

[研究助成 (A)]

ハイドロゲルソフトロボットによる細胞組織の 高速形成システムの開発

Rapid cellular tissue formation system using a hydrogel soft robot



2231013

研究代表者
(助成金受領者)

東京農工大学 工学研究院

准教授

倉科 佑太

共同研究者

慶應義塾大学 理工学部

教授

竹村 研治郎

[研究の目的]

細胞が球状に凝集したスフェロイドの形成は、現在の再生医療や創薬スクリーニングにおいて重要である。スフェロイドの形成は今まで様々な方法が報告されており^[1]、液滴の表面張力で形成する方法^[2]、細胞非接着性の材料の鋳型の中で形成する方法^[3]、超音波定在波を用いた形成^[4,5]などがある。それぞれの方法には利点がある。例えば、鋳型による手法では鋳型の成型が容易であることから大量の細胞組織を生成することができ、超音波による手法は培養ディッシュ内に発生する超音波の節で細胞を集積することで常に圧力がかかることから、高速で細胞組織を形成できる。しかし、従来、大量の細胞組織を高速で形成する方法は確立されていない。そこで、本研究では、アガロースゲルとポリジメチルシロキサン (PDMS) で成形した空気圧ソフトアクチュエータを用いて、大量かつ高速にスフェロイドを形成する方法を提案する。

提案手法のシステムは、培養デバイスと制御回路から構成される。培養デバイスは、空気圧が印加されることで膨張、収縮する。これにより、デバイス中心のアガロースゲルとゲル内部に播種された細胞にも圧力を印加し、細胞組織形成を促す (Fig. 1)。

その際、細胞をアガロースゲルで包み込み、さらに PDMS で包み込むことで、細胞への圧力印加を実現する。具体的には、通常 PDMS

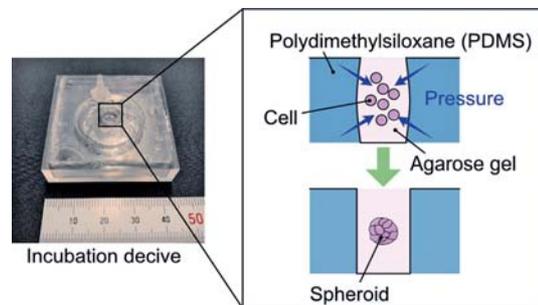


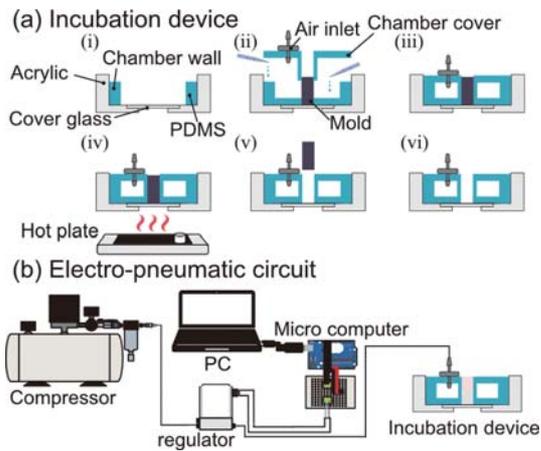
Fig. 1 The concept of the formation of a spheroid by air pressure.

で細胞懸濁液に圧力を印加すると細胞が培地と一緒に上部に浮き上がってしまう。一方で、本研究では細胞懸濁液と PDMS の間に細胞非接着性のハイドロゲルであるアガロースを加えることで、培地はアガロースゲルを抜ける一方で、細胞は捕捉されるため、細胞に圧力を印加することが可能となる。また、印加する圧力の向きも PDMS の底面と側面を外側のアクリルカバーで拘束することで、斜め上から圧力を印加することができるようになり、細胞を包み込むように圧力の印加を実現できる。上記のコンセプトから培養デバイスを構築した。

[研究の内容, 成果]

製作方法

培養デバイスの材料には主に PDMS を使用した。培養デバイスを構成する PDMS は柔軟な素材であるため、内部の気室は空気圧で容易



(a) Assembling the incubation device. (i) Setting the chamber wall with a cover glass on an acrylic cover. (ii) Coating PDMS on the cover glass and the chamber wall with a mold. (iii) Setting the chamber cover on the chamber wall. (iv) Heat curing. (v) Demolding. (vi) Finish. (b) Electro-pneumatic circuit.

Fig. 2 Fabrication of the incubation device.

