

培養細胞・組織への機械刺激負荷マイクロデバイス

清水 一憲^{1*}・小西 聡²・田谷 正仁¹

はじめに

生体内において、細胞は多様な機械刺激を常に受けている。たとえば血流によって、血管内皮細胞にはせん断応力刺激が負荷される。呼吸によって、肺細胞には伸展刺激が負荷される。また何らかの動作によって、皮膚細胞には伸展刺激が負荷される。細胞は、これら多様な機械刺激を、生化学的なシグナルへと変換して細胞内に伝達し、それに対して応答する(メカノトランスダクション)。細胞は機械刺激に応答することで、本来の機能を維持していることが徐々に明らかになってきている。これまでに機械刺激受容センサーとして、機械感受性チャネル、ストレスファイバー、インテグリン、カベオラなどが報告されている¹⁾。機械刺激に対して細胞がどのように応答するかを明らかにすることで、基礎生物学的な理解が深まるのはもちろんであるが、疾患治療法の開発および創薬や移植治療に用いる細胞・組織の機能制御技術の開発などにもつながると期待されている。

これまで、培養細胞や組織に対して機械刺激を負荷するマクロスケールの装置がいくつか開発されてきたが、近年のマイクロシステム技術の発展に伴い、機械刺激負荷用のマイクロスケールの装置(マイクロデバイス)の開発が進んでいる。マイクロデバイスを用いると、高価な試薬や希少な細胞の使用量を減らすことができ、機械刺激の多条件化が容易となる。また、細胞を任意の位置に配置する技術と組み合わせることで、数細胞レベル、一細胞レベル、サブ細胞レベルでの、厳密に制御された機械刺激の負荷が可能であるといった利点がある。

本稿では、これまでに開発された機械刺激を負荷するためのマイクロデバイスについて、特にデバイスの構造に焦点を当てて紹介する。個々の細胞や組織が機械刺激に対してどのような応答を示すかということについては、他の総説を参照していただきたい^{1,2)}。本稿で取りあげる機械刺激の種類は、伸展刺激、圧縮刺激、静水圧刺激、せん断応力刺激である(図1)。まず、それぞれの機械刺激を負荷するための構造やその刺激を多条件で負荷するためのマイクロデバイスを紹介する。最後に、これらの機械刺激を組み合わせた、複合的な機械刺激を負荷するためのマイクロデバイスの開発例を紹介する。

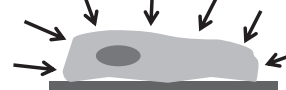
(a) 伸展



(b) 圧縮



(c) 静水圧



(d) せん断応力

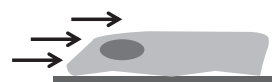


図1. 本稿で取りあげる機械刺激の種類

伸展刺激

伸展刺激を負荷するためのマイクロデバイスを紹介する。図2に示すように、これまでにさまざまな駆動機構のマイクロデバイスが開発されているが、細胞を伸展材料の表面で培養し、その材料を外力で伸縮させることで細胞に伸展刺激を負荷するという点では共通している。伸縮材料としてもっとも多く用いられるのは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)をスピンコート法で薄膜化したものである。デバイスのデザインや駆動機構を変えることで、一軸性、二軸性、等二軸性などの伸展特性を制御することができる。図2cと2dの駆動機構では伸展刺激を負荷している際も細胞の位置はほとんど上下しないという特徴があり、顕微鏡で細胞を観察するには有利である。

多条件化を可能にするマイクロデバイスの開発も進んでいる。Moraesらは、円柱構造を陽圧で駆動させる図2aの駆動機構を利用したマイクロデバイスを開発した³⁾。円柱構造を押し上げるために用いる陽圧の受圧面積を制御することで円柱構造の駆動量を変化させ、マイクロデ

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域(助教) E-mail: shimizu@cheng.es.osaka-u.ac.jp

²立命館大学理工学部機械工学科

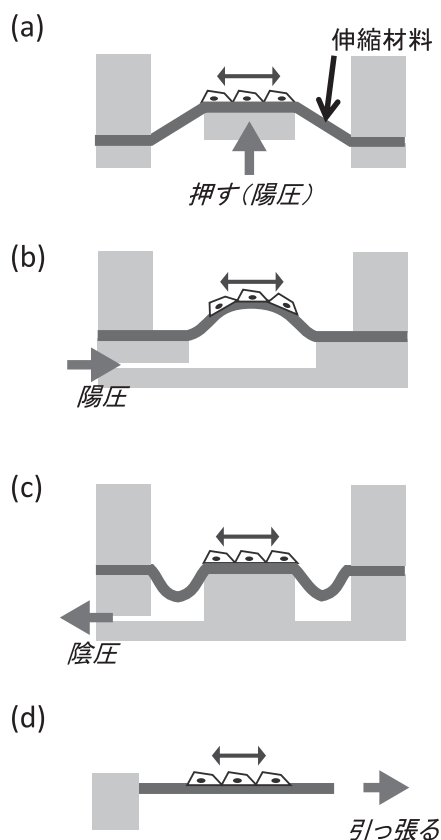


図2. 伸展刺激負荷用マイクロデバイスの駆動機構 (断面図)

