

報告番号	甲 第 14063 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Microfluidic Bioreactor Utilizing Three-dimensional
Microchannel for Platelet Production**
(血小板産生のための三次元マイクロ流路を用いたマイクロ流体バイオリアクター)

氏 名 公文 広樹

論 文 内 容 の 要 旨

人工的に血小板製剤を作製することが求められている。血小板産生のために様々なマイクロ流体バイオリアクターが開発されているが、従来のマイクロ流体バイオリアクターでは、血小板産生における流体力の影響を調べるのが困難であった。そこで本研究では、血小板産生に及ぼす流体力の影響を検討するためのマイクロ流体バイオリアクターの設計論を構築し、血小板産生のための小型テストベンチのマイクロ流体バイオリアクターを開発することを目的とした。第2章では、様々な大きさの巨核球(MK)をトラップするために、流路に沿って徐々に高さが減少する湾曲した三次元マイクロ流路を構築する設計論について述べた。ヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)から誘導したMKを用いたオンチップ血小板産生実験を通して、流路の高さに対応した様々なサイズのMKをトラップすることに成功した。第3章では、MKをトラップした後の流速を一定にするために、MKのサイズ分布の確率密度関数を仮定して設計した三次元マイクロ流路を用いたマイクロ流体バイオリアクターについて検討した。また、MKをトラップした後の断面積のばらつきが小さいマイクロ流路を実現した。これらの結果から、提案した方法は、顕微鏡観察による血小板産生メカニズムの理解だけでなく、時間経過データを用いた血小板産生に対する流体効果の評価にも貢献すると結論付けた。第4章では、明視野下で血小板産生を観察できる透明なシクロオレフィンポリマー(COP)製のマイクロ流体バイオリアクターについて述べた。第3章で紹介したマイクロ流体バイオリアクターの100倍のサンプリングレートで、明視野下での血小板産生を観察することに成功した。COPマイクロ流体バイオリアクターは、血小板産生数の評価だけでなく、顕微鏡観察における血小板産生数の観察にも貢献すると考えられ

る。提案したマイクロ流体バイオリアクターは、オンチップ血小板産生を評価するための小型テストベンチとして応用することが可能である。提案した方法は、血小板産生を顕微鏡観察するだけでなく、血小板産生に及ぼす流体効果の評価にも貢献すると結論づけた。本論文の構成は以下のとおりである。

第 1 章では、人工血小板製剤の必要性和オンチップ血小板産生について述べた。増加する輸血需要に対応するためには、献血に依存しない人工血小板製剤が不可欠である。近年、マイクロ流体バイオリアクターは血小板産生の評価用小型テストベンチとして期待されている。マイクロ流体バイオリアクターは、安定した環境、観察性、システム統合性、低サンプル消費などの利点がある。マイクロ流体バイオリアクターは、マイクロ流路に導入された MK をトラップするための微細構造を持つように設計されている。トラップされた MK に流体力を加えるために外部ポンプシステムを使用することで、少量のサンプルを用いて詳細な血小板産生過程を顕微鏡で観察しながら評価することができる。細胞サイズ分布が比較的大きい MK をマイクロ流路に導入すると流路が部分的に詰まるため、マイクロ流体バイオリアクターシステムの構築には、MK のトラップ方法が重要な検討事項になると考えられる。これまで、トラップ法には大きく分けて化学的トラップと機械的トラップが提案された。化学的トラップ法では、von Willebrand Factor (vWF) をマイクロ流路内のマイクロピラー表面に塗布する。vWF のコーティングは、注入された MK を大きな細胞サイズ分布でトラップすることに貢献するが、MK の詰まりだけでなく、産生された血小板の予期せぬトラップが潜在的な制限となる可能性がある。機械的トラップ法では、注入された MK をトラップするためにあらかじめ狭い隙間を持ったマイクロ流路が設計される。この隙間の大きさは、MK をトラップするために導入された MK よりも小さく、産生された血小板をマイクロ流路の出口から回収するために産生された血小板よりも大きく設計されている。MK のサイズ分布が比較的大きいため、ピッチサイズが不連続な均一パターンを有する従来のマイクロ流体バイオリアクターでは、MK を効果的にトラップすることは困難であった。また、同じピッチで設計された配列間隙では流体条件が異なる。マイクロ流体バイオリアクターの設計の重要な課題は、大きなサイズばらつきをもつ MK のトラップとマイクロ流体制御である。本章では、従来のマイクロ流体バイオリアクターの特徴を考慮し、血小板産生のためのマイクロ流体バイオリアクターの設計方法を議論した。

第 2 章では、様々なサイズの MK をトラップするために、流路に沿って徐々に高さが減少する湾曲した三次元マイクロ流路を構築する設計論について提案した。この湾曲した三次元マイクロチャネルは、グレースケールリソグラフィーと深堀エッチング技術を利用して作製した。提案したマイクロ流体バイオリアクターは、ガラス基板でパッケージされているため、血小板産生の過程を蛍光観察することができる。hiPSC から誘導した MK を用いてオンチップ血小板産生実験を行ったところ、流路高さに応じた様々なサイズの MK をトラップすることに成功した。三次元マイクロ流路を用いて、上面と下面の隙間を利用して、導入された MK をトラップすることができた。流路に沿って徐々にギャップが小さくなる

