

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25820397

研究課題名(和文) マイクロ流体デバイスによる非侵襲的細胞周期同調法の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive cell cycle synchronization method by microfluidic devices

研究代表者

右田 聖 (Satoshi, Migita)

山形大学・理工学研究科・助教

研究者番号：00512302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が開発したマイクロ流体デバイスによるサイズ分離を基にした細胞周期同調を中心に研究を行った。その結果、流路内壁のアルブミン処理によりG0/G1期細胞の回収効率を90%以上に、G2/M期細胞の回収効率を50%以上に向上させることに成功した。また、細胞周期ごとの接着性を利用した細胞分離法を考案し、マイクロ流路では分離効率が低いG2/M期やS期の細胞も効率よく回収できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell cycle synchronization technique which is size-based sorting with microfluidic device was developed. Recovery efficiency of cells from the device was improved by albumin treatment in the microchannel. The recovery rate of G0/G1 phase and G2/M phase were over 90% and 50%, respectively. The size-based microfluidic device was able to separate the cells on G0/G1 phase efficiently by albumin treatment. Also, cell separation technique based on the attachment activity of each cell cycle phase was developed. G2/M phase and S phase may recover efficiently using this technique.

研究分野：生体材料学

キーワード：マイクロデバイス 分離操作 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

細胞周期は、1つの細胞が2つの細胞に分裂するまでの一連の過程を表すものであり、DNA合成準備期(G1期)、DNA合成期(S期)、細胞分裂準備期(G2期)および細胞分裂期(M期)に分類することができる。クローン動物を作成する際には、前処理として細胞周期をG1期に同調させなければならないことが報告されている。また、細胞周期は遺伝子発現のタイミングや細胞膜の流動性の変化とも密接に関連していると考えられるため、これを自在に制御することはクローン技術のみならず、遺伝子治療や細胞治療においても重要なプロセスである。

現在用いられている細胞周期同調法は、培養液から血清成分を除去し、細胞を栄養飢餓状態で培養することにより細胞周期をG1期に同調させる方法やDNAに特異的に結合する薬剤を使用してDNAの複製・分配を阻害する方法である。これらの方法は、強制的に細胞周期を停止させる方法であり、細胞への負担が大きいことから、しばしばDNAを傷つけ、ガン化を誘導したり、細胞死を引き起こすことが知られている。

本研究以前、我々はHydrodynamic Filtrationという原理に基づき、細胞をその大きさごとに分離するためのマイクロ流体デバイスを構築した(図1および図2)。このデバイスを用いると、それぞれのOutletで異なる大きさの細胞を回収することができる。さらに、回収された細胞は、細胞周期に依存して分離されていることを見出した。特に、最も小さいサイズの細胞を回収できるOutletでは、回収された細胞の約80%がG1期であることを明らかにした。しかし、チャンネル内壁に細胞が吸着し詰まったり、細胞の膜を損傷したりすることが問題であった。また、一度に処理できる細胞数が限られることやG1期細胞以外の同調分離に関しても課題が残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、チャンネル内壁の表面処理を行うことで、分離の効率化を実現し、細胞にダメージを与えることなく、細胞周期を同調させる新しい手法を確立することを目的とした。また、M期やS期をターゲットとした分離法の検討および新しいデバイス作成の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 分離効率向上の検討

図1に示すようなデバイスをポリジメチルシロキサン(PDMS)によって作成した。この、デバイスのチャンネル内を0.1%のウシ血清アルブミン(BSA)で満たし、37℃で1時間静置することで流路内壁にBSAを吸着させた。洗浄後、ここにマウス胎児繊維芽細胞NIH3T3およびマウス骨芽細胞MC3T3-E1細胞を導入し、分離を行った。分離後に回収された細胞

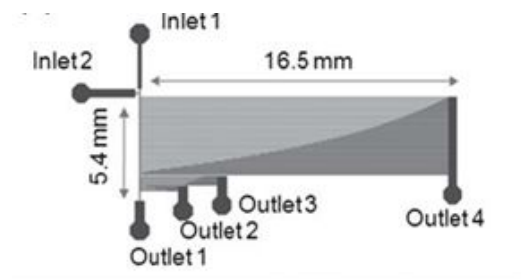


図1 マイクロデバイスの概要図



図2 PDMSで作成したデバイス (Migita et al., Anal. Methods から引用、一部改変)

の顕微鏡写真を取得し、Image Jを用いて細胞のサイズを計測した。その後、細胞をエタノールで固定し、核をPIで染色した。細胞周期の同定にはイメージベースサイトメーター(Tali, Invitrogen)を用いた。

