

マイクロチップを用いた細胞応答計測の研究

バイオエンジニアリング専攻 修士 2 年生 倉澤 知隆

1. 背景

1.1 移植再生医療とその課題

移植再生医療とは、外部から新しい臓器や細胞を患者に移植することにより生体においてすでに廃絶した機能を回復させるためのものである。移植再生医療は臓器移植と細胞移植に大きく分類される。本研究では、細胞移植を対象としている。細胞移植には骨髄移植と膵島移植がほとんどのケースを占め、前者は骨髄中の造血幹細胞を、後者は膵臓における細胞 1000 個程度の塊である島状構造（膵島）をそれぞれ患者に移植する。しかしながら、細胞移植の現状として、移植を行ってみるまでその生着率・機能性は分からず、本来移植すべき細胞以外の細胞や、変性・死滅してしまった細胞も同時に生体内に移植されるので、これが重篤な副作用の原因となることも考えられる。

そこで、移植前に細胞全数に対する個々の細胞活性の評価ができ、かつ、優れた細胞を選別して移植できる技術が求められる。また、短時間内に、細胞非侵襲に測定できることも求められる。

1.2 マイクロチップを用いた細胞応答計測の提案

1.2.1 細胞全数に対する個々の細胞活性の評価

膵島移植において移植の対象となる膵β細胞は、直径約 $10\mu\text{m}$ で移植細胞全数は 10 万個～100 万個程度である。そこで本研究では、マイクロチップ上にオリフィスアレイを配列させ、細胞を吸引固定する技術を提案した。直径約 $10\mu\text{m}$ から成る 10 万個の細胞群を 1000×1000 のアレイ状に配列させても 1cm^2 範囲に収めることができ、マイクロチップで充分対応可能である。これにより、細胞同士を一つ一つ離して固定でき、個々の細胞活性の評価を可能とする。

1.2.2 高速かつ細胞非侵襲な測定

高速で細胞非侵襲な測定を行うためには、光計測が望ましい。そこで本研究では、細胞活性の評価方法として、細胞内に普遍的に存在する NADH

(nicotinamide adenine dinucleotide) の発する自家蛍光 (Ex 340nm / Em 460nm) をリアルタイム測定するという手法を用いた。リアルタイム測定を行ったのは、単に NADH 蛍光の絶

対値を測定する静的な計測では、それがどの程度の活性を反映しているのか分からないため、細胞に薬剤などの刺激を与えた時の NADH の時間変化量を細胞応答ととらえて細胞活性の評価を行った方が、より細胞活性を反映するからである。

2. 実験原理

細胞への刺激方法として細胞外刺激と細胞内刺激の二種類が考えられる。

細胞外刺激とは、マイクロ流路を作製して液置換を行い、細胞周囲の溶液環境を変化させる刺激である。本実験では、グルコーストランスポーター (GLUT2) を有する MIN6-m9 (ラット膵β細胞) を対象とし、細胞外刺激によって細胞の周囲のグルコース濃度を変化させ、細胞の蛍光強度の時間変化から細胞応答の確認を行った。グルコーストランスポーターから取り込まれたグルコースを代謝の基質とし、NADH 濃度が上昇して細胞の蛍光強度が上昇することを確認した。コントロール実験として、同じ糖類であるスクロースも細胞外刺激によって与え、グルコースの場合と比較した。また、細胞の代謝活性を調べるため、代謝阻害剤を与えた時の細胞応答の確認も行った。代謝阻害剤としては NaN₃ (アジ化ナトリウム) を用いた。

しかし、細胞外刺激は、細胞膜表面にその物質に特異なトランスポーターを持つ物質のみしか細胞応答計測に使用できない。そこで、細胞内に直接物質を導入する方法 (細胞内刺激) を行うことを考える。本実験では電界集中を利用したエレクトロポレーションによって、細胞膜に自復可能な一過性の穿孔を引き起こし、物質を導入した (図 1)。これにより、細胞非侵襲性に多少の犠牲を伴うが、細胞内刺激を行って細胞応答を確認することができるのであれば、細胞外刺激に比べてより多くの種類の物質を細胞応答計測のために使用することができる利点があると考えられる。

