

2013年度 生物学奨励賞(照井賞) 受賞



細胞培養マイクロデバイスの研究

福田 淳二^{1*}・掛川 貴弘²



Microdevices for cell culture

Junji Fukuda^{1*}, Takahiro Kakegawa² (¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501; ²Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8573) Seibutsu-kogaku 92: 13-19, 2014.

はじめに

フォトリソグラフィなどの光を用いる微細加工技術は、半導体産業において汎用され高度化されてきた。すでにナノメートルオーダーの精度で、数十センチメートルのウエハ全体にわたって構造体を作製できる技術が確立され、身近にあるさまざまな工業製品に用いられている。PCやデジタルカメラ、携帯電話などが飛躍的に高性能化、小型化した大きな要因の一つはこの微細加工技術の進歩である。近年、この技術をウェットな系であるバイオ分野へと応用し、量的または質的にまったく新しい解析技術を開発する試みがなされている。この領域は、BioMEMS (micro electro mechanical systems), BioChip, microTAS (total analysis system), Lab on a chip, Microfluidicsなどさまざまな名称で呼ばれており、比較的新しい領域である。

安価なラボ用装置でも、直径数十マイクロメートルである細胞と同等、またはそれ以下のスケールで微細加工が可能である。この技術を用いて、細胞周囲の微小環境を厳密に制御し、従来では不可能であった特殊な培養条件下で細胞応答を解析するマイクロデバイスも開発されている。そして、細胞システムの基礎的な理解から再生医療のような応用まで、さまざまな展開が計られている。

我々は、フォトリソグラフィなどの微細加工技術と電気化学の手法を用い、細胞培養マイクロデバイスを開発してきた。特に、細胞と材料表面の相互作用に着目してマイクロな系で細胞接着をコントロールする技術を確認してきた。また、マイクロな系では拡散現象が細胞微小環境

や細胞間の情報伝達において重要となる。そこで、生物化学工学的な視点で細胞培養マイクロシステムを捉え、デバイスの開発および細胞評価をおこなってきた。

本稿では、我々がこれまでに開発したマイクロデバイスの中から、1) マイクロ流路を用いた濃度勾配形成および流路内での細胞マイクロパターンニング、2) 細胞外マトリックスのみを用いてマイクロパターンした異種細胞間の相互作用の解析、3) 微小電極アレイによる位置特異的な細胞脱離、について紹介する。

マイクロ流路を用いた濃度勾配形成および流路内での細胞マイクロパターンニング¹⁻³⁾

フォトリソグラフィにより作製したモールドを用いて、シリコーンゴム (polydimethylsiloxane; PDMS) へ微細形状を転写しマイクロ流路などを得る手法はソフトリソグラフィと呼ばれている。ソフトリソグラフィを利用した新しい細胞評価系として、濃度勾配形成流路 (concentration generator) を用いたマイクロデバイスがある。図1に示すデバイスでは、中央部に配置された蛇行流路を上流から下流へと移動する間に、溶液と希釈液が段階的に混合され、一連の希釈系列が形成される。そしてメイン流路で合流後 (図1C)、流路幅方向への拡散によって、なだらかな濃度勾配となる (図1D)。このようにしてメイン流路の下流の任意の位置では、同じプロファイルの濃度勾配が安定的に維持されることから、ある特定の因子の濃度勾配下における細胞応答を評価することができる。図2Aは、メイン流路に界面活性剤 (Triton X-100) の濃度勾配を形成し、線維芽細胞に暴

* 著者紹介 横浜国立大学大学院工学研究院機能の創生部門 (准教授) E-mail: fukuda@ynu.ac.jp

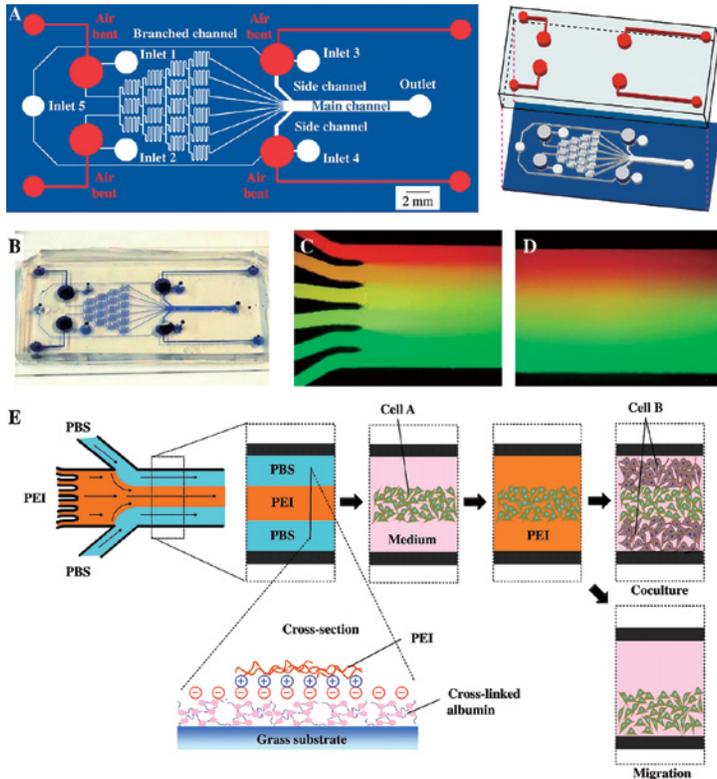


図1. 濃度勾配形成流路とマイクロ流路内細胞パターニングの模式図. デバイス上部は微細構造をもつシリコンゴム, 下部はガラス基板.

