

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20401

研究課題名（和文）前立腺がん発生時における腫瘍微小環境の模擬・解析のためのデバイス開発

研究課題名（英文）Development of a Device for Simulating and Analyzing Tumor Microenvironment in Prostate Cancer Onset

研究代表者

栗生 識（Kuriu, Satoru）

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：90966318

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：誘電泳動は、液中の細胞に高周波電圧を印加することで電極上に捕捉する技術である。誘電泳動を応用し、細胞を配列・培養する技術開発を行なった。誘電泳動した後、流路の誘電泳動用溶液から培養液に置換する必要があるが、液置換中に細胞が剥離してしまうという課題があった。そこで、誘電泳動で細胞を捕捉した後、流路の天地を逆転させ細胞を培養液に落下させるデバイスの開発を行なった。本研究で開発された技術を応用することで、細胞の配列を個々に設定した培養系開発に寄与することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内において細胞は精緻に配列しており、臓器のような立体構造を構成している。マイクロ流体デバイスは、このような生体内環境を人工的に模擬するための技術として注目されている。これまで、細胞を配列させるための手法は、細胞を含んだ液を流すことに留まっていた。本研究で開発された技術は、細胞の配列を一つ一つ制御することが可能である。今後、生体内における細胞の精緻な配列を再現した培養系の構築を実現し、生体内における臓器などの生命現象をより詳細に研究することに寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Dielectrophoretic manipulation is a technique that enables the capture of cells in liquid by leveraging differences in conductivity between intracellular and extracellular environments. In this study, dielectrophoretic manipulation was employed to develop a technique for aligning and culturing cells. Following dielectrophoresis, a challenge arose during the liquid replacement process, where cells tended to detach. To address this issue, a device was developed to reverse the orientation of the flow channel after dielectrophoretic manipulation, allowing cells to fall into the culture medium. The technology developed in this study contributes to the development of cultivation systems where cells can be individually arranged, thereby enhancing the control over cell alignment.

研究分野：機械工学

キーワード：マイクロ流体デバイス 誘電泳動 細胞

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロ流体デバイスは、臓器や腫瘍などの構造・機能を人工的に模擬することが可能な技術として注目されている。しかし、生体内では細胞が精緻に配列している一方で、これを模擬する手法が“細胞を含んだ溶液を流す”、“構造物を用意してそこに格納する”といったことに限られており、狙った数、狙った場所へ配列することに制約があった。

この課題を解決する手段として、誘電泳動による細胞の捕獲に着目した。誘電泳動は、細胞に高周波電圧を印加することで細胞を電極上に捕捉する技術である。誘電泳動には“正”と“負”の誘電泳動が存在する。正の誘電泳動は、細胞内の誘電率が外部の誘電率より大きい場合であり、負の誘電泳動はその逆である。細胞を一つ一つ配列させたような場合は、正の誘電泳動が適している。

一方で正の誘電泳動の作用には、細胞内外の導電率の差を設ける必要がある。さらに細胞の破損を防ぐため、細胞内外の浸透圧を同程度に保つ必要がある。このように正の誘電泳動には、上記二つの条件を満たすよう試薬を調整する必要があるが、調整された試薬は細胞の培養に適さない。正の誘電泳動を用いた細胞捕捉の研究においては、長期培養を実現するための研究が行われていない。そこで本研究では、誘電泳動により配列した細胞の培養環境構築手法の開発に取り組むこととした。

### 2. 研究の目的

本研究は、誘電泳動により配列させた細胞を長期培養することが可能な手法を開発することを目的とする。これにより細胞を一つ一つ配列させた状態から細胞を培養することが可能となる。将来的には、がんの発生時における腫瘍微小環境を模擬した実験系の構築などに寄与することが期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞捕捉のための誘電泳動条件の検討

誘電泳動には、2本の対抗する電極(電極①と②)が複数並んだ、くし形状の電極を用いる。電極①と②に交流電圧を印加することで、細胞に誘電泳動力を作用させる(図1)。

細胞はマイクロ流体デバイス内の流路を流れた状態で電極に捕捉される。そこで、流路を流れる細胞を捕捉可能な誘電泳動の条件として、交流電圧の電圧と周波数を実験的に調査した。また、誘電泳動のために必要な試薬(誘電泳動バッファ)を参考文献などに基づき、以下のように調整した：10 mM HEPES, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 59 mM D-glucose, 236 mM Sucrose。