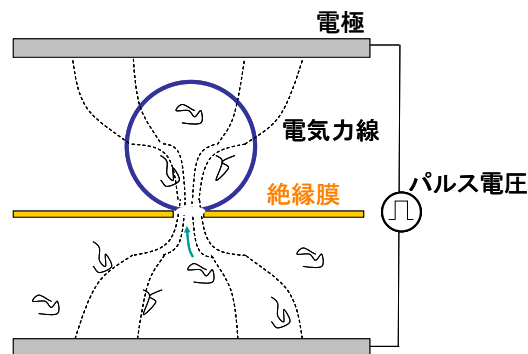


図 1 電界集中を利用したエレクトロポレーション

3. デバイスの作製および実験装置

オリフィスアレイを作製するための基板として、本実験では、透明で自家蛍光が少なく明視野／蛍光観察に適した絶縁膜である厚さ $7.5\mu\text{m}$ のポリイミドフィルム（商標名：カプトンシート）を用いた。このポリイミドフィルムに紫外レーザー（波長 355nm ，出力 7mw ，繰り返し周波数 60kHz ，（株）ネオアーク製）で穴をあけ，間隔 $30\mu\text{m}$ ， 10×10 の計 100 個のオリフィスを加工し，直径約 $2\mu\text{m}$ 程度のオリフィスが加工されたことを確認した。灌流刺激を行うため，この微細オリフィス付絶縁膜を用いて図 2 に示すような実験系を構築した。微細オリフィス付絶縁膜のオリフィス部にシリコンゴムチャンバー（ $3\text{mm}\times 3\text{mm}\times 5\text{mm}$ ）を接続し，埋め込んだシリンジ針からチャンバーに陰圧をかけることで細胞をオリフィスに吸引固定できるようにした。二つのスペーサーによって簡易的な流路を作製し，図 3 のようにマイクロピペットを用いて細胞懸濁液や刺激溶液を流入させることができるようにした。続いて反対側からキムワイブで液を吸い取り，液中に流れを起こして液置換を行える仕組みになっている。電極ポレーション刺激においては，灌流刺激に用いるデバイスとほぼ同じ仕様であるが，上部に ITO コートガラス（厚さ 1mm ）を用いている。ITO コートガラスとシリンジ針とを電極として，ここにパルスジェネレーターをつなぐことでパルス電圧を印加できるような仕組みになっている（図 4）。

