MEMS・マイクロTASの研究の現状と研究事例

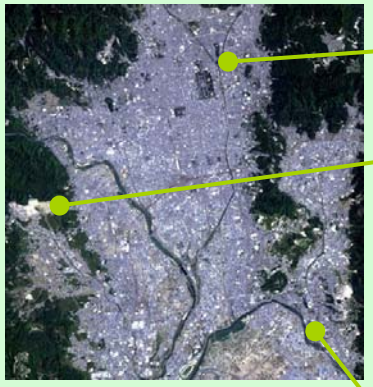
京都大学 大学院工学研究科

ﾏｲｸﾛｴﾝｼﾞﾆｱﾘﾝｸﾞ専攻

小寺秀俊

京都大学3大キャンパス

京都盆地

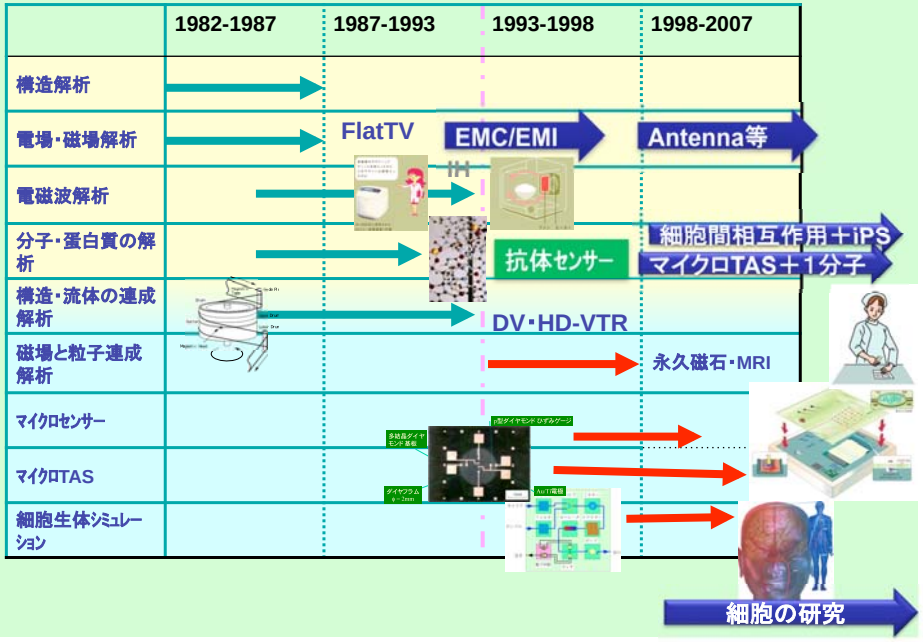


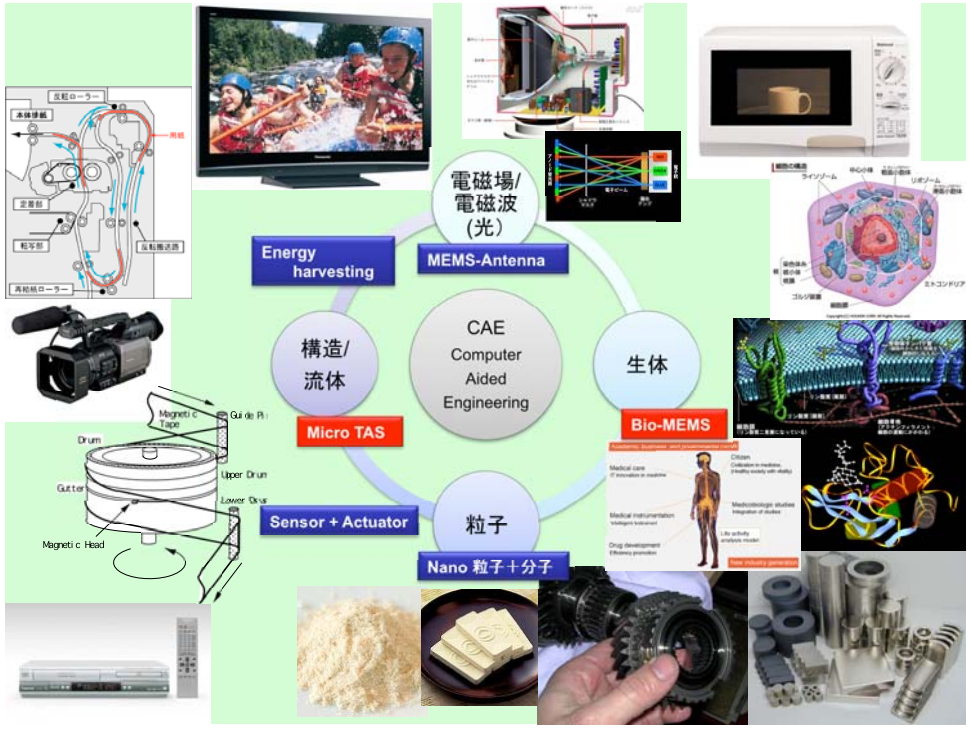
吉田キャンパス
教育・基礎研究

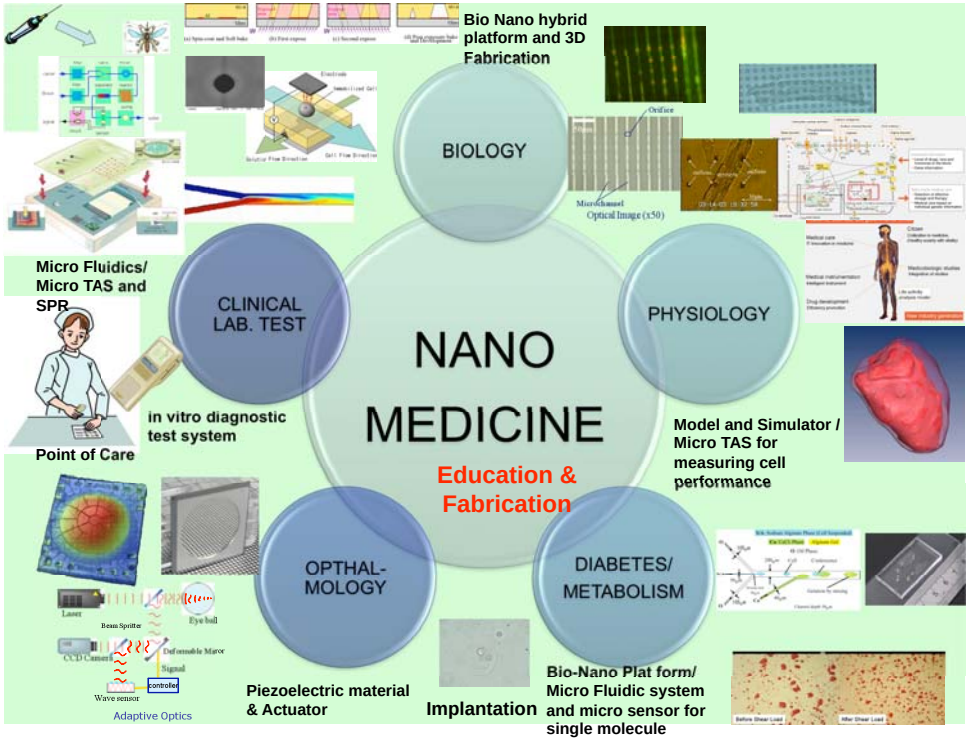
桂キャンパス
テクノサイエンス

宇治キャンパス
生存基盤科学

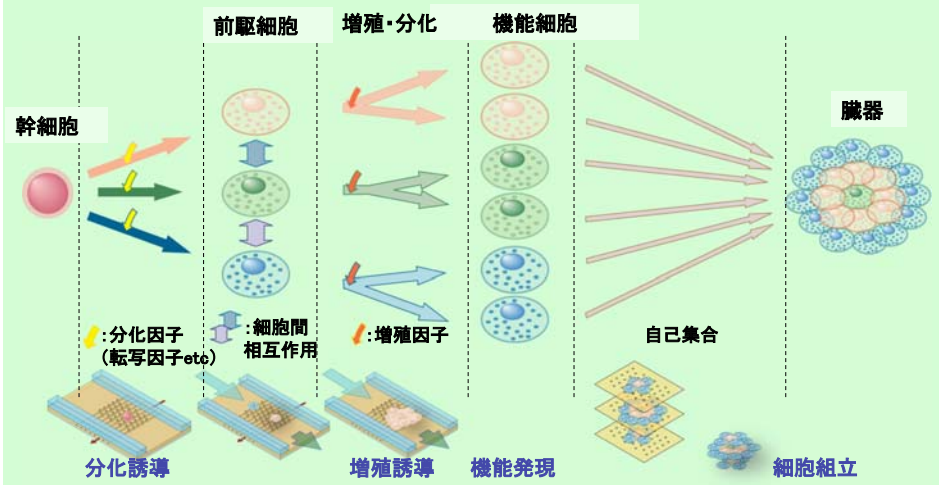
研究履歴







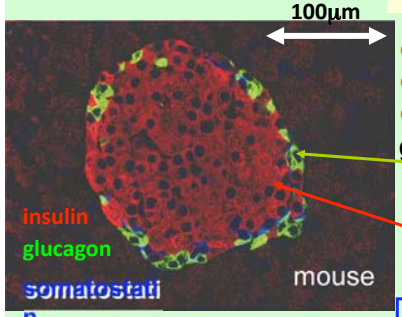
発生における臓器の形成



上のプロセスを人為的に制御・計測するためのナノ・マイクロ技術の開発を行う

1) 細胞間コミュニケーションの計測（分化・増殖・機能発現過程における）
2) 刺激導入や分化等（脱分化・増殖）の制御のための因子導入
3) MEMSを用いた細胞組立による組織再生

Structure of ISLET（Mouse）



- Aggregating Cells with Different Functions
- 3D-Construction to Function Effectively
- Secrete hormones to regulate blood glucose

α-Cells：Glucagon（Blood glucose↑）

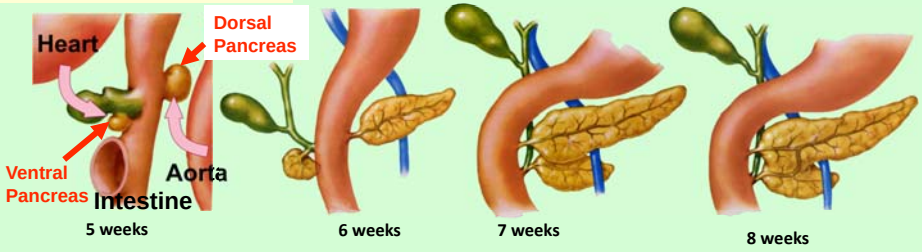
Cell-Cell interaction:
Glucagon Secretion from α-cells inhibits Insulin secretion from β-cells