(2) S期をターゲットとした新しい分離法の検討

細胞のサイズを正確に測定した結果、S期の細胞はサイズの分布が広く、細胞サイズに基づいた分離は難しいと判断した。そこで、細胞周期ごとの接着性の違いに基づく分離の可能性を検討した。まず、マイクロデバイスを利用して90%がG1期にある細胞集団を作成した。また、ノコダゾールを利用してM期に同調した細胞集団を作成した。これらを組織培養皿で12時間培養し、接着形態を観察した。さらに細胞培養基材の表面粗さに依存した分離ができないか検討を行った。表面粗さをRa=数nmとRa=100nmに調整し、分離後の細胞がどのような接着性の違いを見せるか観察した。基材には表面粗さを調整しやすい金属製のものを用いた。

(3) 新しいマイクロデバイス

マイクロデバイスによる細胞の分離では、一度に処理できる細胞数が少なく、回収後生きたまの細胞を生化学・分子生物学的に分析することが難しい。そこで、少ない細胞数でも生物学的分析を可能とする新しいデザインのマイクロデバイスについて検討した。しかしながら、小ロットでのフォトマスクや鋳型の作成は割高になりがちで、多くのデザインを試すことは、限られた研究費のなかでは難しい場合も多い。そこで、スコッチテー

ブを鋳型として利用することで簡易的なマイクロデバイスが作成できないか検討を行った。まず、ドロソフトでデバイスをデザインした。これを、カッティングプロッタへ出力し、スコッチテープをデザイン通りに切断した。その後、切断したスコッチテープを基材に貼り付け、デバイスの鋳型とした。ここに PDMS を流し込みデバイスを作成した。

4. 研究成果

(1) 分離効率向上の検討

デバイスの基材として用いる PDMS への細胞の非特異吸着を抑制するために、PDMS 表面のコーティングについて検討した。アルブミン、ポリエチレングリコール (PEG) を検討した結果、細胞の非特異吸着を抑制するためには、0.1%のアルブミンで1時間処理するれば十分であることを明らかにした。アルブミン処理を行ったデバイスを用いて細胞を分離したところ、研究開始前は 80%程度だった G1 期の回収率を 90%以上に向上させることに成功した (図 3)。

ついで、分裂期にある G2/M 期の細胞の分離を検討した。G2/M 期細胞のサイズ分布は G1 期細胞および S 期細胞とは大きく異なるため、マイクロ流路によるサイズ分離は容易だと考えられた。しかし、大きいサイズが回収できるチャンネルから回収した細胞のうち、G2/M 期の細胞は 20%程度であった。この場合も、チャンネル内壁のコーティングの影響が大きく向上し、アルブミン処理により回収した細胞の 50%が G2/M 期となった。G2/M 期の細胞は比較的大きなサイズを示すため、チャンネル内での細胞どうしの凝集や詰まりによる影響を受けていたと考えられる。

以上のように、PDMS 基材のコーティング条件に従い処理したデバイスを用いることで、G1 期および G2/M 期の細胞の分離効率をこれまで以上に高くできる可能性を見出した。また、サイズ分離の効率はデバイス表面におけるタンパク質や細胞などの非特異吸着によるわずかな圧力変化に影響されることが明らかになった。

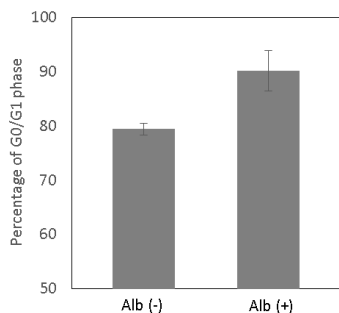


図 3 流路内壁のアルブミン(Alb)処理が G1 期細胞の分離に及ぼす影響

(2) S 期をターゲットとした新しい分離法の検討

細胞周期における S 期は DNA 合成の段階である。まず細胞サイズの正確な計測を行った。モデルケースとして使用した NIH3T3 の G0/G1 期細胞のサイズは 14~15 μm であったのに対し、S 期細胞のサイズは 17~18 μm であり、G0/G1 期細胞よりも 2~3 μm だけ大きなサイズを示した。これまでのデバイスを利用して分離を試みたところ、回収した細胞のうち S 期細胞は最高でも 38%にとどまり、残りの多くは G0/G1 期細胞であった。このことから、マイクロ流体デバイスによるサイズ分離では G0/G1 期と S 期とを十分に分離することが難しいと判断した。そこで細胞サイズ分離による方法ではなく、細胞周期に依存した基材への接着性の違いを利用した分離ができないか検討を行った。

