

マイクロ流体デバイスを用いた接着性細胞縦断面の高解像度ライブイメージング

High-Resolution Live Imaging of the Vertical Section of Adherent Cells Using a Microfluidic Device

精密工学専攻 5号 荒木誠吾
Seigo Araki

1. 緒言

現在、蛍光を用いた細胞のライブイメージングは、細胞を用いる様々な研究分野で必要不可欠の技術である。通常の培養細胞のイメージングは、ガラス上に平面的に広がった細胞を、倒立型の蛍光顕微鏡で二次元的にイメージングする手法が一般的である。一方、上皮系細胞などの接着性細胞には、細胞間接着や細胞層物質透過など、培養面に対して垂直に分布する構造や動態が多くある。観察面垂直方向の構造の広がりや変化・運動を観察するには、共焦点顕微鏡を代表として、多数の二次元スライス画像から三次元情報を再構築する手法が一般的に用いられている。しかし、原理的に撮像に時間がかかるのに加えて軸方向の分解能が水平方向のそれの約1/2倍程度であるため、縦断面像の解像度は極めて低くなるという課題がある⁽¹⁾。

現在、細胞を用いる様々な研究分野の発展に向けた、細胞培養や遺伝子解析などを効率的に行うマイクロ流体デバイスの研究開発が盛んに行われている⁽²⁾。本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて接着性細胞の縦断面を高解像度でイメージングする手法の開発を目的とする。簡便かつ解像度が高い縦断面観察技術を開発することで、細胞動態の新たな発見を促し、細胞生物学をはじめ医学、薬学などの研究分野の発展に貢献することを研究の意義とする。

2. 提案手法の概要

2.1. 原理

本研究では、顕微鏡の高性能化に労力を注ぐのではなく、観察対象である細胞培養面の向きを変えることで縦断面像を取得する手法を取る。具体的には、マイクロ流路内の側面に接着させた細胞を、倒立型の顕微鏡で観察することで縦断面を観察する (Fig. 1a)。この手法によって、ガラス底面に接着した細胞を観察する場合と同様に、1回のスキャンで縦断面の撮像が可能になり、撮像時間が大幅に短縮する。また、水平方向の分解能で撮像できるため、空間解像度が向上する (Fig. 1b)。

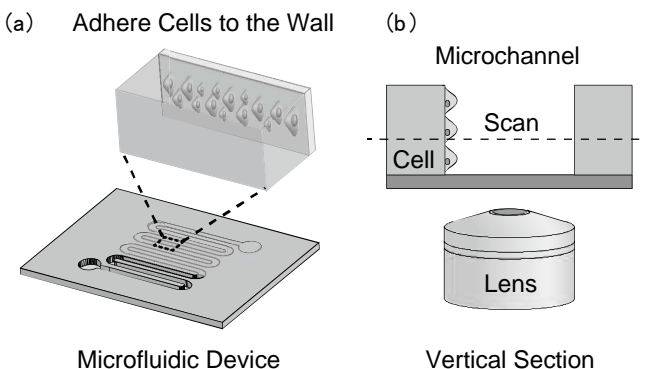


Fig. 1 (a) Conceptual illustration of the microfluidic device for the live imaging of the vertical section of adherent cells. (b) Vertical section of the microchannel to show the principle of imaging.

2.2. マイクロ流体デバイスの作製

ソフトリソグラフィ（樹脂への鋳型転写技術）によってデバイスを作製した。最初に光硬化性の厚膜フォトレジスト (SU-8 25) をシリコンウェハにスピコートした (Fig. 2a)。次に、設計した流路がデザインされたフォトマスクを通して UV 光を露光し (Fig. 2b)、有機系溶剤で感光していない余分なレジストを除去し流路形状の鋳型を作製した。 (Fig. 2c)。シリコーンゴム (PDMS) を鋳型に流し込み、硬化後に離型することで流路を転写した。流路を適当なサイズにカットして (Fig. 2d) 親水化処理を行い、カバーガラスと結合させた。本研究では、凹型の溝構造を持ち上側が開放状態にある開流路デバイス、および流路がガラスと PDMS によって閉じられた閉流路デバイス 2 種類を作製し、イメージングへの有効性を比較検討した。閉流路デバイスは、流路の端に貫通穴を設けた後にガラスと結合した (Fig. 2e)。実験に用いた開流路デバイスは、流路深さが約 50 μm 、流路幅が 30 から 70 μm まで 10 μm きざみのものを作製した。閉流路デバイスは流路幅が 7 mm、高さが約 60 μm のものを作製した。

