

2017年7月6日(木)
14:00~14:25

②

単一粒子上での共培養のための コラーゲンヤヌスビーズの作製

慶應義塾大学
理工学部 機械工学科

准教授 尾上 弘晃

■ 新技術の概要

遠心力を駆動源としたマイクロ流体デバイスを用いることにより、複数種類の細胞外マトリックスゲル（コラーゲンゲルやマトリゲル等）を異方的に有する直径100 μm 程度のヤヌスゲルビーズを簡便かつ大量に製作できる技術を提供する。ビーズに細胞を封入することで単一粒子内に異種類の細胞を共培養させることが可能である。

■ 従来技術・競合技術との比較

従来のコラーゲンビーズの作製手法としては、エマルジョン（油中水滴）や微細管より射出されたコラーゲンの液滴をゲル化させる手法が主である。しかし、これらの手法では作成されたコラーゲンゲルビーズは等方的であり、in vivo にみられる異方的な微小環境の再現は困難であった。本発明によりこの課題を解決する。

■ 新技術の特徴

- 均一径かつ異方性を付与したコラーゲンビーズを実現
- 生体内部の環境を再現可能
- 簡便な装置で作成可能

■ 想定される用途

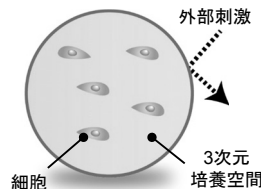
- 個々の幹細胞の分化誘導
- 単一粒子上における異種細胞間の共培養

単一粒子上の共培養のための コラーゲンヤヌスビーズの作製

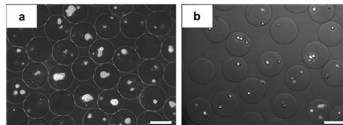
慶應義塾大学 理工学部 機械工学科
准教授 尾上弘晃

ハイドロゲルビーズによる細胞培養

生体外における細胞培養の手段として、ハイドロゲルビーズの利用が注目されている。



例: アガロースゲルビーズ



A. Kumachev, J. Greener, E. Tumarkin, E. Eiser, P. W. Zandstra, E. Kumacheva, *Biomaterials* 2011, 32, 1477.

ハイドロゲルビーズ

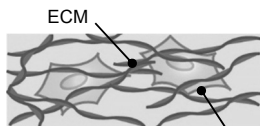
- 高い生体適合性
- 3次元培養空間
- 外界の刺激からの保護

様々なハイドロゲルビーズを用いた細胞培養が報告されている

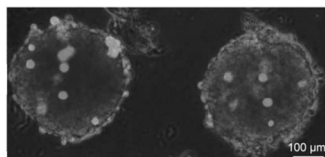
細胞外マトリクス (ECM)

ECM

例: コラーゲン, ラミニンなど



ECMハイドロゲルビーズ

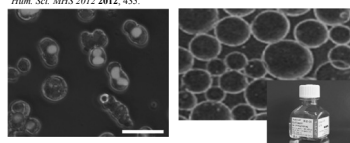


S. Sugaya, M. Yamada, M. Seki, 2012 *Int. Symp. Micro-NanoMechanics Hum. Sci. MBIS* 2012 2012, 435.

- 細胞接着の足場
- 組織の機械的強度の向上
- 分化・細胞挙動への寄与

細胞組織の構築に
必要不可欠

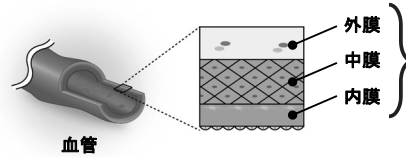
マイクロサイズ, 大量作製, 均質な培養空間



M. Yamada, A. Hori, S. Sugaya, Y. Yajima, R. Utoh, Y. Masayuki, S. Minoru, *Ipredit04.html*より転載 *Lab Chip* 2015, 3941. <http://www.atelocollagen.com/atelocel>

