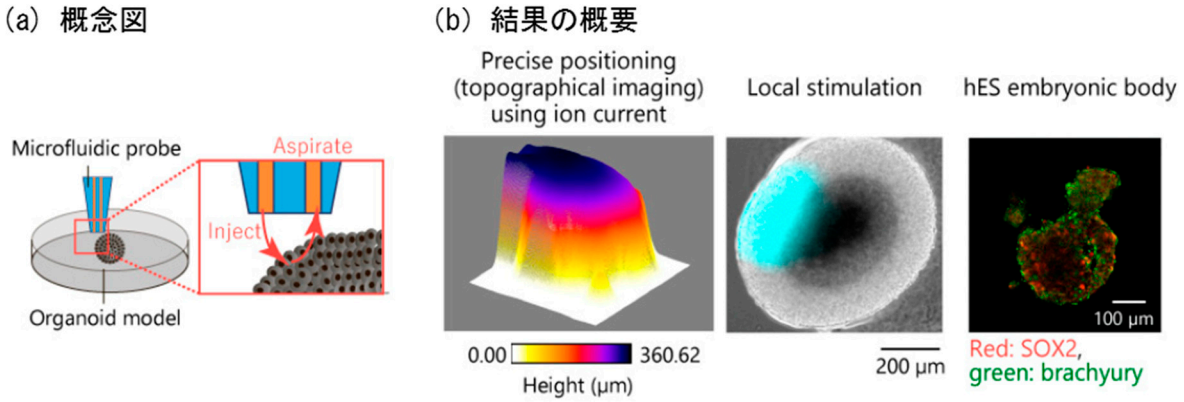
204　細胞分化の空間制御に資するマイクロデバイスの創出	梨本　裕司

【目的】ヒト幹細胞から誘導されるミニ臓器モデル（オルガノイド）は、現在、主に空間的に均一な刺激を逐次的に与えることで作製されている。しかし、実際の組織の発生過程は、空間的、時間的に複雑なシグナルが統合された現象であるため、均質な刺激のみでは、発生過程の再現、検証には不十分である。このため、発生の理解や検証には、時空間的な細胞へのシグナルを制御するためのツールが必要となる。マイクロ流体デバイスによる局所刺激は、新たな分化誘導ツールとして有望であるが、閉鎖された培養系では、適用可能なオルガノイドの大きさに制限があった。そこで本研究では探針型のマイクロ流体デバイス（マイクロ流体プローブ、MFP）を用い、数 mm 程度のオルガノイドまでを対象とする、空間的な分化刺激の付与システムの開発検討を行った。

【方法】探針の位置制御には、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）で利用されている、イオン電流を用いたフィードバックシステムを採用した。マイクロ流体プローブには、ガラス管の内壁が隔壁で仕切られた、θ 型のガラス管を用いた。一方の管路から、薬液による刺激を行い、他方の管路から吸引を行うことで、局所的な刺激が可能であるか試みた。基礎的な検討は、市販の細胞（ヒト乳腺がん細胞、MCF-7、ヒト肺線維芽細胞）を用いて行った。最終的な対象としては、ヒト胚性幹細胞（hES 細胞）を材料とするオルガノイドを用いることを見据え、基本的な培養システムの立ち上げと、分化誘導システムの検証を行った。

【結果】位置制御の精度を示すために、イオン電流値を基に探針のポジショニングを行い、胚様体と同様の形状を有する細胞凝集体（スフェロイド）の形状イメージを取得可能であるか、確認を行った。その結果、スフェロイドの形状と合致する形状イメージを取得することが可能であった。MFP によるスフェロイドの局所刺激を確認する目的で、導入口より、細胞核の染色試薬である Hoechst 33342 を 100 μg/mL の濃度で導入を行ったところ、細胞核の蛍光シグナルが、MFP を配置した位置に局在していることを確認した。また、hES 細胞の利用に関する倫理承認を得、hES 細胞の培養を介しするとともに、胚様体（EB）を用いた分化モデルの検討を行ったところ、BMP-4 の刺激による EB の分化の進行を確認できた。以上、イオン電流を用いた、胚様体様の大きさのサンプルを対象とした探針の位置制御システム、MFP を用いた局所的な薬剤刺激システムの基礎的な確認に成功するとともに、測定対象となる hES 細胞の培養環境の立ち上げに成功した。今後、検討した距離制御システム、局所薬剤刺激システムを用い、hES 細胞から誘導するオルガノイドモデルの分化制御を継続的に検討していく。

