

## 論文の内容の要旨

論文題目 Development of photothermal etching method for softmaterial-based microfabrication and its application to on-chip cell cultivations

(集束光加熱エッチング法を用いたソフトマテリアルの微細加工技術の開発と細胞培養系への応用)

論文提出者氏名 森口 裕之

### 序章 本研究の背景と目的

一般に、多細胞の組織が組織全体として示す協調性や機能は、細胞集団がその組織に特有の細胞種・細胞数・空間的配置・極性・ネットワークパターンなどの局所的な形態学的側面（モルフォロジー）を形成し維持あるいは変化させることによってはじめて実現されている。このような多細胞組織の形態学的側面が担う機能の成立と維持の機構を説明し理解するためには、研究対象である組織の形態学的側面の全貌を把握して機能計測を行なうだけでなく、その形態学的側面の一部がある変化をしたときに組織全体の機能がどのように変化するかを計測する差分的計測が必要になる。そして、このような実験手法的課題は実際には、 ) 一つの細胞を最小構成単位として細胞ネットワークモデルを構築し、 ) 構築した細胞ネットワークパターンを変化させる、という一連の技術開発によって実現できると考えられる。

一方、現在までの細胞ネットワークの構築技術は、産業的要請から発展した半導体や合成樹脂などのハードマテリアルベースの微細加工技術を直接細胞培養系に転用したものであり、加工原理が細胞には致死的であったため、細胞ネットワークの構築はできても、いったん構築した細胞ネットワークに時空間的に制御した変更を加えることはできなかった。

以上のような多細胞組織機能の研究の現状と背景から、本研究の目的を、「多細胞組織の理解のために、任意のネットワークパターンを持つ多細胞ネットワークモデルを組み立て、さらにネットワークパターンを時空間的に制御しながら計測できる新しい細胞培養実験系を実現すること」とし、ハイドロゲル類の生体親和性と加工特性に着目して、アガロースゲルを中心材料とする新たな一連の「ソフトマテリアルの微細加工技術」を開発し細胞培養実験系に応用する、という見通しで技術開発研究を行った。

### 第1章 Photothermal Etching 法の開発

微細構造の材料には、ハイドロゲル類の中でもゾル - ゲル相転移の温度ヒステシスが特に大きく（ゾル化温度とゲル化温度の差が 40 K 前後）、多くの細胞に対して化学的に非活性・非接着性であるアガロースゲルを用いた。加工原理には、直径約 1  $\mu\text{m}$  まで集光できる集束赤外レーザー光を顕微鏡ステージ上に固定したアガロースゲルに照射し局所的に加熱融解除去する方法を取った。その結果、Nd:YAG レーザー（波長

1064nm) と Raman Fiber レーザー (波長 1480nm) の 2 種類のレーザー光を用いて各々の特長を持った “Photothermal Etching” の原理を開発し、ゲルの微細加工技術としての評価を行った。

波長 1064nm のレーザーによる加工では、水中の 2% 低融点アガロースゲル (Melting Point: 65.5 ) 層の底面に設けた吸光発熱層としてのクロムの薄膜 (厚さ 20 ~ 150 ) への照射によって、ゲル底面を中心としたドーム状・トンネル状の領域 (直径 2  $\mu\text{m}$  ~ 300  $\mu\text{m}$ ) が融解除去された。水分子に直接吸収のある波長 1480nm のレーザーによる加工では、Z 軸方向に深いチャンバー状・チャンネル状の領域 (直径 5  $\mu\text{m}$  ~ 500  $\mu\text{m}$ ) が融解除去された (図 1)。ともに、作成されるゲル中の微細空洞構造のサイズと形状は、レーザー光の照射出力、照射時間、焦点の位置とクロム層の厚さ、対物レンズの種類などのパラメーターに依存していた。

微細構造底面に露出する基板表面をあらかじめコラーゲンなどの足場分子でコートしモデル細胞 PC12 細胞をマイクロチャンバーに運び入れて NGF 存在下で培養すると、細胞は突起をマイクロトンネルに沿って進展させ、形成される神経用ネットワークパターンの自由度はマイクロトンネルのパターニングによって制御された。さらに、培養中にも同様に追加加工ができ、新たな細胞間ネットワークを人為的に追加できることが分かった (図 2)。