バイス上でさまざまな大きさの伸展量を生み出すことに成功した。同じく図2aの駆動機構を利用したマイクロデバイスとしては、Kamotaniらが開発した点字ディスプレイを利用したものがあげられる⁴⁾。点字ディスプレイのピンを上へ駆動させることで、細胞を接着させた伸縮材料を伸展させた。ピンの駆動を個々に制御することで、多条件化を容易に達成することができる。

Simmonsらは、図2cに示すように、動かない円柱構造（ピラー）と陰圧による駆動機構を利用したマイクロデバイスを開発した⁵⁾。底面がPDMS薄膜でできた細胞培養容器をアクリル製のピラーの上に設置する。アクリル構造体内部に陰圧を加えると、薄膜の外周部がピラー周囲の環状空隙に引き込まれ、薄膜上に接着した細胞に伸展刺激が負荷される。ピラーの直径を変えて、細胞に負荷する伸展刺激の大きさを制御した。

我々はマイクロ流路の圧力損失を利用したマイクロデバイスを開発した(図3)⁶⁾。マイクロデバイスには、主流路とそれから分岐する流路（支流路）がある。主流路入口から、圧力を印加すると、支流路の先にあるPDMS薄膜が膨張し、PDMS薄膜に接着した培養細胞が伸展する。主流路における圧力損失により、下流の支流路ほど、

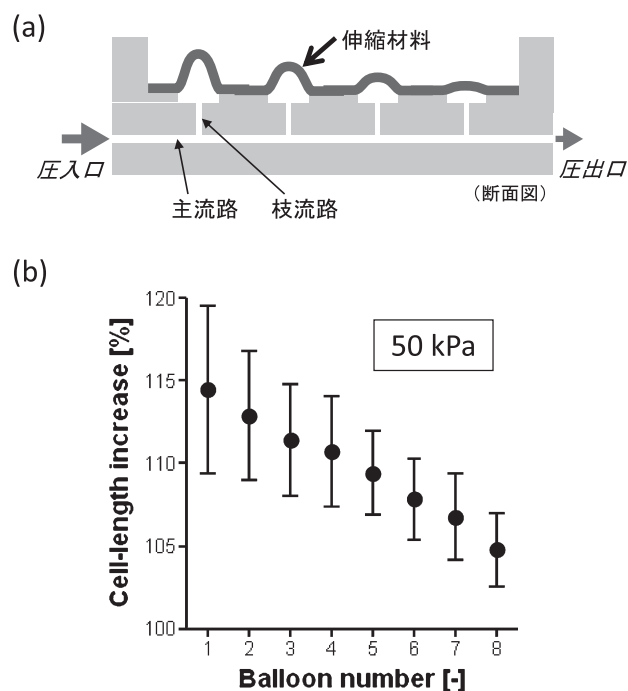


図3. 圧力損失を利用した伸展刺激負荷用マイクロデバイス

薄膜を膨張させるための圧力が小さくなる(図3a)。実際に図2bの駆動機構をもつマイクロデバイスを製作し、一つのデバイス上で培養細胞に対して105から115%の伸展量の刺激を負荷することに成功した(図3b)。

圧縮刺激

圧縮刺激を負荷するためのマイクロデバイスを紹介する。図2aと2bの駆動機構は圧縮刺激の負荷に応用可能である。Kimらは、平面培養した細胞を圧縮するためのデバイスを開発した(図4a)^{7,8)}。図2bの駆動機構を細胞培養部の上面に設置し、PDMS薄膜を膨張させることで下面に接着した細胞を圧縮した。下面が凹に湾曲していることで、細胞培養部全体の細胞を比較的均一に圧縮することができた。Moraesらは、図2aの駆動機構を三次元培養組織に圧縮刺激を負荷するためのマイクロデバイスに応用した(図4b)⁹⁾。伸展刺激では、ピラーを駆動させて細胞が接着したPDMS薄膜を上へ押し上げたが(図2a)、その代わりに三次元組織（細胞を混合したハイドロゲル）を上へ押し付けて圧縮刺激を負荷した。光硬化性ハイドロゲルをピラー上部のみで選択的に硬化させることで、これを実現した。