露した後, 生死染色を行った結果である. 図2B-Dは培養ディッシュを用いてそれぞれの濃度の界面活性剤に暴露した結果である. 図2Eに示すように, 流路幅方向の位置と濃度の関係は理論計算から求めることができ, 実験結果ともよく一致する. したがって, 図2B-Dのような培養ディッシュを用いた実験を繰り返さなくとも, 図2Aのように1度の実験で毒性が発現する濃度を見積もることができる¹⁾.

細胞の走化性 (Chemotaxis) の評価では, 従来は濃度勾配下の個々の細胞の動きを経時的にトレースすることで評価が行われてきた. しかしこの場合, 培養は常に顕微鏡ステージ上で観察しながら行う必要があり, また流路幅方向でそれぞれの細胞が置かれる濃度が異なるという問題があった. そこで我々は, マイクロ流路底面の細胞接着性を位置特異的にスイッチングする手法を考案した. これを用いて, 細胞を特定の接着領域に接着・配列させた後, その周囲の領域を細胞接着性にスイッチングすることで, 遊走の開始点を規定した上で, そこから周囲への細胞遊走を評価できるマイクロデバイスを開発した. これにより個々の細胞をトレースしなくとも, 培養開始と培養後の細胞移動量のみから遊走を評価できる. 作製したデバイス (図1) は, 上述した濃度勾配形成流路に加え, 2本のサイド流路をメイン流路に接続し

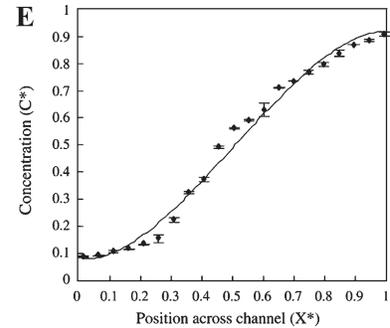
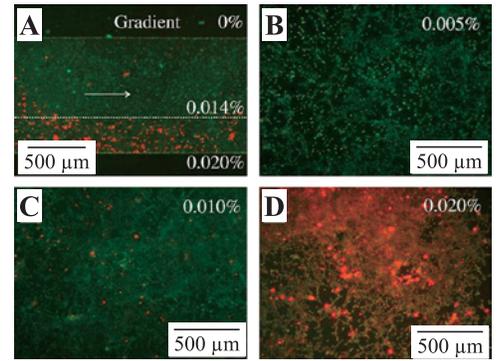


図2. マイクロデバイスを用いたTriton X-100の細胞毒性評価. A-D: 緑は生細胞, 赤は死細胞. グラフ: 実線は理論値.

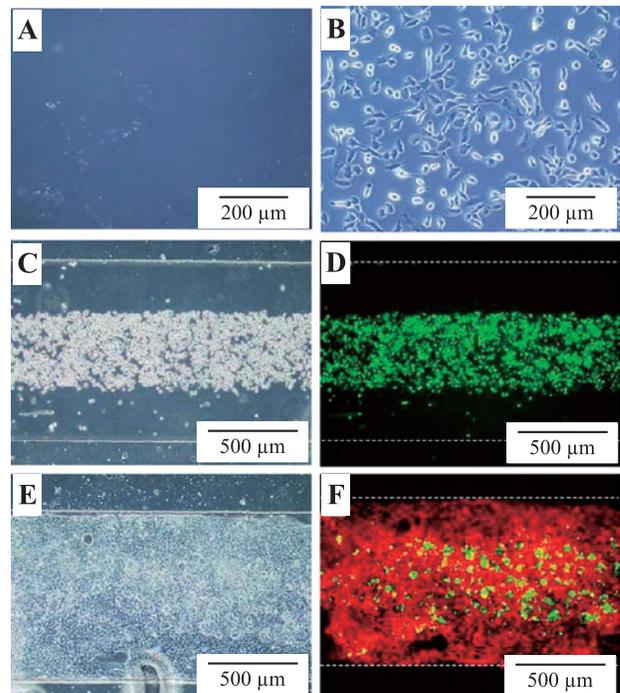


図3. 架橋アルブミンによる細胞接着制御とマイクロ流路内での細胞マイクロパターニング. D, F: 赤と緑は異なる細胞腫を示す.

