

課題番号 : F-17-KT-0007  
利用形態 : 技術代行  
利用課題名(日本語) : ナノ・マイクロ加工技術による細胞機能制御  
Program Title(English) : Cell function controls by nano/micro fabrication technology  
利用者名(日本語) : 亀井謙一郎  
Username(English) : K. Kamei  
所属名(日本語) : 京都大学高等研究院物質・細胞統合システム拠点  
Affiliation(English) : Kyoto University Institute of Advanced Study, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University  
キーワード/Keyword : 形状・形態観察、ナノファイバー、マイクロ流体デバイス

## 1. 概要(Summary)

細胞治療、再生医療、薬剤開発等へのヒト多能性幹細胞の応用を展開するうえで、その細胞運命(自己複製能・多分化能)を正確に制御することは重要である。生体内では、ニッチと呼ばれる細胞外微小環境により細胞運命が決定されている。そのため、生体外において定義された材料を用いニッチを再構築・模倣することは、生体内により近い細胞・組織を安定して得るために有効である。

ニッチは、可溶性因子(増殖因子、ホルモン、ガス分子、イオン)、細胞外マトリクス、細胞間相互作用から構成される。しかし、これらを生体外において再現するには、従来の細胞培養技術では困難である。この課題を解決するひとつのアプローチとして、ナノ・マイクロ加工技術が考えられている。例えば、ナノファイバーは、細胞外マトリクスのトポロジー・機械特性を模倣できるだけでなく、タンパク質・ペプチド因子が修飾可能、作製が容易、構成成分が定義されているといった利点があり、産業応用を指向した人工細胞基質として注目されている。一方、可溶性因子や細胞間相互作用を3次元的に制御する技術としてマイクロ流体デバイスが利用されており、増殖因子やガス分子の濃度勾配生成、細胞パターンニング、流体せん断応力の制御、3次元細胞培養、等のより生体に近い環境を再現した数多くの報告がある。

しかしながら、ニッチ研究の多くは、様々な因子を個々に構築し評価したものであり、それぞれの総合的な組み合わせを検討した例は少ない。

そこで、我々の研究では、様々な構成因子から成るニッチをスクリーニングするためのデバイスの開発を目指している。本研究では、そのコンセプトを示すために、人工細胞基質であるナノファイバー(NF)と、3次元微小環境構築を可能とするマイクロ流体デバイス( $\mu$ FD)をアレイ

状に組み合わせたハイスループットスクリーニング用デバイス(NF- $\mu$ FD)を開発し、これを用いて幹細胞の運命決定における様々な培養条件を検討した。

開発したNF- $\mu$ FDは主に① $\mu$ FDアレイと、②NFアレイの2つの要素から成る。

$\mu$ FDアレイは、生体適合性・ガス透過性に優れたPDMSを材料とした、長さ1.0 mm、幅0.7 mm、高さ0.25/0.5/1.0 mmのシンプルな設計の細胞培養チャンバを1プレート上に48個有するデバイスである。このデバイスは、96 wellプレートと同じ規格で作製されており、一般的なオートインジェクターによるセミオートマティックな実験に対応可能である。また、 $\mu$ FDの鋳型作製には一般的にフォトリソグラフィーを利用するが、本研究では、3Dプリンタにより行った。解像度はリソグラフィーに比べ劣るが、デザイン変更が時間的・コスト的に非常に容易である他、96 wellプレート規格のような比較的大きなデバイス作製にも容易に対応可能である。一方、NFアレイは、エレクトロスピニング法を利用し、簡便・安価に作製された。NFアレイには、デザインの異なる8種類のプラスチック製マスクを用いて、1プレート上に種類と密度の異なる16(最大48)種類のナノファイバーを作製した。ここで用いたマスクは、3Dプリンタにより数時間で作製されている。最後に、 $\mu$ FDアレイとNFアレイをコロナ放電処理した後に貼り付けることにより、NF- $\mu$ FDを得た。

現在、作製されたNF- $\mu$ FD上でH9ヒトES細胞を3日間培養し、多能性、増殖能、アポトーシス、細胞数について、波長の異なる蛍光色素を用いた同時解析を行っているところである。これにより、幹細胞の多能性維持におけるファイバーの種類・密度、細胞密度の組み合わせの影響を評価すると共に、本スクリーニングデバイスの有効性を示す。

## 5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

(1) Kamei et al., Small, 13, 1603104 (2017)

## 6. 関連特許(Patent)

なし。

## 2. 実験(Experimental)

### 【利用した主な装置】

3D 測定レーザー顕微鏡、超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡、高速液中原子間力顕微鏡、全反射励起蛍光イメージングシステム、X線回折装置

### 【実験方法】

3D 測定レーザー顕微鏡を用いて、作製した PDMS の高さプロファイリングを評価し、目的とするデザインを作成できていることを確認した。

超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡を用いて、作製した NF の観察、直径の分布などを評価した。

全反射励起蛍光イメージングシステムを用いて、NF のイメージングを行った。

X線回折装置を用いて NF の表面の化学的特性の評価を行った。

## 3. 結果と考察(Results and Discussion)

作製したデバイスの高さプロファイリングを行った (Fig. 1)。その結果、3D プリンタで作成したモールドがデザインした高さを正確には再現しきれていないことが確認できた。

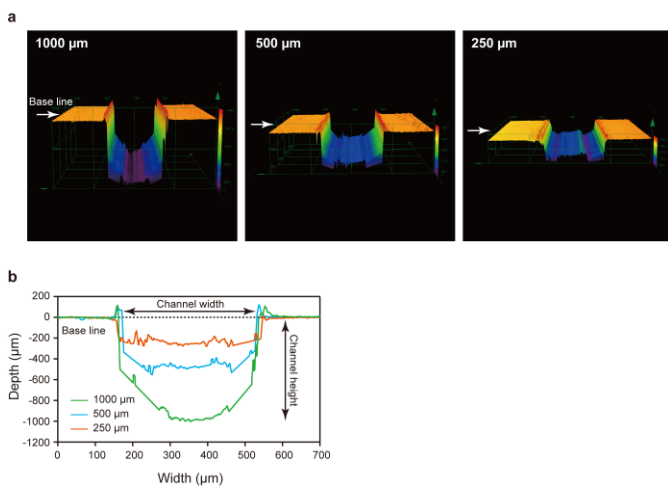


Fig. 1 Characterization of the PDMS microfluidic structure fabricated using a 3D printer. a, Images of microfluidic cell-culture channels of distinct channel heights, acquired using a 3D laser-scanning confocal microscope. b, A cross-sectional diagram of the cell-culture channels.

## 4. その他・特記事項(Others)

特になし。