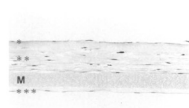
従来課題: 異方的なECM微小環境の再現

生体組織の特徴: 異方的な微小環境



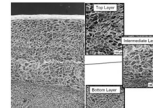
異なる構造が互いに接した組織構築

マクロな組織における生体外異方的環境



角膜組織を模擬

Y. Minami, H. Sugihara, *IOFS* 1993, 34, 2316.



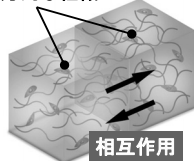
軟骨組織を模擬

T. J. Levingstone, A. Matisko, G. R. Dickson, F. J. O'Brien, J. P. Gleason, *Acta Biomater.* 2014, 10, 1996.

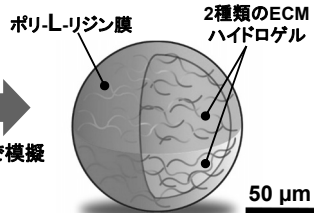
マイクロビーズ内においても異方的な微小環境を構築することが重要

提案: 異方的なマイクロコラーゲンビーズの作製法

生体内における異方的な組織



生体外で模擬



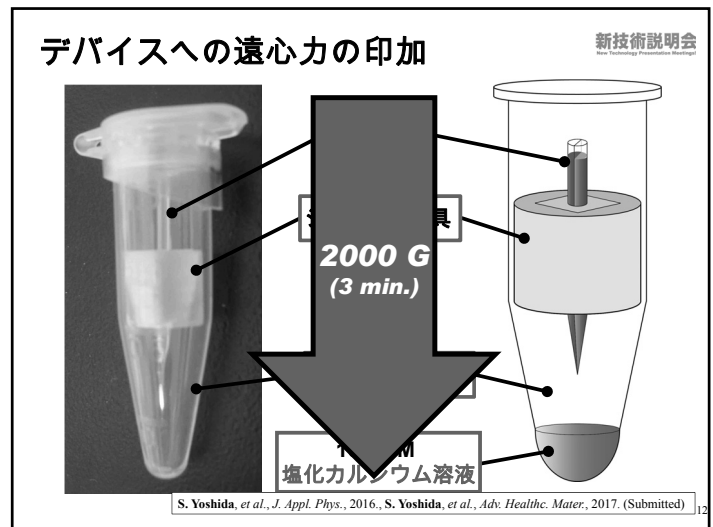
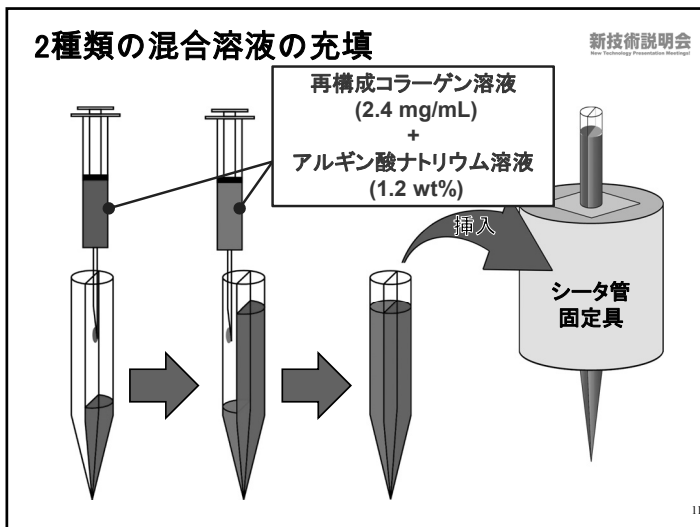
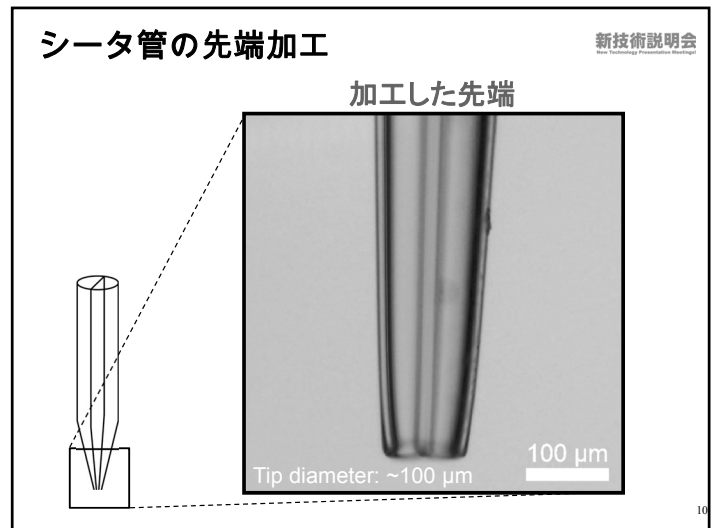
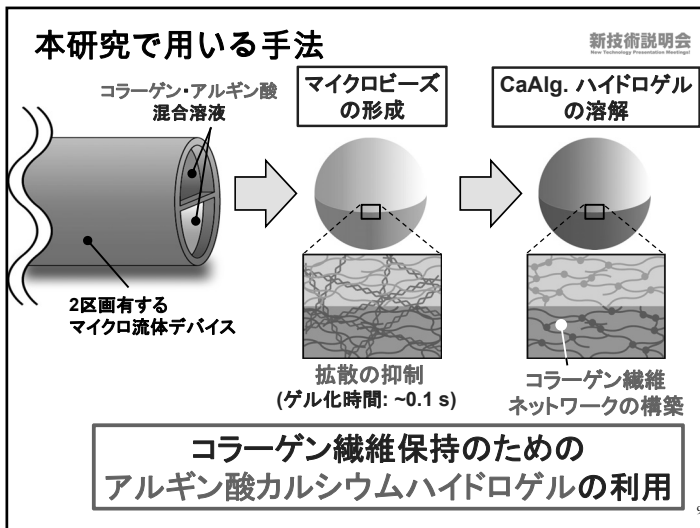
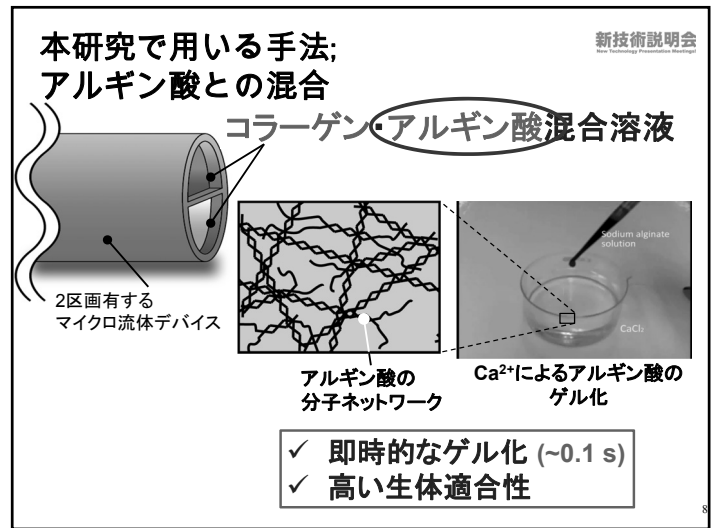
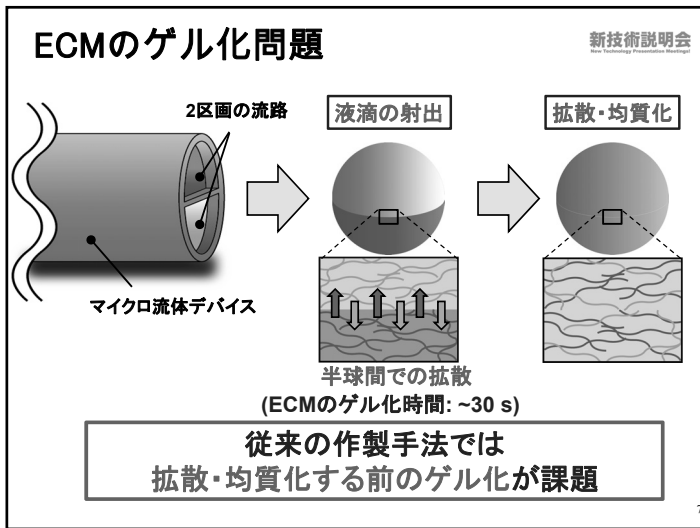
特徴:

