生体内環境を模倣したジオメトリック三次元凝集体バイオチップの作製

従来のスフェロイド（3D球体細胞凝集体）は直径 200 μm を超えると培地の供給および老廃物の除去ができずにスフェロイド中心部において細胞が壊死してしまうことが知られている。そこで3次元細胞凝集体の幾何学形状を制御し、任意の細胞凝集体を作成するバイオチップを作製する。ここではスフェロイド中心部を培地の供給や老廃物の除去のために開放したトロイダル形状の細胞凝集体の作成を目的とし、効率的な酸素・栄養分の供給による3次元細胞凝集体の長期培養を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体内環境を模倣した Cell-to-Cell バイオチップの作製

Cell-to-Cell バイオチップの作製コンセプトを以下に示す。

① 使用する基板は非毒性で透明性を備えること：基板材料は、その優良な生体適合性からバイオ分野で頻りに利用される PDMS（ポリジメチルシロキサン）を使用する。申請者もこれまでのバイオチップ等への適用からその機能性・操作性は熟知している。また、PDMS の透明性は上下重ね合わせた培養においても光学的な測定が可能である。

② サブミクロンの一定距離を維持すること：平面培養した細胞の厚みは数十ミクロン程度である。3次元培養に最適な距離を検討するために、上下重ね合わせたときにサブミクロンの一定距離を維持できるバイオチップをソフトリソグラフィーにて作成する。また、バイオチップは正確な上下位置合わせ機構を備え、培養期間中に不本意なズレが生じない構造とする。

③ サブミクロンの隙間に栄養補給、試薬投与できること：開いた系の培養において、空隙間は培地の循環ができずにアポトーシスを起こす可能性がある。提案するバイオチップはマイクロ流路を備え、強制的に老廃物の除去、栄養の補給、成長因子の投与などを行い、細胞外基質の誘導を行う。

以上のことをふまえ Cell-to-Cell バイオチップを作製した（図1）。

細胞はマウス由来未分化骨芽細胞 ST-2 を用い、それぞれ上下 PDMS 基板の親水化処理・フィブロネクチン固定を行い、ST-2 細胞を播種した。上下重ね合わせ、一定期間培養

後に LIVE/DEAD アッセイを行った。

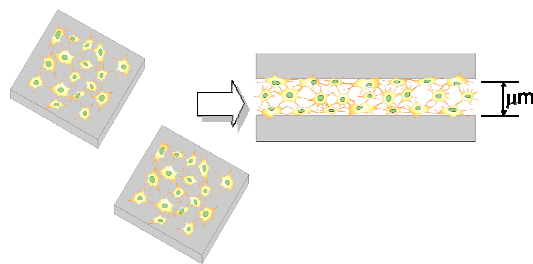


図1 Cell-to-Cell バイオチップのコンセプト図。数ミクロンの幅を維持して重ね合わせ、上下方向のセルコンタクトを期待する。

(2) 生体内環境を模倣したジオメトリック三次元凝集体バイオチップの作製

トロイダル形状細胞凝集体の作成コンセプトを図2に示す。本研究で提案する培養デバイスは、細胞非接着性U字底に1本のマイクロポストを有するチャンバーをアレイ化させたものである。チャンバー内に播種した細胞は、その非接着性表面とU字底のためポスト周囲に集積し、一定期間の培養後にはトロイダル形状の細胞凝集体が形成される。培養デバイスは、ソフトリソグラフィー技術を応用することにより、容易にそのU字底の曲率、およびマイクロポストサイズを変更することができ、形状やサイズの異なる凝集体を作成することが可能である。

培養デバイスの作製は、高精密な加工が安価に行えるソフトリソグラフィー技術に加え、三次元微細加工技術の1つであるグレースケール露光を用いた。グレースケール露光は濃淡パターン（グレースケールマスク）を通して平行光を照射し、連続的かつ滑らかな深さパターンの加工を行う手法である。グレースケールマスクの設計次第で任意の三次元形状の作製が可能だが、グレースケールマスクが非常に高価であり作製パターンの設計変更が容易に行えない。そこで本件研究ではマスクを利用しないマスクレス・グレースケール露光を行いました。本研究で使用したマスクレス露光装置（以下、液晶露光装置）は、市販の液晶プロジェクタを搭載することにより、PC によって描画した任意のビットマップ画像（BMP ファイル）をフォトレジストに直接縮小投写することができるため、グレースケールのラピッドプロトタイピングが可能である。