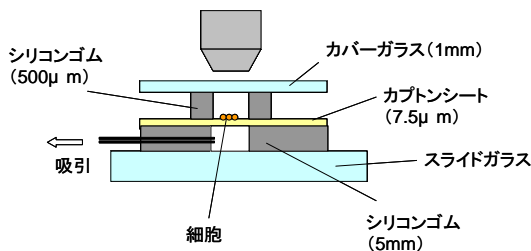


図 2 灌流刺激に用いるデバイス

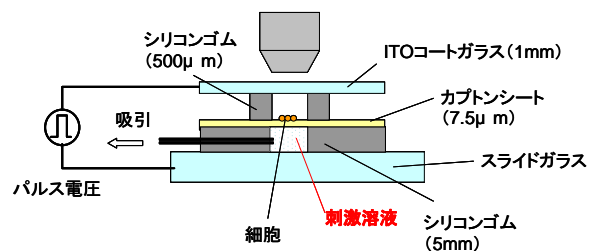


図 4 エレクトロポレーション刺激に用いるデバイス

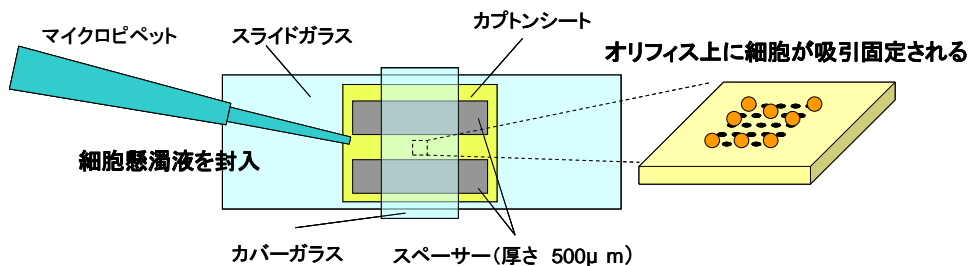


図 3 灌流刺激の方法

4. 細胞外刺激による細胞応答計測

4.1 実験方法

① 細胞懸濁液の作製

シャーレ上で接着培養していた細胞をトリプシン処理によってシャーレから剥がし、細胞を浮遊状態にした。遠心分離機によって細胞と培地 (DMEM) を分離し、そこに新鮮な培地 (DMEM) を加えて再懸濁し、これを細胞懸濁液として用いた。

② 細胞の吸引固定

- (1) シリコンゴムスペーサーで作製した流路に細胞懸濁液を流入させた。
- (2) シリンジによって下部チャンバー内の圧力を細胞懸濁液に比べて低く保ち、細胞を微細オリフィスに吸引固定した。
- (3) リン酸緩衝液 (PBS) を一方から流し、もう一方から緩衝液をキムワイプで吸い取り、細胞懸濁液中に流れを起こして、固定されていない細胞および DMEM 培地を洗い流した。

③ 露光および蛍光観察

蛍光顕微鏡で露光 (露光時間 200-300msec, 露光間隔 5sec) を行い、蛍光顕微鏡に接続した CCD カメラで蛍光像を取得した。

⑤ 灌流刺激

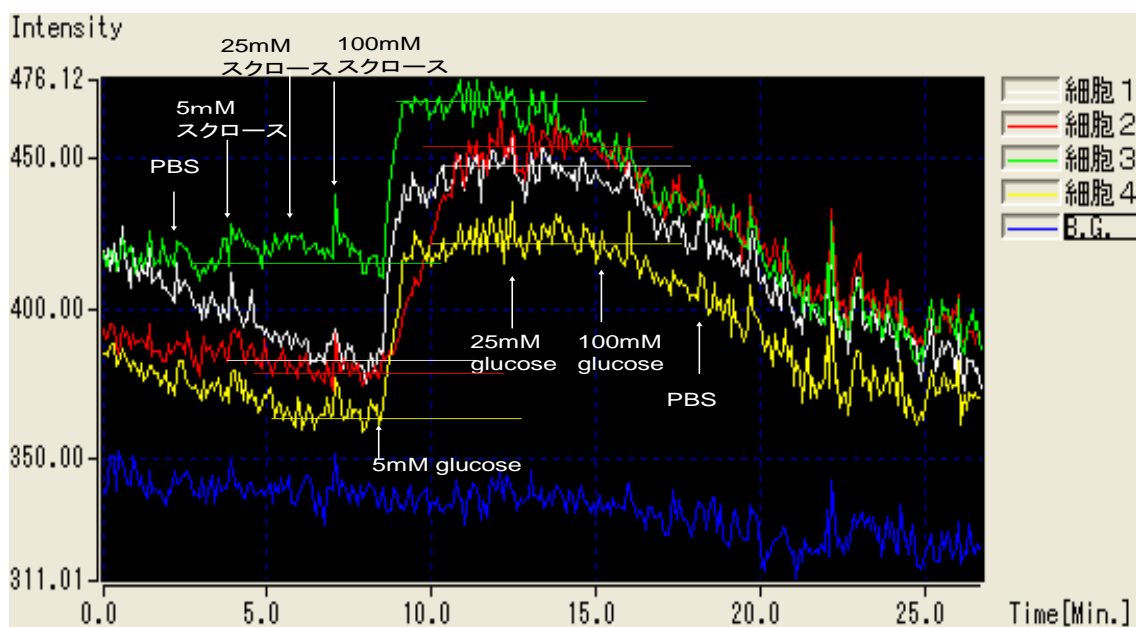
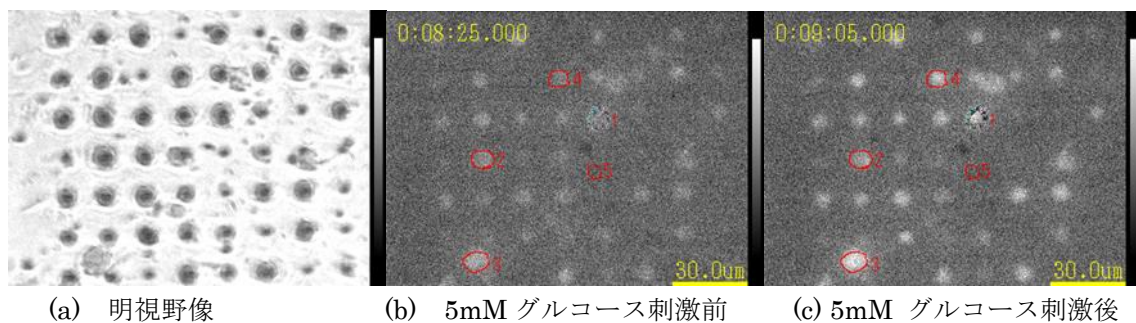
数分の時間間隔を置いて、刺激溶液を流入させて液置換し、細胞応答を確認した。