β-Cells：Insulin（Blood glucose↓）

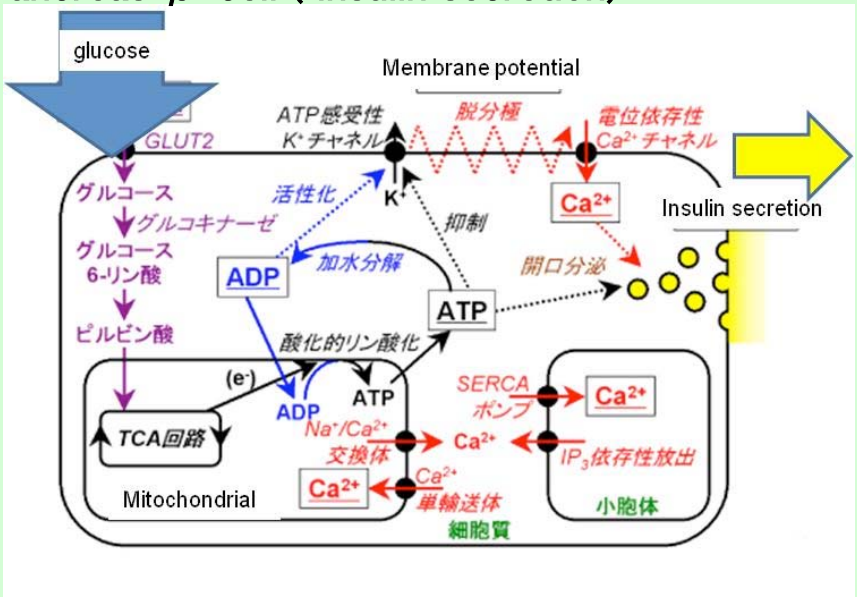
Patient Number of Diabetes:
Type 1: 50000
Type 2: 100000000

Aggregating β-Cells secrete more dose of insulin than that in total from the same number of isolated β-Cells.
➔Cell-Cell Interaction

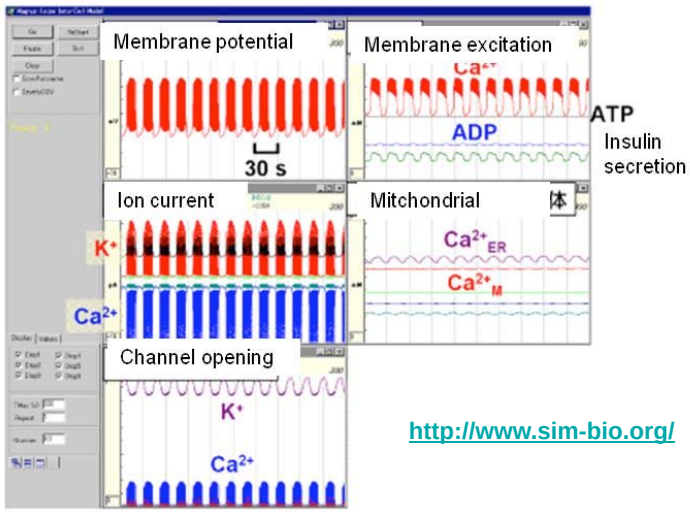
Development of Pancreas



Pancreas β cell (insulin secretion)

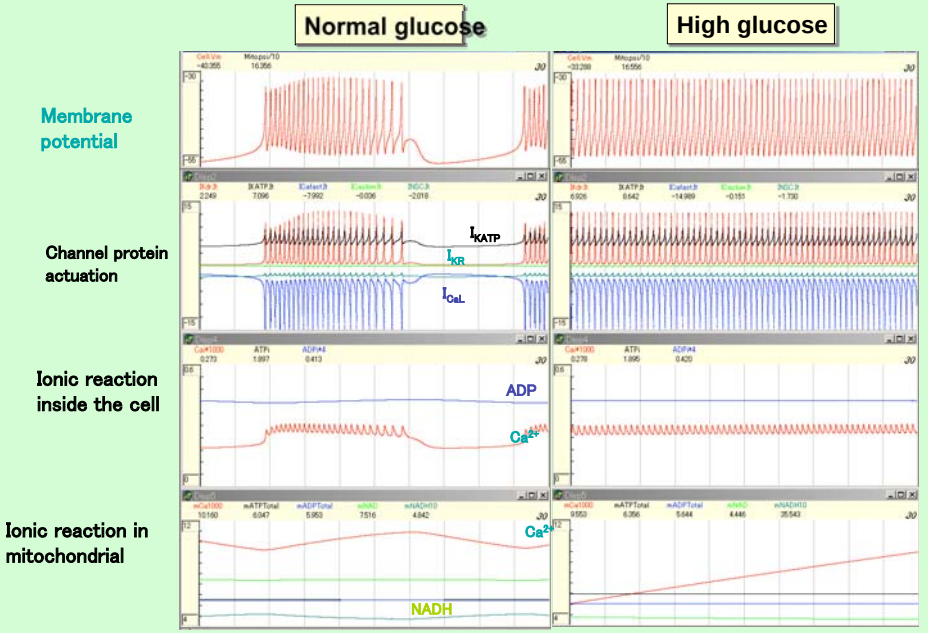


Bio Simulator



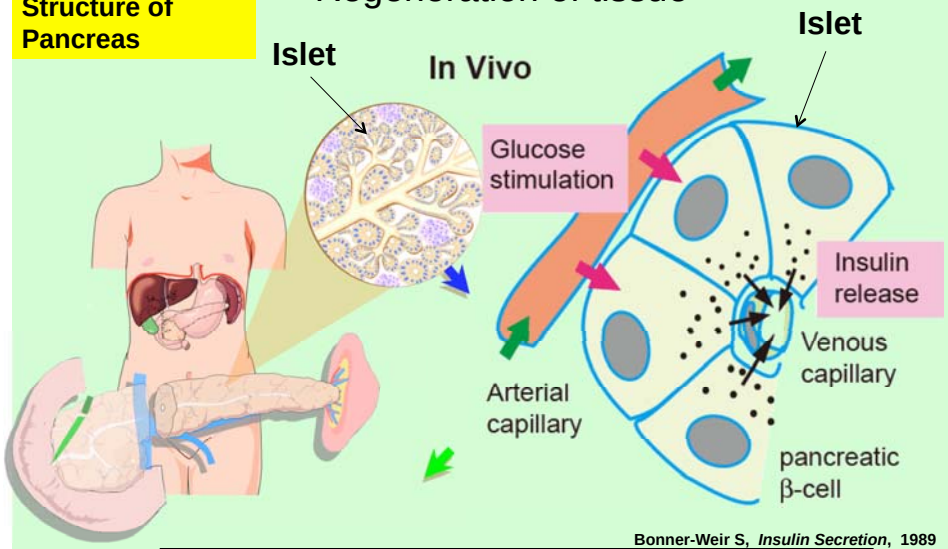
http://www.sim-bio.org/

Pancreas β cell (insulin secretion): Type 2 Diabetes



Measuring Cell-Cell Communication and Regeneration of tissue

Structure of Pancreas

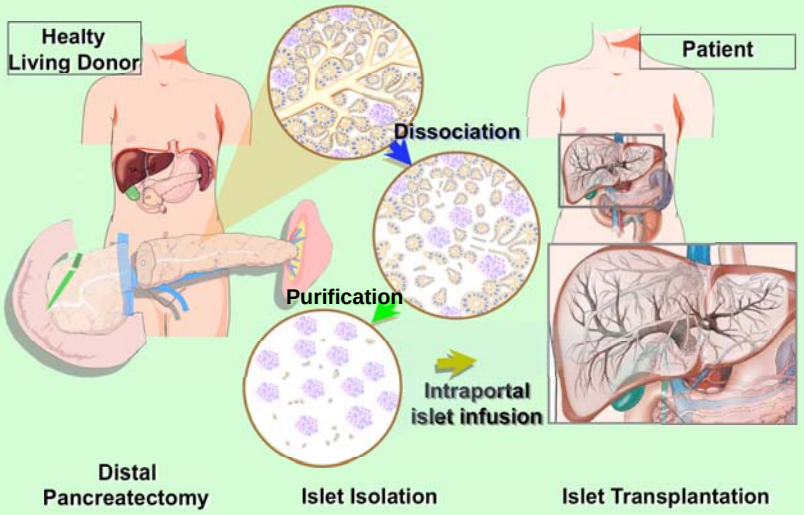


Bonner-Weir S, *Insulin Secretion*, 1989

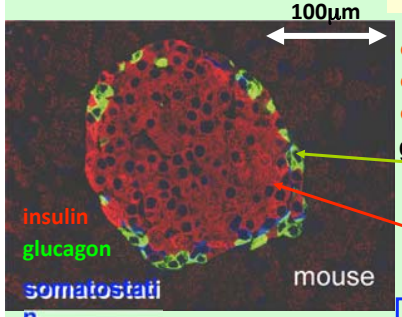
Q: How the cell response for the Glucose stimulation?