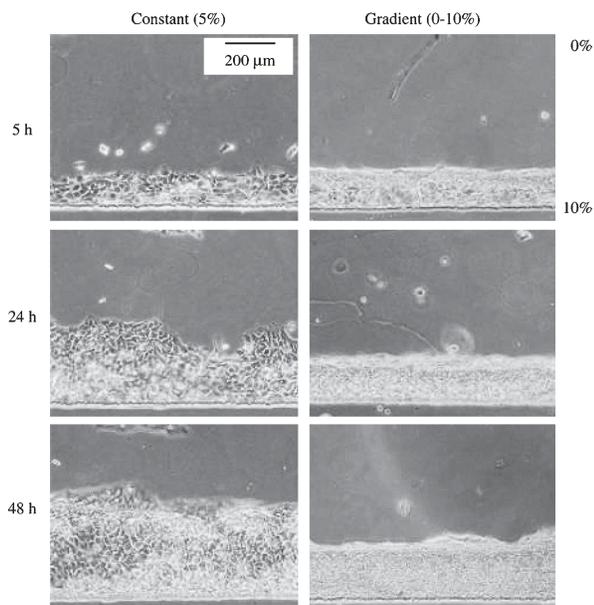


図4. ウシ胎児血清の濃度勾配下における細胞遊走距離の比較。左：勾配なし，右：勾配あり。

た構造となっている。細胞接着性のスイッチングには、架橋アルブミンを用いた。血清アルブミンを架橋反応させて作る架橋アルブミンは、基板表面を細胞非接着性にすることができ、また負電荷を持つため、ポリエチレニン (PEI) のような正電荷を持つポリマーと静電的に結合し、表面を細胞非接着性から接着性へとスイッチングすることができる (図3A, B)^{2,3)}。

具体的にはまず、メイン流路全面に架橋アルブミンをコートして細胞非接着性とした。次に、図1Eに示すように、層流流れの特性を利用してサイド流路からの送液によりメイン流路からの流れを絞り込むことで、任意の位置にのみPEIを送液し、任意の位置に帯状に細胞接着領域を形成した。ここへ細胞を接着させた後 (図3C, D)、残った細胞非接着面に対し再びPEIを流すことでメイン流路全体を細胞接着性にスイッチングした。実際に、別の種類の細胞を播種することで、この領域が細胞接着性に素早くスイッチングしていることを確認した (図3E, F)。次に、勾配形成流路を用いて液性因子の勾配を形成し、流路の特定の位置からの細胞遊走を試験した。図4は、細胞を流路端に配置した後、さまざまな成長因子を含むウシ胎児血清の濃度勾配下において、細胞遊走試験を行った結果である。勾配がない場合と比較して、濃度勾配を形成した場合は勾配に依存した線維芽細胞の遊走や増殖が観察された。また、神経細胞を流路中央に接着させた系においても、神経成長因子の濃度勾配下において、濃度勾配方向への神経突起の伸長誘導が観察された。

さらに、同様の方法を用いて、三次元的な球状細胞組織体 (スフェロイド) と、二次元的に伸展した細胞とを

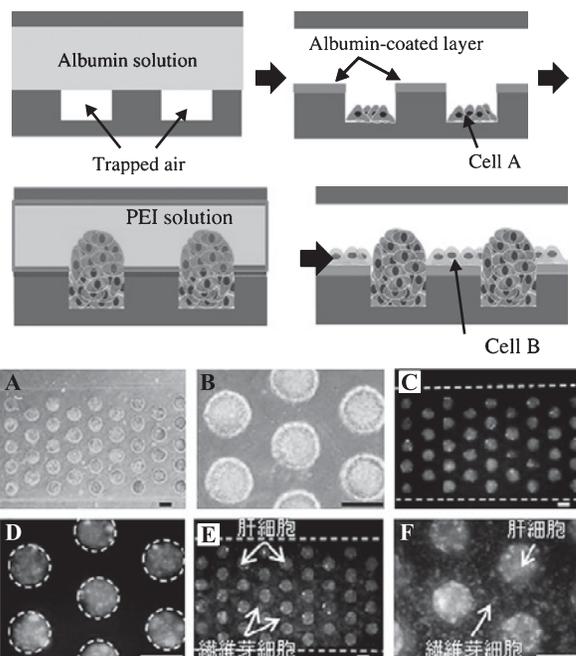


図5. スフェロイドと単層状態の2種類の細胞を共培養するマイクロデバイス

マイクロ流路内で共培養し、なおかつ特定の位置の細胞にのみ液性因子の刺激を与えるデバイスを作製した (図5)。詳細は省略するが、メイン流路底面の微細な凹凸well構造と架橋アルブミンの利用により実現した。一般に、肝細胞のようにスフェロイドとして培養することで特異的な機能を発現する細胞と、線維芽細胞のように強く伸展するのが好ましい細胞が存在することから、このデバイスは培養形態を含めた細胞微小環境を総合的に制御した上で細胞試験を行うのに有用であると考えられる。

