

多能性幹細胞を分離回収するマイクロチップの開発

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇 小幡勤

(国) 富山大学医学薬学研究部 小池千加 二階堂敏雄 (国) 京都大学 古賀毅

1. 緒言

幹細胞は、様々な細胞へ分化する能力と自己複製する能力を合わせ持つ細胞であり、これを利用した再生医療が新しい医療として期待されている。分化した成熟細胞を未分化状態に戻すことによってできる幹細胞が大きく注目されている一方で、私たちの体の中に既に存在している幹細胞を利用する研究も盛んに行われている。

母体の中で胎児を包んでいる羊膜は、通常分娩後に廃棄されているが、その中にも幹細胞が存在する¹⁾。羊膜由来の幹細胞は、倫理的問題がない、安定供給が可能、ガン化のリスクがない、移植の際の免疫拒絶性が低いなど、幹細胞供給源として優れた特徴を持っているため、羊膜組織から幹細胞を効率よく抽出できれば様々な再生医療への応用が見込まれる。本研究では、この羊膜由来の幹細胞を分離することを目的として、細胞をサイズによって分離する方法と抗体によって捕捉する方法を組み合わせた新しい樹脂マイクロチップの開発を行った。

2. 実験方法

2.1 チップシステムの作製

チップの作製は別報（一般研究「多能性幹細胞の分離を効率化するための前処理チップの開発」）と同様に行った。また、マイクロチップにフタをして送液チューブ等を接続するためのチップホルダを作製した。

2.2 細胞分離実験

培養細胞は食道がん由来細胞株である KYSE510 と羊膜由来細胞を不死化した細胞である iHAE²⁾ および iHAM³⁾ を用いた。培養した細胞をトリプシン処理により回収した後、フルオレセインにより蛍光標識し、送液バッファーに懸濁した。送液バッファーは 0.5% BSA と 2mM EDTA を含んだ PBS を用いた。シリンジポンプにより流速 20 μ L/min で細胞懸濁液を送液し、流路を流れる蛍光標識細胞を青色光で励起し、露光時間を 0.5 秒として撮影することにより細胞の軌跡を観測した。KYSE510 を用いた実験では、マイクロチップの抗体捕捉部に EpCAM に対する抗体を、iHAE、iHAM を用いた実験では、SSEA4 に対する抗体を固定化した。

3. 実験結果および考察

作製したチップの外観を図 1 に示す。このチップはサ

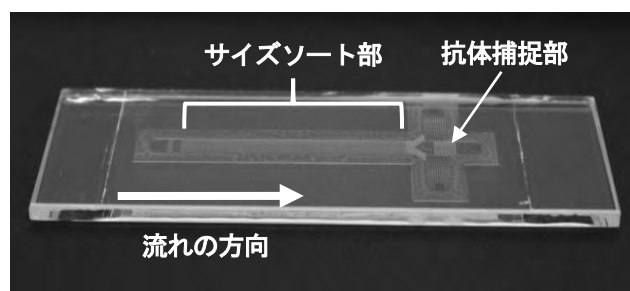


図 1 マイクロチップの外観

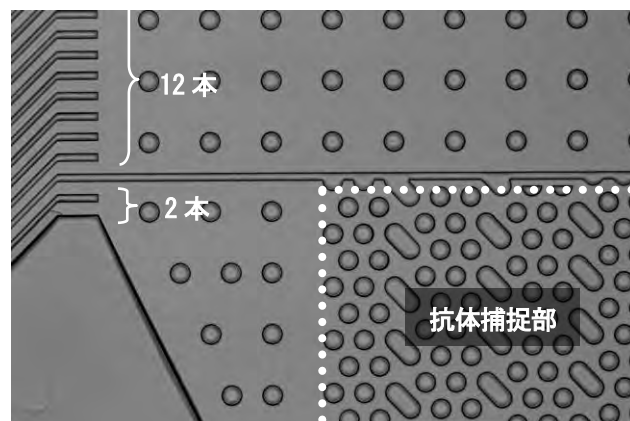


図 2 抗体捕捉部へ流入する部分の構造

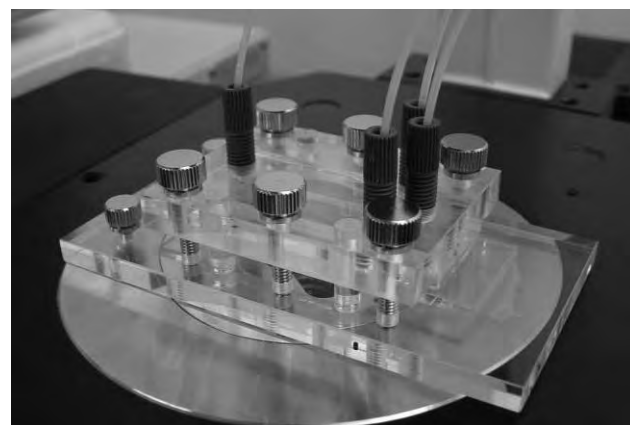


図 3 チップホルダ

イズによってソートする部分の後に、抗体によって捕捉する部分を設けてある。サイズソート部の構造については、別報（一般研究「多能性幹細胞の分離を効率化するための前処理チップの開発」）の構造と同様である。（中心線に対して左右対称に二つのサイズソート部を設けてある。）サイズソート部の後で、抗体捕捉部へと流入する部分の構造を図 2 に示す。サイズソート部の終わりで、流路は 14 本に仕切られ、その内 2 本が抗体捕捉部へ流入し、残り 12 本は排出される構造になっている。また、作製したチップホルダの外観を図 3 に示す。