5.2 実験結果

図 5 に実験結果を示す。(a)は吸引固定された MIN6-m9 の明視野での様子である。この図より、加工したほとんどのオリフィスにおいて細胞を吸引固定できていることが分かる。(b)(c) は 5mM グルコース刺激前後の蛍光像である。(a)の明視野像と見比べて、白く光っているのが細胞であり、オリフィス部は蛍光を発していないことが分かる。(b)(c)における赤丸は細胞部分を範囲指定したもので、この範囲を 256 階調 (0 - 255) で輝度解析して値を算出し、時間変化をグラフにしたものが(d)である。(b)(c)における赤丸 1 ~ 4 が(d)の細胞 1 ~ 4 にそれぞれ対応している。また、蛍光強度変化が細胞応答であることを示すため、バックグラウンドの蛍光強度も測定した。

最初、PBS を流入させたが、細胞の蛍光強度に変化は見られなかった。これは細胞周囲の溶液の環境に変化がなかったことを示している。その後、5mM スクロース、25mM スクロース、100mM スクロースを流入させたが、細胞の蛍光強度に変化は見られなかった。これは第二章で述べたように、細胞膜表面にスクロースを取り込むトランスポーターが存在しないためである。次に 5mM グルコースを流入させたところ、細胞の蛍光強度が上昇した。細胞膜表面のグルコーストランスポーター (GLUT2) から細胞内へグルコースが取り込ま

れ、代謝が活性化して NADH の産生量が増加したためである。これらの刺激溶液に対する細胞応答から、NADH 蛍光を指標として細胞の代謝活性を評価出来たと言える。



(d) 蛍光強度変化

図5 MIN6-m9 への灌流刺激実験

6. 細胞内刺激による細胞応答計測

6.1 実験方法

実験手順は以下のとおりである。

- ① 下部チャンバーにシリンジで陰圧をかけ、微細オリフィス上に細胞を吸引固定した。続いて、吸引固定された細胞以外の細胞や培地を、PBS を液置換して洗い流した。
- ② 電圧値 1.5V, 周波数 50kHz, 持続時間 10 msec~100msec の高周波変調パルス電圧を印加し、刺激溶液を細胞内へ導入した。刺激溶液には代謝の基質となる 100mM グルコースを用いた。

