

平成 25 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：若手共同 研究期間：平成 25 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究課題名：メカノバイオマイクロデバイスの開発と幹細胞培養への応用

ラボ長

所属：物質創成専攻 化学工学領域 生物プロセス工学講座 生物反応工学 Gr

氏名：清水 一憲

研究成果（当初の研究目的と得られた結果を記載ください。図表を含め 2 ページ程度）：

本研究の目的は、物理刺激を用いて iPS 細胞の分化指向性（特定の種類の細胞へのなりやすさ）を制御する手法を開発することである。

初年度は、デバイス開発とそれを用いた iPS 細胞培養法の確立を目指して研究を進めた。

培養細胞に対して複合的な物理刺激を負荷することが可能なマイクロデバイスとして、Estrada らの論文[Analytical Chemistry 2011]を参考にして、図 1 のようなマイクロデバイスを作製した。当該デバイスは、培地の流れ制御のみで、伸展刺激、せん断刺激、水圧刺激を負荷することが可能である。

作製手順は次の通りである。まずジュラルミン製のマイクロ流路用モールドにポリジメチルシロキサン（PDMS）を流し込み、硬化させた。作製したマイクロ流路部 PDMS

基板を、シリコン基板上にスピンコート法で作製した PDMS 薄膜と不可逆的に接合し、マイクロデバイスを完成させた。PDMS 同士の不可逆接合には、イオンプラズマボンバーダーを用いた。

次に、作製したデバイス（図 2a, b）を用いて動物細胞を培養した。モデル細胞として、株化腸管上皮細胞 Caco2 を用いた。まずデバイスを UV に照射し、滅菌した。次にデバイスへの細胞接着性を向上させるために、細胞接着部位（PDMS 薄膜表面）をマトリゲルでコーティングした。 1.5×10^5 cells/cm² となるように細胞をマイクロ流路に導入し（図 2c）、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で、静置することで、細胞を表面に接着させた（図 2d, e）。その後、Elveflow 社製の流れ制御システムを用いて、周期的に流量を変化させながらマイクロ流路に培地を流すことで、物理刺激を負荷しながらの細胞培養を行った。