細胞外マトリックスのみを用いて マイクロパターンした異種細胞間の相互作用の解析^{4,5)}

細胞が単なる「烏合の衆」ではなく、自己の位置を認識し組織を形成するためには、細胞がシグナルを発信し、かつ目的とする細胞がそのシグナルを受信することが必須である。これは特に胚の発生過程でドラスティックに作用するが、成体でも当然ながら重要である。この中でも局所的な細胞間シグナル伝達には、隣接する細胞-細胞間でのギャップ結合などを介した直接的な伝達や、細胞外マトリックスを介した間接的な伝達、液性因子などがある。胚発生や臓器特異的機能発現に関わる因子などが徐々に解明されつつあるが、*in vivo*で生じるこれらのシグナル伝達は非常に複雑かつ多軸的であるため、その解明には単純化した*in vitro*評価系が有用である。

マイクロパターン細胞共培養とは、2種類以上の細胞をそれぞれの接着領域を制御して培養することで異種および同種細胞間の接触頻度を制御する手法である。これ

は細胞微小環境，特に細胞-細胞間のシグナル伝達が，細胞の増殖，分化，機能発現に及ぼす影響を試験するために用いられてきた。従来のほとんどのアプローチは，比較的接着しやすい表面と接着しにくい表面をパターンし，その表面で細胞の接着性の違いを利用して1種類または2種類の細胞をマイクロパターンする手法であった。この方法では，接着力の違いを利用するため利用可能な細胞に限られるが，たとえば，肝細胞と繊維芽細胞のマイクロパターン共培養では，細胞間の直接的なシグナル伝達が機能発現に及ぼす効果が報告されている。さらに近年，明確に細胞の接着/非接着領域を規定し1種類目の細胞を接着させた後に，非接着面を接着面へとスイッチングして2種類目の細胞を接着させる技術が報告されている。この方法では培養表面の接着/非接着性が明確であるため，評価可能な細胞の種類や播種の順番などが比較的自由に設定できる利点がある。この方法には，たとえば，温度応答性ポリマーや電位応答性ポリマーが利用され，細胞非接着表面を温度変化や電位印加によって細胞接着面へとスイッチする。また，磁気ビーズを利用する方法では，磁気ビーズを細胞内に導入し，磁力によりパターンを形成する。これらの方法は画期的ではあるものの，特殊なポリマーや装置が必要であり，また細胞毒性の問題や，細胞外マトリックスからのシグナル伝達が存在しないといった問題がある。細胞外マトリックスは，細胞間の単なる充填物ではなく，細胞の分化，増殖，機能発現に重要な役割を担っていることが明らかとなり，その重要性が認識されつつある。たとえば，ある種の細胞外マトリックスに接着することで，本来の液性因子に対するレセプターを発現することなどが分かっており，液性因子に対する細胞応答も大きく異なる。

筆者らは，いくつかの細胞外マトリックスの物理化学的な性質を利用して，細胞の接着/非接着表面をパターンし，その後，非接着面を接着面へとスイッチングする

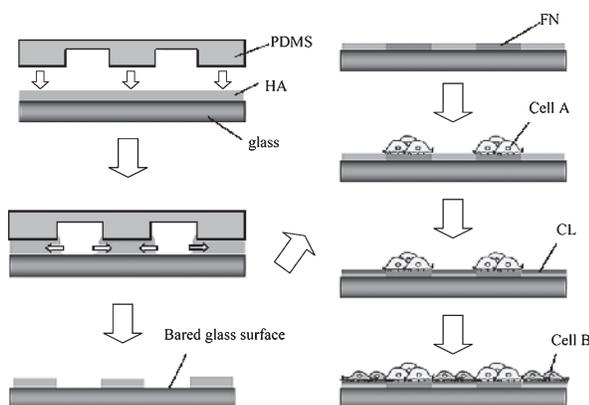


図6. 細胞外マトリックスの静電的な相互作用を利用した細胞マイクロパターン手順。HA：ヒアルロン酸，FN：フィブロネクチン，CL：コラーゲン。

手法を考案した⁵⁾。図6にその具体的な手順を示している。まず，細胞外マトリックスの主要成分のひとつであるヒアルロン酸 (HA) を capillary force lithography と名づけた技術を用いてマイクロパターンする。すなわち，HA 溶液をガラスチップ上にスピコートし，その上に凹構造をもつPDMSを載せ，室温で3時間ほど静置して水分を蒸発させる。この過程で，HA 溶液とPDMS，ガラス，空気の三つの界面における界面自由エネルギー差により，PDMSとガラスの接近した領域にのみHA 溶液が集まり，HA とガラス露出面のパターンが形成される。HA にはタンパク質や細胞の付着を抑制する性質があるため，このチップをフィブロネクチン (FN) 溶液に浸すと，ガラス露出面のみにFNが物理吸着し，そこへ1種類目の細胞を部位特異的に接着させることができる。一方で，HAはグルコロン酸とN-アセチルグルコサミンの2糖の繰り返し構造を有するポリサッカライドであるため，全体としてマイナスにチャージしている。そのため，ポジティブチャージを持つポリマーとは，layer-by-layer depositionにより静電的に結合する。そこで，1種類目の細胞パターンを形成させた状態で，ポジティブチャージを持つポリ-L-リジル (PL) またはコラーゲン (CL) をHAと静電的に結合させ，これにより細胞非接着性であるHA表面を細胞接着面へとスイッチングすることを発想した。以上の手順により，主要な細胞外マトリックスのみを用いて2種類の細胞マイクロパターン共培養が可能となる。

