

## 2021年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

「iPS細胞の分化誘導における高品質・安定化に向けた微小環境制御デバイスの開発」

[ 国立大学法人 香川大学 ・ 准教授 ] [ 寺尾 京平 ]

### 1. はじめに

再生医療において、iPS細胞から分化誘導した細胞の利用が期待される一方で、分化誘導すると1細胞レベルでヘテロな細胞群が生じ、腫瘍化の危険性が伴う。薬剤だけでは分化方向性を正確にコントロールできず、その不均一性の原因は未解明という課題がある。結果的に分化の方向性は予測できず経験と偶然に頼らざるを得ない。高品質で安定な iPS 細胞分化誘導を実現するためには、薬剤因子に加えて、環境因子が分化方向性に与える影響を評価する手法が求められている。

本課題をクリアするため、薬剤処理と合わせて様々な環境因子が制御された分化誘導環境を人為的に作り出すデバイスを実現することを目標に研究を実施した。具体的には、環境因子として、細胞数、周囲空間容積、誘導薬剤刺激面積を調節することのできるデバイスを開発し、それらの因子が分化に与える影響を計測できるようにする。

これまでに我々は、細胞配置や局所的に制御された薬剤刺激といったマイクロ加工の利点を生かした様々な細胞培養・計測デバイスを開発してきた。それらの成果を基盤として、iPS細胞の実用化の障害となっている分化誘導の非制御性に対して環境因子を調節することにより解決を試みる。ここで示した環境因子をカバーする同様のアプローチは報告されておらず、それらを実現するためのデバイスも当然実用化されていない。

### 2. 概要

iPS細胞の実用化研究の課題となっている分化誘導の制御について、微小な溶液環境を制御することのできるマイクロウェルアレイデバイスを開発することにより、既存技術と比較し、高品質で安定的な分化誘導を実現し、再生医療における iPS 細胞実用化の促進を目指す。

マイクロウェルアレイデバイスの製造について、まず成形法を検討し、商品化に向けた検討を実施した。マイクロウェルデバイスについて、直径 8  $\mu\text{m}$  と 100  $\mu\text{m}$  の貫通孔を有した2種類の試作デバイスの作製に成功し、iPS細胞胚様体の培養および基本的機能である溶液環境の分離能を実証した。また、量産に適した設計および加工プロセスについて検討を開始し、課題の抽出を行った。

今後は、試作デバイスを用い、操作性・培養特性・分化誘導特性に関して既存のデバイスとの比較実験を進めることで有用性の検証を行うとともに、量産に向けた加工法の確立を行う。

### 3. 研究成果および今後の課題

パラメータを調節した微小環境を生成可能なデバイスとして新たな細胞培養容器の実現に取り組んだ。培養容器に必要な機能は、(A)分化誘導に用いられる胚様体と呼ばれる iPS 細胞の凝集体を安定に形成できること、(B)得られた胚様体に対して、薬剤を与え、分化誘導を行えること、(C)分化誘導で得られた細胞群をロスなく回収できること、である。これらの基本機能に加えて、(A)培養については、胚様体サイズ(細胞数)を調節できる、(B)分化誘導では、誘導薬剤刺激面積を調節できる、(C)操作性については、一般的に利用される細胞培養容器(ウェルプレート)にアドオンで設置できる、これらの機能を付加することで目的とする細胞培養用容器を実現する。

本研究では、既存のデバイスでは達成されていない(A)~(C)の機能を満たすべく、アレイ状に配置された凹形状のマイクロウェル底面に貫通孔を有したデバイスを設計し、貫通孔を挟んだ上層・下層で溶液環境を分離できるデバイスの作製を行った(図1)。iPS細胞はマイクロウェル内で胚様体を形成し、下層に導入した分化誘導薬剤により貫通孔を介して局所的に刺激を受ける。この微小環境によって生じる肺様体内の細胞間相互作用による分化の変化を評価する。本デバイスは研究用途を想定しており、細胞

培養容器として商品化することを狙っている。期間内に、その準備段階として、培養容器商品化に向けたデバイスの設計および製作法の検討を行い、実用上重要なターゲットである iPS 細胞から内胚葉細胞への分化誘導をターゲットとしてデバイスの有用性評価を行うことを計画した。

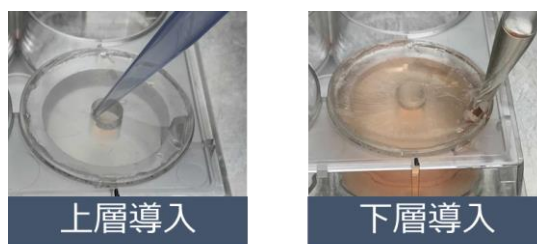


図1. マイクロウェルアレイデバイスへの溶液導入

貫通孔を有したマイクロウェルアレイデバイスの製造については、まず成形法を検討し、商品化に向けた検討を実施した。マイクロウェルアレイデバイスについて、直径  $8\ \mu\text{m}$  と  $100\ \mu\text{m}$  の貫通孔を有した2種類の試作デバイスの作製に成功し、iPS 細胞胚様体の培養および基本的機能である溶液環境の分離能を実証した。