Clinical Application of Regenerative Medicine

- Islet Transplantation -



Structure of ISLET（Mouse）



- Aggregating Cells with Different Functions
- 3D-Construction to Function Effectively
- Secrete hormones to regulate blood glucose

α-Cells：Glucagon（Blood glucose↑）

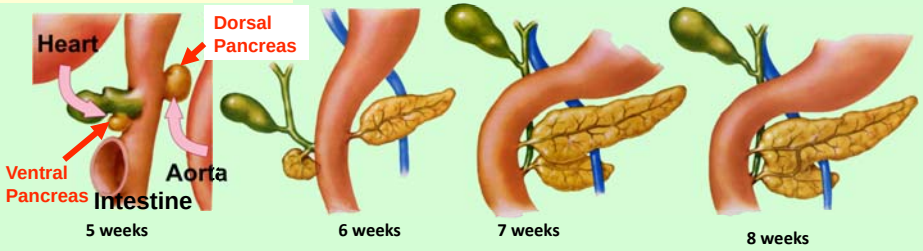
Cell–Cell interaction:
Glucagon Secretion from α–cells inhibits Insulin secretion from β–cells

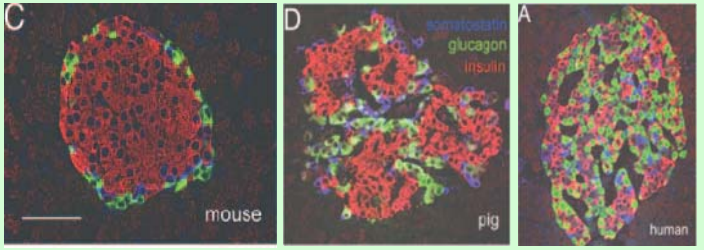
β-Cells：Insulin（Blood glucose↓）

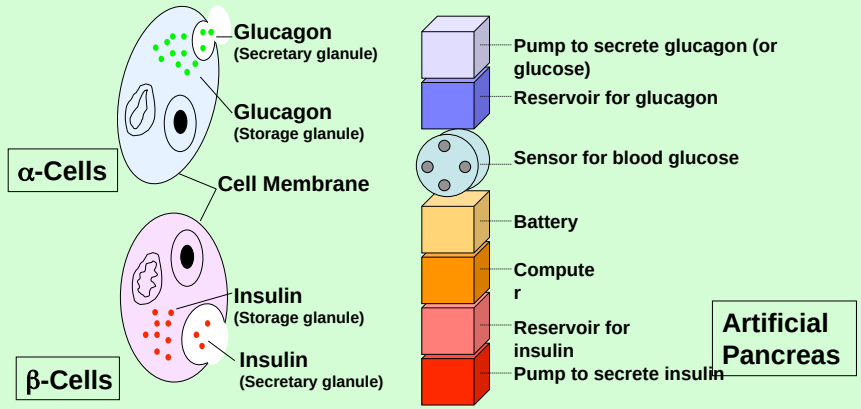
Patient Number of Diabetes：
Type 1: 50000
Type 2: 100000000

Aggregating β-Cells secrete more dose of insulin than that in total from the same number of isolated β-Cells.
➔Cell-Cell Interaction

Development of Pancreas







Essential specifications for the artificial pancreas to mimic pancreatic β-Cells and α-Cells

研 究 の 目 的

MEMS/NEMS
ナノ・マイクロハンドリング技術
微小領域における計測技術

Bio-Technology
遺伝子分析
蛋白質等高分子分析
生理活性・生理機能計測・制御
分化・発生・増殖
ES細胞・幹葉系細胞

Top Down

Bottom Up

バイオ/ナノ ハイブリッド プラットホーム

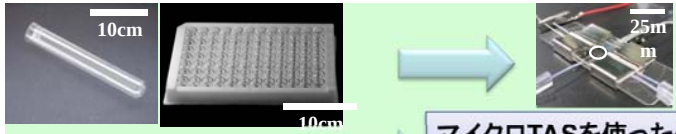
革新的製造技術シーズ

- 高機能マイクロTASチップの量産技術
- 人為的空間配置
- 刺激応答計測
  物質導入・局所刺激（化学的・物理的）
- 細胞間相互作用のリアルタイム計測
  微小領域での高精度計測技術
  （1細胞レベル・組織レベル）
- 選択的細胞融合

ナノ科学へのインパクト

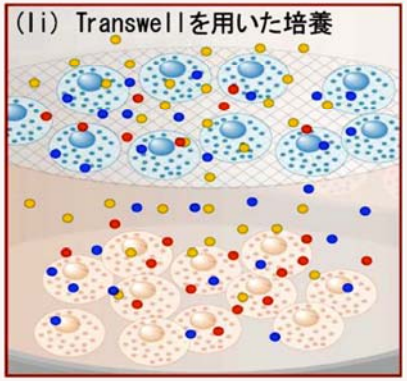
- 細胞間相互作用
- 刺激応答
- 分化制御遺伝子・蛋白質計測
- 増殖機能の解明
- 組織再生と医療応用