Capillary force lithographyにより形成したHAパターンは，PDMSを剥離した直後の層の厚さは約60 nmであり，位相差顕微鏡でもパターンが視認できる。この表面を純水に浸すと，過剰に堆積したHAは洗い流され，もはや位相差顕微鏡では観察できないが，AFMやその他の機器で解析することで約3 nmの吸着層が残存することを確認している。この吸着層は，純水またはPBS中でおおよそ1週間は安定であった。CLは，このHAパターン上に繊維構造をある程度保持したままlayer-by-layer depositionによって静電的に結合され，その層の厚さは，およそ百数十nmであった。ガラス表面への繊維芽細胞の接着細胞数を100%とし，HA表面やHA表面をFNで処理した表面への細胞接着性を評価したところ，接着細胞数は10%以下であった。これに対して，HA表面をPLやCLで処理することで，60~80%の細胞が接着した。つまり，HAとPLまたはCLの組合せで，培養表面の細胞接着性をスイッチングできるということが明らかとなった。ただし，この細胞接着性のスイッチングは，1種類目の細胞存在下で行う必要があるが，PLは濃度および処理時間が長くなるにつれて細胞毒性が生じた。一方，細胞外マトリックスの一つであるCLは高濃度や長時間の処理でも細胞への悪影響は観察されず，スイッチ

ング剤として適している。図6に示した手順により形成したマイクロパターン細胞共培養を図7に示す。このように細胞の種類やパターンによらず、2種類の細胞マイクロパターンを形成することができる。パターン形状のその後の維持期間は、細胞の組合せや培養培地などによってさまざまである。たとえば、肝細胞と繊維芽細胞の組合せは、無血清培地中で10日間程度は維持された。

形成したマイクロパターン細胞共培養が機能発現に及ぼす効果を評価するために、初代肝細胞と繊維芽細胞の共培養、および初代肝細胞のみの単独培養系において、肝特異機能であるアルブミン合成能を比較した。その結果を図8に示す。単独培養系ではアルブミン合成能は急激に低下するのに対して、共培養によって合成能の維持傾向が観察された。ところで、隣接する細胞はいくつか

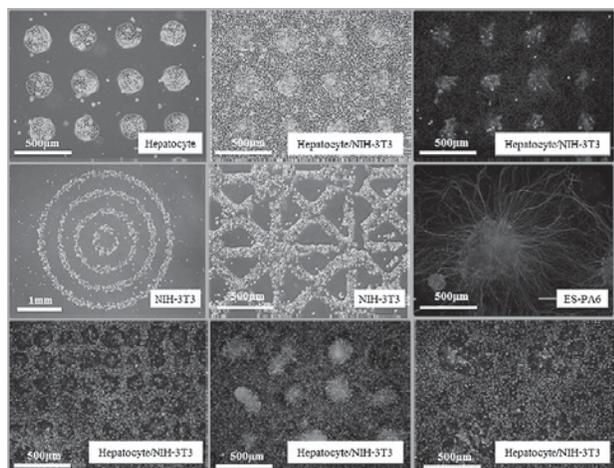


図7. 種々の細胞マイクロパターン

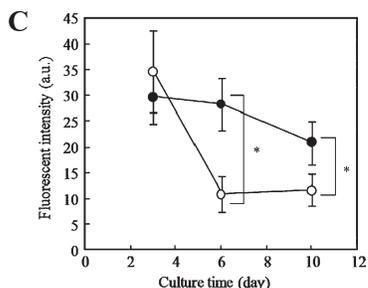
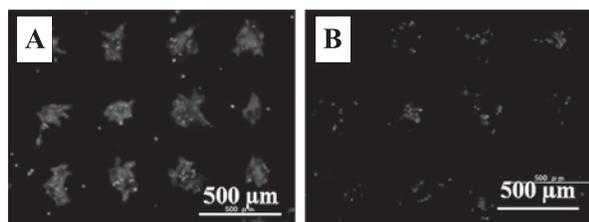


図8. マイクロパターン細胞共培養におけるアルブミン合成能の維持。A, B: アルブミンの免疫染色, A: 肝細胞と繊維芽細胞の共培養, B: 肝細胞のみ, C: 黒丸が共培養, 白丸は肝細胞のみ。