デバイスは、3次元的な微細加工が施された金型を使用し、シリコーン樹脂 polymethyl siloxane (PDMS)をモールドイングすることで作製した。当初、ドライエッチングを利用した複雑な工程となっていたことが課題であった。そこで、量産に適した設計および加工プロセスについて検討を行い、ドライエッチング不要な、単純な樹脂注型プロセスで作製ができるよう改善を行った。直径  $100\ \mu\text{m}$  の貫通孔のデバイスについては安定に作製できることが確かめられた。より微細な  $10\ \mu\text{m}$  以下の貫通孔のデバイスについては今後取り組む計画である。

培養容器として機能するか確かめるため、成形したPDMSデバイスに iPS 細胞を播種し、培養を行ったところ、すべてのウェルで胚様体が形成され、安定した細胞増殖が見られた(図2)。また、デバイス外で形成した胚様体についても本デバイスのウェルに容易に移せることが確かめられた。本デバイスは上層と下層で溶液環境を分離できることが特徴的な基本機能であり、本機能について、蛍光色素を用いたリーク実験により数日以上、安定に溶液環境を分離できることを実証した。

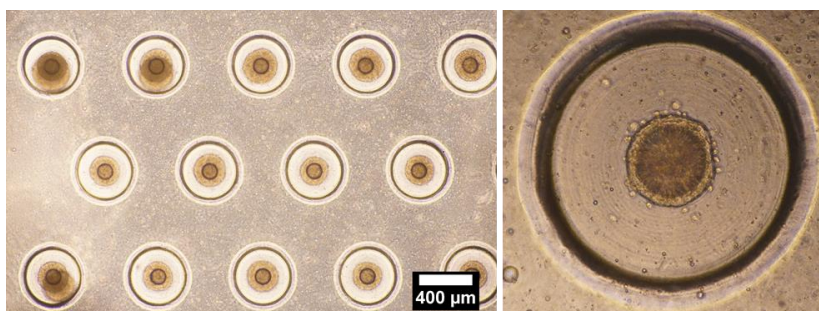


図2. ウェルに形成された iPS 細胞胚様体

ウェル径・深さ、貫通孔径、溶液操作に適した容器形状について、検討を行い、胚様体サイズ、胚様体回収率を指標として評価を行った。特に胚様体回収率については、従来法で7割程度のところを9割以上に向上させることに成功し、また操作性も向上することが示された。貫通孔を有していることで、胚様体がある場所で捕捉され、流出が防止できたことが要因である。したがって、貴重な細胞サンプルをロスなく分化誘導し、回収することが可能になると期待される。分化誘導実験については、期間内に実施できなかったが、今後、分化誘導効率について、従来法との比較検証を行い、本手法の優位性を実証する計画である。最終的に、高品質で安定な分化誘導が可能な形状と溶液操作法を決定することを目指す。

#### 4. おわりに

微小な溶液環境を制御することのできる貫通孔を有したマイクロウェルデバイスを開発することにより、既存技術と比較し、高品質で安定的な胚様体の形成と分化誘導を実現し、再生医療における iPS 細胞実用化の課題を解決することを目指し手研究に取り組んだ。

マイクロウェルアレイデバイスの製造について、まず成形法を検討し、商品化に向けた検討を実施した。マイクロウェルデバイスについて、2種類の試作デバイスの作製に成功し、iPS 細胞胚様体の培養および基本的機能である溶液環境の分離能を実証した。また、量産に適した設計および加工プロセスについて検討を開始し、課題の抽出を行った。したがって、開発の目標はほぼ達成できたと考えられるが、分化誘導に関する詳細な評価については実施できていないため、商品化に当たっては、本データの取得が必要と考えられる。

#### 5. 本研究の今後の計画

今後、試作デバイスを用い、操作性・培養特性・分化誘導特性に関して既存のデバイスとの比較実験を進めることで有用性の検証を行うとともに、量産に向けた加工法の確立を行う。特に、分化誘導後の細胞の評価を進め、試作デバイスにおける分化誘導特性を明らかにしたい。

また、商品化に向けた取り組みについては、製造工程を確立することが優先課題と考えており、マイクロウェルアレイデバイスについて、量産に適した設計および加工プロセスについてこれまでの検討で得られた知見を基に、より微細な貫通孔の形成に取り組む計画である。

#### 6. その他

(1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

なし

(2) 投稿論文(タイトル・学会名等)

「iPS 細胞の局所刺激を目指したマイクロデバイスの開発」、楠直人、小長谷周平、西田光徳、佐藤成弘、高尾英邦、下川房男、寺尾京平、電気学会第 38 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2021.11

「iPS 細胞胚様体の局所刺激を目指したマイクロデバイスの開発」、楠直人、小長谷周平、西田光徳、佐藤成弘、高尾英邦、下川房男、寺尾京平、投稿中

(3) 本研究会の参加企業・団体名

タツモ株式会社



競輪の補助事業

この報告書は、競輪の補助により作成しました。

<https://jka-cycle.jp>