PDMS（ポリジメチルシロキサン）培養デバイスの表面は 4% Pluronic（F-127）で6時間インキュベートし、細胞非接着処理を行った。細胞試料はマウス由来軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いた。細胞凝集体形成実験は、DMEM（5% FBS, 1% penicillin/streptomycin）で 1×10^6 cells / 3ml / device の濃度で3日間培

養した。3日間培養後、細胞形態観察とLIVE/DEADアッセイを行った。さらに軟骨分化マーカーであるグリコサミノグリカンの産生量を定量するためにアルシアンブルーアッセイを行った。

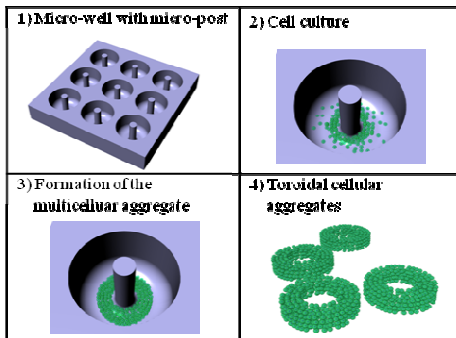


図2 トロイダル形状細胞凝集体の作成コンセプト図

4. 研究成果

(1) 生体内環境を模倣した Cell-to-Cell バイオチップの作製

Cell-to-Cell バイオチップを用いたマウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 による細胞相互の応答の検討を行った。図3に Cell-to-Cell バイオチップおよび培地循環システムの写真を示す。バイオチップはチップ成型過程に生じるオス・メスをそのまま上下培養基板に利用することにより、位置合わせが容易で、培養領域を密閉された空間（チャンネル）とでき培地および試薬の液送が可能となった。

共焦点顕微鏡を用いて LIVE/DEAD アッセイを行った結果、86%の生存率が確認され長期間の細胞培養が可能であることが明らかになった。また、全 RNA を抽出して RT-PCR により mRNA の発現量を調べた結果、2次元培養（単層培養）群と比較して Cell-to-Cell バイオチップで培養した培養群は HSP70 の発現が優位に低下することが確認された。HSP70 は代表的な熱ショックタンパク質で、熱刺激のみならず様々な刺激・ストレスによって発現することが知られている。つまり本研究で作製した Cell-to-Cell バイオチップは単層培養に比べストレスが少なく、より生理的環境下に近い状態で培養できることが示唆された。

(2) 生体内環境を模倣したジオメトリック三次元凝集体バイオチップの作製

図6にマスクレス・グレースケール露光によって作製したバイオチップの断面写真と形状パターンを示す。培養チャンバーはU字底と十分な高さのマイクロポストを有することが確認され、ジオメトリック三次元細胞凝集体バイオチップとして目的の形状を達