マイクロ流体プローブを用いた分化刺激の局所制御



204. 細胞分化の空間制御に資するマイクロデバイスの創出

梨本　裕司

東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部

Key words：マイクロ流体プローブ，イオン電流，三次元培養，ヒト胚性幹細胞

緒　言

ヒトの発生機序を理解し、再生医療や、遺伝的疾病の治療を目指した研究が盛んに検討されている。各種のヒト幹細胞から誘導されるミニ臓器モデル（オルガノイド）は、脳、腎臓、肺などの発生過程の一部の再現に成功したが、これらのオルガノイドは、主に空間的に均一な刺激を逐次的に与えることで誘導されている。発生は、胚を形成する細胞が、空間的、時間的なシグナルを統合し、周囲と協調して行う現象であるため、均質な刺激のみでは、発生過程の再現、検証には不十分である。事実、既存のオルガノイドは、また臓器の構成要素は含むものの、空間的な位置が不均一であり、統合的な組織機能の再現に至っていない。これらの発生の理解、検証のためには、時空間的な細胞へのシグナルを制御するためのツールが必要となる。

この課題を解決するため、半導体分野で発展してきた、マイクロエンジニアリング技術に注目が集まっている［1］。ヒト胚性幹細胞（hESC）の培養領域を 1 mm 程度の円形領域に制限し、Bone morphogenetic protein 4（BMP4）を投与すると、原腸形成過程に類似した、3 つの胚葉（内胚葉、外胚葉、中胚葉）を、リング状に誘導可能であることが報告された［2］。現れるリング状のパターンは、再現性が極めて高く、空間的な培養領域の制御の重要性が示された。一方、形態形成の促進因子（morphogen）の濃度勾配を再現も検討されている。微小な流路を複数組み合わせることで、特定の培養領域内に、安定した濃度勾配を作製することが可能である。これを利用し、神経管の発生過程に関わる 4 種の化学物質の時空間的な濃度勾配を制御し、神経管の発生に与える影響が検討されている［3］。ごく最近、前述した hESC を用いたリングパターンとマイクロ流体デバイスを組み合わせ、胚の発生過程において必須となる、分化パターンの胚内の対称性が崩れる条件に関する研究も報告されている［4］。

しかし、マイクロ流体デバイス内に導入可能な細胞モデルは、大きくても 1 mm 程度であり、既存のオルガノイドモデル（1〜5 mm 程度）への適用には大きな制限がある。また、デバイス中で付与可能な刺激のパターンは、デバイスデザインで決まるため、細胞の導入後は、変更が難しい。発生時のサイズ、細胞種のダイナミックな変化を考えれば、時間的に摂動箇所、パターンを制御する必要がある。本研究で提案する走査型プローブ顕微鏡による制御は、オープンな培養環境で行える制御手法であり、適用可能なオルガノイドのサイズに制約は無い。また、顕微鏡として発展してきた位置制御の技術は、胚の成長に伴うサイズの変化にも適用可能であり、走査による刺激部位の時間的制御が容易である。

我々は、走査型プローブ顕微鏡技術を用いた組織モデル、細胞からの物質回収技術に長年取り組んできた［5，6］。そこで本研究では、我々の知見をベースとして、オルガノイドの発生過程の理解、検証に向けた新たな医工融合領域の研究に取り組んだ。なお、本研究は、我々が代表を務める科研費若手研究「マイクロ流体プローブによるオルガノイドの時空間的な分化制御法の開発」を補完し、ヒト胚性幹細胞を使用するプロジェクトとして行われた。