静水圧刺激

静水圧刺激を負荷するためのマイクロデバイスを紹介する。他の機械刺激に比べて報告例が少ないが、図2b

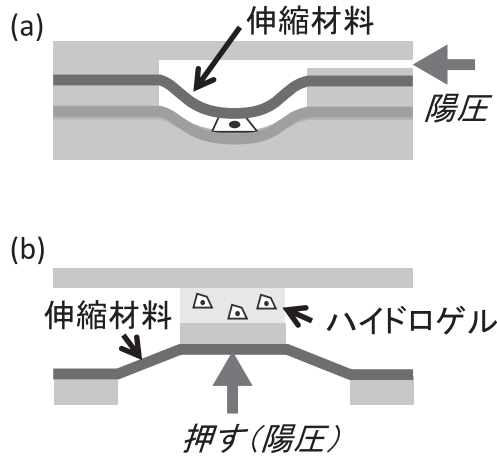


図4. 圧縮刺激負荷用マイクロデバイスの例（断面図）

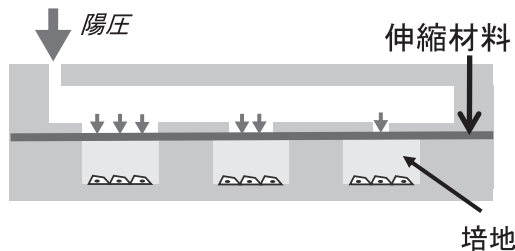


図5. 静水圧刺激負荷用マイクロデバイスの例（断面図）

の構造を用いたマイクロデバイスをSimらが報告している^{10,11)}。図5のように、細胞培養ウェルの上面に図2bの構造を作り、受圧面積を変えることで、異なる大きさの静水圧を細胞に負荷することができた。圧力が異なると溶存ガス濃度も異なるため、静水圧刺激のみによる細胞機能の変化を明らかにするためには、それぞれの圧力においてガス分圧を個別に調整するなどの注意が必要である¹²⁾。

せん断応力刺激

せん断応力刺激を負荷するためのマイクロデバイスを紹介する。細胞を培養したマイクロ流路に培地を送液するだけで、細胞に対してせん断応力刺激を負荷することができる。一般に、送液にはシリンジポンプあるいは圧力制御装置や重力を利用した圧力駆動流が用いられる。多条件化のためのマイクロデバイスの開発も進んでおり、一つのマイクロデバイス上で一つの送液装置を用いて、さまざまな大きさのせん断応力刺激を負荷することができるマイクロデバイスがすでに多く報告されている。たとえば、Chauら¹³⁾はマイクロ流路の長さを変えることで（図6a）、Wangら¹⁴⁾やRossiら¹⁵⁾はマイクロ流

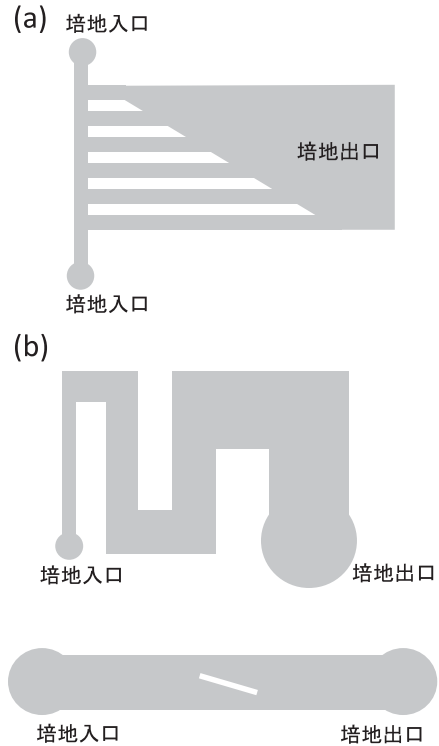


図6. せん断応力刺激負荷用マイクロデバイスの例（上面図）

路の幅を変えることで（図6b）多条件化を達成した。またWangら¹⁶⁾はマイクロ流路内に培地流れの障害となるような構造を作ることによって、マイクロ流路内で異なる大きさのせん断応力刺激を生み出した（図6c）。