位相差顕微鏡により観察したところ、播種前に S 期に同調させた細胞は、培養 12 時間後には基材に扁平に広がるように接着することがわかった (図 5b)。一方で、G0/G1 期細胞に同調させた細胞は、遊走活性が高く、絶えず動き回っている様子が観察された (図 5a)。これは細胞周期ごとの増殖や遊走に関連するイベントの違いを反映したものであると考えられる。一般的に接着性が低下し、基材から剥離しやすいと言われているのは G2/M 期である。このことから、播種前に G0/G1 期に同調させた細胞は、12 時間培養したことにより、同調したまま細胞周期が進行し、M 期となっているのではないかと考えられる。このため、いったんマイクロデバイスで G0/G1 期細胞のみを分離・回収し、それを適切な時間培養することで、G2/M 期や S 期に同調した細胞集団を作り出すことができるのではないかと考えられる。また、培養基材をポリスチレン製の組織培養皿から金属基板に変更したところ、細胞周期による接着性の違いがより顕著に現われることを見出した。

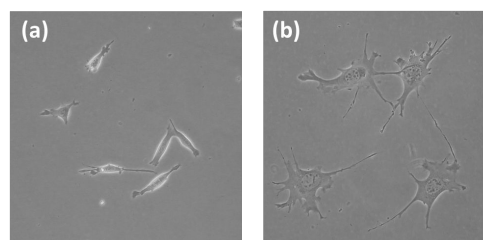


図 4 デバイスで分離した細胞を 12 時間培養した後の顕微鏡像。(a) G1 期細胞、(b) S 期細胞

(3) 新しいマイクロデバイスアレイ

スコッチテープを利用した簡易型マイクロデバイスの作成法について検討した。使用したスコッチテープの厚さは 50 μm であった。ドロソフト Inkscape を利用して PC 上でデ

バイスをデザインし、それをカッティングプロッタに出力した。カットされたスコッチテープをマイクロ流路の鋳型とした。PDMSを用いてマイクロデバイスを作成したところ、最小で幅 200 μm 、深さ 50 μm のチャンネルを形成することに成功した。また、この方法で様々な形状のデバイスを作成できることを明らかにした(図5)。このデバイスの横断面を観察したところ、チャンネルの深さは約 50 μm であり、スコッチテープの厚さを反映していた。さらに、このなかに細胞を導入し、回収することに成功した(図6)。

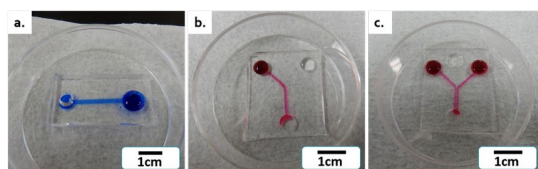


図 5 スコッチテープを鋳型として作成したマイクロデバイス。1 inlet 1 outlet (左図)、2 inlet 1 outlet (中央)、3 inlet 1 outlet (右図)

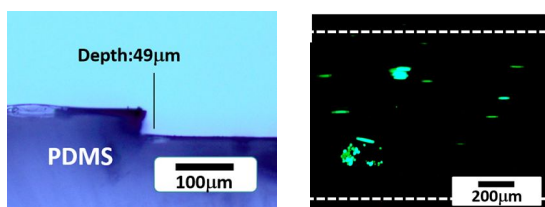


図 6 スコッチテープを鋳型として作成したデバイスの横断面(左図)、チャンネル内に細胞を導入した様子(右図)

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 1 件)

1. Satoshi Migita, So Okuyama, Kunitaka Araki, Sub-micrometer scale surface roughness of titanium reduces fibroblasts function, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, **14**, e65-e69, DOI:10.5301/jabfm.5000260, 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 右田 聖, 荒木国孝, 奥山 颯, 蘇亜拉
図 Zr-1Cr 合金へのタンパク質吸着及び細胞接着性評価, 第 36 回バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 京都, 2015 年 11 月 10 日
2. 右田 聖, 荒木 国孝, 金属材料の表面

粗さによる骨芽細胞の機能制御, 第 67 回生物工学会大会, 城山観光ホテル, 鹿児島, 2015 年 10 月 28 日

3. 右田 聖, 金属表面における細胞初期接着挙動の解析, 第 24 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 東京女子医科大学, 東京, 2015 年 1 月 19 日
4. 右田 聖, 奥山 颯, 荒木国孝, 異なる表面粗さを持つ Ti が細胞の接着に及ぼす影響, 第 36 回バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀, 東京, 2014 年 11 月 17 日
5. Satoshi Migita, Cell cycle synchronization for reproducible cell-based biosensor, US-Japan Nano-bio symposium, Tsukuba, Dec 9th, 2013

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.facebook.com/miglab33>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 聖 (MIGITA SATOSHI)
山形大学・理工学研究科・助教
研究者番号: 00512302