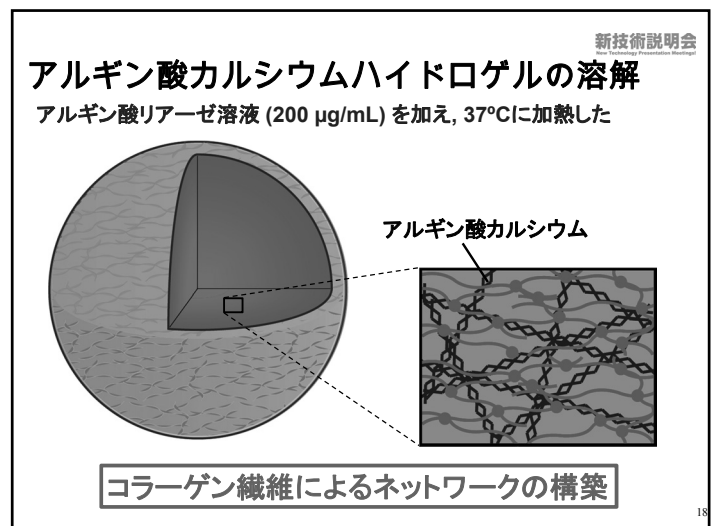
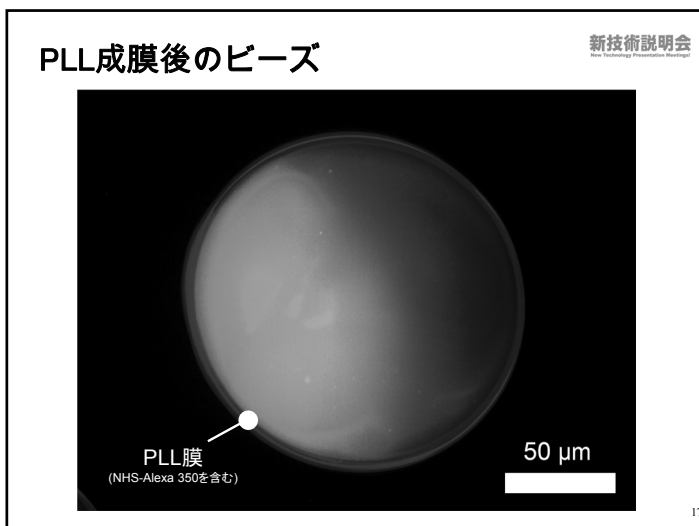
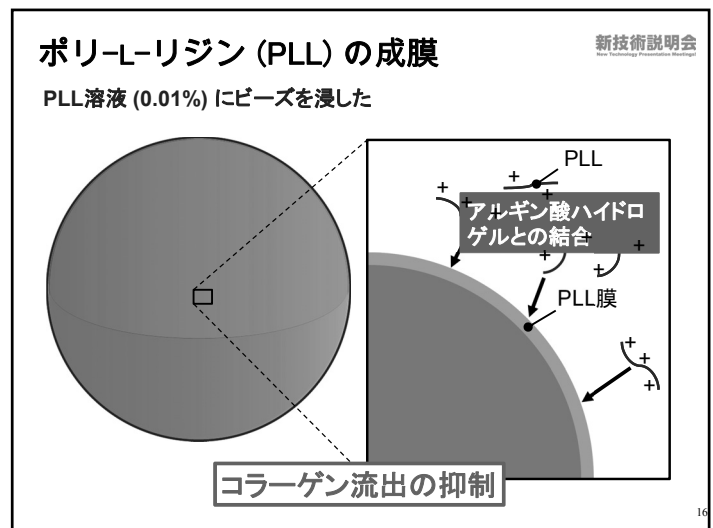
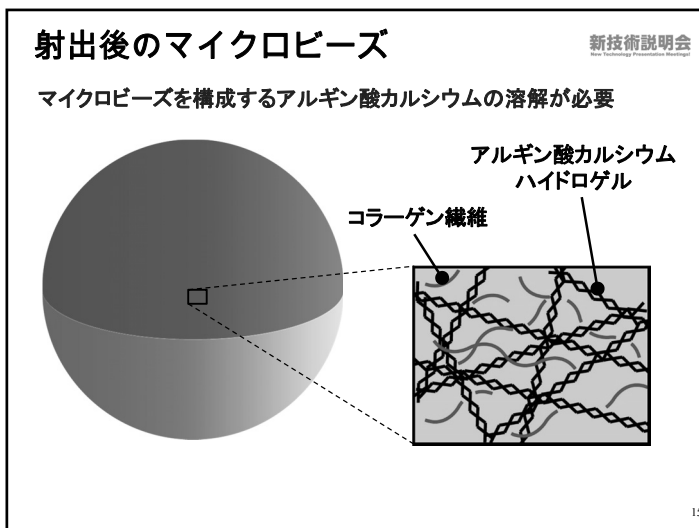
