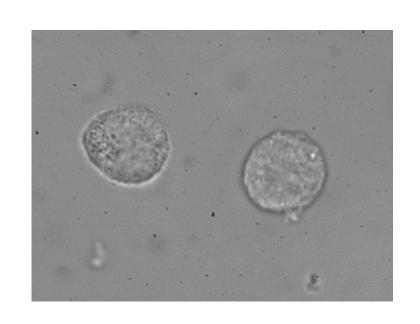
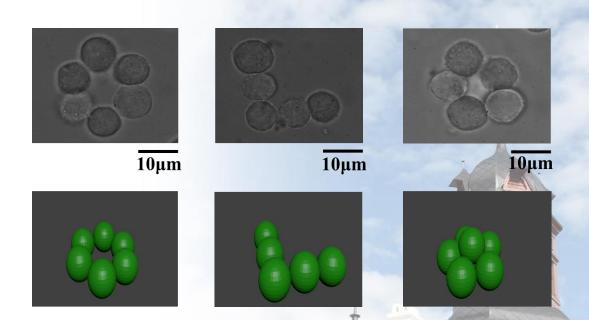
# 近赤外レーザーを活用した細胞3D組織化: ミニ臓器構築に向けての新手法





同志社大学生命医科学部 **貞包浩一朗**,山崎健広,岸本幹史,辻翔都,剣持貴弘,吉川研一



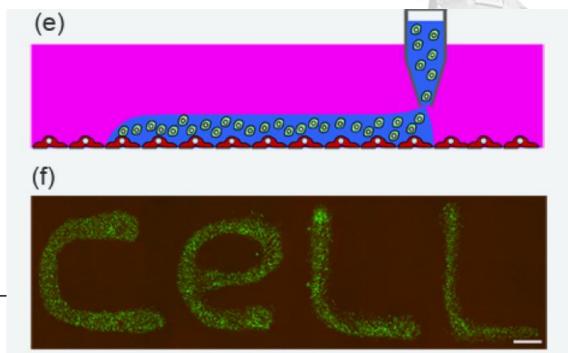
アカデミックフォーラム 2018年6月29日(金)於:東京ビッグサイト

- □ 背景と目的:3次元細胞組織体を構築したい!
  - 光ピンセットの「捕捉力」と高分子の「枯渇相互作用」を 活用した新規な手法を提案
  - A. Yoshida, S. Tsuji, H. Taniguchi, T. Kenmotsu, K. Sadakane, K. Yoshikawa, *Polymers*, 9, 319 (2017)
  - S. Hashimoto, A. Yoshida, T. Ohta, H. Taniguchi, K. Sadakane, K. Yoshikawa, *Chem. Phys. Lett*, **655**, 11 (2016)
- □ 細胞間相互作用、光ピンセット、高分子枯渇相互作用について
- □実験の詳細
- ロまとめ
- □ 今後の展開:共同開発のためのシーズ

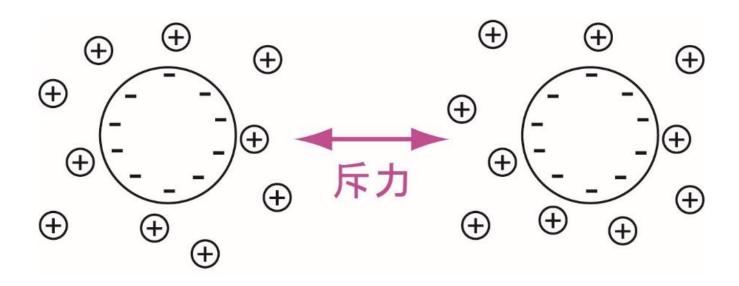
- ➤ iPS細胞やES細胞などの万能細胞を、実際に、再生医療などの分野で活用させたい
- ▶ そのためには、分化した細胞を3次元的に配列させて、機能的な細胞 組織体を人工的に構築するための技術が不可欠
- ▶ 従来の細胞組織体構築のための足場は、ゲルなどの人工物