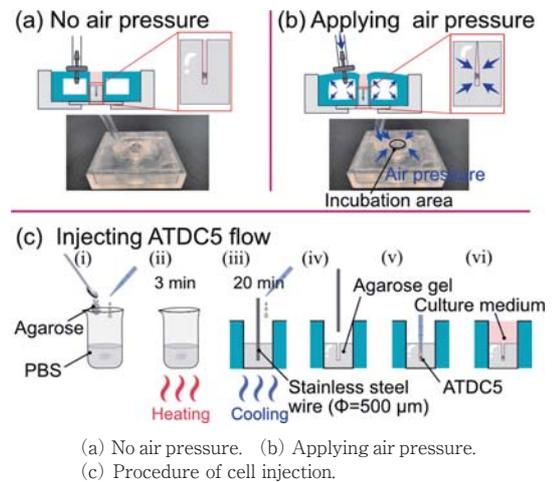
に膨張・収縮する。まず、チャンバー壁とカバーガラスをアクリルカバーにセットした (Fig. 2a (i))。次に、チャンバー壁とアクリルカバーの底面にPDMSをモールドと一緒に注入した (Fig. 2a (ii, iii))。その後、ホットプレート上で90℃、2時間加熱してPDMSを硬化させた (Fig. 2a (iv))。最後に、型をアクリルカバーから抜き取り、PDMSを硬化させ、培養デバイスを完成させた。(Fig. 2a (v, vi))。制御回路は、Arduino Uno、電空レギュレーター、電気回路で構成されている (Fig. 2b)。

この制御回路を用いることで、デバイスの中心部に空気圧を加えることができる。

実験方法

収縮率測定

培養デバイスに空気圧を加えると、培養デバイスの中心部が収縮する (Fig. 3 (a, b))。デバイスの収縮率測定では、最大0.1 MPaの空気圧を培養デバイスに加えた。また、空気圧によるデバイス中心部の収縮を実体顕微鏡で撮影し、画像解析ソフトImageJに動画を取り込み、デバイス中心部の収縮率を測定した。



(a) No air pressure. (b) Applying air pressure. (c) Procedure of cell injection.

Fig. 3 The behavior of incubation device driven by air pressure.

細胞培養

培養デバイスで細胞培養するために、細胞、アガロースゲル、培地を培養デバイス中心部に注入した。細胞はマウスの軟骨様細胞であるATDC5を用いた。まず粉末状のアガロースをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と混合し、アガロース溶液を調製した (Fig. 3c (i))。次にアガロース溶液 100 mL ビーカーに入れて電子レンジで3分加熱し、デバイスの培養部に流し込んだ (Fig. 3c (ii, iii))。その後、デバイスの中心部に直径0.5 mmのステンレス線を設置した状態で、培養デバイスを冷蔵庫内で20分冷却した。アガロース溶液は、加熱し、冷却することで、アガロースゲルに変化する。ステンレス線は培養デバイスの下部にあるカバーガラスから0.5 mm離れた状態で設置した。ゲル化した後、ステンレス線を引き抜き、細胞をアガロースゲル内部に成形した穴に注入した (Fig. 3c (iv, v))。最後に、デバイス培養部のアガロースゲルの上を培地で満たした (Fig. 3c (vi))。

細胞をデバイスに注入した後は、空気圧印加あり、なしで細胞を12時間、24時間で培養した。また、培養した細胞は位相差顕微鏡と共焦点顕微鏡で観察した。共焦点顕微鏡を用いるときは、細胞核をHoechstで青色、細胞骨格をPhalloidinで緑色に免疫染色し、細胞を観察した。

結果と考察

収縮率測定から、デバイスの収縮率と空気圧は比例していた (Fig. 4)。また、デバイスの最大収縮率は約 17.5% であった。

12 時間培養した細胞について位相差顕微鏡を用いて観察した。観察した結果、空気圧を印加してない細胞と、印加した細胞では形状に違いが確認された。細胞塊 (Fig. 5a) は、ある断面ではスフェロイドの形状に似ている。しかし、空気圧をかけない 3 つの異なる断面での細胞塊の形状は不均一である。したがって、空気圧印加なしの細胞塊はスフェロイドではない。一方、空気圧をかけた細胞塊は、上、中、下のいずれの断面でも球状であった (Fig. 5b)。

また、24 時間培養した細胞は共焦点顕微鏡

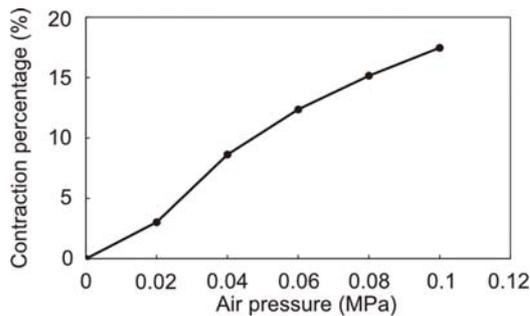


Fig. 4 Contraction percentage driven by air pressure.

