

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	接着性細胞を用いた細胞特異的結合分子探索のためのマイクロ流路デバイス開発
Title(English)	
著者(和文)	神永真帆
Author(English)	Maho Kaminaga
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11185号, 授与年月日:2019年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小俣 透,近藤 科江,初澤 毅,柳田 保子,八木 透,石田 忠
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11185号, Conferred date:2019/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	機械 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	神永 真帆		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	小俣 透	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	石田 忠	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は、「接着性細胞を用いた細胞特異的結合分子探索のためのマイクロ流路デバイス開発」と題し、以下の6章から構成されている。

第1章「序論」では、本論文の研究背景、研究目的を述べる。抗がん剤などの薬の副作用を低減する方法として、がん細胞などの標的細胞のみに薬を集積させることが有効であり、そのために標的細胞に特異的に結合する分子（以下、細胞特異的結合分子）が注目されている。この方法は、標的細胞の表面分子に特徴があれば、様々な臓器の疾患に適用できるが、標的細胞ごとに細胞特異的結合分子を用意する必要があるという問題点がある。そのため、その探索が重要になるが、従来の手作業による探索では、作業能率、探索精度が低く、サンプル消費が多いことが問題点である。そこで、マイクロ流路技術を用いることで、それらが改善できることに着目し、先行研究において、接着細胞を接着させた状態で用いて、非標的細胞に結合する分子を除去することが達成されていないことを明らかにする。従って、これらの条件を満たす細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの開発を本研究の研究目的とする。

第2章「細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの概念設計」では、細胞特異的結合分子の探索をチップ上で実現するためのマイクロ流路デバイスを提案し、その特徴および探索操作を説明する。このデバイスは三つの非標的細胞チャンバと一つの標的細胞チャンバを直列に連結したものである。上流側に配置する非標的細胞チャンバにより非標的細胞結合分子を分子のライブラリから除去し、その残りに含まれる細胞特異的結合分子を標的細胞チャンバで探索する。このための要素技術として、細胞均一播種のためのマイクロピラーアレイ (MPA)、および高さのある流路を切り替えるための平行四辺形断面空圧バルブの概要について述べる。

第3章「細胞均一播種のためのMPAの開発」では、要素技術である細胞均一播種のためのMPAの詳細について説明する。MPAは等間隔に配置されたマイクロピラーから構成され、間隔を適切に設定することにより、ピラー間に細胞が一時的に保持され、やがて解放される。この動作を繰り返すことでランダム流を生成することができる。MPAを配置したチャンバに細胞を流すと、ランダム流により細胞を均一に播種できることを実験的に確認するとともに、細胞の増殖や形態に影響が見られないことを確認した。

第4章「流路切り替えのための空圧バルブの開発」では、流路切り替えのための平行四辺形断面液流路を持つ空圧バルブを提案し、その詳細を説明する。一般的に空圧バルブはバルーン状の空圧流路に空圧を印加し、液流路と空圧流路を隔てる膜を変形させることで液流路を閉鎖する。一般的なプロセスで作製される矩形断面液流路のバルブでは、膜と液流路断面の角に隙間が生じるために液流路を完全に閉鎖することができない。その解決のため、従来はレジストのリフロー

を用いた半円形断面液流路が使用されていたが、リフローを使用すると液流路鋳型全体の形状が変化するために、MPA 構造が変形するという問題がある。そこで、目的部位の断面形状のみを変更できる傾斜露光を用いて、平行四辺形断面の空圧バルブを提案する。液流路断面を平行四辺形とすることで、膜と角の隙間を解消し、流路を完全に閉鎖することが期待できる。このバルブを試作し、高さ 50 μm 、幅 500 μm 、露光傾斜角 60°の液流路と膜厚 40 μm の膜の組合せにおいて、液流路の完全閉鎖と繰り返し開閉ができることを確認した。さらに、最大高さ 350 μm の液流路の完全閉鎖と繰り返し開閉が可能なバルブを提案し試作した。

第 5 章「細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの作製と評価」では、第 2 章で概念を説明した細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの実装と、これを用いた実験について説明する。第 3 章で説明した MPA、および第 4 章で説明した平行四辺形断面空圧バルブを組み込むことにより、デバイスを作製した。HeLa 細胞を非標的細胞、N87 細胞を標的細胞とし、蛍光標識抗体を細胞特異的結合分子および非標的細胞結合分子として、デバイスの性能評価実験を行った。細胞導入時に異種細胞が隣接チャンバに混入しないこと、キャノーラ油により抗体溶液を押し出して非標的細胞を培養した三つの直列チャンバを通過させることにより、非標的細胞に結合する抗体を蛍光測定の検出限界まで除去できること、回収バッファを用いて標的細胞に特異的に結合する抗体を回収できることを確認した。さらに、マイクロ流路デバイスを使用することでサンプルの消費量が約 1/100 になり、制御を行うことにより細胞導入から標的細胞特異的結合分子の回収までの全ステップを自動化できる可能性を示す。

第 6 章「結論」では、本論文をまとめるとともに、今後の課題、展望を述べる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	機械 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	神永 真帆		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	小俣 透	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	石田 忠	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Molecules that specifically bind to target cells have the possibility of realizing highly effective drugs with fewer side effects. To find them, an efficient screening can be expected by using a microfluidic device. Adherent cells used for screening should be adhered to the bottom of the chamber to prevent changes in their surface molecules, which may occur by differences in culture environment. Non-target-cell-binding molecules should be filtered out to prevent side effects. However, a microfluidic device that can fulfill both functions has not been developed. Thus, the purpose of this paper is to develop a microfluidic screening device that can remove non-target cell-binding molecules using adherent cells in adhered state.

The developed microfluidic device has non-target-cell chambers connected in series upstream of the target-cell chamber, which can filter non-target-cell-binding molecules. It also has a cell homogenous seeding structure to increase effective cell area, and a pneumatic valve to switch connecting channels between chambers to avoid contamination between non-target-cells and target-cells. The pneumatic valves can close microchannels with enough depth (50 μm) for cells to pass because it has parallelogram shape cross section.

I conducted experiments to evaluate the device. The experiments used two types of cancer cells and fluorescence-labeled antibodies, that is, N87 cells as the target-cells, HeLa cells as the non-target-cells, anti-HER2 antibodies as the target-cell-specific-binding molecules and anti-Integrin antibodies as the non-target-cell-binding molecules. The device could reduce the non-target-cell-binding antibodies to the detection limit of fluorescence measurement. It could collect the target-cell-specific-binding antibodies bound to target-cell.

The microfluidic device could perform filtering of the non-target-cell binding antibodies, binding of the target-cell-specific-binding antibodies to the target cells, washing of unbound antibodies, and collection of the target-cell-specific-binding antibodies, which are the entire screening processes. Future work is to conduct experiments using libraries to verify the validity of the developed device.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).