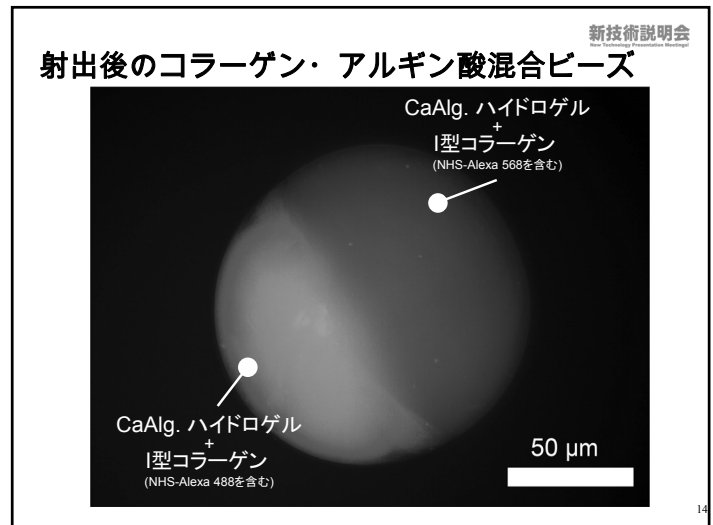
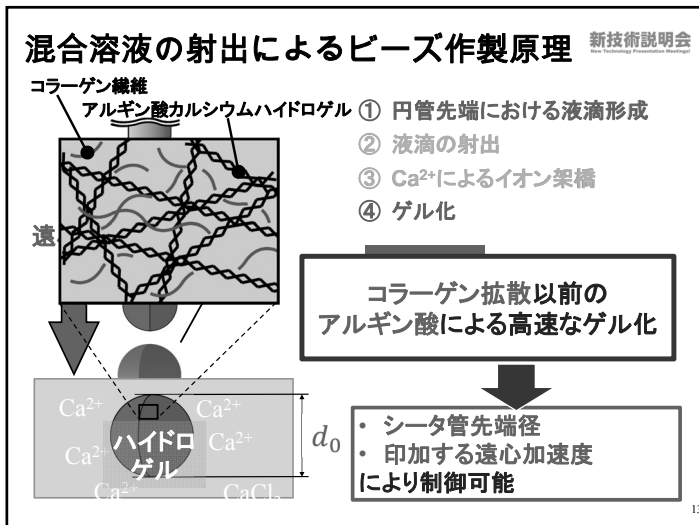
1. スケール: 約100 μm
2. 一度に大量の作製が可能
3. 異方的な微小環境の実現