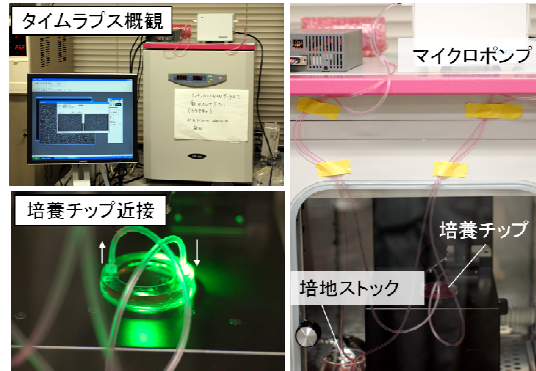


図3 Cell-to-Cell バイオチップの実験概観

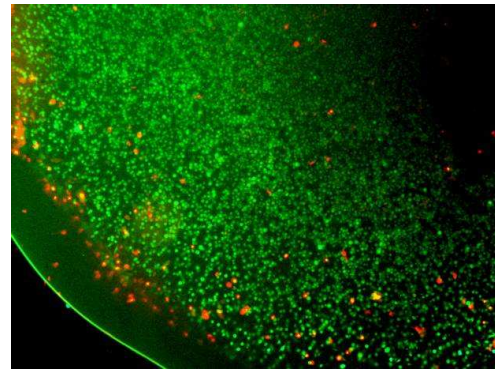


図4 Cell-to-Cell バイオチップを用いた ST-2 細胞の LIVE/DEAD アッセイ

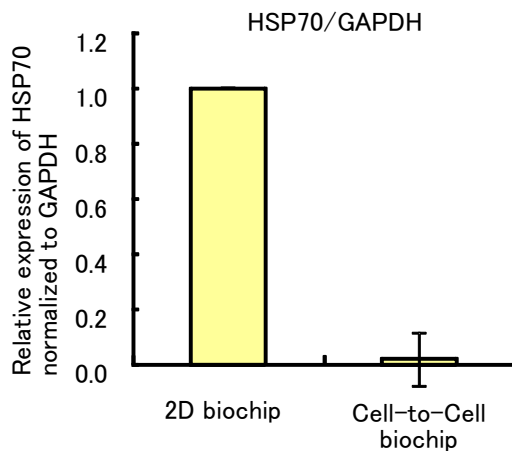


図5 Cell-to-Cell バイオチップを用いた ST-2 細胞の HSP70 の発現量評価

成できた。本研究におけるマスクレス露光装置を利用したグレースケール露光技術は、従来のフォトリソグラフィに比べより安価で作製できること、さらにはラピッドプロトタイプングに適していることから、今後の細胞凝集体の形状変更またはサイズ変更を適宜必要とする、スクリーニング評価などにも有効な技術となり得る。

バイオチップ培養装置を用いて ATDC5 細胞を3次元培養した結果、中心部分に空孔を

もつトロイダル形状の細胞凝集体を作成することに成功した(図7). 市販されている3次元スフェロイド培養容器は、スフェロイドが底部に固着せず不安定に浮遊した状態で凝集するため、培地交換が困難であった。それに対して今回提案するトロイダル細胞凝集体形成デバイスは、細胞がマイクロポスト周囲に巻きつくように集積、チャンバー内に安定して保持できるため、培地の交換および試薬の投与などの操作性が格段に改善された。また、LIVE/DEAD アッセイの結果、約95%の生存が確認された。また、アルシアンブルー染色を行い細胞内グリコサミノグリカン量を定量した結果、市販のスフェロイド培養器で作成した3次元細胞凝集体と比較して、トロイダル形状3次元細胞凝集体が軟骨細胞の分化を約1.7倍促進することが観察された(図8)。

今回作成したトロイダル形状3次元細胞凝集体は、中心孔を利用した三次元的な組織のアセンブリなどが考えられ、中心孔の方向性を制御し三次元的にアセンブリすることで、血管系や神経系の導入を含めた機能性をもった組織の再構築が可能になると考えられる。また、その機能性を有する三次元組織構造体の再構築に応用して、バイオアクチュエータ、再生医療、ドラッグデリバリーなどの多岐にわたる展開が期待される。

