

## 論文の内容の要旨

論文題目： セロミクス研究のためのオンチップ1細胞計測システムの開発

氏名： 高橋 一憲

### 1. はじめに

細胞は外部環境の変化に対して応答し、適応や分化などの独特の現象を起こすが、このことはゲノム情報や、細胞内の反応ネットワークだけではなく、細胞間での情報のやりとり、すなわち細胞間コミュニティーエフェクトの存在が重要であることを示唆している。従来の細胞観察は特定の細胞の情報のやり取りを制御することなく、ランダムな集団状態での細胞を扱っていたため、無秩序なコミュニティーエフェクトの結果生じる細胞の振る舞いを見ていたことになる。そのため、細胞レベルでの振る舞いと分子レベルや個体レベルなど他の階層とのつながりの由来を解明することに自ずと限界があった。細胞内外の経路に由来する細胞レベルでの反応を理解し、コミュニティーエフェクトの効果を明らかにするためには、状態を規格化した1細胞または細胞群を基盤とする新たなバイオインフォマティクスを実現する技術を構築することが必要となる。私はこの従来の手法に置き代わる「1細胞単位でスクリーニングする新しい手法」、すなわち「オンチップセロミクス計測技術」を実現するために必要な3つの主要技術の開発を行ってきた。以下にそれぞれの説明をすると、

光学的な透過性を有する高分子樹脂（PDMS）基板内に形成した流路、容器、電極などを用いて、1細胞レベルで細胞集団から特定の細胞を非侵襲的に分取するオンチップセルソーティングシステム

コミュニティーエフェクトの効果を観察するため、細胞の数や配置を制御した状態で長期間培養するためのオンチップマイクロ培養

時空間的発現分布解析を行うためのオンチップ発現解析

である。いずれの技術も半導体微細加工で利用されてきた技術をバイオ用に最適化し、1細胞単位でスクリーニングすることに初めて成功したものである。開発した要素技術のうち、オンチップセルソーティングシステムおよびオンチップマイクロ培養はすでに原理実験を終えており、これらについて具体的に説明を行う。

## 2. 要素技術の開発について

### 2.1 オンチップセルソーティングシステム

特定の細胞を細胞集団から選び出し、細胞数や配置を制御して培養を行うことはセロミクス研究において必須の前処理技術である。本研究では従来のフローサイトメトリー、セルソーターでは難しかった分離・精製した細胞を培養するための非侵襲的・効率的なセルソーティングを実現する顕微画像認識型オンチップセルソーティングシステムの開発を行った。図1(a)はセルソーターチップの構造を、(b)は完成したチップをアルミ製のシャーシに取り付けた状態の写真を示す。厚さ0.2mmのガラスチップ上に微細加工技術によって作製した幅20 $\mu$ m、高さ10 $\mu$ mの微細流路中を流れる細胞を100倍の対物レンズを備えた顕微鏡で直接観察を行い、CCDカメラにより得られた画像情報を元にその細胞を識別する。ソーティングは電気的な外力を細胞に作用させて行うが、そのためのマイクロ電極作成

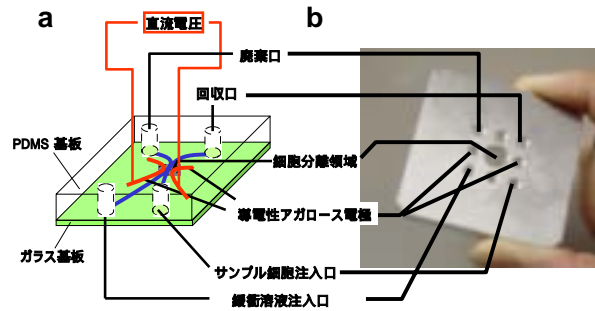


図1. オンチップセルソーターの構造  
(a)微細な流路中で細胞を分取、  
(b)シャーシを取り付けた状態のチップ。

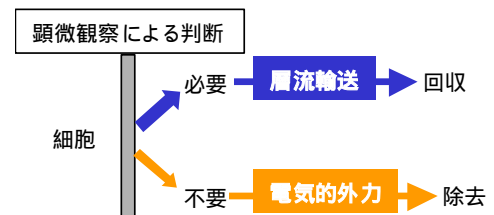


図2. 細胞に損傷を与えないソーティングプロトコル

る細胞を100倍の対物レンズを備えた顕微鏡で直接観察を行い、CCDカメラにより得られた画像情報を元にその細胞を識別する。ソーティングは電気的な外力を細胞に作用させて行うが、そのためのマイクロ電極作成

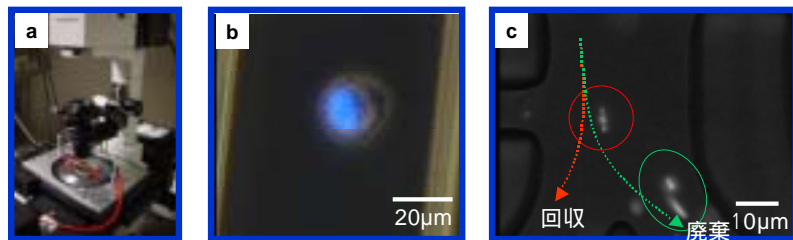


図3. 顕微観察に基づくソーティング  
(a)顕微鏡下においたチップ、(b)微細流路中を流れる染色COS細胞、  
(c)GFPの局在染色をしたバクテリアのソーティング。