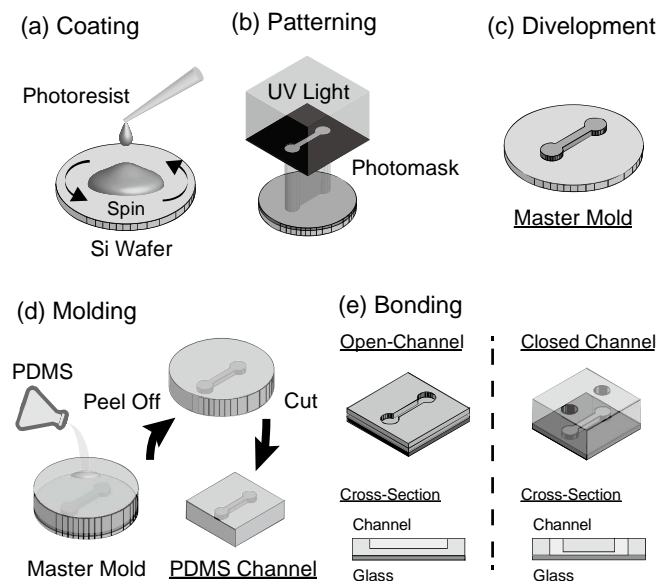


Fig. 2 Fabrication process of the microfluidic device.

2.3. 実験方法

最初に、作製したデバイスに細胞接着を促すために糖タンパク質であるフィブロネクチンをデバイス表面にコートした。コート後、細胞を培地で希釈して濃度を調整した細胞懸濁液をデバイスに封入し細胞を播種した。細胞は、上皮細胞のモデルとしてよく使われる、イヌ腎臓尿管上皮細胞 (MDCK Cell) を用いた。細胞播種後、必要に応じて 1~4 日間培養した。このとき、開流路デバイスは地面と水平方向に置いて培養、閉流路デバイスは地面に対し垂直に立てて培養した。培養後、各実験で細胞核の染色や、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したチューブリン遺伝子の導入による微小

管の可視化処理等を施した後、培地を緩衝液に置換し蛍光観察した。また、デバイス内細胞の極性発達を確認する実験では、細胞を固定し免疫染色により細胞核の染色および密着結合（タイトジャンクション）を構成するタンパク質の一つである ZO-1 を免疫染色した後、観察した。また、密着結合のライブイメージングの目的で、GFP を融合したクロロドイン（密着結合の構成要素）を定常発現させた MDCK 細胞株を構築し、それを用いた。蛍光顕微鏡観察は、全て共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-700, Carl Zeiss または FV-3000, Olympus) で行った。

2.4. 解像度の評価方法

本研究では、取得像に Sobel filter という画像処理を行い、取得像の解像度評価指標値を算出した。この画像処理は、隣接するピクセル間の輝度値の勾配を二次元的に算出するもので、エッジ検出等によく使われる。Fig. 3a はアクチン繊維の低解像度の画像（上図）と高解像度の画像（下図）である。画像がボケているほどピクセル間の輝度値の勾配は小さく、コントラストがはっきりしているほどピクセル間の輝度勾配が大きくなる。よって、処理後の画像では、低解像度に比べ高解像度の画像の方が明るいピクセルが多くなる (Fig. 3b)。本研究では、解像度の評価指標として、Sobel filter 処理後の画像の輝度値の平均値を用いた。デバイス上細胞縦断面像の値をガラス上細胞の水平断面像の値、および再構成縦断面像の値と比較することで解像度を評価した。本研究で行った解像度評価はすべて 10 個の MDCK 細胞内の微小管の蛍光像を Sobel Filter で画像処理をし、それらの平均値を用いた。また、撮影条件の違いから生じる誤差を防ぐため、すべての実験においてレーザー光強度や撮影のゲイン値、対物レンズの種類および拡大倍率、画像処理範囲を統一して撮像した。

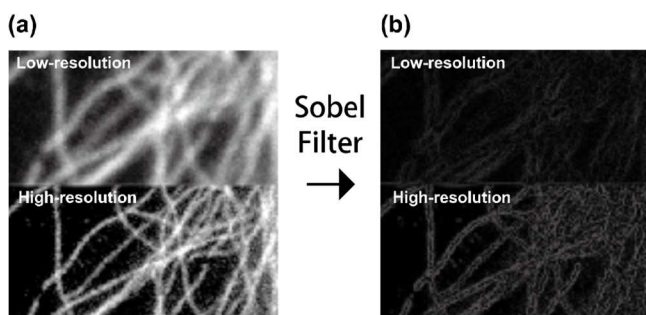


Fig. 3 (a) Example of high and low-resolution fluorescent images of the cell fibers. (b) Images processed with the Sobel filter.

