

**【目的】**本研究は、血中がん細胞が血管狭窄部を通過した際に生じる遺伝子発現の変化と遺伝子変異の蓄積を解析する方法論を実現する。それにより、血中がん細胞が如何にして血液循環中に「進化」し、他臓器への転移能を獲得する（あるいは抑制される）に至るのか、という疑問にアプローチする。そのために、毛細血管の狭窄部を再現した3次元微細構造を半導体微細加工技術によって作製し、ライブイメージングによる狭窄部通過前後の1細胞毎の計測を通じて、がん細胞と細胞核の物理的挙動について可視化するとともに、狭窄部通過後のがん細胞を回収し、遺伝子発現・変異を評価することで細胞機能の変化を解析する。

**【方法】**以下の三つの要素に関して、マイクロナノテクノロジーを用いて、装置及び手法の開発と評価を行い、血中がん細胞進化解析に関する新たな方法論を確立した。1. 血管狭窄部の3次元モデル形成：ヒトの血管最小狭窄部は直径約6 $\mu\text{m}$ の円形に近い断面を持っている。これを生体外で再現するため、半導体加工技術とポリマーの自己組織化を利用したマイクロブリッジ鑄型形成手法を開発した。2. 1細胞観察デバイス：蛍光顕微鏡下に*in vitro*血管モデルとなる1の狭窄部構造を有したマイクロ流体デバイスを設置し、がん由来の細胞株をサンプルとして、狭窄部通過前後のがん細胞および細胞核の変形と形状回復に関するデータを物理刺激の履歴として取得するとともに、細胞内動態を蛍光ライブイメージングにより可視化し、進化の駆動因子として評価する。そのために、狭窄部通過後の細胞を微細構造でトラップするデバイスを開発した。3. 多細胞回収デバイス：狭窄部を通過した細胞群をマイクロ流体デバイスから回収し、特にがんの転移に関わる機能の評価を行う。回収細胞群の遺伝子発現解析を行うために、解析に十分な細胞数を回収することが必要なことから、*in vitro*血管狭窄部モデルをマイクロ流体デバイス内で多数並列化することで単位時間当たりの回収細胞数を向上させることに取り組んだ。また、それを実現するために、細胞をアレイ化した狭窄部構造に均等に分配する分岐型流路の設計と評価を行った。

**【結果】**三つの技術要素について、研究開発に取り組み、細胞計測に用いるための技術を確立した。1. 血管狭窄部の3次元モデル形成：微細加工時の様々なパラメータを検討することで、メニスカスを用いたマイクロブリッジ鑄型により6 $\mu\text{m}$ 径の円形断面を有した微小狭窄構造の形成に成功した。2. 1細胞観察デバイス：がん由来細胞株MDA-MB-231を用いて狭窄部通過実験を行い、細胞の狭窄部通過による変形と、通過後の細胞の変形からの回復挙動を顕微鏡によりイメージングした。変形回復挙動から、線形粘弾性モデルにより形状回復の時定数が8秒程度であることが見積もられた。3. 多細胞回収デバイス：細胞を均等分配する分岐型流路と512個の狭窄部アレイを有したマイクロ流体デバイスを作製した。熱交換器設計を参考に、数値流体解析と細胞を用いた実験を行い、細胞を効率よく狭窄部に誘導・分配するマイクロ流路設計の最適化を行った。

*in vitro*微小血管狭窄部3次元モデルと細胞計測