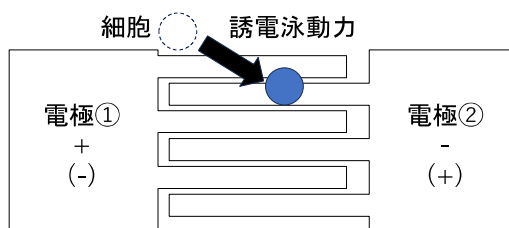


図1. 誘電泳動の原理

#### (2)誘電泳動後の細胞培養環境構築手法の検討

誘電泳動バッファは細胞の培養に適していないため、誘電泳動後は細胞を培養液がある環境に移す必要がある。そこで誘電泳動バッファから培養液への置換方法を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞捕捉のための誘電泳動条件の検討

本研究で使用した電極基板を図2に示す。電極基盤は、ガラス上にくし形状(縦幅80 μm、間隔10 μm)のITO電極がプリントされている。

この電極を用いて、誘電泳動の条件を実験的に検討した。この電極状に細胞を一つ一つトラップするためのwellを配置した(図3)。使用する細胞は、ヒト前立腺がん細胞株として一般的なDU145を用いた。DU145の直径を調べたところ、直径14~20 μmの細胞が80%以上を占めていた

ため、wellの直径は20 μmに設定した。流路(幅5 mm、高さ50 μm)に流量1~3 uL/minで細胞を流した。流量が1 uL/minの場合、細胞が流路底面に付着してしまい溜まってしまった。また流量が3 uL/minの場合、流れが速くなってしまい、細胞にダメージを与える可能性のある6V以上

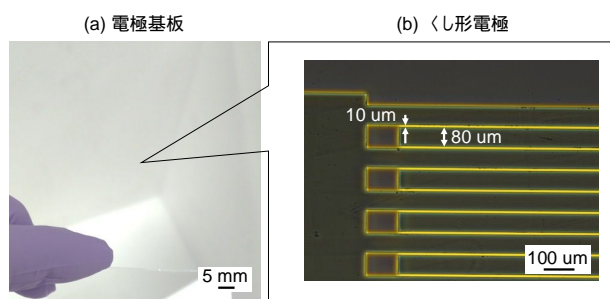


図2. くし形電極. (a)電極基盤. (b)くし形電極.

の電圧を印加しないと捕捉できなかった。そこで、流量は 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  に固定し、誘電泳動の条件を検討した。結果、電圧 5 V・周波数 3.5 MHz の条件による誘電泳動が細胞捕捉に適することが判った(図 4)。

#### (2) 誘電泳動後の細胞培養環境構築手法の検討

誘電泳動後、流路内の誘電泳動バッファを培養液に置換することを試みた。電極上に捕捉した細胞を動かさないよう、培養液を流量 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  以下で流路に流すことで液の置換を試みたが、時間の経過とともに細胞が電極から剥離してしまうという問題が発生した。

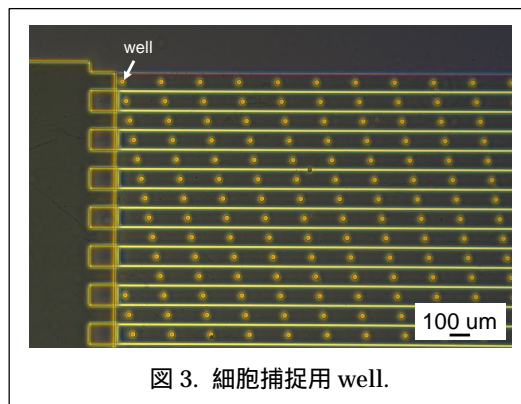


図 3. 細胞捕捉用 well.