MEMS/NEMSを用いた新たなバイオテクノロジーを推進する製造技術の創出と研究方法の創出を実現する

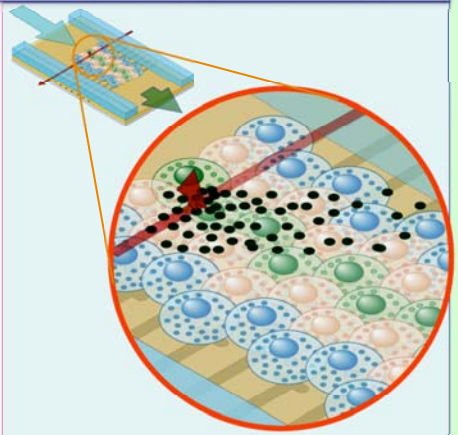


従来技術

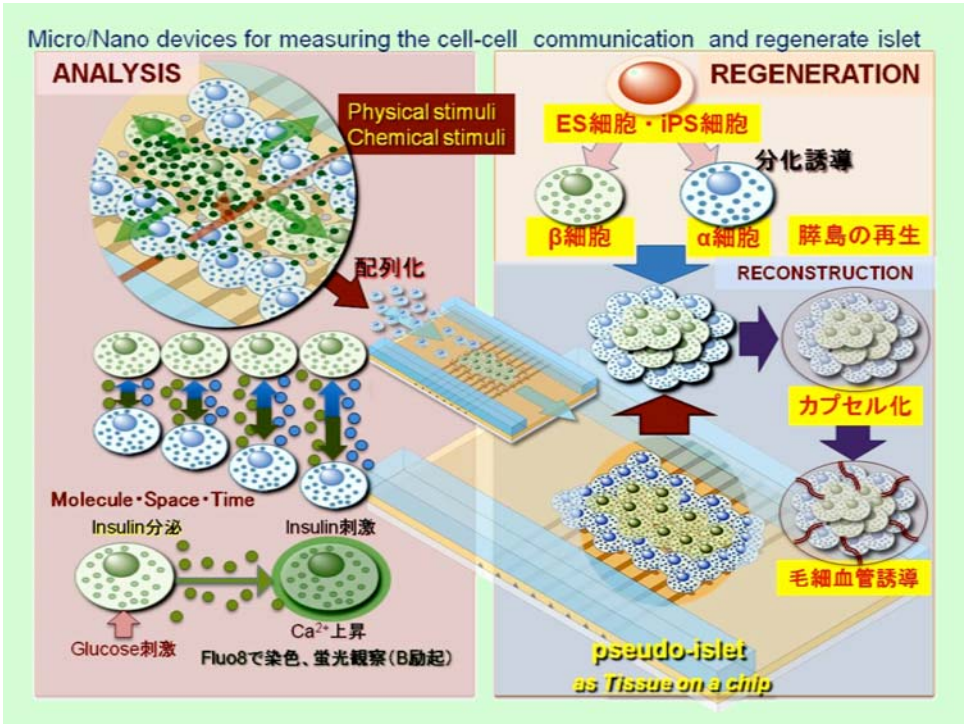
マイクロTASを使った個々の細胞への刺激とその応答および相互作用計測技術

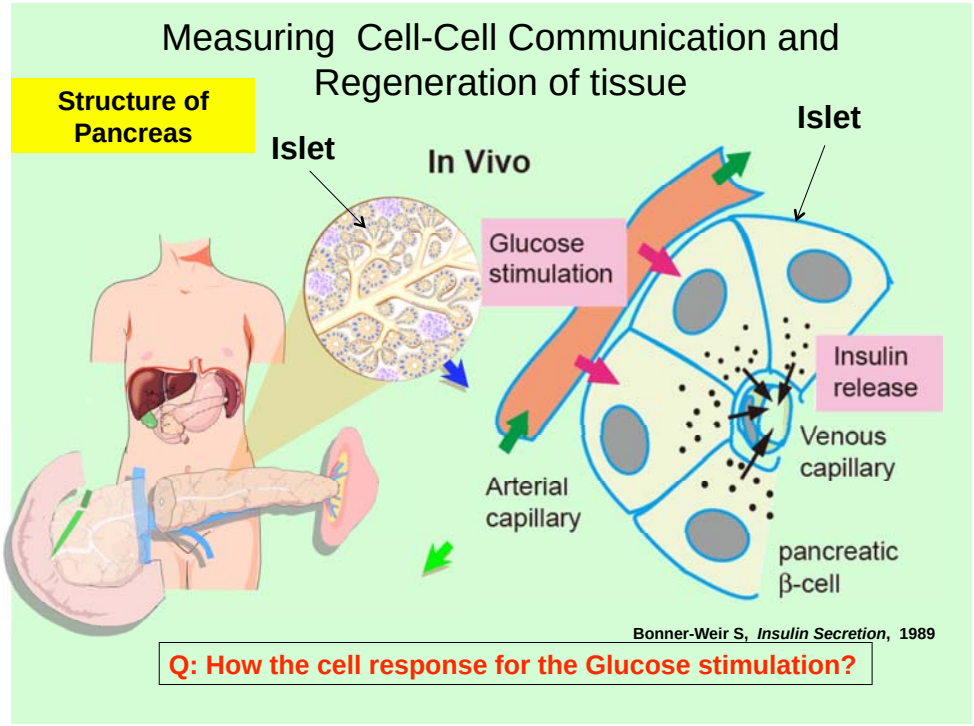


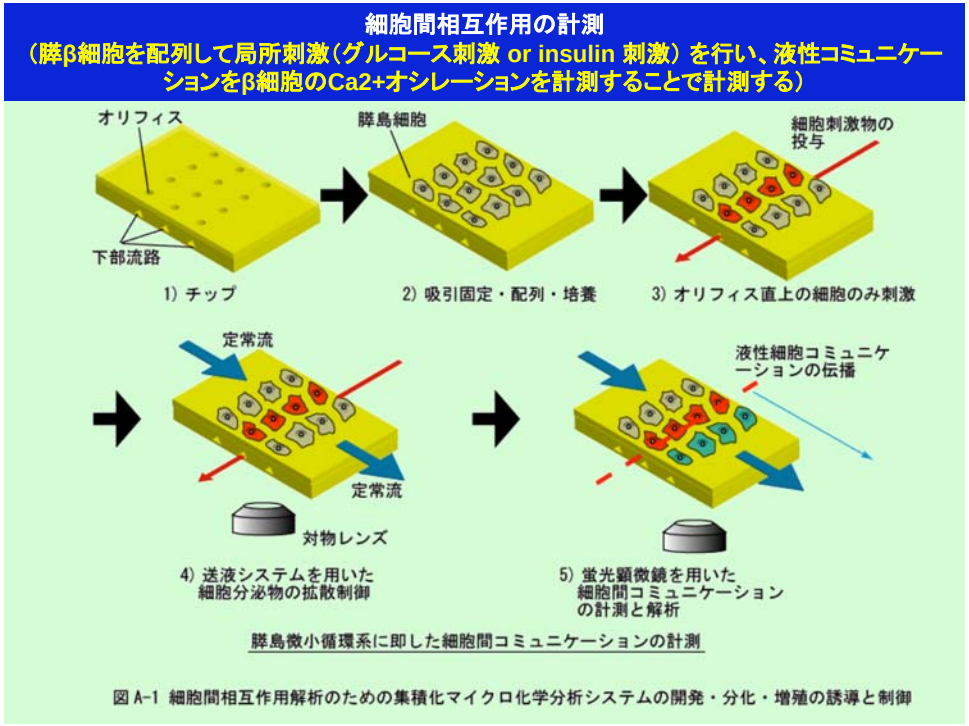
- 細胞間相互作用に方向性を持たせることが困難
- 刺激の対象が非特異的

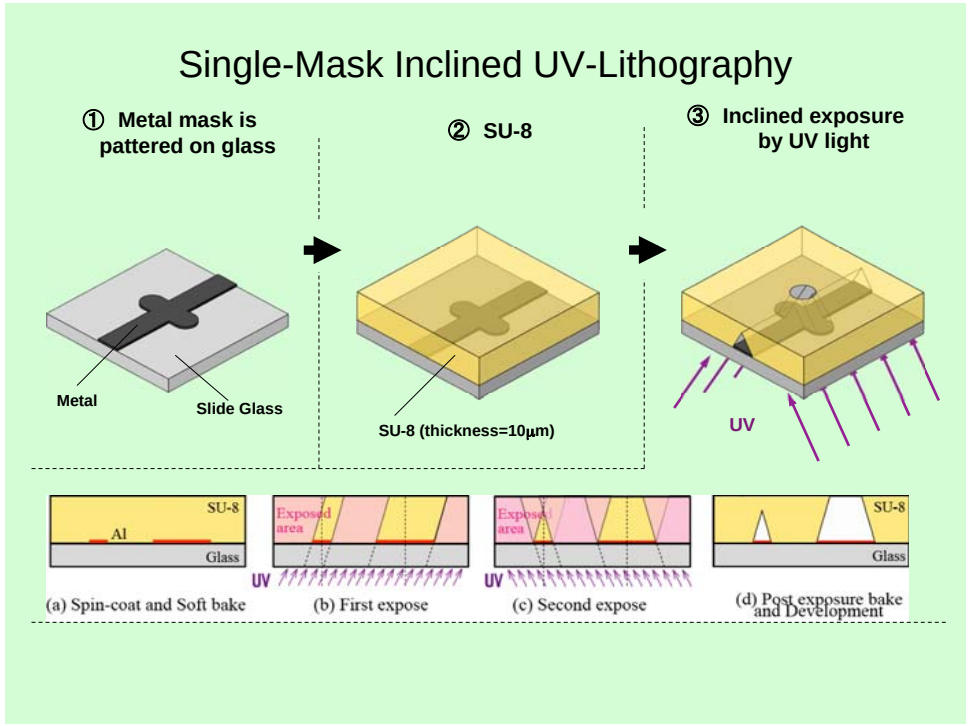


特定の細胞に刺激を加えた時の細胞間相互作用の伝播をリアルタイム計測することができる


Micro/Nano devices for measuring the cell-cell communication and regenerate islet
ANALYSIS
REGENERATION
Physical stimuli
Chemical stimuli
ES細胞・iPS細胞
分化誘導
β細胞
α細胞
膵島の再生
RECONSTRUCTION
配列化
カプセル化
毛細血管誘導
Molecule・Space・Time
Insulin分泌
Insulin刺激
Glucose刺激
Ca2+上昇
Fluo8で染色、蛍光観察(B励起)
pseudo-islet
as Tissue on a chip

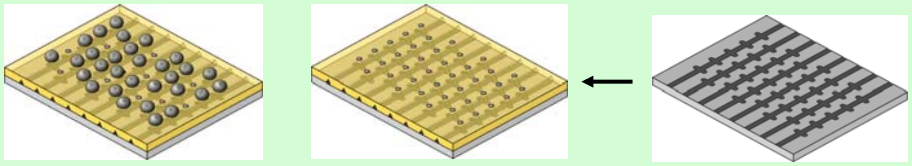

Measuring Cell-Cell Communication and Regeneration of tissue
Structure of Pancreas
Islet
In Vivo
Islet
Glucose stimulation
Insulin release
Venous capillary
Arterial capillary
pancreatic β-cell
Bonner-Weir S, Insulin Secretion, 1989
Q: How the cell response for the Glucose stimulation?


細胞間相互作用の計測
(膵β細胞を配列して局所刺激(グルコース刺激 or insulin 刺激)を行い、液性コミュニケーションをβ細胞のCa2+オシレーションを計測することで計測する)
オリフィス
膵島細胞
細胞刺激物の投与
下部流路
1) チップ
2) 吸引固定・配列・培養
3) オリフィス直上の細胞のみ刺激
定常流
液性細胞コミュニケーションの伝播
定常流
対物レンズ
4) 送液システムを用いた細胞分泌物の拡散制御
5) 蛍光顕微鏡を用いた細胞間コミュニケーションの計測と解析
膵島微小循環系に即した細胞間コミュニケーションの計測
図 A-1 細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発・分化・増殖の誘導と制御


Single-Mask Inclined UV-Lithography
① Metal mask is pattered on glass
② SU-8
③ Inclined exposure by UV light
Metal
Slide Glass
SU-8 (thickness=10μm)
UV
SU-8
Al
Glass
Exposed area
UV
Exposed area
UV
SU-8
Glass
(a) Spin-coat and Soft bake
(b) First expose
(c) Second expose
(d) Post exposure bake and Development

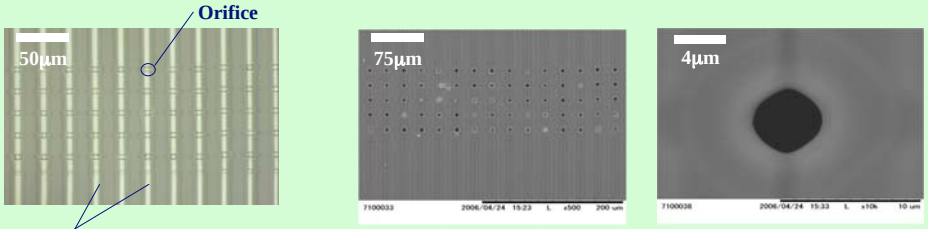
Electroporation chip

Micro channel. Orifice and electrode is fabricated simultaneously



Cell array

Mask Pattern on Slide Glass

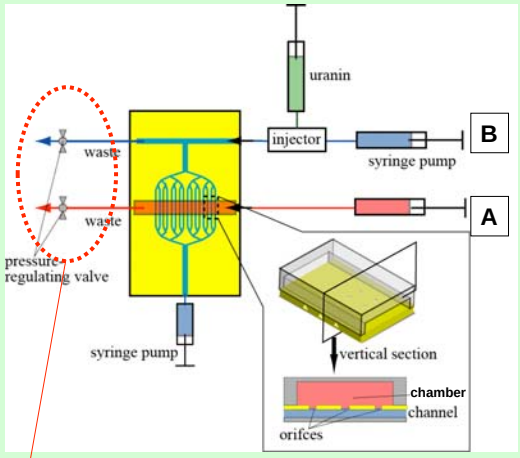


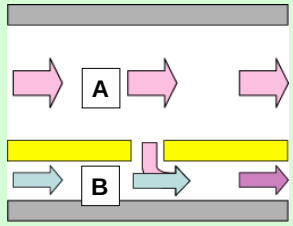
Optical Image (x50)

SEM Images

To validate microfluidic flow in micro-channels and lack of leakage from micro-orifices_1

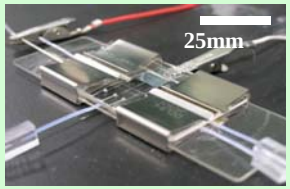
When the micro-chamber is higher pressure then micro-channels with lower pressure, a reagent flow through micro-channels without leakage from micro-orifices





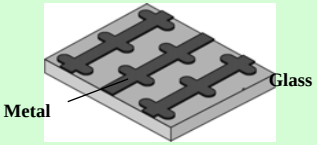
pressure
A > B

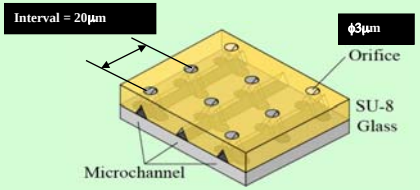
pressure regulating valves

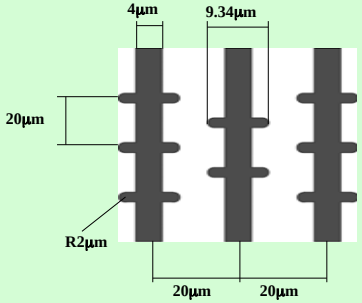


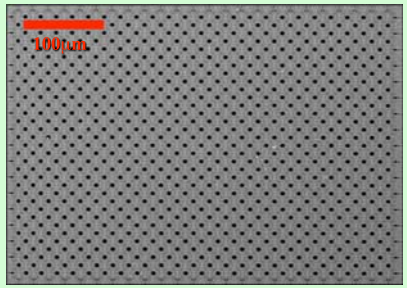
More than ten thousands of cells are measured parallel on one chip