にはソフトマテリアルの1種である導電性アガロースゲルを用いた。図2はソーティング時に必要な細胞に損傷を与えないためのソーティングプロトコルである。使用する細胞に対しては、そのまま流路を層流中で滑らかに通過させ、捨てる細胞のみに外力を作用させて流路から除外するため、非侵襲的に分取を行うことが可能である。この概念は、既存のセルソーター技術では採用されておらず独自の技術である。さらに顕微鏡と連結してある光学系を工夫して細胞の蛍光像や位相差像を同時に処理・解析する手法を開発した。また、この分取技術は更に小さな細胞内小器官(オルガネラ)分取のためにも利用可能である。図3(a)は顕微鏡下にチップを置いた様子を、(b)はチップ内の微細流路中を流れる核を染色したCOS細胞の様子を、(c)はGFPが極に局在化したバクテリアを印加電圧3Vでソーティングしている様子を示す。

### 2.2 オンチップマイクロ培養

移動性の高い浮遊細胞を特定の空間で長期培養をするため、光学的に透明な高分子樹脂PDMSを用いて、マイクロバルブを備えたチャンバーを作成した。これは植物細胞の1つで

あるクラミドモナスの概日リズムを1細胞レベルで調べるために作成したものである。このバルブにより、新鮮な培地は常にチャンバーに供給されるが、細胞のマイクロチャンバーへの入出はマイクロバルブによって制御できるため、長期間にわたり、細胞数を維持しながら観察し続けることが可能である。マイクロバルブは空気圧で容易に開閉し、制御しやすい点が特徴である。図4はバルブにより、マイクロチャンバー内にある細胞をチャンバー外へ導いている様子を示したものである。

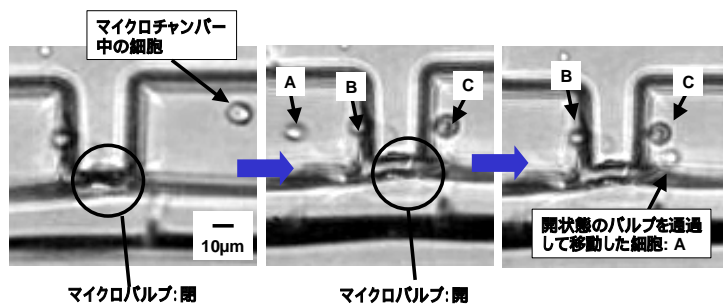


図4. 細胞培養中のマイクロバルブ開閉の様子

また、神経細胞のネットワーク形状制御と長期間の計測を可能にするため、多電極アレイチップに細胞培養マイクロチャンバーアレイと、アビジン・ビオチン反応を利用した半透膜シールによる細胞の不純物混入防止技術<sup>(1)</sup>を加えた微小多電極アレイ長期培養計測システムを試作した。細胞の空間配置、ネットワークの形成方向は30µm×30µmの微小電極8個が配置された培養チップ上に光硬化性樹脂を用いて形成した高さ25µm、幅5µmの壁からなるマイクロ構造によって制御した。また、マイクロチャンバーアレイに蓋をする技術を用いて神経細胞がマイクロ構造を乗り越えるのを阻止するのみならず、大腸菌等の雑菌のマイクロチャンバーへの侵入を防いだ。この技術を用いてラット小脳顆粒細胞を培養したところ、細胞はこの構造物を乗り越えることができないこと、および不純物の混入なしに細胞の位置制御が可能であることを確認できた。図5にラット小脳顆粒細胞を、本システムで培養した結果を示す。マイクロチャンバーアレイに封入した細胞は、チャンバーから逃れることなく、ネットワークを形成しているのが観察された。

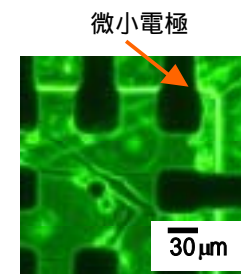


図5. 電極を組み込んだマイクロチャンバーアレイ内の神経細胞ネットワークの様子

### 3. まとめ

以上、一連のオンチップセロミクス計測のために必要な要素技術の開発を行い、それらの原理実験に成功することができた。今後はもう一つの要素技術であるオンチップ発現解析の原理実験を終わらせ、これらの技術を統合し1つの完成されたオンチップセロミクス計測システムを構築する予定である。そして、この技術を用いて、1細胞レベルでのスクリーニングを実現したいと考えている。

#### 参考文献

1. I. Inoue, Y. Wakamoto, H. Moriguchi, K. Okano, K. Yasuda (2001) "On-chip culture system for observation of isolated individual cells" Lab on a Chip 1 50-55.