の細胞間接着タンパク質を介して相互作用している。この中でも、ギャップ結合は、コネクソンと呼ばれるトンネル構造を持つタンパク質集合体からなり、隣接する二つの細胞膜を横断して、細胞質から細胞質へと水溶性低分子（分子量約1000以下）の直接的な輸送を可能としている。一般に、この構造のおかげで細胞間に代謝的または電気的共役が生じると考えられている。たとえば、心筋ではこのギャップ結合が電気的興奮を共役し、組織全体の収縮を可能としている。異種の細胞間においてもギャップ結合が形成され、直接的なシグナルの伝達が生じるのだろうか。この解析のために、図9に示すように、マイクロパターン細胞共培養において、一方の細胞集団の細胞質内の蛍光物質をアルゴンレーザーでブリーチングし、隣接するもう一方の細胞集団からの蛍光物質の流入をモニタリングすることで、間接的に異種の細胞-細胞間におけるギャップ結合の存在を評価した。その結果、単独培養では、蛍光の回復はまったく見られなかった。これに対し、共培養系では緩やかではあるが蛍光強度の回復が見られ、ギャップ結合による直接的な輸送経路を構築し、異種細胞間でシグナル伝達を生じていることが示唆された⁴⁾。

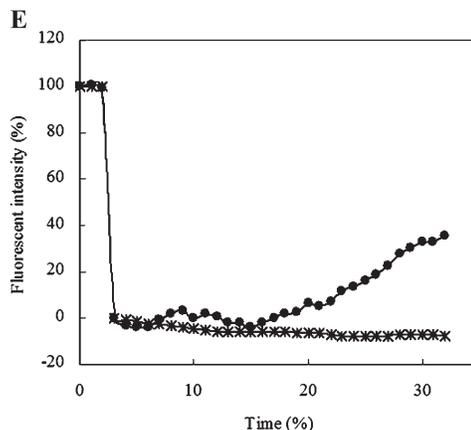
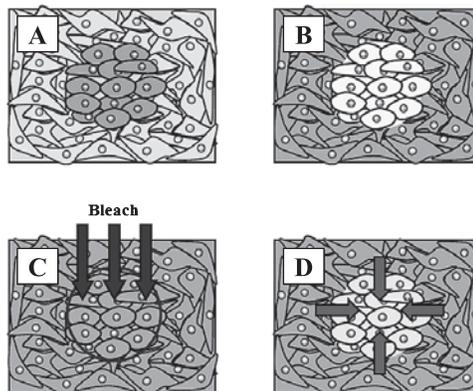


図9. 蛍光退色法を用いたギャップ結合の評価。A-D: フリーチングの手順, E: 蛍光強度の回復。グラフ: 黒丸は共培養, ×は単独培養。

微小電極アレイによる位置特異的な細胞脱離⁶⁻¹⁰⁾

顕微鏡観察下で、ある特定の細胞を直接回収する技術は、再生医療における分化誘導プロセスなど細胞培養を用いる幅広い分野において強力なツールとなりうる。この目的のため、レーザーやUVを用いて任意の1細胞を回収する技術が開発されてきた。しかし、光による細胞への障害が避けられないことが、根本的な問題となっている。そこで、著者らは電気化学的な細胞脱離法を新しく考案し、位置特異的な細胞回収に応用した⁶⁾。

電気化学的な細胞脱離の原理には、金-チオール結合の切断を利用する(図10)。すなわち、金-チオール結合により金電極表面に密な単分子層を形成し、これを介して接着させた細胞を、この金-チオール結合を電気化学的に切断することで、分子層とともに脱離させるものである。これまでに、アルカンチオール自己組織化単分子膜(SAM)を介して金電極表面に接着した細胞が、5分間以内に脱離することを示してきた¹⁰⁾。しかし、金電極を微小電極アレイした場合には、金電極とガラスの光の透過性の違いからハレーションが生じ電極上の細胞を観察できないという問題が生じた。そこで、金電極の代わりに透明電極として幅広く知られているITO電極(tin-doped indium oxide)を用いて、位置選択的な細胞回収法の確立に取り組んだ。

配向性をもった密なSAMを形成し、実験の正確性を高めるためには、SAMを修飾するITO電極基板の表面状態が重要である。そこでまず原子間力顕微鏡(AFM)により、ITO電極表面の形状を観察した(図11A)。ITO電極表面では結晶粒が観察され、SAM修飾電極、未修飾電極において表面形状に大きな差は見られなかった。一方、白金を対極、銀塩化銀電極を参照極とする三電極系を形成し、サイクリックボルタンメトリーを用いてITO電極上からのSAMの還元脱離電位を測定した。その結果、ITO電極上のSAMは-0.9 V程度の電位印加で還元され脱離することが確認された(図11B)。また、電