Single-MASK Inclined UV Lithography

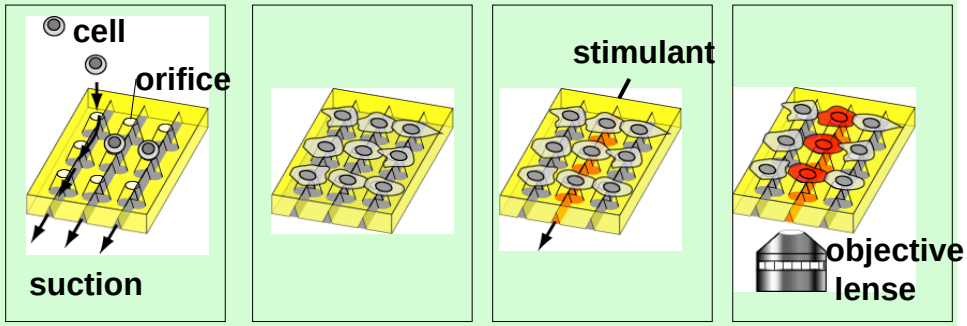


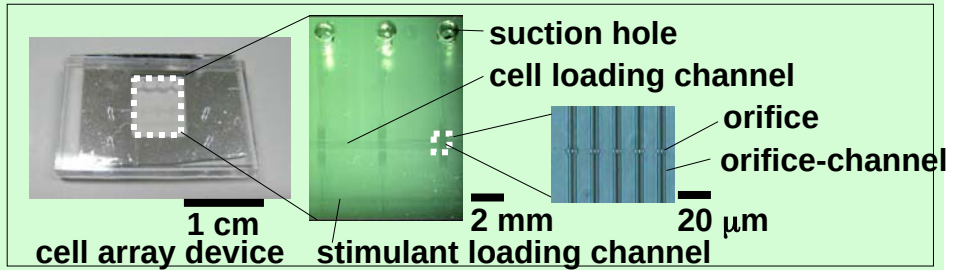




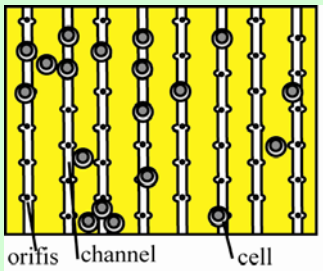


β-Cell (Min 6 m9) humoral transmission

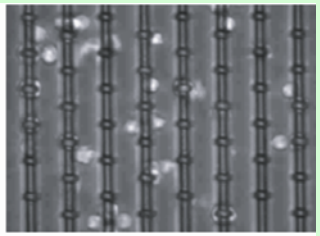




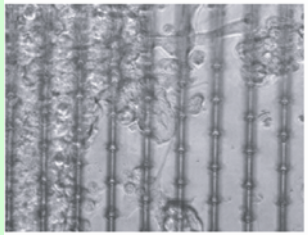
Cell trapping & Culturing



(a) schematic of cell trapping

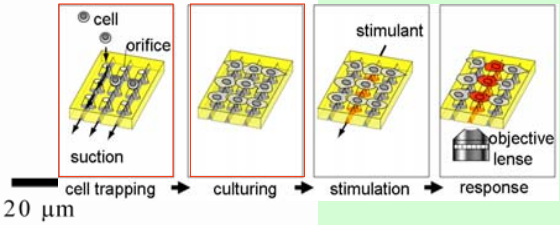


(b) phase contrast image of cell trapping



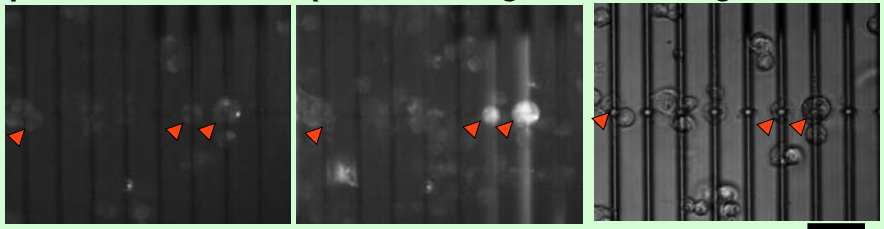
(c) culturing of trapped MIN-m9 cells for 3days

Experimental procedure

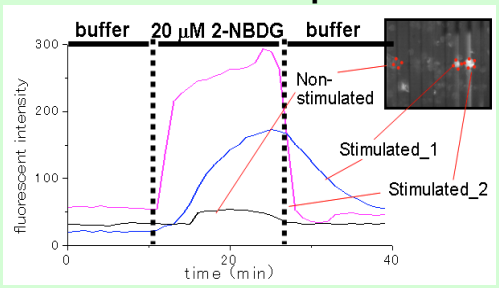


Stimulation

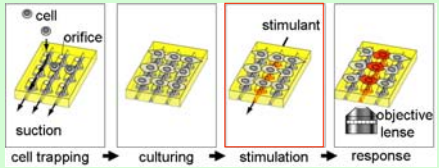
Uptake of a stimulus (fluorescent glucose analogue: 2-NBDG)



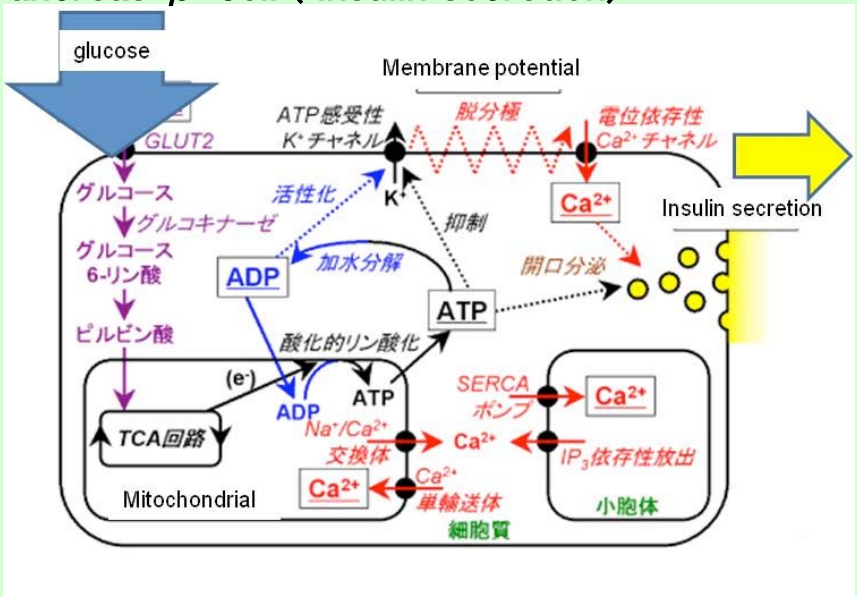
Time course of the uptake of 2-NBDG



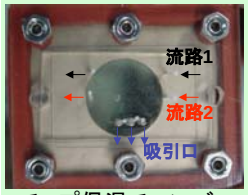
Experimental procedure



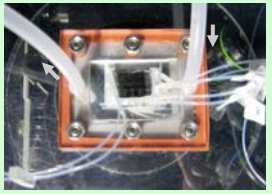
Pancreas β cell (insulin secretion)



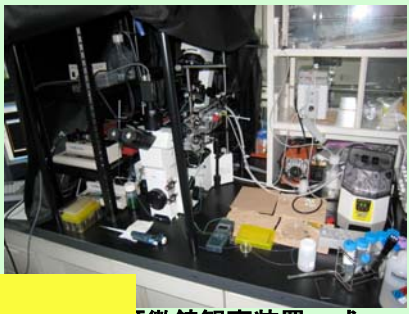
装 置 概 観 図

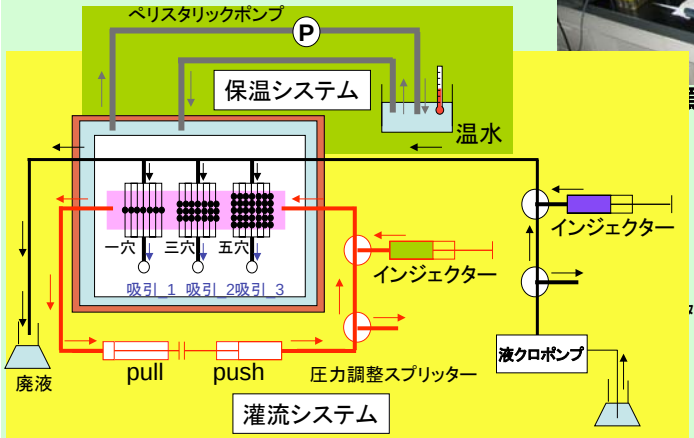


チップ保温チャンバー

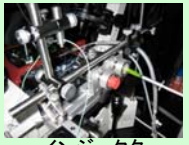


温水を循環





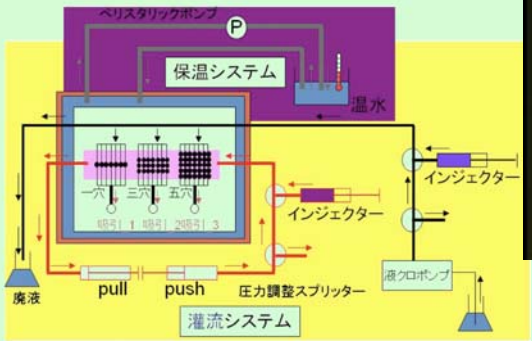
顕微鏡観察装置一式



インジェクター

スプリッター

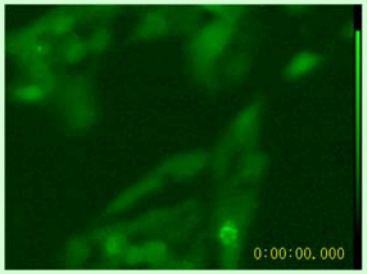
膵β細胞を配列して局所刺激（グルコース刺激 or insulin 刺激）を行い、液性コミュニケーションをβ細胞のCa2+オシレーションを計測



×5速

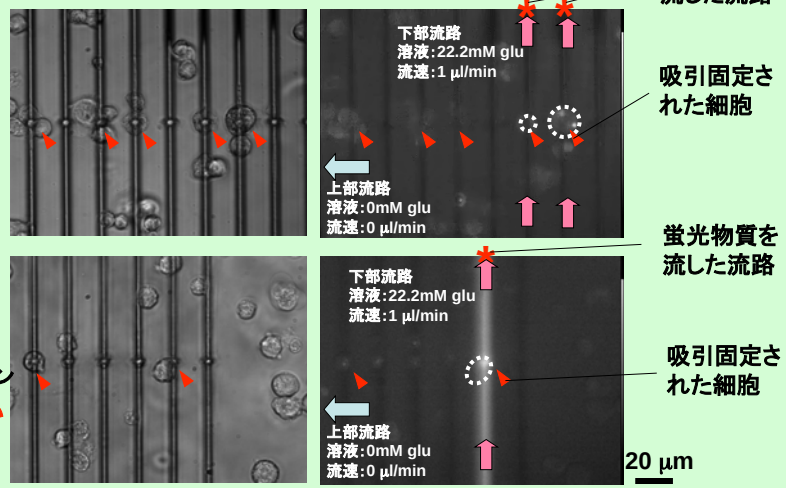
膵β細胞の吸引固定

- 細胞株：MIN6-m9
- 吸引流速：1 μl/min
- 吸引孔径：ϕ2μm



- 細胞間での刺激の伝播
- 膵β細胞へのインスリン刺激-細胞内Ca^{2+}濃度上昇
  （0-5分：0mM, 5-10分：5.5mM,10分-600nMInsuline +5.5mMGlucose