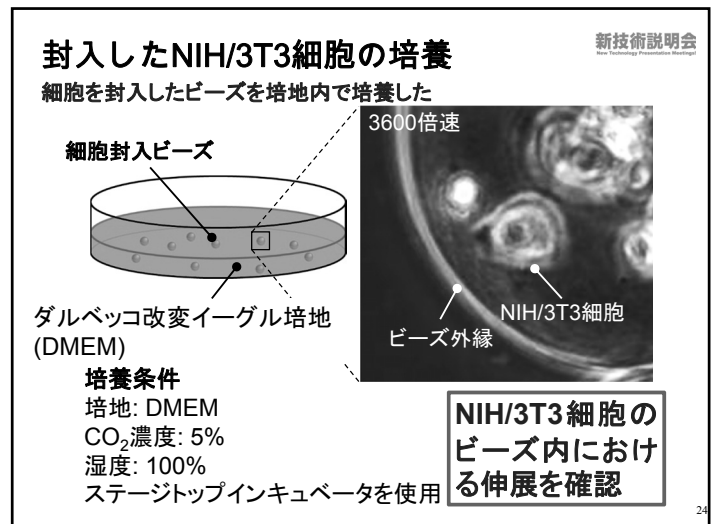
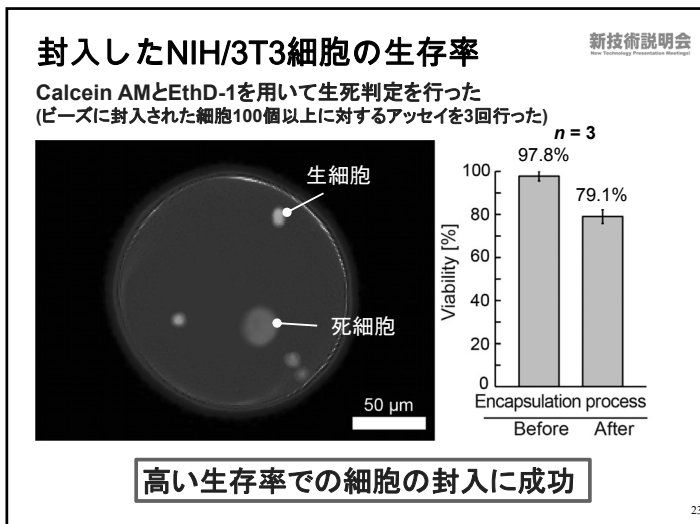
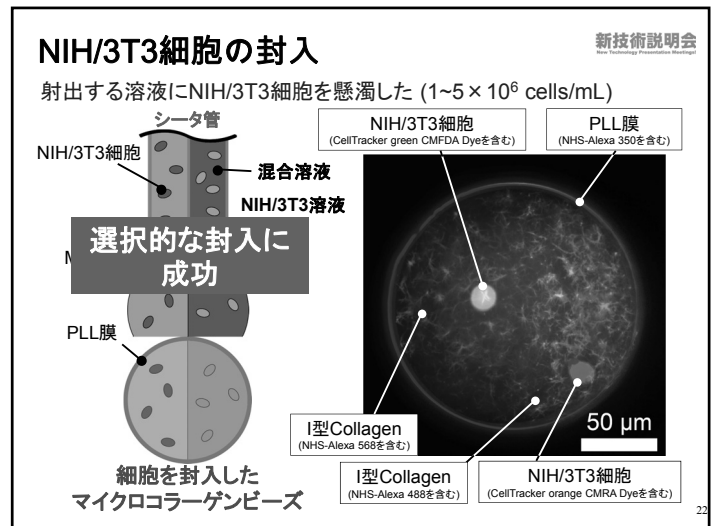
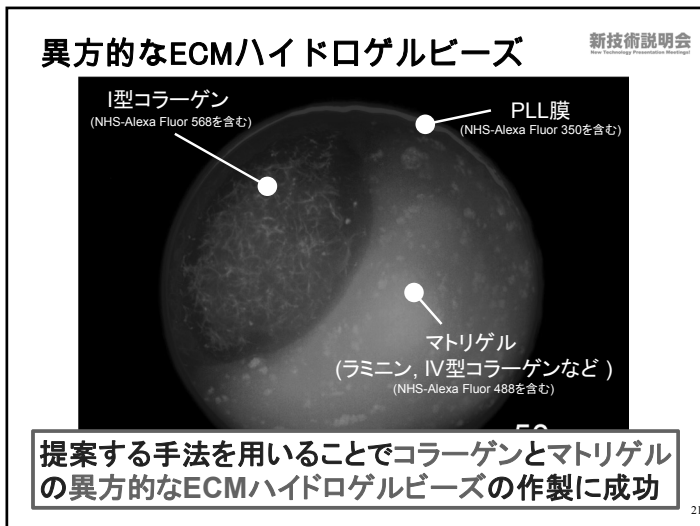
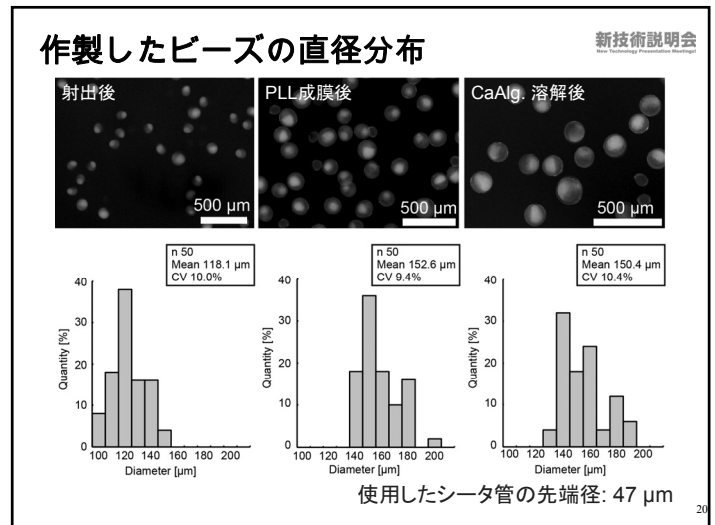
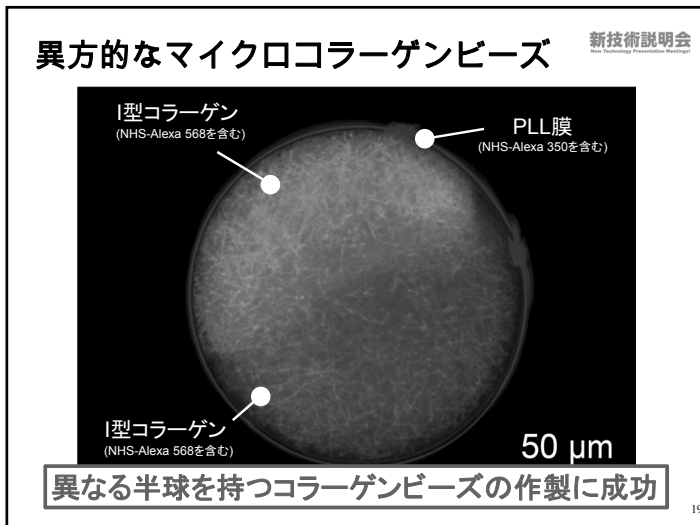
- 生体内環境に近い細胞の3次元培養
- 定量的な細胞挙動の評価