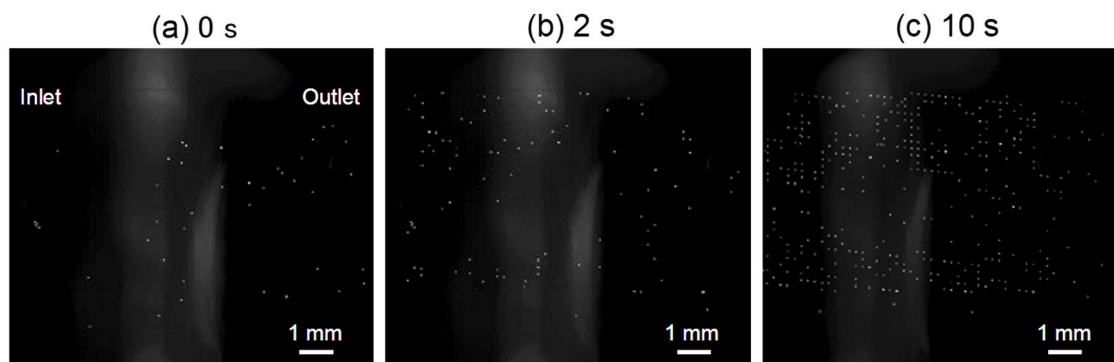


図 4. Well 上への細胞の捕捉. 誘電泳動開始から (a) 0 s. (b) 2 s. (c) 10 s.

そこで発想の転換として、誘電泳動で捕獲した細胞を重力で培養用のチャンバに移送するというアイデア(①誘電泳動で細胞を捕捉→②流路の天井を開放し、デバイスの天地を逆転→③誘電泳動を off にして、細胞を培養液の中に落下)を着想した。そのため、流路の天井を開放可能なデバイスを作製した(図 5)。流路は電極を備えたガラス基板上に、流路の形を備えたガイドを貼り付けてある。さらにガイドには両面テープを貼り付けてあり、誘電泳動実験時は天井を密着させることで流路を密閉し、細胞を移送させる際は天井を剥がすことで流路を開放する。捕捉した細胞を重力により落下させた際の様子を図 6 に示す。ピンク色の光点が蛍光染色した細胞である。誘電泳動を off にしてから 60 秒経過時には、重力による落下で観察していた

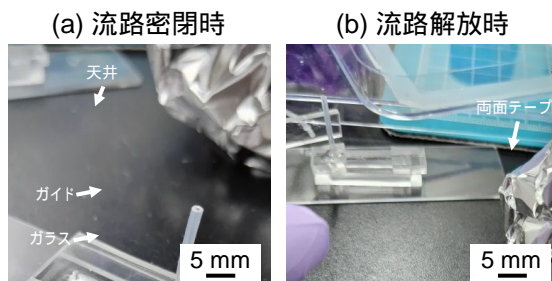


図 5. 流路開放が可能なデバイス. 流路(a)密閉時. (b)解放時.

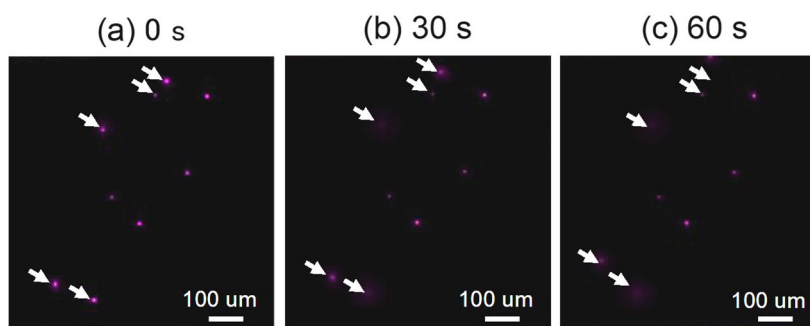


図 6. 捕捉した細胞の重力による移送. 移送開始から (a) 0 s, (b) 30 s, (c) 60 s.

白矢印は落下した細胞.

視野の高さから消えた。一方で、観察していた細胞 9 個のうち 4 個は電極状に残ってしまった。この原因として、細胞が誘電泳動バッファに比べ比重が同程度であったことや、電極に付着してしまったことが可能性として考えられる。

本研究では、誘電泳動により配列させた細胞を長期培養することが可能な手法を開発することを目的とし、誘電泳動による細胞の捕捉後、培養液へ移送することを目的としたデバイスを開

発した。移送するため、流路天井を開放可能なデバイス形態を考案した。開発したデバイスを用い、誘電泳動により捕捉した細胞を重力により培養液中へ落下させることに成功した。

一方で、落下を試みた細胞のうち半数近くが電極付近に残留してしまうことがあった。今後は細胞が電極に付着しない工夫や溶液の比重を調整するなどして細胞の落下効率を向上させる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------