オリフィスへ配置した膵b細胞へのグルコース取り込み



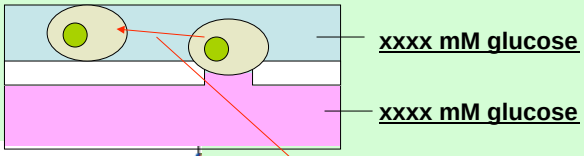
- 細胞株：MIN6-m9
- 吸引孔径：ϕ2μm

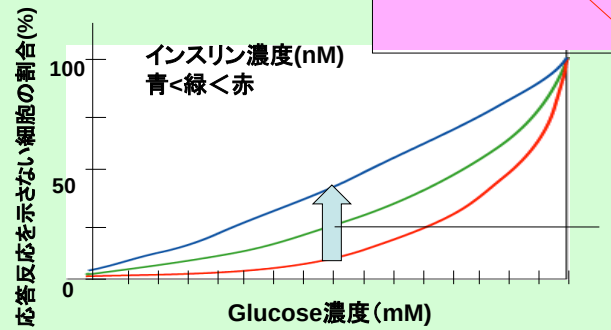
下部流路に蛍光グルコースを流した細胞のみに蛍光強度の上昇が見られる

Glucose刺激、insulin刺激の最適化

目的

使用しているMIN6-m9が、どの程度のglucoseまたはinsulin濃度で刺激すると細胞応答反応を示すか調べる
上記で求めた値から、デバイス実験における上下流路に流すglucoseまたはinsulin濃度を決定する

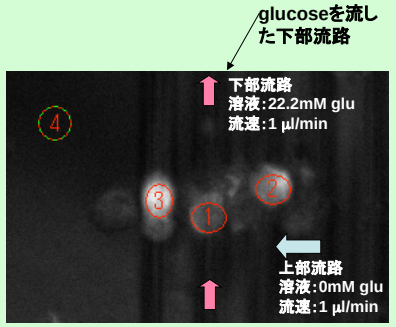


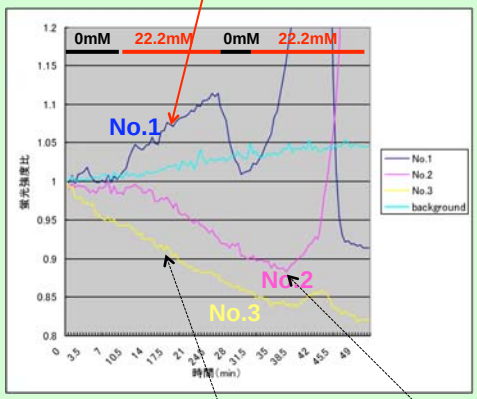


インスリン濃度が上がるにつれ、グルコース刺激に対する応答反応を示す細胞の割合がずれるのを調べる

オリフィスへ配置した膵b細胞へのグルコース局所刺激を与えたときの細胞内Ca^{2+}濃度変化の測定

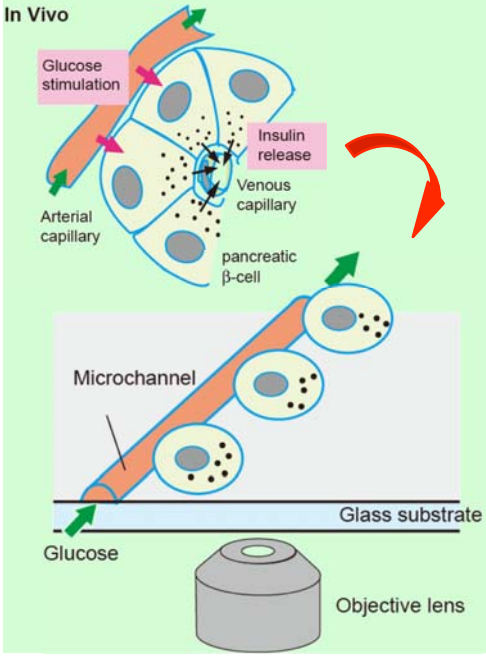
吸引固定されたNo.1~3の細胞うち、No.1の細胞のみへ下部流路から22.2 mM glucoseを与えたときに 細胞内Ca2+濃度の上昇が見られる

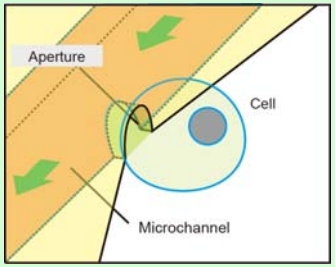




染色条件：5μM Fluo8-AM（Ca2+蛍光指示薬, 37℃, 1時間
対物レンズ：20X LUCPlanFL, N.A. 0.45
CCDカメラ：Orca-ER
露光時間：111msec
ゲイン：100
インターバル：30秒間隔で蛍光像を撮影

Mimicked Tissue Micro-environment





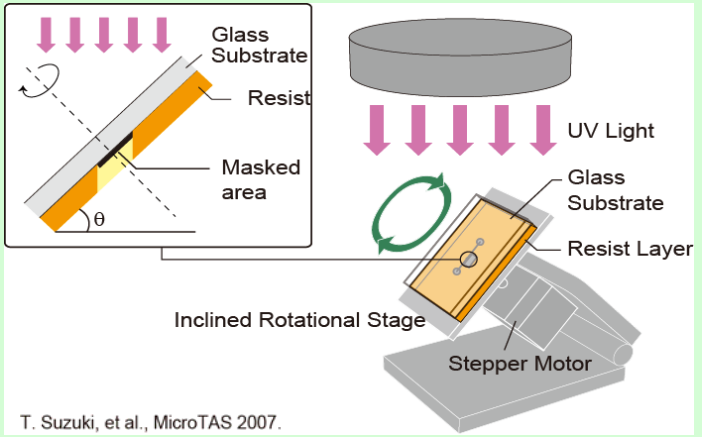
Localization and control mechanism of secreting direction

1. **Apply localized stimuli**
   Stimulate through
   "Pseudo-arterial capillary"

2. **Measure intracellular response**
   4D imaging (x,y,z and time)

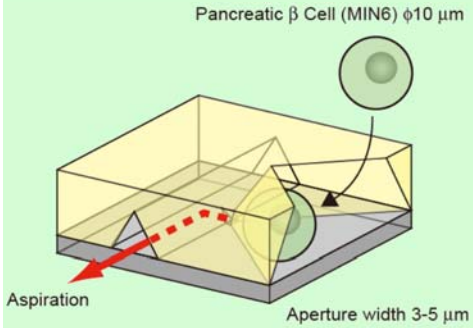
Fabrication

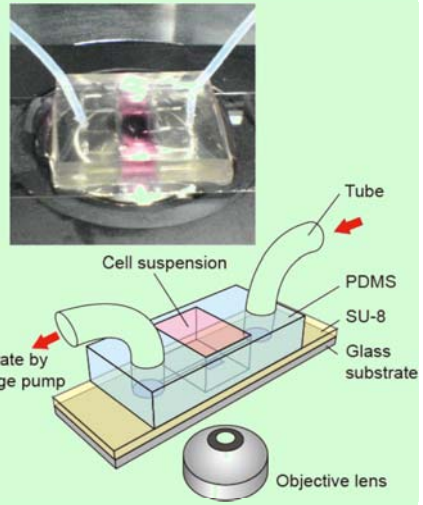
Multi-Directional UV Lithography.



- **Complex micro channel from *Single* photo mask**
- ***No* mask alignment process**

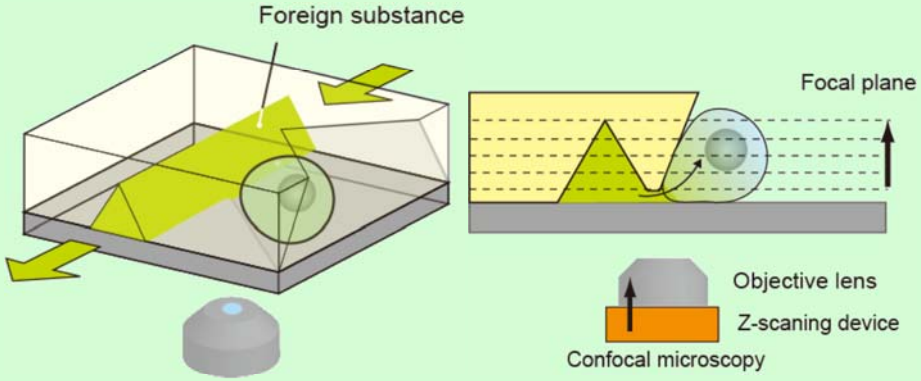
Positioning of single cell





Trap single cell by aspiration through micro channel.

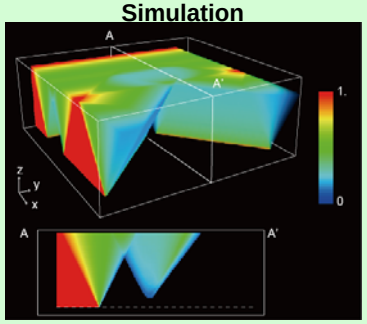
Setup for measuring localization and secretion



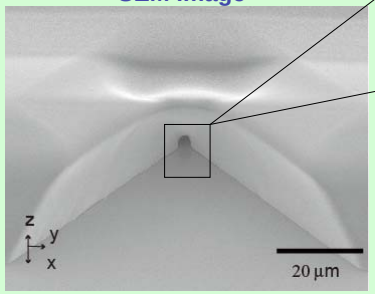
- **Localized stimuli introduction into trapped cell**
- **4D imaging of its uptake and intracellular responses**