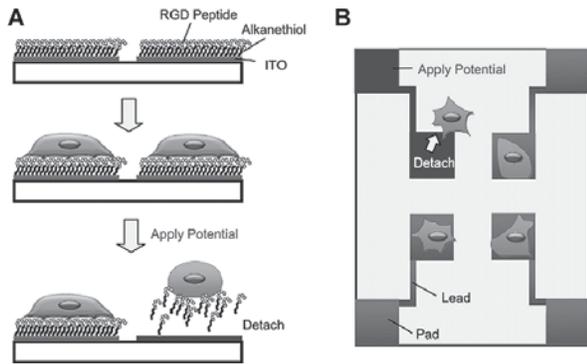


図10. 電気化学細胞脱離の原理とアレイ電極の模式図。左：細胞脱離の原理。右：アレイ電極の模式図。

位印加後の基板のX線光電子分光(XPS)観察を行ったところ、SAM形成後のITO基板では硫黄由来のピークが観察されたのに対して、電位印加後の基板ではピークが確認されなくなったため、電位印加によってほとんどのSAMが還元脱離していることが確認された(図11C)。

ITO基板上にSAMを形成し、そのSAM末端に細胞接着性ペプチドであるRGDを化学修飾した。この基板上に細胞を播種することで、SAMを介して細胞を基板上に接着させた後、-1.0 V (vs. Ag/AgCl)の電位を印加することでSAMの脱離とともに細胞が脱離可能であるか評価した。電位印加中の細胞脱離の挙動をリアルタイムで顕微鏡観察したところ、電位印加前にはITO基板上に強く進展していた細胞が、5分間の電位印加後には収縮し、丸くなっていく様子が観察された(図12)。この細胞形態の変化を共焦点顕微鏡によってさらに解析した結果を図13に示す。電位印加前には7.9 μmであった細胞高さが、5分間の電位印加後には12 μmとなった。一方、細胞幅に関しては、電位印加前には74 μmであったが、電位印加後には13 μmと、減少することが確認された。細胞脱離を定量的に評価したものが、図13Gである。最初の1分間で半数以上の細胞が脱離し、電位印加5分後にはほぼすべての細胞が脱離することが確認された。

このように従来法と比較して素早く細胞を脱離できることが確認されたため、本手法を位置選択的な細胞回収へと応用した。まず、透明電極であるITO電極をフォトリソグラフィとウェットエッチングによって図10Bに示す形状にパターンニングした。次に基板上に先ほどと同様、SAM、細胞接着性ペプチドを修飾した。この基板上に細胞を播種し、24時間培養したのち、パターンニングされた電極の一部に-1.0 V (vs. Ag/AgCl)の電位を印加し、電極上に接着した細胞を脱離させた。続いて、

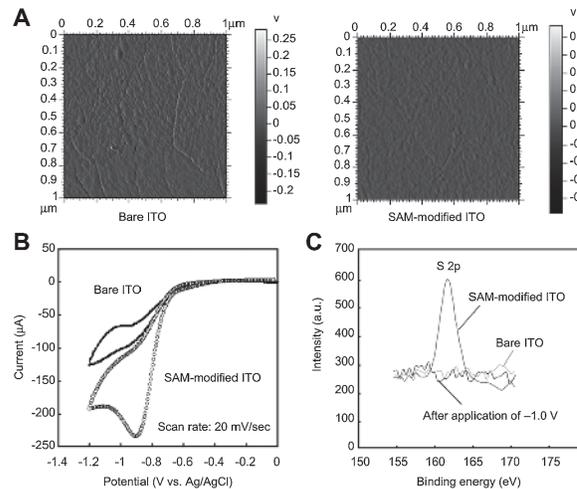


図11. アルカンチオールSAM修飾ITO電極の特性評価。A：SAM未修飾(左)とSAM修飾(右)ITO電極表面のAFM像。B：SAMの還元脱離電位の測定。C：SAM修飾表面のXPS解析。

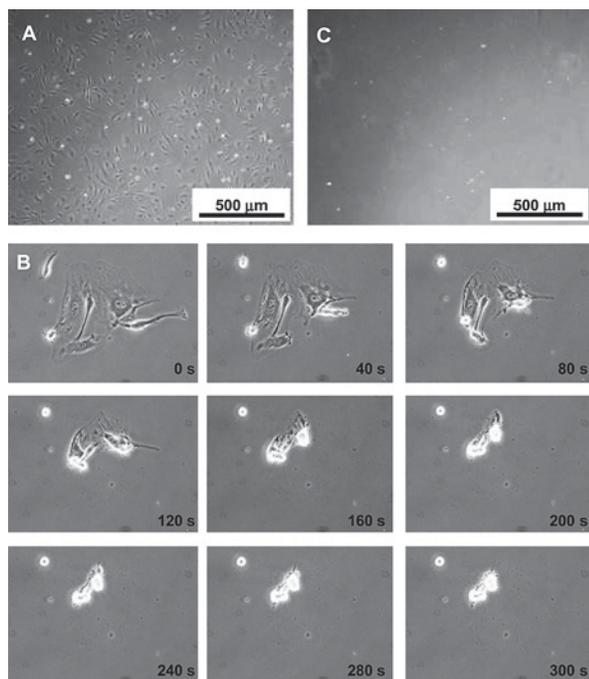


図12. 電気化学細胞脱離における細胞脱離の様子. A: 電位印加前, B: 5分電位印加後, C: 細胞形態の変化.