## 第 2 章 Photothermal Etching 法の 3 次元微細加工への展開

現実には 3 次元的なトポグラフィーを持つ多細胞組織をモデル化する目的から、これまでは基板底面に固定配置していた吸光発熱層を 3 次元的に配置または操作することによって、photothermal etching 法を 2 次元から段階的に 3 次元の微細加工技術へと展開する技術開発を行った。その結果、アガロースゲル内部に吸光発熱層を挟み込んだ多層構造のゲルに対する photothermal etching と、マイクロマニピュレーターに接続した微小なニードルの先端 (直径 20  $\mu\text{m}$  等) を可動の吸光発熱点として用いる photothermal etching により、3 次元の形状と配置を持つマイクロチャンバーがゲルの内部に作成できることを確認した (図 3)。

## 第 3 章 Photothermal Etching 法の他の機能的構造材料への展開

一方、構造材料の面では、細胞非接着性の材料の加工だけでなく、細胞接着性の微細構造の作成や培養後の細胞集団の非侵襲的回収を実現するために、アガロースゲルへの任意のタンパク質のグラフト化の方法と、ゼラチンゲルの photothermal etching 法の開発を試みた。その結果、反応活性の高い官能基を持たないアガロースゲルに官能基を表面にもつ微小粒子 (直径約 100 nm) をゲルに混ぜ込んで反応の足場とするタンパク質のグラフティング法によって、フィブロネクチンを間接的にグラフト化した細胞接着性の高いアガロースゲル微細構造が得られた。また、5% のゼラチンゲルと 2% のアガロースゲルの等量混合ゲルによって、加工時の局所的な温度上昇によるゼラチンゲルの膨潤を抑え込んだゼラチンゲルの photothermal etching 法を開発した。ゼラチンゲルは、培養温度での膨潤と融解を防ぐために、加工後にグルタルアルデヒドで架橋し、洗浄後に細胞培養に用いた。これらの二種類の方法により、細胞接着性や酵素分解能を供えた機能的なゲルにも photothermal etching 法を応用できることが確認した。

## 第 4 章 Photothermal Etching 法を用いた多細胞組織形成過程の構成的実験

以上の一連の新しい技術を総合して、細胞ネットワーク形成過程の構成的実験と多細胞組織の構築技術の組織工学的応用の試験を行った。細胞ネットワークの構成的実験では、神経ネットワーク形成モデルとしての PC12 細胞の分化培養系を用いて、神経突起伸長への空間的拘束の影響を分析した。組織工学的応用では、機能的バイオ人工臓器作成のキーテクニックである血管作成技術を、人臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて、管状の微細構造内での血管作成を試みた。その結果、PC12 細胞を用いた培養実験

では、神経突起伸長過程における突起先端の成長円錐の振動運動が観察され、空間的拘束は振動回数ではなく一回の運動プロセスの移動距離を拘束し、同じ距離を移動した神経突起の全運動距離を減少させることが観察された(図4)。また、血管構築の試みでは、細胞は管状の微細構造内で生育したが細胞間の接着による管状の細胞シート形成には至らず、機能的な血管の作成には培養液の循環などによる物理的な環境の制御がさらに必要であることが示唆された。

## 第5章 結論

photothermal etching 法の細胞パターンニング技術としての利点は、以下の4点にある。

- 1) 細胞培養中にも微細加工ができる。
- 2) 多種類の接着性細胞に対して共通の原理で使用できる。
- 3) 1細胞単位での安定な細胞ネットワーク形状制御ができる。
- 4) クリーンルーム設備が不要である。

本技術は、同研究室の共同研究者らにより神経ネットワーク、心筋細胞集団への応用が行われており、今後はさらに他の広く一般の多細胞組織の基礎的研究や組織工学への応用展開が考えられる。残された課題は、加工技術の面ではより自由度の高い3次元の非接触加工の実現であり、材料の面ではさらに他の機能的な材料の選定や合成にある。