方　法

1. 細胞培養

マイクロ流体プローブの基本的な動作検証は、ヒト肺線維芽細胞（hLF、Lonza）、ヒト乳腺上皮がん細胞（MCF-7、

東北大学加齢医学研究所）を用いて行った。実際の分化誘導を行う細胞として、ヒト胚性幹細胞（hESC、理化学研究所）を用いた。hESC の使用にあたっては、文部科学省の規定に準じ、学内の倫理審査委員会の承認を得て行った。hLF、MCF-7 を 5,000、10,000 cells/well で 96-well に播種し、2 日間培養することで、細胞凝集体（スフェロイド）を得、これを疑似的なオルガノイドモデルとした。hESC の分化は、平面培養における過去の報告を参考に、hESC の胚様体（embryoid body （EB）、1,000 cells/EB）を構築し、50 ng/mL の BMP-4 を添加することで、初期の分化の誘導を試みた。

2. 探針の位置制御の基本原理

探針には、先端開口部の直径が 10～50 μm のマイクロピペットに電解質を充填して用いた。マイクロピペット内外に挿入した Ag/AgCl 電極間に、電位差を設けると、イオン電流が発生するが、このイオン電流の変化は、マイクロピペット先端と試料との距離に依存する。試料からナノピペットが十分離れた時の電流値を基準とし、イオン電流値が 0.5%程度減少したところで探針を停止するようプログラムすると、非接触に対象の近傍に探針を配置可能となる（図 1）。

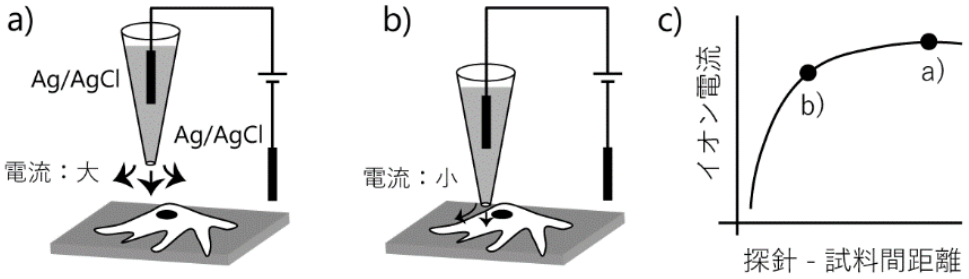


図 1. 探針の位置制御の基本原理
ピペット先端-試料間が十分離れた際の（a）のイオン電流値を指標とし、先端-試料間近接（b）による電流値の減少をモニタする。

3. マイクロ流体プローブ（MFP）の基本原理

先端に、開口部を二つ以上有する探針を用い、一方から試薬を導入し、他方から吸引を行う。吸引の流量が導入の流量よりも十分に大きい場合には、導入した溶液の拡散は探針の開口部と同じオーダーに制限され、吸引口に回収される。これを利用して、対象に対して局所的な化学的摂動を付与可能である［7］。

4. マイクロピペット、MFP の作製

位置制御の基本検証に用いたマイクロピペットは、レーザープラー（Sutter Instrument）を用いて作製した。ボロシリケートガラス管（外径 1.20 mm、内径 0.69 mm）をレーザープラーで延伸し、先端 10～50 μm のシングルバレルのガラス管を得た。マイクロ流体プローブは、内部に隔壁を有するガラス管（θ 管、外径 1.5 mm、内径 1.02 mm）を、同様にレーザープラーで延伸し、先端におけるそれぞれの開口部がおよそ直径 50 μm 程度になるように調整した。θ 管の基部にシリカキャピラリーを挿入、アラルダイトで封止することでシリカキャピラリーと θ 管の内腔を接続し、さらにシリカキャピラリーをシリンジポンプ（Low Pressure Syringe Pump neMESYS 290N）に接続し、溶液の送液を行った。

結果および考察

1. イオン電流を用いた探針位置の制御

位置制御の精度を示すために、イオン電流値を元に探針のポジショニングを行い、形状イメージを取得可能であるか、確認を行った（図 2a）。hLF のスフェロイド（図 2b）に対して、イオン電流をベースとした形状計測を行ったところ、スフェロイドの形状と合致する形状イメージを取得することが可能であった（図 2c）。平坦な培養ディッシュでは、こ