他の部分の電極にも電位を印加し, 視野内の細胞を次々に回収することで位置選択的な細胞回収が可能であった(図14).

おわりに

フォトリソグラフィなどの微細加工技術を用いて作製した, 動物細胞評価用マイクロデバイスについて概説した. 一つの細胞と同程度のミクロな系では, 拡散現象が細胞微小環境の制御や細胞間の情報伝達などにおいて重要であり, 生物化学工学の知識や手法が重要な役割を果たす. これらのマイクロデバイスでは, 従来のマクロな系では設定不可能であった条件下で動物細胞を培養することが可能であり, 生物システムの基本的な理解を深める上で有用である可能性を示した. 今後, 微細加工技術を生物化学工学のアプローチへと適用し, 基礎的な細胞生物学に加え, 再生医療などの応用分野へと展開を計りたいと考えている.

謝 辞

本研究は, 筑波大学大学院数理工学物質科学研究科にて行われたものであり, 鈴木博章教授および研究室の学生に感謝しております. また, 架橋アルミニウムに関する共同研究を行っていただいた産業技術総合研究所の山添泰宗主任研究員にお礼申し上げます. 最後に, 生物工学会セルプロセス計測評価研究部会(部会代表: 大政健史先生)に, 当該研究のアイデアや新しい発想につながる議論の場, 研究に挑むエネルギーをいただいたことに心から感謝します.

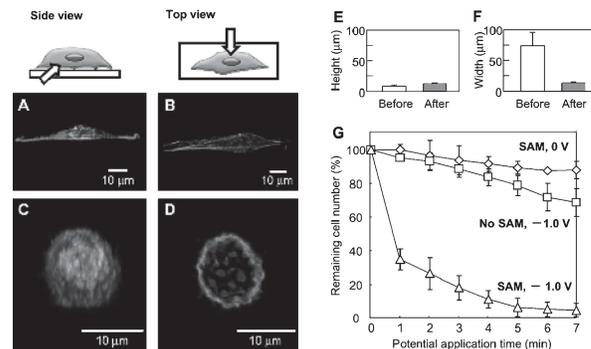


図13. 細胞脱離の定量的評価. A-F: 細胞形態の変化, G: 電位印加時間と脱離細胞数の関係.

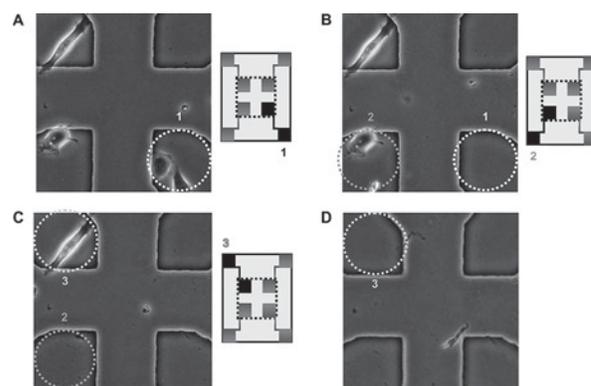


図14. 位置選択的な細胞脱離. 番号: 電位印加の順番.

文 献

- 1) Okuyama, T., Yamazoe, H., Seto, Y., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 230–237 (2010).
- 2) Okuyama, T., Yamazoe, H., Mochizuki, N., Khademhosseini, A., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 572–576 (2010).
- 3) Yamazoe, H., Okuyama, T., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *Acta Biomater.*, **6**, 526–533 (2010).
- 4) Takahashi, S., Yamazoe, H., Sassa, F., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 544–550 (2009).
- 5) Fukuda, J., Khademhosseini, A., Yeh, J., Eng, G., Cheng, J. J., Farokhzad, O. C., and Langer, R.: *Biomaterials*, **27**, 1479–1486 (2006).
- 6) Fukuda, J., Kameoka, Y., and Suzuki, H.: *Biomaterials*, **32**, 6663–6669 (2011).
- 7) Kakegawa, T., Mochizuki, N., Sadr, N., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *Tissue Eng. Part A*, **19**, 290–298 (2013).
- 8) Seto, Y., Inaba, R., Okuyama, T., Sassa, F., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *Biomaterials*, **31**, 2209–2215 (2010).
- 9) Sadr, N., Zhu, M. J., Osaki, T., Kakegawa, T., Yang, Y. Z., Moretti, M., Fukuda, J., and Khademhosseini, A.: *Biomaterials*, **32**, 7479–7490 (2011).
- 10) Inaba, R., Khademhosseini, A., Suzuki, H., and Fukuda, J.: *Biomaterials*, **30**, 3573–3579 (2009).