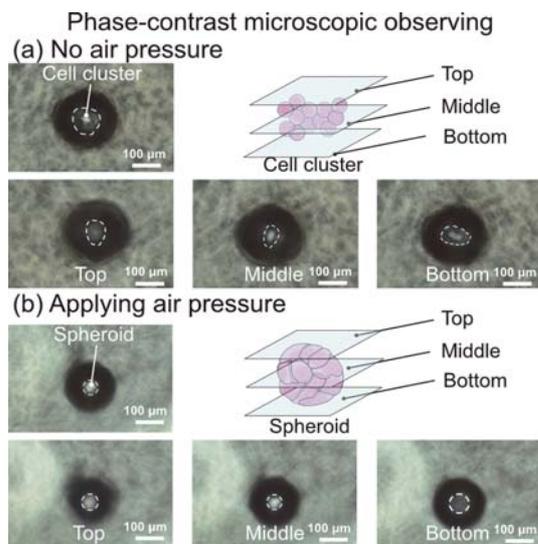


Fig. 5 Comparing cell tissues at different cross sections between with and without air pressure. Cell tissues cultured for 12 hours (a) without and (b) with air pressure.

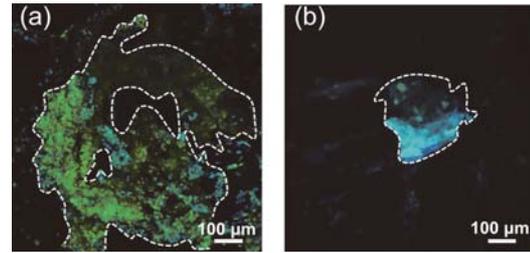


Fig. 6 Stained cell tissues. Cell tissues cultured for 24 hours (a) without and (b) with air pressure.

を用いて観察した。その結果、空気圧印加なしの細胞は、細胞同士が凝集している部分はあるが、ほとんどの細胞はアガロースゲル内の穴に散らばっていた (Fig. 6a)。一方、空気圧印加ありの細胞は約 200 μm の細胞塊を形成していた (Fig. 6b)。これらの結果から、空気圧印加ありでの細胞培養は、空気圧を印加なしの細胞培養に比べて、スフェロイドの形成を促進することを示唆している。したがって、本研究の空気圧を使ったシステムは、細胞組織形成の促進に寄与している。

[参考文献]

- [1] R. Z. Lin, H. Y. Chang, "Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research", *Biotechnol. J.*, vol. 3, no. 9-10, pp. 1172-1184, 2008.
- [2] O. Frey, P. M. Misun, D. A. Fluri, J. G. Hengstler, A. Hierlemann, "Reconfigurable Microfluidic Hanging Drop Network for Multi-Tissue Interaction and Analysis", *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, 4250, 2014.
- [3] A. P. Na Napolitano, D. M. Dean, A. J. Man, J. Youssef, D. N. Ho, A. P. Rago, M. P. Lech, J. R. Morgan, "Scaffold-Free Three-Dimensional Cell Culture Utilizing Micromolded Nonadhesive Hydrogels", *Biotechniques*, vol. 43, No. 4, pp. 494-500, 2007.
- [4] Y. Kurashina, K. Takemura, J. Friend, "Cell Agglomeration in the Wells of a 24-Well Plate Using Acoustic Streaming", *Lab. Chip.*, vol. 17, no. 5, pp. 876-886, 2017.
- [5] M. Nakao, C. Imashiro, T. Kuribara, Y. Kurashina, K. Totani, K. Takemura, "Formation of Large Scaffold-Free 3-D Aggregates in a Cell Culture Dish by Ultrasound Standing Wave Trapping", *Ultrasound. Med. Biol.*, vol. 45, no. 5, pp. 1306-1315, 2019.

[成果の発表, 論文など]

1. ○Ryota Kawamae, Atsushi Takata, Kenjiro Takemura, and Yuta Kurashina, "Forming Spheroid Using Hydrogel Microwell and Pneumatic Soft Actuator," The 37th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2024), Austin, TX, USA, 2024/01/21-25.
 2. ○河前遼太, 高田敦, 竹村研治郎, 倉科佑太, "空
 3. ○河前遼太, 高田敦, 竹村研治郎, 倉科佑太, "ハイドロゲルとソフトアクチュエータを用いた細胞組織形成システム", Dynamics and Design Conference 2023 (D&D2023), 名古屋, 2023/8/28-31.
- 気駆動ソフトアクチュエータによるスフェロイド形成", 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会 (CHEMINAS48), 熊本, 2023/11/6-9.