ため、細胞サイズ分布の大きい MK は、細胞サイズの大きい順にトラップされた。三次元マイクロ流路により、MK のトラップと血小板の回収が可能となった。マイクロ流体バイオリアクターでの血小板産生は、トラップした MK から血小板前駆細胞への伸長と、血小板前駆細胞から血小板への断片化の 2 段階からなることを顕微鏡観察により確認した。また、MK のリモデリングと血小板の脱落に寄与する新規化学因子を発見した。湾曲した三次元マイクロ流路を用いたマイクロ流体バイオリアクターは、血小板産生の評価に貢献すると結論付けた。

第 3 章では、MK をトラップした後の流速を一定にするために、細胞のサイズ分布の確率密度関数を仮定して設計した三次元マイクロ流路を用いたマイクロ流体バイオリアクターについて述べた。第 2 章で提案したマイクロ流体バイオリアクターでは、所望の流体条件の実現には課題が残されていた。第 2 章では、MK 導入前の三次元マイクロ流路は、流路に沿った断面積が同じになるように設計されていた。しかし、MK をトラップした後に断面積が部分的に減少し、マイクロ流路の目詰まりが発生した。そのため、MK をトラップした後も同じ断面積を持つマイクロ流路が強く望まれている。しかし、トラップされた MK が断面積に及ぼす影響を考慮した設計論は、これまで議論されてこなかった。そこで、導入された MK の細胞サイズ分布を反映して設計した三次元マイクロ流路を提案した。その結果、MK をトラップした後の流路断面積についてばらつきの小さいマイクロ流路の断面積を実現した。hiPSC 由来の MK を用いたオンチップ血小板産生の結果、圧力を 10, 50, 100, 200 kPa とした場合、1 つの MK あたりの血小板産生数の平均数はそれぞれ 35, 26, 22, 18 PLT/MK であることがわかった。また、産生された血小板の機能として、P-セレクトリン発現、PAC-1 結合、アネキシン V 結合を測定した。これらの結果から、血小板の産生効率について時間と培養コストの観点から考察し、提案したマイクロ流体バイオリアクターで血小板を効率的に産生するには、低圧条件が望ましいことが分かった。これらの結果から、提案した方法は、顕微鏡観察から血小板産生のメカニズムを理解するだけでなく、時間経過データを用いて血小板産生に対する流体効果を評価することにも貢献できると結論づけた。

第 4 章では、明視野下で血小板産生を観察できる透明な COP 製マイクロ流体バイオリアクターについて述べた。培養装置では産生効率が重要なポイントであるが、物理的刺激による血小板産生過程の可視化も血小板産生の形態検討には重要である。そこで、第 3 章では、GFP を発現する MK を用いて、ガラス-Si ガラスの 3 層構造からなるマイクロ流体バイオリアクターでの血小板産生のタイムラプスモニタリングを行った。しかし、血小板産生を詳細に観察することには課題がある。不透明な Si 層があるため透過光で血小板産生の様子を観察することができないため、モニタリングには蛍光観察を行った。MK を蛍光で明確に観察するためには、5 s の露光時間が必要であった。5 s の間に MK の形態が大きく変化したため、断片化した位置を詳細に確認することが困難であった。そのため、血小板の断片化部位の詳細な形状を蛍光観察により高サンプリングレートで観察することは困難であった。物理的刺激による血小板産生のリアルタイム可視化はまだ確立されておらず、最適化され

ていないため、血小板産生の動的形態の研究は乏しい。このような状況から、血小板産生を観察するためには透明なマイクロ流体バイオリアクターが望まれる。そこで、本章では、COP を用いた透明なマイクロ流体バイオリアクターを提案した。測定した COP の引張接着強度を考慮して、三次元マイクロ流路を設計した。提案したマイクロ流体バイオリアクターを用いて明視野下での血小板産生の観察に成功し、血小板前駆細胞の狭い領域で血小板が断片化していることを観察した。hiPSC 由来の MK を用いた血小板産生の結果、ガラス-Si ガラス製のマイクロ流体バイオリアクターと同等であることが確認された。これらの結果から、提案した透明で剛性の高いマイクロ流体バイオリアクターは、オンチップ血小板産生評価のためのテストベンチとして適用できることを確認した。

第5章では、本研究の結論および今後の展望を記述している。本研究では、マイクロ流体バイオリアクターの設計戦略を議論し、血小板産生のための小型テストベンチのマイクロ流体バイオリアクターを開発した。これらの技術は従来困難とされていた血小板産生における流体環境の評価や、血小板産生メカニズムの解明への応用を切り拓くと考えられる。今後、オンチップ血小板産生の技術を基盤として、乱流エネルギーの影響の評価や、シングル MK 解析を行うマイクロ流体バイオリアクターへの発展を行う。