

課題番号 : F-21-KT-0062
 利用形態 : 技術代行
 利用課題名(日本語) : ヒトオルガノイドを用いた重力応答機構の解析
 Program Title (English) : Analysis of response to gravity using human organoids
 利用者名(日本語) : 清木誠
 Username (English) : Makoto Seiki
 所属名(日本語) : 山口大学大学院医学研究科/システムズ再生・病態医化学
 Affiliation (English) : Graduate School of Medicine, Yamaguchi University/ Systems Biochemistry in Regeneration and Pathology
 キーワード/Keyword : マイクロ流体デバイス、リソグラフィ・露光・描画装置、SU-8、YAP、機械ホメオスタシス

1. 概要(Summary)

我々が見出した三次元臓器の重力応答機構[1]を実証する宇宙実験が予定されている。オルガノイド長期培養用 PDMS 製マイクロ流体デバイス作製(Fig.1)のため、モールドを京都大学ナノハブ拠点で作製した。

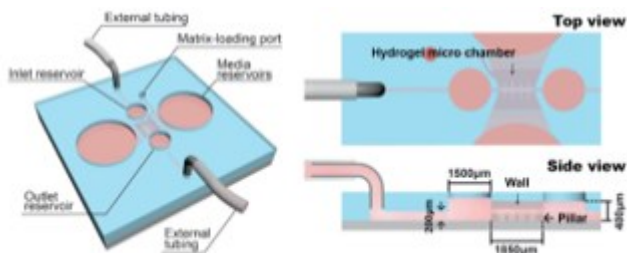


Fig.1 Schematic of 3D hydrogel-containing microfluidic device.[2]

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

レーザー直接描画装置、両面マスクアライナー、UV オゾンクリーナ・キュア装置、ウェハスピン洗浄装置

【実験方法】

レーザー直接描画装置を用いて、流路高さ 200µm (Pillar 部)と 400µm (Wall 部)用の 2 層分のフォトマスク 2 枚を作製した。最初に 4 インチ Si ウエハ上に 2 層重ね合わせのためのマークを 10µm 厚の SU-8 で形成した。モールド材となるレジストには高膜厚仕様の SU-8 を用いた。SU-8 200µm 塗布、Pillar 部用フォトマスクを介して両面マスクアライナーで露光、ベーク(95°C60min)後、2 層目の SU-8 を 200µm 塗布し、重ね合わせをして Wall 用フォトマスクを露光、ベーク(95°C60min)、PGMEA で現像した。ハードベーク(135°C4hr)後、UV オゾンクリーナ・キュア装置で親水化処理をし、パーフロシランカップリング剤(PFOCTS)で PDMS に対する離型剤処理を施してモールドを完成させた。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

作製したモールドを Fig.2 に示す。2 段構造の各厚さ、重ね合せ、Pillar 部の寸法は、所望どおりであった。



Fig.2 Fabricated SU-8 mold and measured size.

以降の処理は研究室でおこなった。これを鋳型にして PDMS 製流体デバイスを作製した(Fig.3 a)。チャンバー内にヒドロゲルを流し込み、UV レーザーアブレーションでマイクロチャンネルを形成した。腸オルガノイドを播種し、次の日には細胞が接着し腸の陰窩構造が形成できた(Fig.3 b)。

今後、長期培養後、微小重力試験をおこなう。

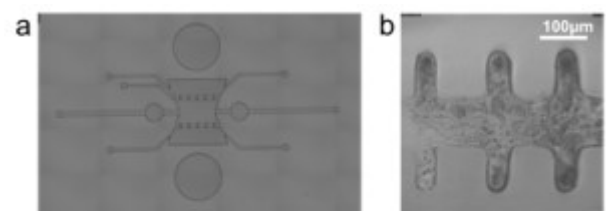


Fig.3 PDMS microfluidic device (a) was used to generate a mini-gut with crypt-like shape by culturing gut organoid cells (b).

4. その他・特記事項(Others)

・参考文献:[1] S.Porazinski et al., Nature 521, 217 (2015).

[2] M.Nikolaev et.al., DOI:10.21203/rs.3.pex-903/v1 (2020).

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

なし

6. 関連特許(Patent) なし