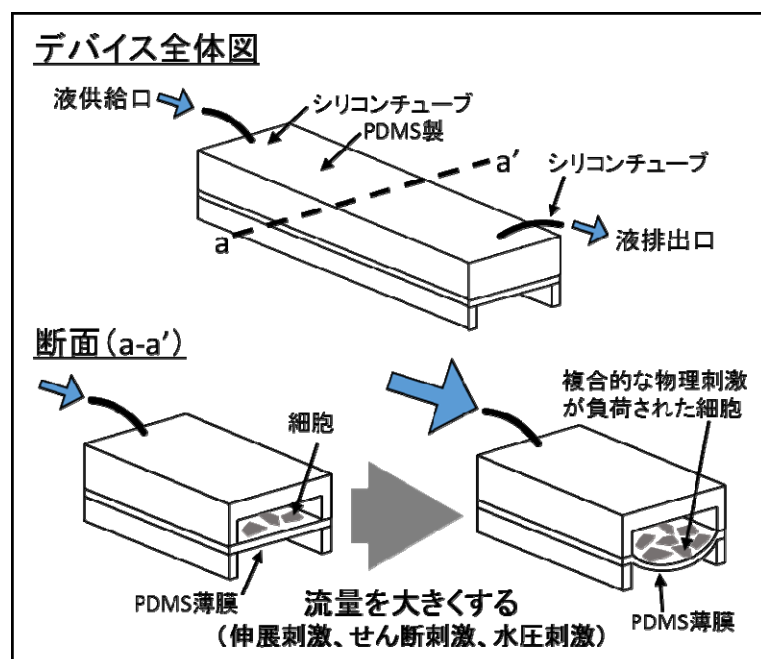


図 1 製作したマイクロデバイスの概略図

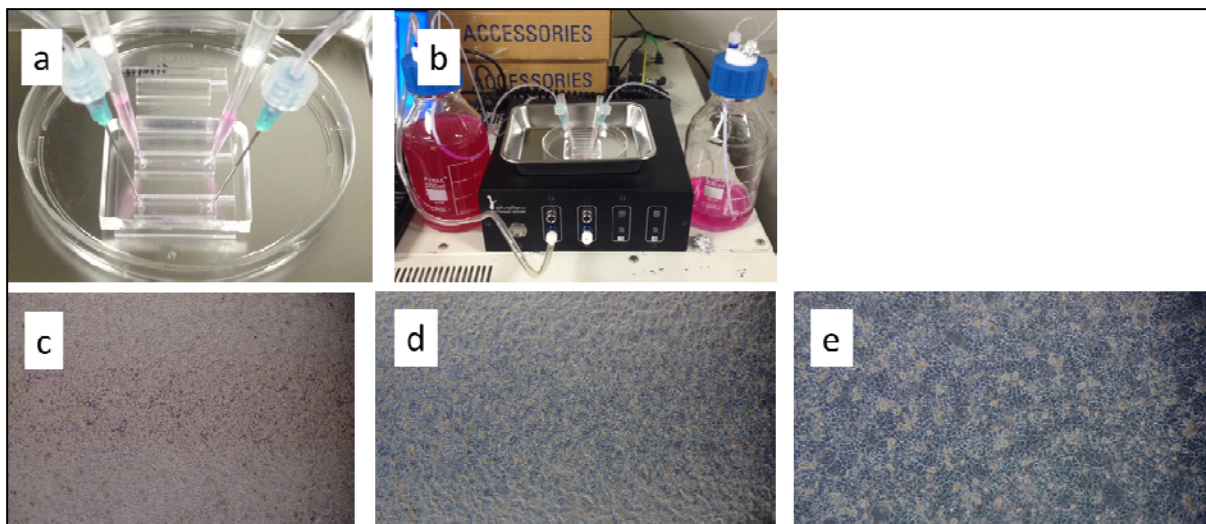


図2 製作したマイクロデバイスと細胞培養の様子

(a) デバイスの概観、(b) 液流れ制御システムとデバイスを接続した様子、(c) マイクロ流路へ細胞を導入した直後の様子、(d) 21 時間後の様子、(e) 21 時間後の様子：拡大観察

その結果、本デバイスを用い周期的な物理刺激を負荷しながらの培養が可能であることがわかった。しかしながら、次の 2 点の問題点が明らかになった。1 つ目は気泡の問題である。長期的な培養を行うと、マイクロ流路内に空気（気泡）が入り、培養中の細胞にダメージを与え、PDMS 薄膜面からはがれた。今後は、マイクロ流路よりも上流にバブルトラップなどの気泡を除去するため装置を組み込み、長期間培養に対応する予定である。2 つ目は培地量の問題である。本実験では、幅 5 mm、長さ 20 mm、高さ 0.5 mm（PDMS 薄膜厚さ約 0.17 mm）のマイクロ流路を用いたが、必要と考えられる大きさの物理刺激を負荷するためには、一晩で 0.5 L ほどの培地量が必要であることが明らかとなった。iPS 細胞培養用培地は非常に高価であるため、長期培養のためには、必要な培地量を減らす必要がある。まず、マイクロ流路をサイズダウンすることでこれを解決する予定である。このため本年度は、長期的な培養を必要とする、デバイス上での iPS 細胞の分化誘導培養の実施には至らなかった。次年度以降に、デバイスを改良するとともに、デバイス上での iPS 細胞培養を行う予定である。また合わせて、iPS 細胞への単独の物理刺激負荷の影響も明らかにする予定である。

キーワード：MEMS、マイクロデバイス、物理刺激、幹細胞、iPS 細胞、分化指向性制御

研究経費（H25 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
483,000 円	717,000 円	0 円	0 円	0 円	1,200,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

洞出 光洋・システム創成専攻 システム科学領域

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

Asep Superman・物質創成専攻 化学工学専攻・M2

発表論文等（平成 26 年 3 月 31 日現在）

〔雑誌論文〕

なし

〔著書〕

なし

〔学会発表〕

なし

〔その他〕

なし

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST 等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

なし

参考となるHP等

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>

<http://www-arailab.sys.es.osaka-u.ac.jp/>