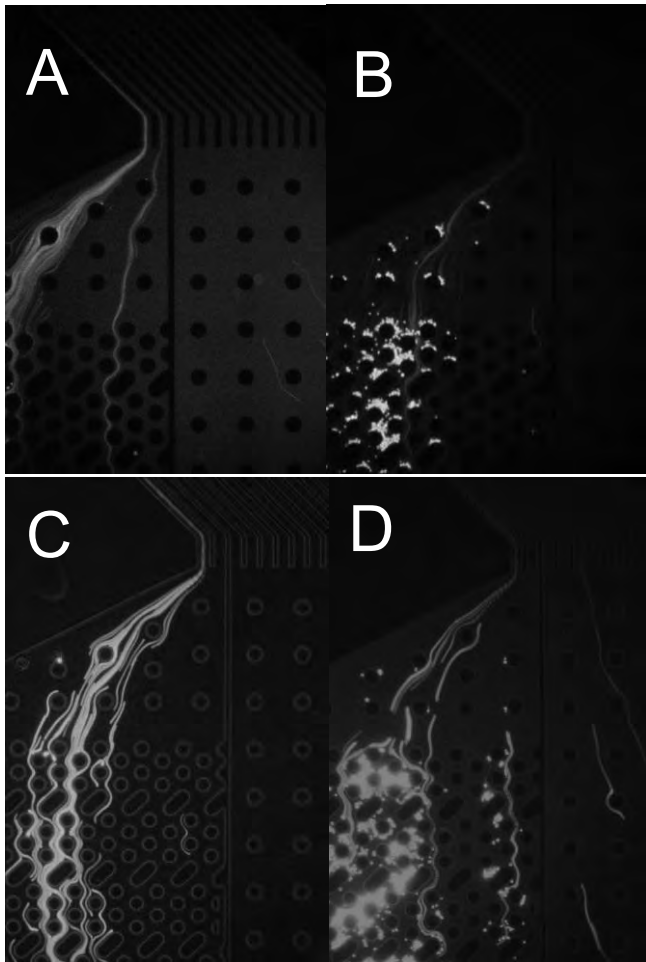


図4 抗体捕捉部へ流入する部分での細胞の軌跡
Aは抗体固定化なしでKYSE510を、BはEpCAM抗体固定化でKYSE510を、CはSSEA4抗体固定化でiHAEを、DはSSEA4抗体固定化でiHAMを流した結果

次に細胞分離実験において、細胞が抗体捕捉部へ流入する部分での細胞の軌跡を図4（図2から90度回転）に示す。ほとんどの細胞が2本の流路から細胞捕捉部へと入っていることがわかる。これは、サイズソート部によって細胞を濃縮して抗体捕捉部へ導入していることを意

味している。これによって抗体による捕捉効率に影響する流速を抑えたまま、全体の処理速度を上げることが可能となる。図4Aは抗体を固定化していないチップにKYSE510を、図4BはEpCAM抗体を固定化したチップにKYSE510を流した結果である。抗体を固定化していない場合は、細胞は留まらず流れているのに対し、抗体を固定化した場合は、細胞が留まっている。これらのことから、このチップによって細胞をサイズによってソートした後に、抗体によって捕捉できることを示した。ただ、抗体捕捉部が小さい等の理由から未だ捕捉率は十分ではなく、今後改良が必要である。図4C、図4DはSSEA4抗体を固定化したチップにiHAE、iHAMをそれぞれ流した結果である。SSEA4を発現していないiHAEはチップに留まらず流れているのに対し、SSEA4を発現しているiHAMはチップに留まっている細胞があることがわかる。このことから羊膜由来の細胞についてもこのチップによって捕捉できる可能性を示すことができた。ただ、iHAMに関しては、非特異的な吸着が多い傾向があったため、目的の細胞を抗体によって捕捉できているかどうかについては、さらなる検討が必要である。

4. 結言

サイズによるソートと抗体による捕捉を組み合わせたマイクロチップを作製し、培養細胞を用いた分離・捕捉実験を行うことができた。これにより今後は羊膜細胞等のさまざまな細胞へこの樹脂マイクロチップを応用していくことができるようになった。

参考文献

- 1) Toda A. *et al.* J. Pharmacol Sci. **105**, 215-228 (2007)
- 2) Zhou K. *et al.* Cell Reprogram. **15**, 55-67 (2013)
- 3) Teng Z. *et al.* Cell Transplant. **22**, 267-278 (2013)

キーワード：マイクロ流体デバイス、紫外線硬化樹脂、細胞分離、幹細胞

Development of Polymeric Microfluidic Devices for Stem Cell Separation

Koji TAKATA, Takashi OHNAGA, Tsutomu OBATA

Chika KOIKE, Toshio NIKAIDO (University of Toyama)

Tsuyoshi KOGA (Kyoto University)

Microfluidic devices which could be used for size-based and immuno-affinity-based cell separation and recovery were developed using new UV curable resin. We carried out separation tests using cancer cell line and immortalized human amniotic cells and showed that these cells were successfully captured by our microfluidic chips. In comparison with conventional silicon chips, the use of this polymeric chip can drastically reduce the cost of such separation system. Moreover, this chip can reduce the processing time in comparison with the chip in which immuno-affinity is only utilized.