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術(エマルジョン法など)で形成が困難であった、複数種類のECMゲルによりマイクロ粒子(ヤヌス粒子)を形成することに成功した。
- 従来はECMゲル(コラーゲンゲル, ラミニンゲル)は、ゲル化に時間を要する(数十秒~数分)ためヤヌス粒子の形成が難しかったが、高速にゲル化するアルギン酸ゲル(後述)との併用によりそれが可能となった。







新技術説明会

封入したNIH/3T3細胞の培養

細胞を封入したビーズを37°Cに保った培地内で培養した
位相差画像 重ね合わせ画像

Day 4

Day 4

異方的なコラーゲン

ビーズ内において異方的な環境下での3次元培養

25

新技術説明会

異方的なコラーゲンマイクロウェルアレイ

特徴:
•固定された異方的なコラーゲン微小環境
•均一サイズのマイクロウェル

定期的に配列されたマイクロウェル

26

新技術説明会

ウェルアレイの作製手順

コラーゲン繊維保持のためのアルギン酸カルシウムハイドロゲルの利用

27

新技術説明会

異方的なコラーゲンマイクロウェルアレイ

異方的な環境を有するウェルアレイの作製に成功

28

新技術説明会

想定される用途

- 本技術の特徴として、異種類の細胞間や組織間への薬剤による応答を計測する薬剤テストデバイスなどが用途として向いていると考えられる。
- また、異種類の3次元組織の構築技術は今後の再生医療の基盤技術になると期待されるため、研究用途のための培養ツールに展開することも可能と思われる。

29

新技術説明会

実用化に向けた課題

- 現在、異種類のECMゲルのマイクロビーズ化について形成法、および細胞が繊維芽細胞株 (NIH/3T3) 培養可能であるところまで開発済み。しかし、細胞の培養については、他の細胞種に対しての検討はまだ実施していない。
- 実用化に向けて、ビーズの大量生産するような技術を確立する必要あり。

30

企業への期待

- 細胞を用いた薬剤テストの具体的な応用例を見出す点については、関連企業へのヒアリングを通じての解決が必要と考えている。
- 細胞培養に関する技術を持つ企業、薬剤テストの技術を持つ企業、精密加工技術を持つ企業との共同研究を希望。

31

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : マイクロビーズ及びその製造方法
出願番号 : 特願特願2015-210971
- 出願人 : 学校法人慶應義塾
- 発明者 : 尾上弘晃、吉田悟、瀧ノ上正浩

32

産学連携の経歴

- 2010年-2013年 JST ERATOプロジェクト(竹内バイオ融合)において、株式会社柴崎製作所とポンプシステムの共同研究を実施
- 2015年- 大学発ベンチャー、株式会社セルファイバ 取締役就任

33

お問い合わせ先

慶應義塾大学 研究連携推進本部

TEL 03-5427-1439

FAX 03-5418-6455

e-mail toiawasesaki-ipc@adst.keio.ac.jp

34