のような形状は観測できず（図 2d）、スフェロイドの形状に応答して、探針位置を制御できていることが確認できた。

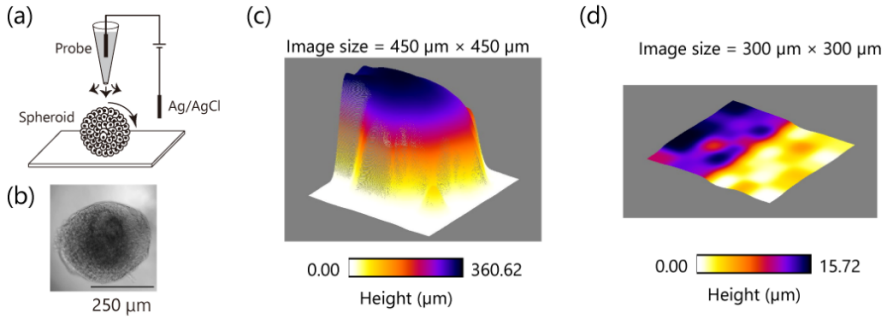


図 2. イオン電流を利用した細胞凝集塊に対する探針のポジショニング機能の検証

a) イオン電流を利用した細胞凝集体へのアプローチ。ポジショニング機能の検証のため、イオン電流を利用した形状計測を実施。

b) 計測に用いたヒト肺線維芽細胞の凝集体。

c) 細胞凝集体の形状イメージング。

d) 細胞凝集体なしの基板のイメージング。

2. マイクロ流体プローブを用いた局所刺激の検討

MFP を用いた局所的な細胞刺激が可能であるか、確認を行った。導入口から溶液内にローダミンを吐出し、MFP 周囲のローダミンの蛍光輝度を蛍光顕微鏡により定量した（図 3a～c）。導入の流量を 33 nL/s で固定し、導入：吸引の比率を変化させたところ、導入口の蛍光輝度が一定であったことに対し、吸引口の蛍光輝度は、比率の増加とともに、減少してくことを確認した。また、MFP の外部の蛍光輝度の総和も、比率の増加とともに減少し、1：20 以上の比率では殆ど変化しなかった。これは、今回、計測を行った MFP の外部領域においては、1：20 以上の流量比において、おおよそローダミンの拡散を抑止できていることを示唆している。MFP による導入試薬の拡散領域の抑制には、MFP－探針間の距離が重要であるが、今回は、MFP が基板から十分離れた距離で計測を行っており、今後、拡散制限領域の距離依存性を評価していく必要がある。次に、MFP によるスフェロイドの局所刺激を確認する目的で、導入口より、細胞核の染色試薬である Hoechst 33342 を 100 µg/mL の濃度で導入を行った（図 3d）。局所刺激後の細胞の蛍光顕微鏡写真を図 3e に示す。細胞核の蛍光シグナルが、MFP を配置した位置に局在していることを確認した。