6.2 実験結果

図6に100mMグルコースを導入したときのMIN6-m9の細胞応答を示す。時刻5分、6分、14分のあたりでスパイク応答が見られている。これは、グルグルコースが細胞内に導入されたことで細胞の代謝が活性化されてNADH蛍光が上昇したのではないかと考えられる。エレクトロポレーション刺激においては瞬間的に導入されるため、少量しか入らず、すぐに産生されたNADHがすぐに消費されるためにスパイク状の応答になったのではないかと考えられる。このため、連続的な細胞応答を確認するためには、印加するパルス電圧の回数を多くし、細胞内のNADH濃度を高める必要があるものと思われる。この実験結果から、エレクトロポレーション刺激によってグルコースを導入した際のスパイク状の蛍光強度変化より、細胞応答が確認できている可能性が示唆された。

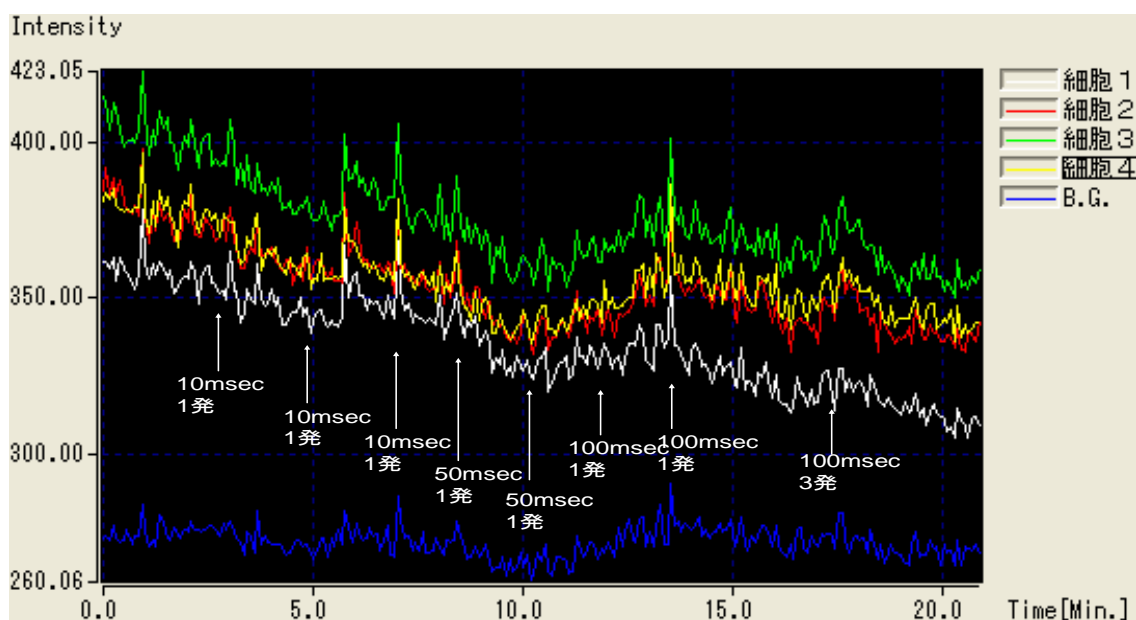


図6 MIN6-m9 へのエレクトロポレーション刺激実験

7. 結論

- 細胞外刺激により、細胞の代謝状態を活性化（または阻害）する物質を与えた時のNADH 蛍光強度の変化から細胞応答を確認できた。これにより、細胞膜表面に輸送担体を持つ物質においてはこの刺激方法によって細胞の代謝活性を評価することが可能になることが示された。
- エレクトロポレーション刺激により、細胞応答を確認できることが示された。これにより、非侵襲性は多少犠牲にするが、細胞外刺激に比べてより多くの種類の物質を細胞応答計測のために使用することができる利点生まれ、細胞応答計測の可能性を広げると考えられる。