複数の機械刺激を組み合わせたマイクロデバイス

最後に、上述した機械刺激を複合的に負荷するマイクロデバイスの応用例を紹介する。Ingberらは、伸展刺激とせん断応力刺激を複合的に負荷できるマイクロデバイスを開発し、これまでに肺¹⁷⁾や腸¹⁸⁾などのモデル組織をデバイス上で再現している（図7a）。肺を再現したマイクロデバイスでは、多孔性のPDMS薄膜の上面に肺胞上皮細胞、下面に毛細血管内皮細胞をそれぞれ培養し、デバイスに陰圧を印加することで伸展刺激を周期的に加えた。伸展刺激を負荷することで、シリカナノ粒子への毒性反応や炎症反応が増強することが明らかになった。またマイクロ流路に送液し、毛細血管内皮細胞にせん断応力刺激を負荷しておくことで、上皮細胞から内皮細胞へのナノ粒子の移行が促進されることも見いだした。マウスを用いた実験でも同様の結果が得られており、本マイクロデバイスが医薬品開発における動物実験代替技術として利用できる可能性が示されている。またSethuらは、心筋細胞や血管内皮細胞に対して、生体内と同様の

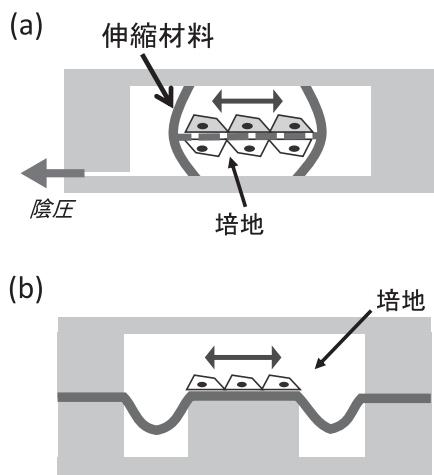


図7. 複合的な機械刺激負荷用マイクロデバイスの例(断面図)
a, bともに、培地は紙面の奥から手前(またはその逆)に流れる。

複合的な機械刺激を負荷するためのマイクロデバイスを開発した^{19,20)}。図7bのように心筋細胞を培養し、培地の送液を制御することで、生体内における複合的な機械刺激を再現した。圧力(血圧)、流速、伸展量、せん断応力の大きさをパラメーターとして、健常状態、心不全、高血圧症、低血圧症、運動時、徐脈などの状態をマイクロデバイス上で再現することに成功した。

おわりに

本稿で紹介したように、最近のマイクロシステム技術の発展に伴い、伸展刺激、圧縮刺激、静水圧刺激、せん断応力刺激を個別に負荷するためのマイクロデバイスが多く開発されている。さらに、それらの機械刺激を複合

的に負荷するためのマイクロデバイスの開発も進んでいる。現在、細胞培養といえば、フラスコやディッシュ、プレートなどを用いた“静的な細胞培養法”が一般的である。機械刺激負荷培養マイクロデバイスを用いることで、効率的に研究が進み、細胞のメカノトランスダクションに関する知見が深まり、細胞への機械刺激負荷の重要性の認識が高まっていくと思われる。今後、機械刺激負荷を行う“動的な細胞培養法”の利用が広く進んでいくであろう。

文 献

- 1) 曾我部正博：細胞工学，**31**, 978 (2012).
- 2) Earls, J. K. *et al.*: *Tissue Eng. Part B Rev.*, **19**, 420 (2013).
- 3) Moraes, C. *et al.*: *Lab Chip*, **10**, 227 (2010).
- 4) Kamotani, Y. *et al.*: *Biomaterials*, **29**, 2646 (2008).
- 5) Simmons, C. S. *et al.*: *J. Micromech. Microeng.*, **21**, 054016 (2011).
- 6) Shimizu, K. *et al.*: *Sens. Actuators B-Chem.*, **156**, 486 (2011).
- 7) Kim, Y. C. *et al.*: *Sens. Actuators B-Chem.*, **128**, 108 (2007).
- 8) Kim, Y. C. *et al.*: *Analyst*, **133**, 1432 (2008).
- 9) Moraes, C. *et al.*: *Biomaterials*, **31**, 577 (2010).
- 10) Sim, W. Y. *et al.*: *Lab Chip*, **7**, 1775 (2007).
- 11) Park, S.-H. *et al.*: *PLoS ONE*, **7**, e46689 (2012).
- 12) Moraes, C. *et al.*: *Integr. Biol.*, **3**, 959 (2011).
- 13) Chau, L. *et al.*: *Lab Chip*, **9**, 1897 (2009).
- 14) Wang, L. *et al.*: *Lab Chip*, **11**, 4235 (2011).
- 15) Rossi, M. *et al.*: *Lab Chip*, **9**, 1403 (2009).
- 16) Wang, J. *et al.*: *Lab Chip*, **10**, 235 (2010).
- 17) Huh, D. *et al.*: *Science*, **328**, 1662 (2010).
- 18) Kim, H. J. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 2165 (2012).
- 19) Giridharan, G. A. *et al.*: *Anal. Chem.*, **82**, 7581 (2010).
- 20) Estrada, R. *et al.*: *Anal. Chem.*, **83**, 3170 (2011).