Micro channel and hole

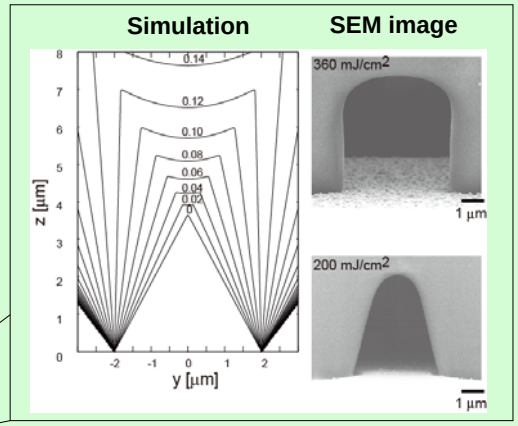
Simulation



SEM image

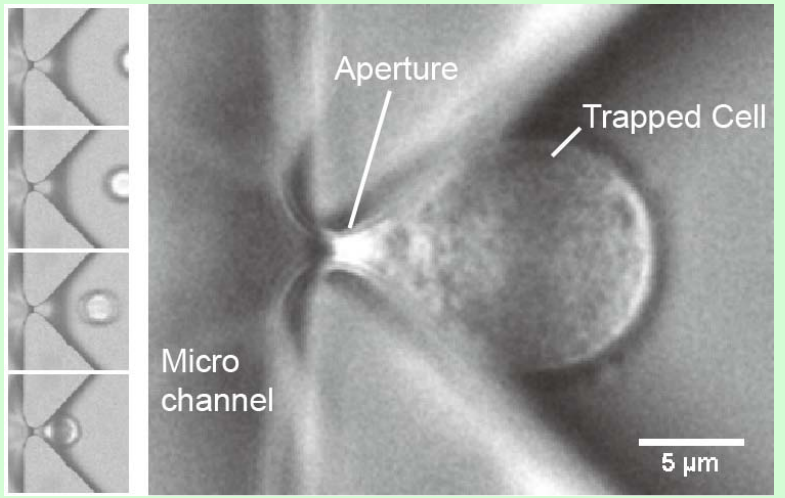


Simulation SEM image



- Aperture-size/shape control by exposure dose

Cell positioning

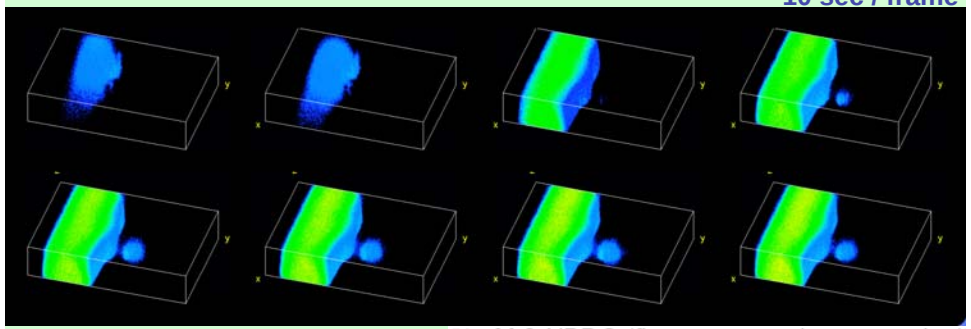


160 ms/frame

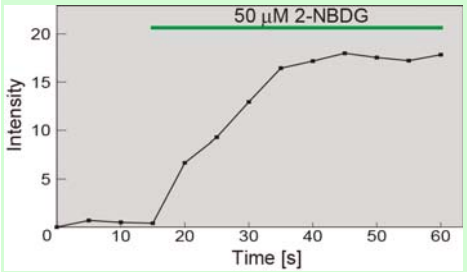
Single cell is positioned at an aperture.

Glucose instability and localization inside cell

10 sec / frame

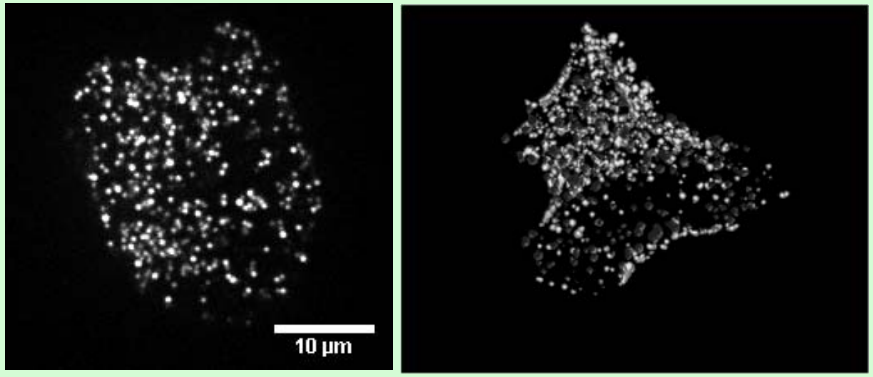


50 µM 2-NBDG (fluorescence glucose analog)



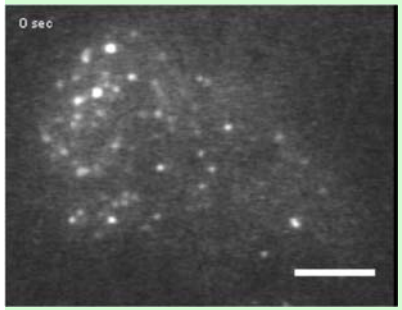
- External substances is introduced
- Glucose uptake is visualized with 4D (x,y,z and time) resolution.

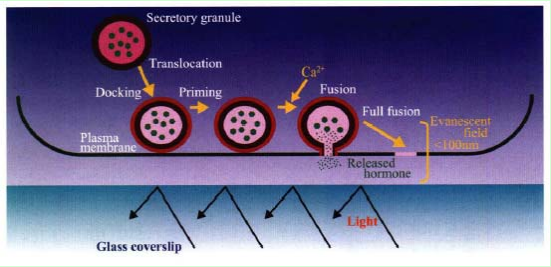
Insulin GFP is introduce and imaged in β cell



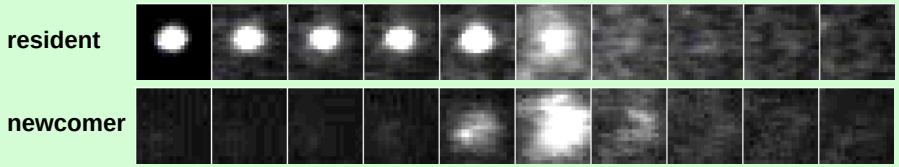
Insulin-eGFP / MIN6 cell

Insulin Secretion

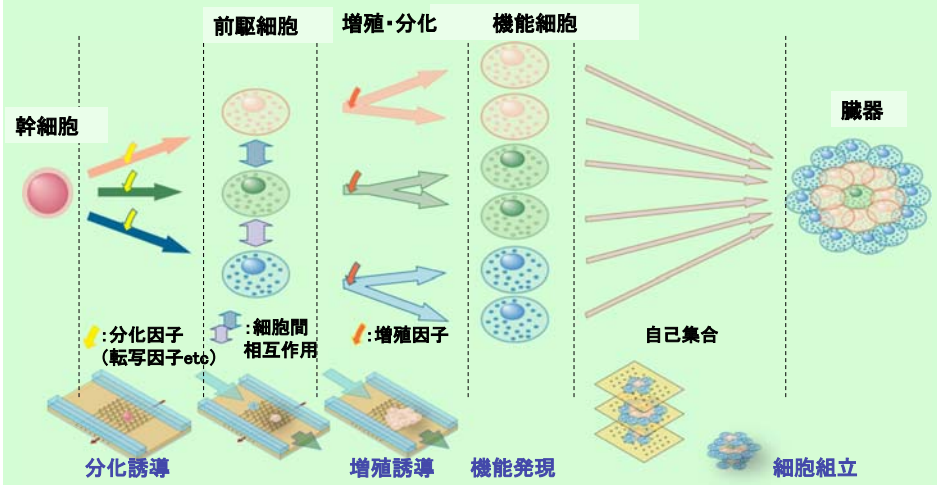




Insulin-eGFP / MIN6 cell



発生における臓器の形成

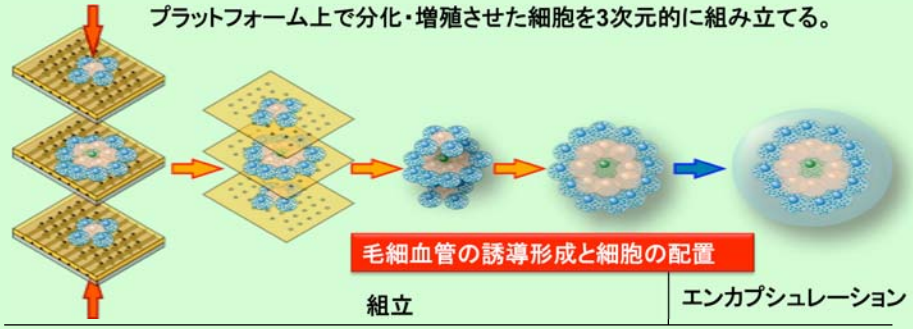


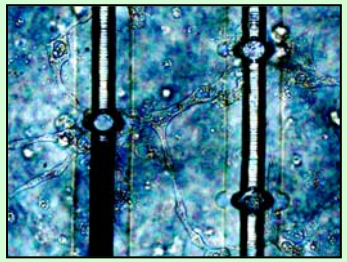
上のプロセスを人為的に制御・計測するためのナノ・マイクロ技術の開発を行う

1) 細胞間コミュニケーションの計測(分化・増殖・機能発現過程における)
2) 刺激導入や分化等(脱分化・増殖)の制御のための因子導入
3) MEMSを用いた細胞組立による組織再生

3)細胞組み立て技術

●再構築も可能:例(分離時に壊れた膵島細胞からの再構築)