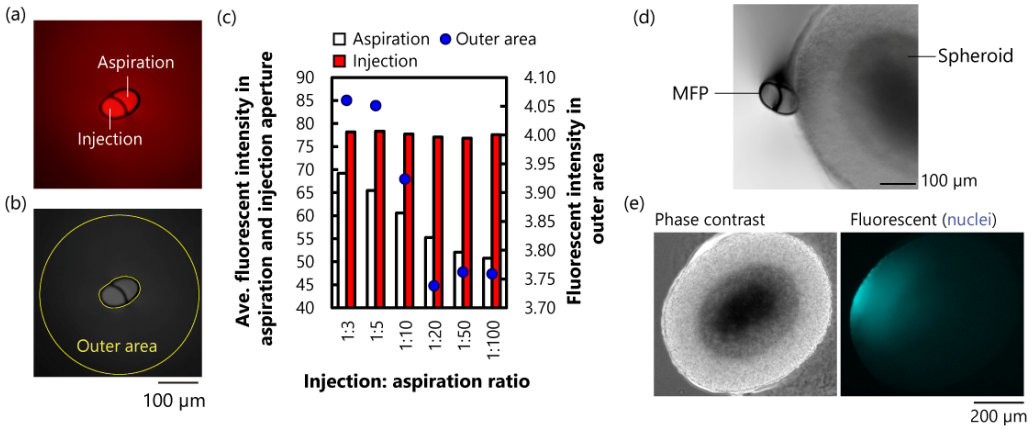


図 3. マイクロ流体プローブ（MFP）を用いたスフェロイドへの局所刺激

a) ローダミン B を流した際の MFP 先端の蛍光写真。

b) MFP 外の ROI。

c) 蛍光輝度の定量結果。

d) MFP によるスフェロイドの局所刺激時の様子。

e) Hoechst 33342 による局所刺激後のスフェロイド観察。

3. EB を用いた分化誘導系の検討

探針による局所的な分化誘導を見据え、胚様体による分化誘導システムを検討した。BMP-4 刺激を開始後、0～2 日間の EB の位相差顕微鏡写真を図 4a に示す。BMP-4 刺激の有無によらず、hES 細胞から EB が形成可能であった（Day 0）。BMP-4 刺激を行った EB は、Day 1 から Day 2 にかけて、突起状の構造体を形成する様子が観察された（n=8）。分化の進行度と局在を確認する目的で、外胚葉マーカー（SOX2）、中胚葉マーカー（brachyury）、栄養芽細胞のマーカー（CDX2）の免疫染色を行った（図 4b、c）。BMP-4 を添加した場合には、シグナルが微弱ながらも、EB のへりに $CDX2^+$の細胞が観察されたが、BMP-4 を添加しなかった EB では、$CDX2^+$の細胞は殆ど観察できなかった（Plane 1、2）。一方、$SOX2^+$、$brachyury^+$の細胞は、$CDX2^+$細胞と同様に、EB の縁に主に存在していたが（Plane 1、2）、$SOX2^+$細胞はより EB の内側の領域まで存在していた（Plane 2）。

hES 細胞を平面的な円状にパターンした場合には、BMP-4 の刺激により、円の外側から順に $CDX2^+$、$brachyury^+$、$SOX2^+$細胞が形成されることが報告されている [2]。EB の形成自体が分化を進行させる刺激となりうるため、本研究では、BMP-4 を添加しなかった EB においても、hES 細胞の分化が観察されたと考える（図 4c）。一方、BMP-4 を添加した EB では、シグナルが微弱であるものの、外側より $CDX-2^+$、$brachyury^+$、$SOX2^+$細胞が形成されており、BMP-4 刺激による分化誘導に一定の効果が確認できた。

2020 年度に助成が開始された本研究課題であるが、hES 細胞の倫理申請に想定以上の時間を要し、培養が開始できたのは、2020 年 12 月にずれ込んでしまったことから、基本的な分化誘導の確認に検討は留まった。しかし、およそ 3 か月で hES 細胞の基本的な培養環境、手技を整えることに成功した。今後は開発した MFP を用いた hES 細胞の EB を対象に、BMP-4 の局所刺激を行い、分化制御がどのように可能であるか、検証を行っていく予定である。