▶ 人工の足場を用いずに、生体にやさしい環境で、3次元細胞組織体を

作成したい



### 細胞間相互作用

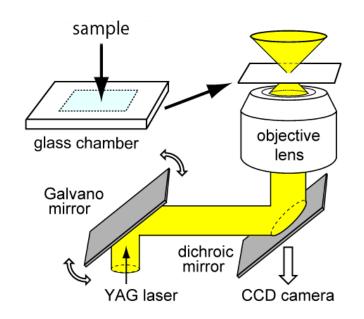


#### 溶液中で細胞同士が近づくと斥力が働く

- > 表面電荷由来の長距離斥力
- ▶ 膜の波打ち運動に由来する長距離斥力
- > 水和斥力
- Glycocalyx repulsion

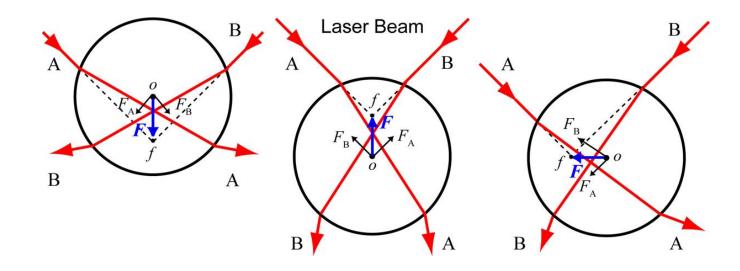
「分子間力と表面力」J.N. イスラエルアチヴィリ、朝倉書店 (2013)

# 光ピンセット





NanoTracker2 (JPK Instruments)



- ▶ 光子の屈折に伴う作用反作用 → トラップカ
- ➤ レーザーの波長: 1064nm (細胞にダメージを与えない)
- > レーザーの強度: 最大1500mW

#### サンプルの一例

> 細胞:

マウスの乳腺上皮細胞(NMuMG cells)、

Jurkat Cell (提供元: RIKEN BRC)

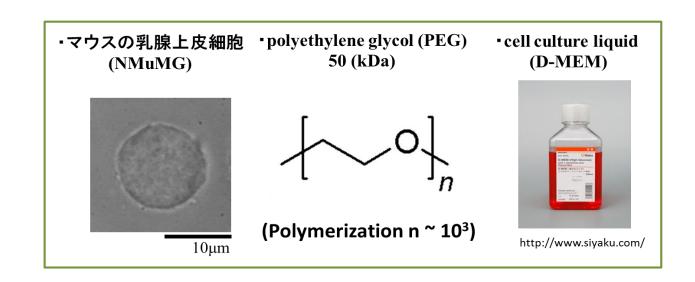
> 培地:

D-MEM(細胞用液体培地、含ハイグルコース、10% FBS,

1% ペニシリン- ストレプトマイシン) (和光純薬)

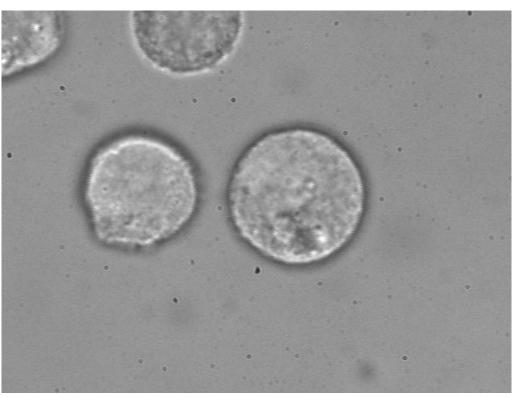
▶ 高分子:

PEG (分子量 5×104 g/mol)、デキストラン、アルブミン (和光純薬)



# 細胞接着実験

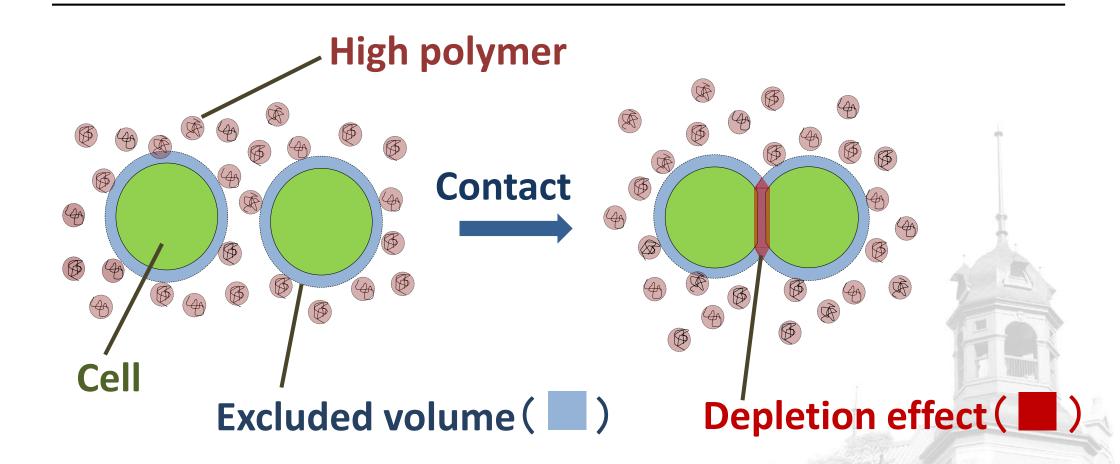




高分子無し

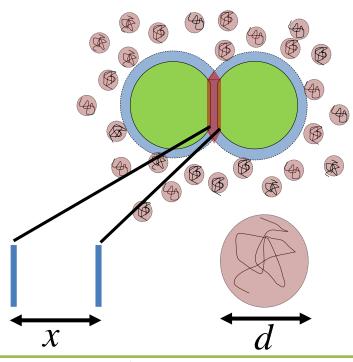
PEG 40mg/mL

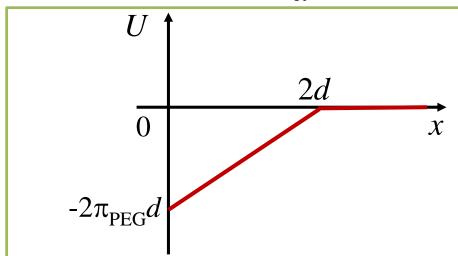
### 高分子による枯渇相互作用



**☑** The reduction of excluded volume lead to the entropic depletion force.

# 枯渇相互作用と膜間斥力





Stabilization energy as a function of x

Osmotic pressure due to the crowding PEG

Stabilization energy due to the depletion effect

$$U = -\pi_{PEG} (2d - x) \qquad x \le 2d$$

$$U = 0 \qquad x > 2d$$

Attractive force due to the depletion effect

$$P_{dep} \approx -\frac{\partial U}{\partial x} = -\pi_{PEG} \qquad x \le 2d$$

$$P_{dep} \approx 0 \qquad x > 2d$$

Positive pressure considering electrostatic interactions together with possible steric effect

$$P_{rep} = P_{rep}^{0} \exp\left(-\frac{x}{L}\right)$$

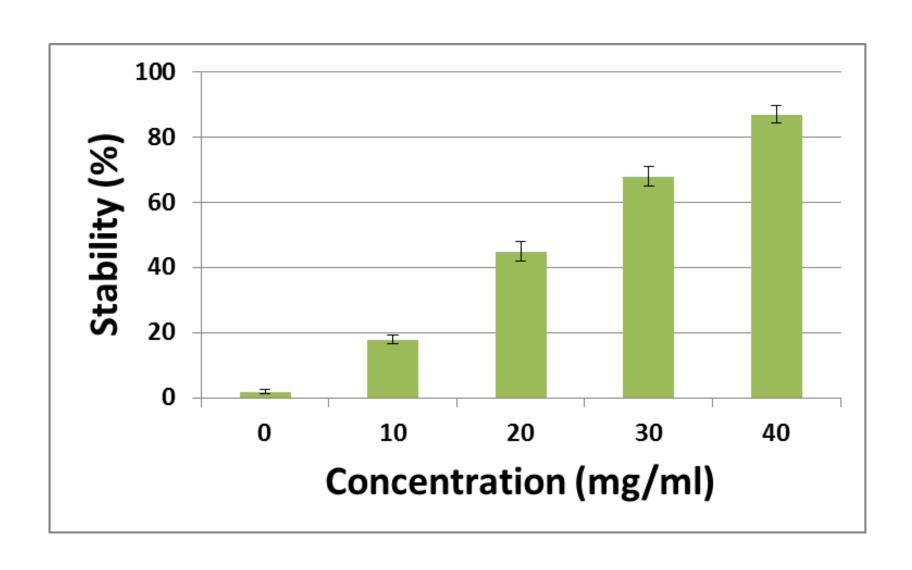
Sum of the depletion and repulsive interactions

$$P_{net} = P_{dep} + P_{rep}$$

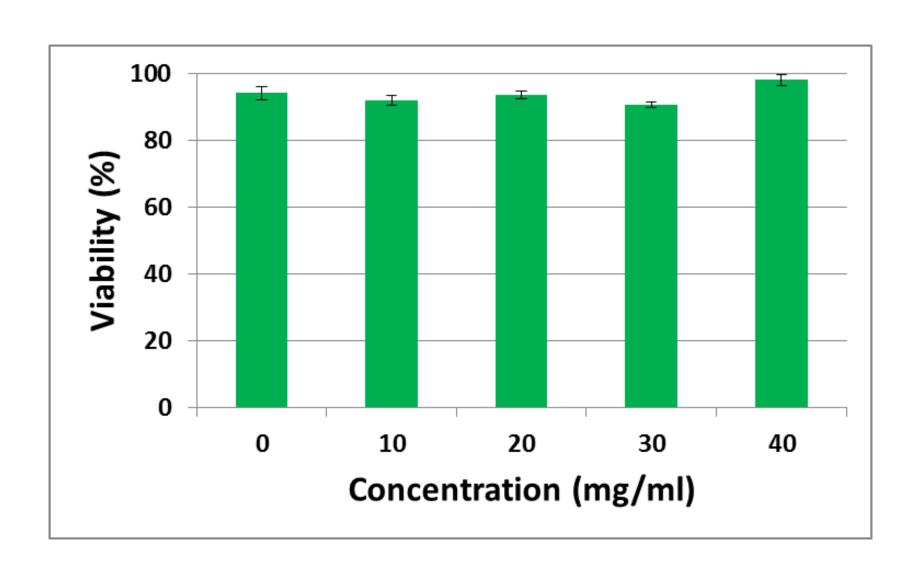
S. Hashimoto et al., Chemical Physics Letters, 655 - 656, 11–16 (2016)

P.C. Hiemenz, et al, Principles of Colloid and Surface Chemistry, Marcel Dekker, Inc, New York, 1997.

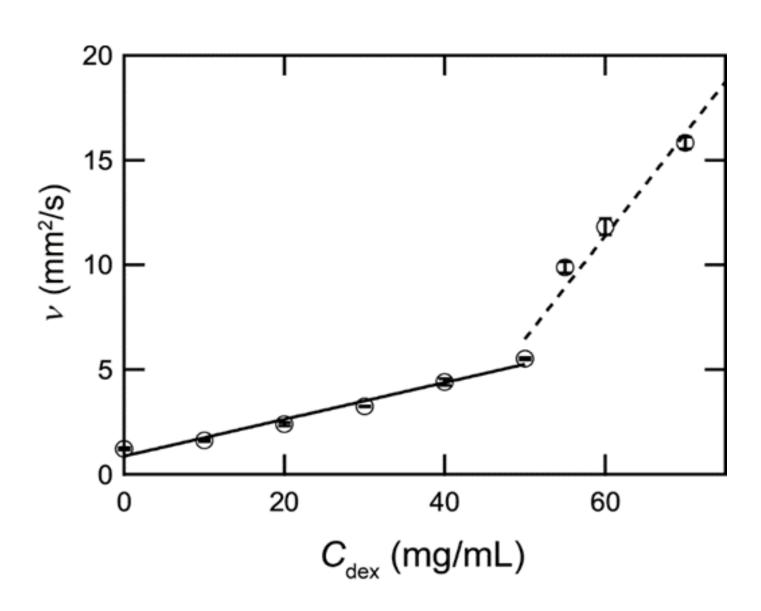
### 細胞接着の効果: 高分子濃度依存性

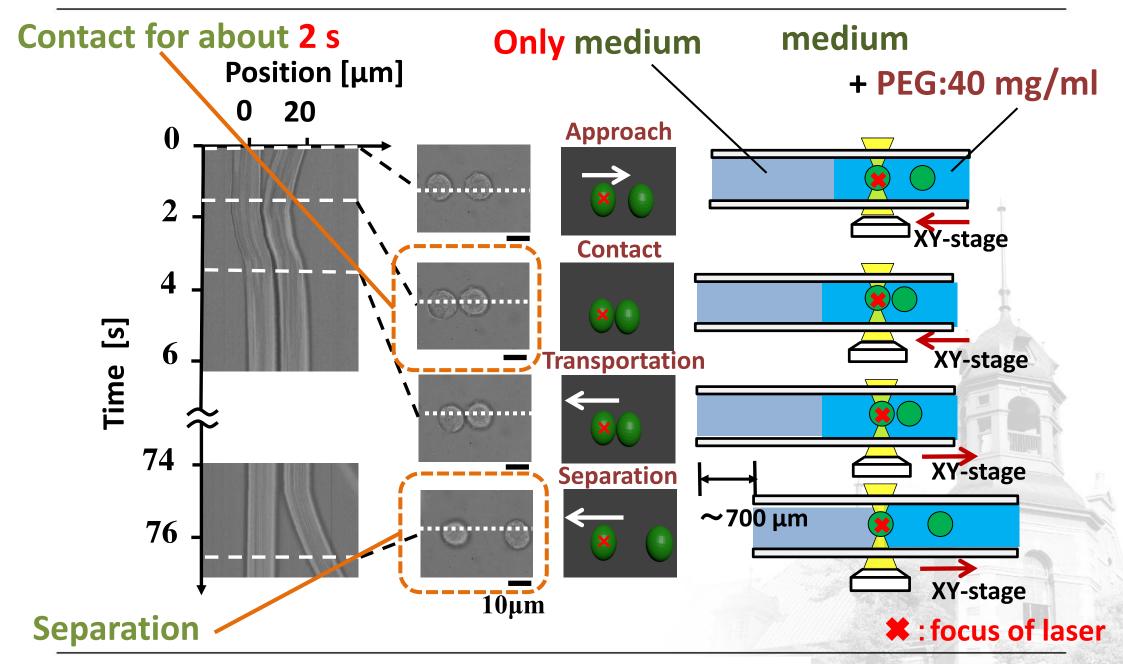


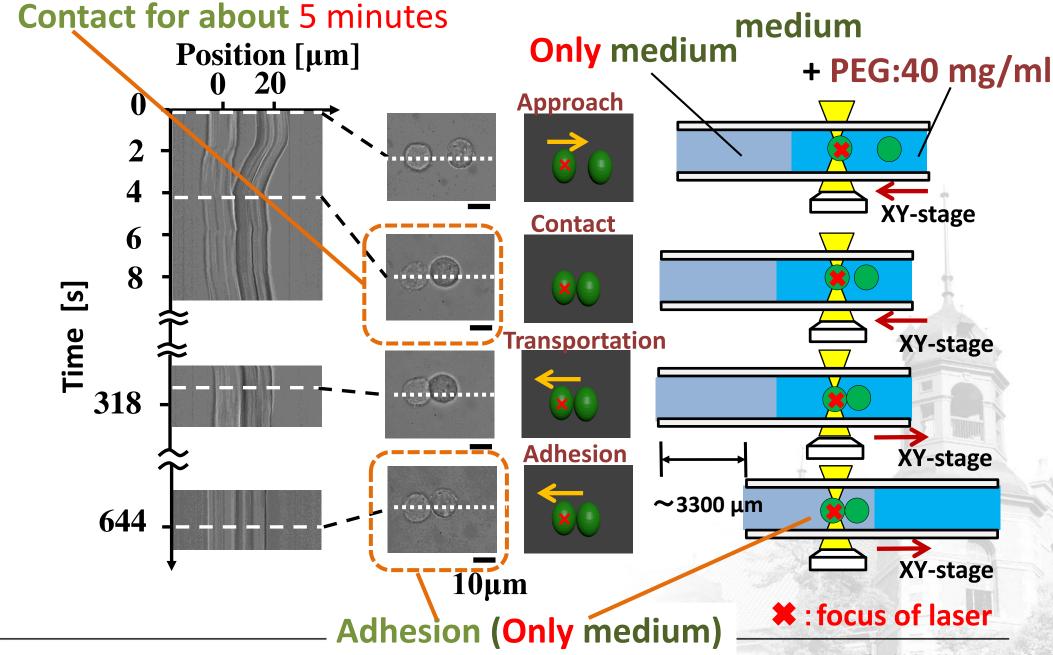
# 細胞の生存率



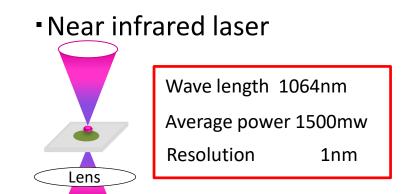
# 溶液の粘度の変化

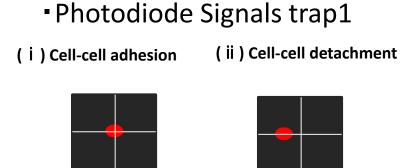


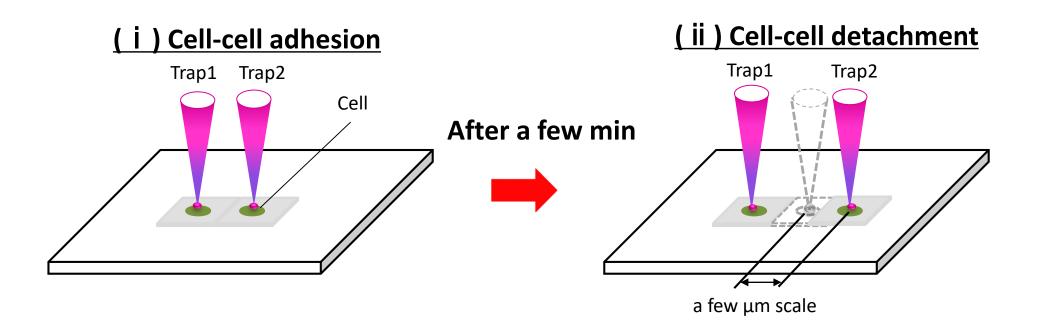




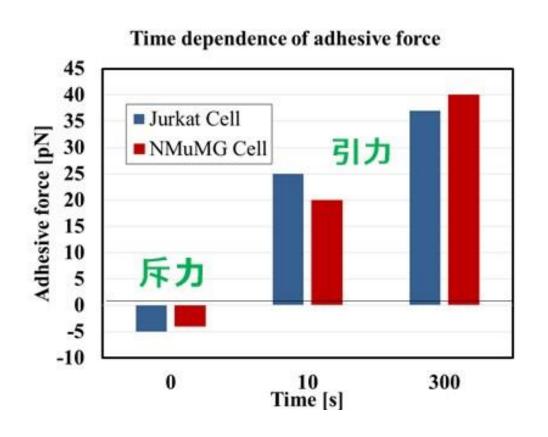
# フォトダイオードを用いた細胞間相互作用の測定



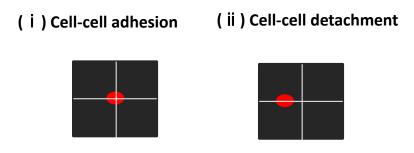




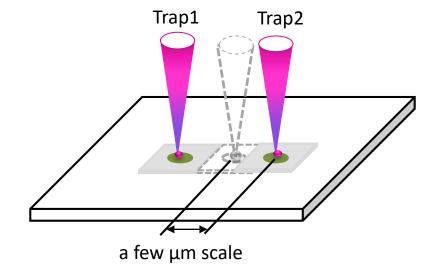
### フォトダイオードを用いた細胞間相互作用の測定

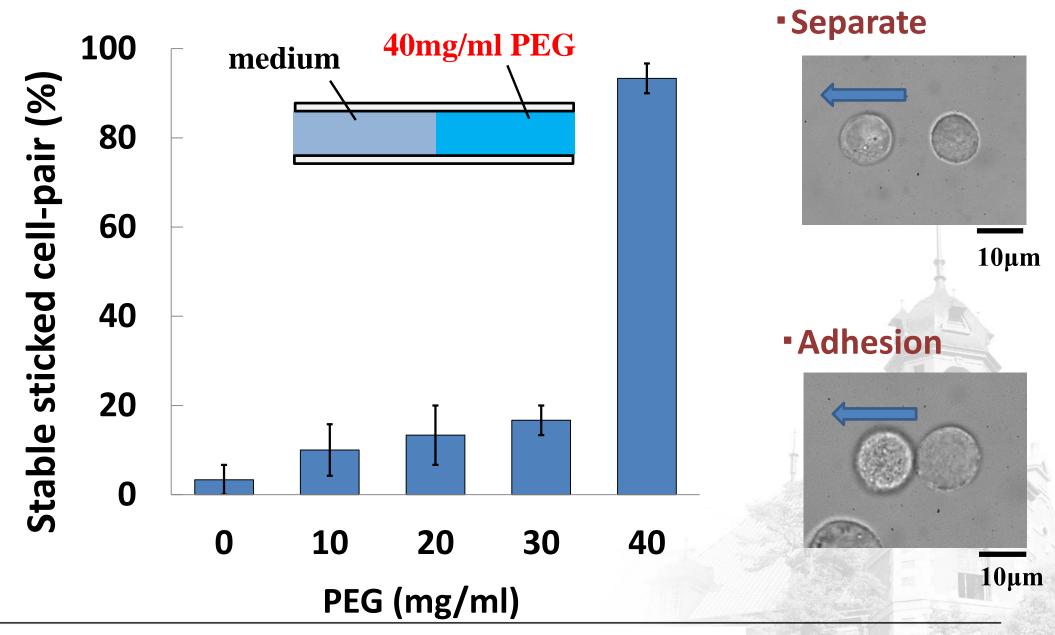


#### Photodiode Signals trap1

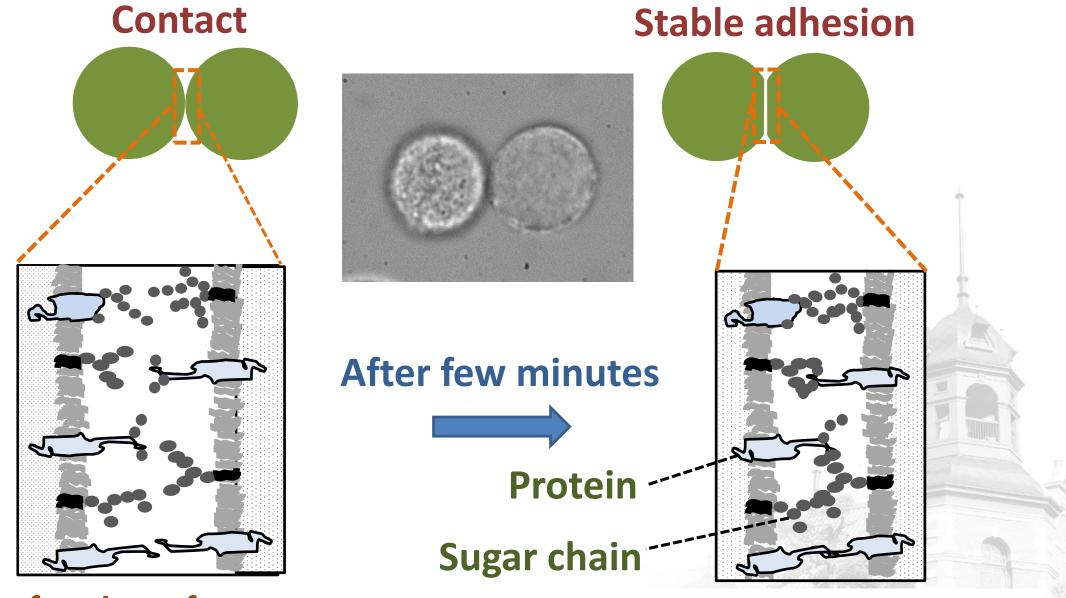


#### (ii) Cell-cell detachment





#### Formation of stable cellular adhesion

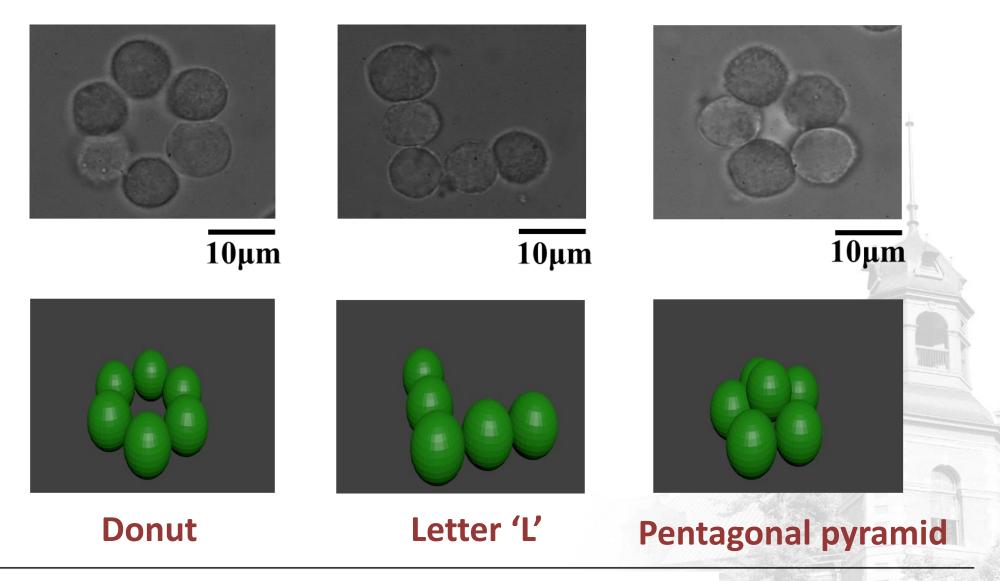


**Surface just after contact** 

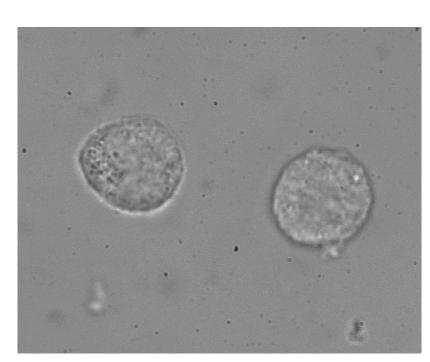
**Surface after establishing** 

S. Hashimoto et al., Chemical Physics Letters, 655 - 656, : stable adhesion

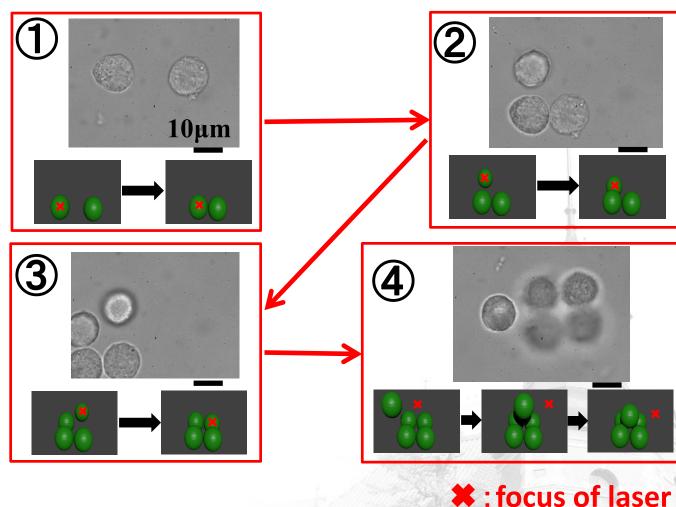
# Formation of various morphologies with multiple cells (PEG: 40 mg/ml)



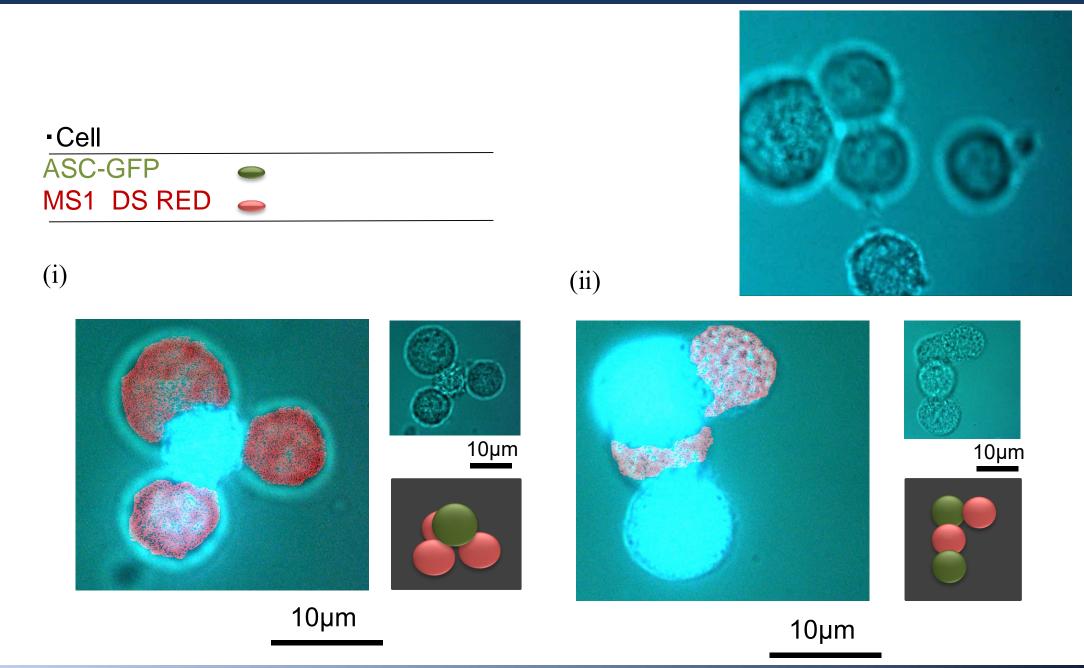
#### Stable 3-D cellular assembly of pentagonal pyramid



Formation of 3-D cellular assembly in real time



(PEG: 40 mg/ml)





### まとめ、今後の展望・共同開発のためのシーズ

- ▶ 光ピンセットの補足効果および高分子の混雑効果により、人工的な足場を用いることなく、短時間で3次元細胞組織体を構築する技術を開発した
- > 今後
  - より多くの細胞による組織体の構築 (現在は最大10個)
  - 細胞組織体の構築が可能な細胞・高分子の種類の解明
  - 実際の医療現場での活用