研究目的

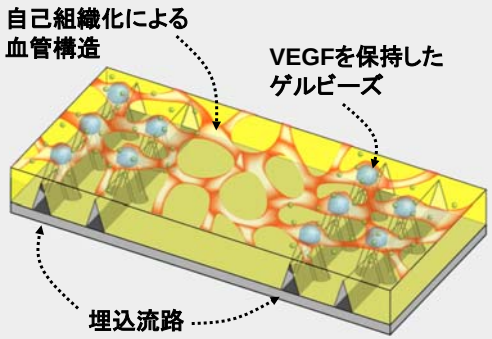
VEGFゲルビーズを用いた
血管構造の誘導形成法

↓

デバイスの作製と
ゲルビーズの吸引固定

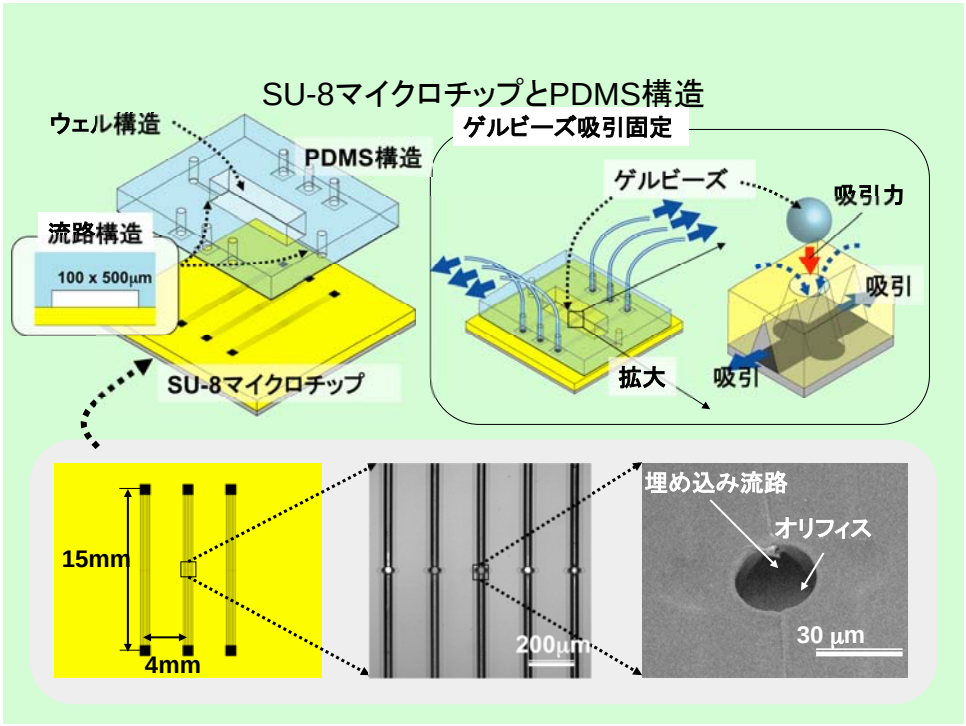
↓

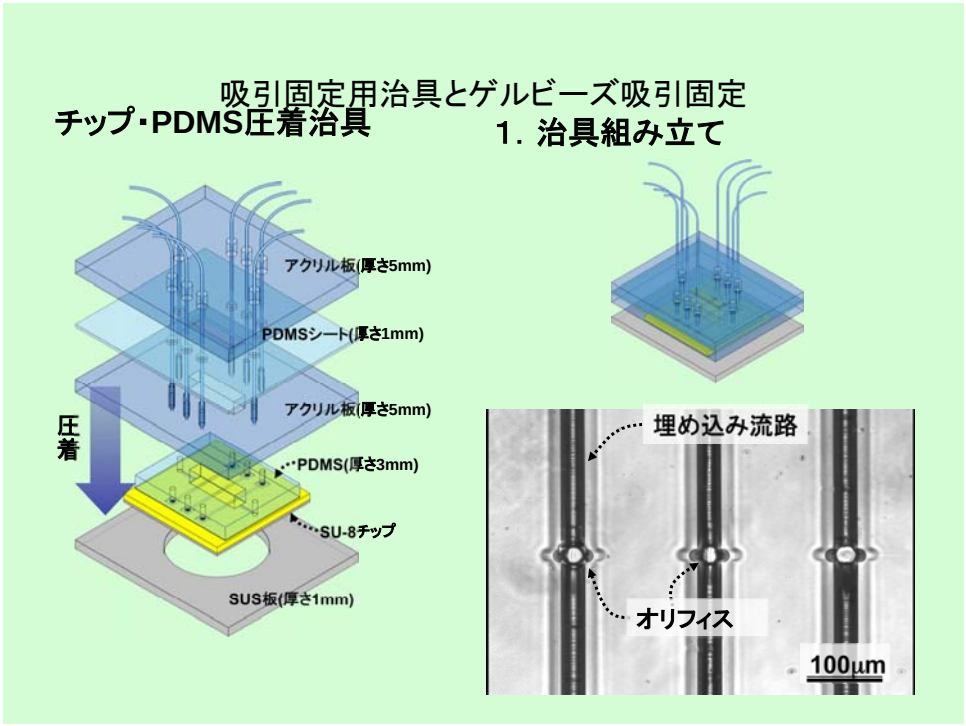
デバイス上での
血管構造の誘導形成

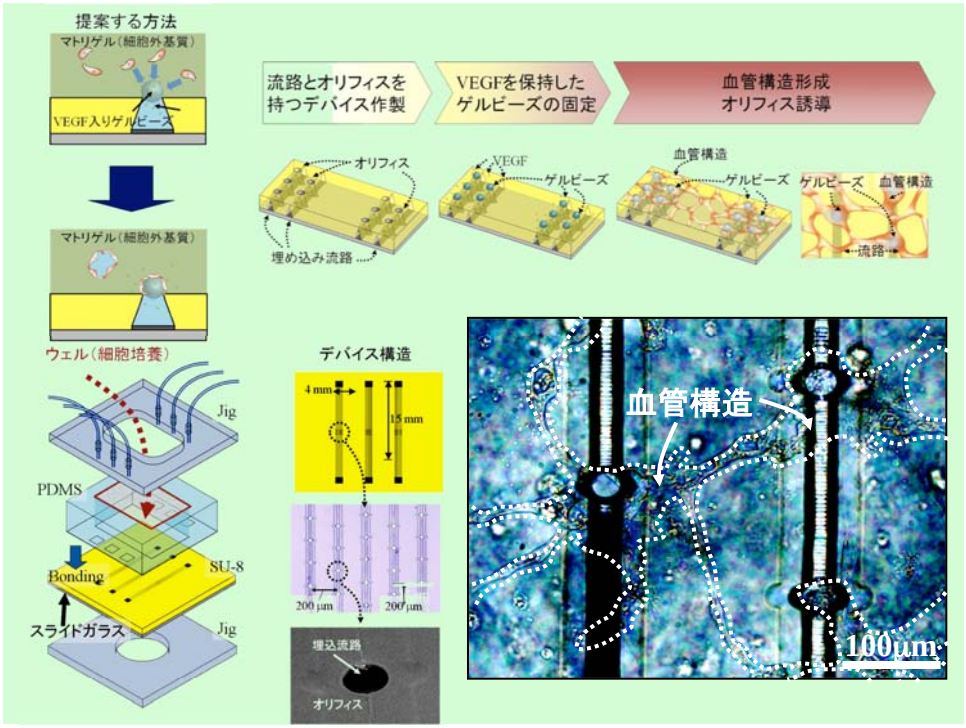


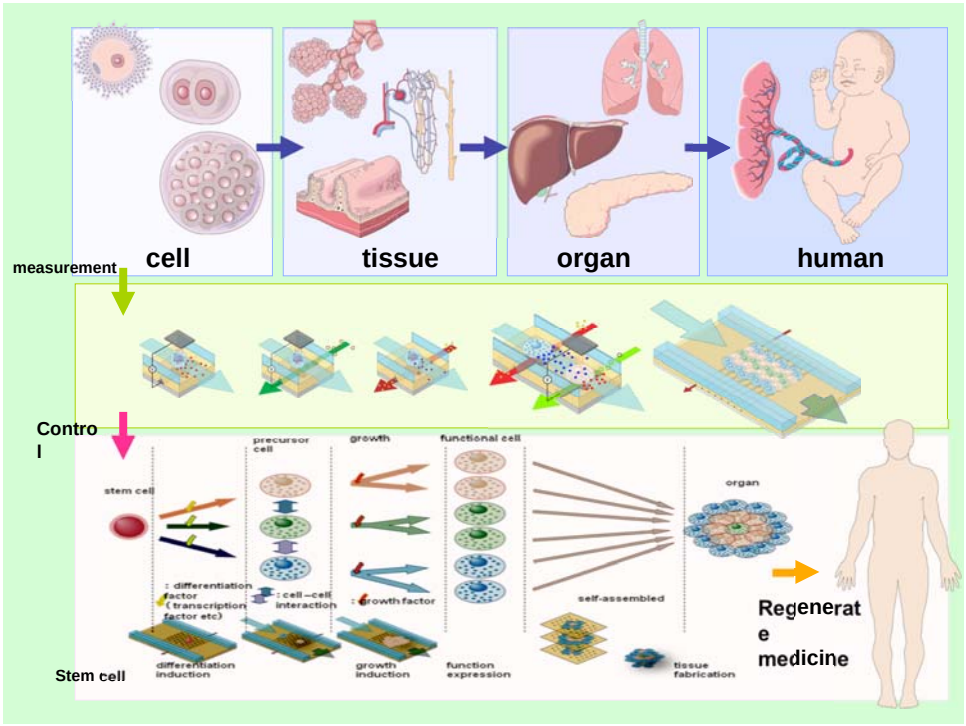
オリフィスに接続するような

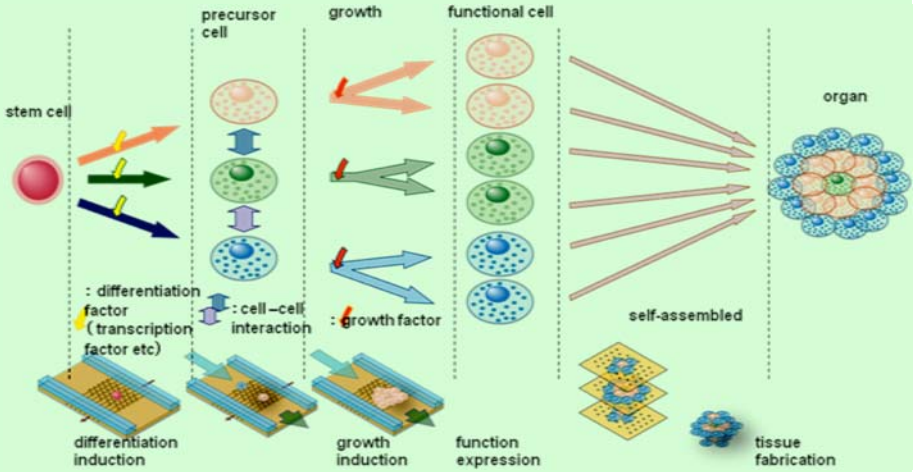
血管構造を誘導形成


SU-8マイクロチップとPDMS構造
ウェル構造
PDMS構造
流路構造
100 x 500μm
SU-8マイクロチップ
ゲルビーズ吸引固定
ゲルビーズ
吸引力
吸引
拡大
吸引
15mm
4mm
200μm
埋め込み流路
オリフィス
30 μm


吸引固定用治具とゲルビーズ吸引固定
チップ・PDMS圧着治具
1. 治具組み立て
アクリル板(厚さ5mm)
PDMSシート(厚さ1mm)
アクリル板(厚さ5mm)
圧着
PDMS(厚さ3mm)
SU-8チップ
SUS板(厚さ1mm)
埋め込み流路
オリフィス
100μm


提案する方法
マトリゲル(細胞外基質)
VEGF入りゲルビーズ
マトリゲル(細胞外基質)
ウェル(細胞培養)
Jig
PDMS
SU-8
Bonding
スライドガラス
Jig
流路とオリフィスを持つデバイス作製
VEGFを保持したゲルビーズの固定
血管構造形成オリフィス誘導
オリフィス
埋め込み流路
VEGF
ゲルビーズ
血管構造
ゲルビーズ
ゲルビーズ
血管構造
流路
デバイス構造
4 mm
15 mm
200 μm
200 μm
埋込流路
オリフィス
血管構造
100μm


cell
tissue
organ
human
measurement
Control
stem cell
precursor cell
growth
functional cell
organ
self-assembled
Regenerative medicine
Stem cell
differentiation induction
growth induction
function expression
tissue fabrication



1) Micro Device for measuring communicate the cells

βcell-βcell, αcell-βcell, Other cell or tissue-βcell

➔ Separate the cell from tissue to measuring communication

2) Devices for Measuring the protein and/or small molecules which communicate the cells (1molecule level)

3) Micro Devices for regenerating the tissue from cell

伝統を基礎とし、
革新と創造の
魅力・活力・実力ある
京都大学を目指して

ご静聴、
ありがとう
ございました