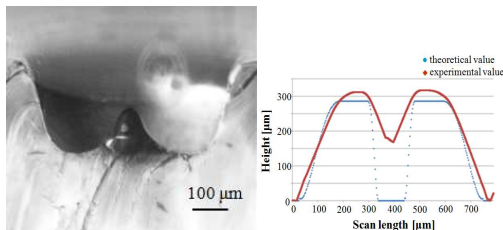


図6 トロイダル三次元細胞凝集体マイクロチップの断面写真および残差計の結果。

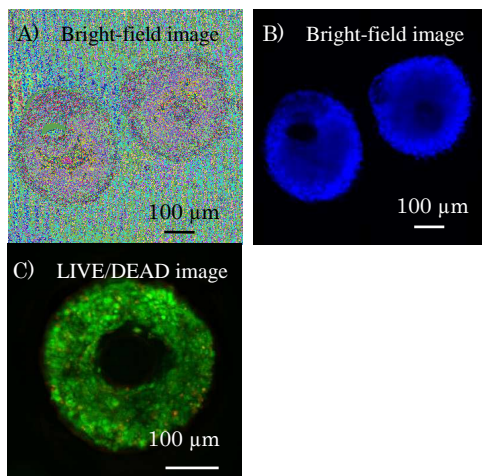


図7 トロイダル三次元細胞凝集体の顕微鏡写真. C) 3日間培養後 LIVE/DEAD アッセ

イした結果、95%の生存が確認された。

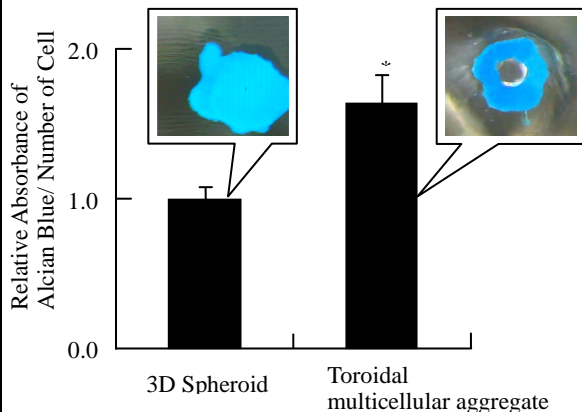


図8 通常スフェロイド細胞凝集体とトロイダル細胞凝集体のグリコサミノグリカン産生量の比較

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)

[雑誌論文] (計7件)

- ① H Hagiwara, T. Kawahara, T. Masuda, et al, On-Chip Magnetically Actuated Robot with Ultrasonic Vibration for Single Cell Manipulations, Lab on a Chip, (2011) 印刷中, 査読有.
- ② H Maruyama, K Kotani, T. Masuda, et al, Nanomanipulation of single influenza virus using dielectrophoretic concentration and optical tweezers for single virus infection to a specific cell on a microfluidic chip, Microfluidic Nanofluidic, 10 (2011) 1109-1117, 査読有.
- ③ Y Shiwaku, Y Honda, T. Masuda, et al, Analysis of physicochemical properties of octacalcium phosphate prepared by hydrolysis and co-precipitation with fluoride ions, J Ceram Soc Japan, 118 (2010) 402-405, 査読有.
- ④ T. Masuda, T Kawai, T Anada, et al, Quality of regenerated bone enhanced by implantation of octacalcium phosphate-collagen composite, Tissue Eng Part C, 16 (2010) 471-478, 査読有.
- ⑤ T Anada, T. Masuda, Y. Honda, et al, Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression, Sens Actuators B Chem, 147 (2010) 376-379, 査読有.
- ⑥ N Shiraishi, T Anada, T. Masuda, et al, Preparation and characterization of porous alginate scaffolds containing various amounts of octacalcium phosphate (OCP)

crystals, J Mater Sci Mater Med, 21 (2010) 907-914, 査読有.

- ⑦ I Takahashi, T Masuda, K Kohsaka, et al, Molecular Mechanisms of mechanical Stress Response during Chondrogenesis, Journal of Biomechanical Science and Engineering, J Biomechanical Science and Engineering, 4 (2009) 307-316, 査読有.

〔学会発表〕(計9件)

- ① T Masuda, et al, Active virus filter for enrichment and manipulation of virus, 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, (2011.1.24) Cancun, メキシコ.
- ② 益田泰輔ほか, 細胞-細胞間微細操作における力学刺激応答, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, (2011.1.8) 熊本.
- ③ 益田泰輔ほか, 単一ウイルス分離操作のための能動ウイルスフィルタ, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, (2011.1.8) 熊本.
- ④ 益田泰輔ほか, MEMS技術による3次元細胞凝集体の作成, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, (2011.1.8) 熊本.
- ⑤ 益田泰輔ほか, 能動ウイルスフィルタを用いた単一ウイルス操作, 第11回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, (2010.12.25) 仙台.
- ⑥ 益田泰輔ほか, 能動ウイルスフィルタによるウイルス濃度制御, 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, (2010.11.18) 名古屋.
- ⑦ 益田泰輔ほか, マスクレス・グレースケール露光を利用した3次元培養装置の作成, 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, (2010.11.18) 名古屋.
- ⑧ 益田泰輔ほか, 長期培養のための3次元細胞凝集体形成デバイスの開発, 日第28回日本ロボット学会学術講演会, (2010.9.22) 名古屋.
- ⑨ T Masuda, et al, Development of a pH indicator immobilized gel-sheet for micro-environment analysis, 20th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, (2009.11.8) Nagoya.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/index.html>

(1) 研究代表者

益田 泰輔 (MASUDA TAISUKE)

名古屋大学・大学院工学研究科・特任助教
研究者番号：30431513

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし