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





10µm











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



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



H. Tavana, B. Mosadegh and S. Takayama, Adv Mater 22, 2628 (2010).

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







> 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

NanoTracker2 (JPK Instruments)

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)







高分子無し



高分子による枯渇相互作用



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

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

枯渇相互作用と膜間斥カ

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.

8

細胞接着の効果: 高分子濃度依存性







溶液の粘度の変化



Experimental results (medium + PEG 40 mg/ml) 12



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

Experimental results (medium + PEG 40 mg/ml) 13



74 フォトダイオードを用いた細胞間相互作用の測定

Near infrared laser



Photodiode Signals trap1

(i) Cell-cell adhesion

(ii) Cell-cell detachment





(i) Cell-cell adhesion Trap1 Trap2 Cell After a few min a few µm scale

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

(i) Cell-cell adhesion (ii)

(ii) Cell-cell detachment





(ii) Cell-cell detachment



Contribution of PEG for stable sticked cell-pair 16



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

Formation of stable cellular adhesion

Contact





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)



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

Doshisha University

18

Stable 3-D cellular assembly of pentagonal pyramid 19



Formation of 3-D cellular assembly in real time



(PEG: 40 mg/ml)

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

異種細胞同士の接着

•Cell ASC-GFP • MS1 DS RED •

(i)

(ii)





Doshisha University, Life and Medical Science Laboratory



<u>まとめ、今後の展望・共同開発のためのシーズ</u>

- 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



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