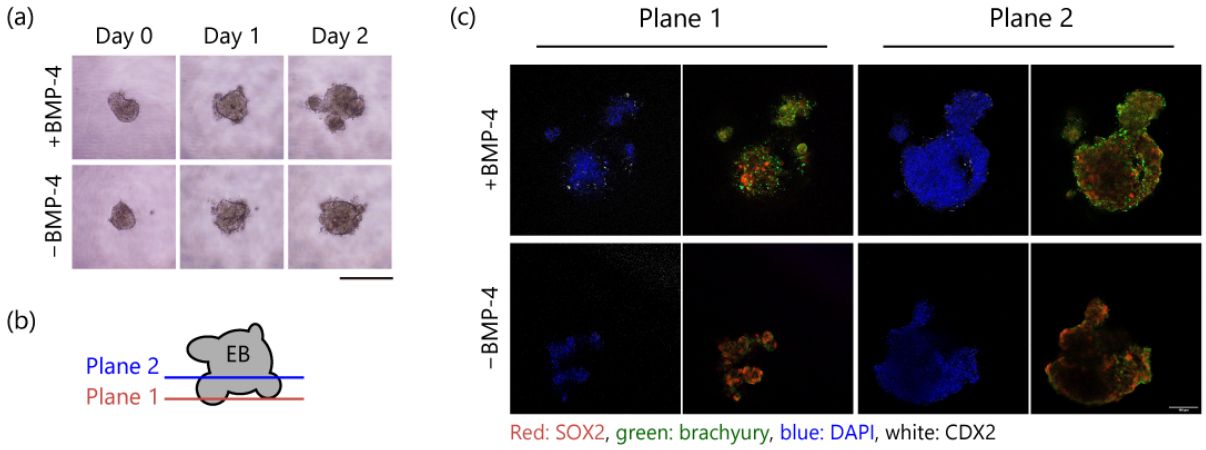


図 4. hES 細胞の EB を用いた分化誘導系の基礎検討

a) BMP-4 添加による分化誘導時の位相差顕微鏡写真。Scale bar＝500 μm。

b) 共焦点顕微鏡観察（c）における光学切片の模式図。

c) BMP-4 刺激 48 h 後の EB を用いた免疫染色写真。Scale bar＝100 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は、東北大学大学院工研究科バイオ工学専攻の珠玖仁教授、および珠玖研究室のスタッフ、学生である。東北大学加齢医学研究所の鈴木隆哉助教に、ヒト胚性幹細胞の実技指導において、多大なサポートを頂いた。また、実験データの取得にあたり、実験補助者の近藤朋子さん、大学院生の向本励くんに中心的にサポートを頂いた。ここに深く感謝を述べる。

文　献

1) Brassard JA, Lutolf MP. Engineering Stem Cell Self-organization to Build Better Organoids. Cell Stem Cell. 2019;24(6):860-76. Epub 2019/06/08. doi: 10.1016/j.stem.2019.05.005. PubMed PMID: 31173716.

2) Warmflash A, Sorre B, Etoc F, Siggia ED, Brivanlou AH. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. Nat Methods. 2014;11(8):847-54. Epub 2014/06/30. doi: 10.1038/nmeth.3016. PubMed PMID: 24973948; PMCID: PMC4341966.

3) Demers CJ, Soundararajan P, Chennampally P, Cox GA, Briscoe J, Collins SD, Smith RL. Development-on-chip: in vitro neural tube patterning with a microfluidic device. Development. 2016;143(11):1884-92. Epub 2016/06/02. doi: 10.1242/dev.126847. PubMed PMID: 27246712; PMCID: PMC4920155.

4) Manfrin A, Tabata Y, Paquet ER, Vuaridel AR, Rivest FR, Naef F, Lutolf MP. Engineered signaling centers for the spatially controlled patterning of human pluripotent stem cells. Nat Methods. 2019;16(7):640-8. Epub 2019/06/30. doi: 10.1038/s41592-019-0455-2. PubMed PMID: 31249412.

5) Nashimoto Y, Takahashi Y, Zhou Y, Ito H, Ida H, Ino K, Matsue T, Shiku H. Evaluation of mRNA Localization Using Double Barrel Scanning Ion Conductance Microscopy. ACS Nano. 2016;10(7):6915-22. Epub 2016/07/12. doi: 10.1021/acsnano.6b02753. PubMed PMID: 27399804.

6) Ino K, Nashimoto Y, Taira N, Azcon JR, Shiku H. Intracellular Electrochemical Sensing. Electroanalysis. 2018;30(10):2195-209. doi: https://doi.org/10.1002/elan.201800410.

7) Juncker D, Schmid H, Delamarche E. Multipurpose microfluidic probe. Nat Mater. 2005;4(8):622-8. Epub 2005/07/26. doi: 10.1038/nmat1435. PubMed PMID: 16041377.