3. 開流路デバイスを用いた縦断面観察実験

3.1. 実験の概要

凹型溝構造の流路を持つ開流路デバイスは、デバイス上面に取り付けた円形チャンバーを細胞懸濁液で満たすことで、細胞をデバイス表面に播種し培養することができる。これは、ディッシュを用いた一般的な細胞培養法と同様の手順であり、また細胞内小器官の染色等、細胞観察までに必要な工程も従来の手法を適用することができるため、適切な播種密度や培地量を従来プロトコルの延長として決定することができる。また、デバイスの作製も容易である。よって閉流路のデバイスに比べ、縦断面観察を簡便に行うことが可能である。本研究では、最初に開流路デバイスを用いて縦断面観察を行った。また、2.4 節に記した手法でデバイス内細胞の縦断面像の解像度を評価した。

一方、開流路デバイスは、一般的な観察系と異なりカバーガラスと観察対象の細胞との間に PDMS 層が存在する。一般的なカバーガラスの屈折率は約 1.5 程度であるのに対し PDMS のそれは約 1.4 程度であり、収差が生じて解像度が低下する恐れがある。そのため、PDMS 層が縦断面イメージングの解像度に及ぼす影響の大きさを検証した。

3.2. 結果と考察

3.2.1. 縦断面像の解像度評価

Fig. 4 に、ガラス上で培養した細胞の水平断面像(a)、多数水平スライス像より再構成した縦断面像(b)、および開流路デバイスの縦断面像(c)の代表例を示す。開流路デバイスを用いた縦断面の撮像では (Fig. 4c)、ガラス上細胞の水平断面像 (Fig. 4a) と同様に、微小管の繊維構造を極めて明瞭に確認することができた。また、解像度評価した結果、開流路デバイスにおける縦断面解像度指標は、水平断面像に比べ約 0.76 倍の値であるものの、再構成縦断面像に比べ 1.37 倍と良い成績を示した (Fig. 5)。再構成断面は、10~20 枚の画像を取得するのに 5~10 分を要したが、Fig. 4(c)の画像は 1 スキャン (30 秒程度) で取得できており、本デバイスを用いることで時間的に高い解像度で縦断面観察ができることが確認された。

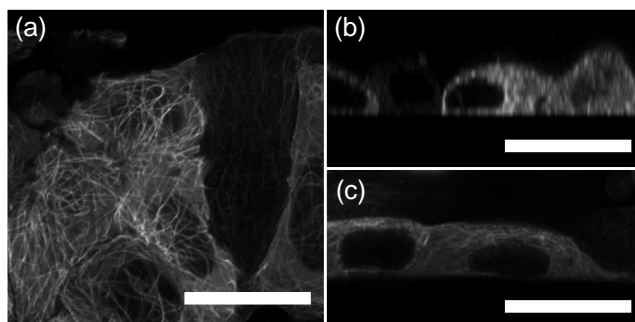


Fig. 4 (a) Horizontal image of cells grown on a glass slide. (b) Reconstructed vertical section image. (c) Vertical section of cells grown on the vertical sidewall of the open-channel device. All scale bars represent 20 μm .

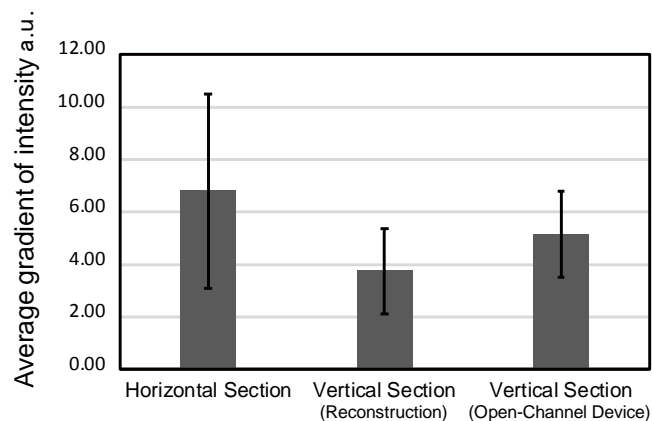


Fig. 5 Resolution of microtubules imaging of cells grown on a regular coverglass and in the open-channel device.

3.2.2. PDMS による解像度への影響

細胞をカバーガラス上および様々な厚さで PDMS コートしたガラス上に接着させたものを観察し、PDMS の存在が細胞イメージングの解像度に与える影響を調べた。観察系を

Fig. 6a に記す. ガラス上の細胞は微小管の繊維構造が極めて明瞭に確認できた (Fig. 6b). また, PDMS 層が薄い場合も微小管の繊維構造を確認することができた (Fig. 6c~e). しかし, PDMS 層が厚い場合, 微小管の繊維構造がぼやけてしまい, 確認することができなかつた (Fig. 6 f-h). 次に, 各 PDMS 厚さについて, 2.4 節の方法で解像度指標の定量評価を行った (Fig. 7) ところ, PDMS が厚いほど輝度値の勾配の平均値は小さくなる傾向を確認した. PDMS 層の厚さが 40~50 μm 程度になると, カバーガラス上の指標値の約 1/2 倍になることがわかった. この結果より, 屈折率がガラスと異なる PDMS 層が厚くなるほど, 解像度が低下することが示された.

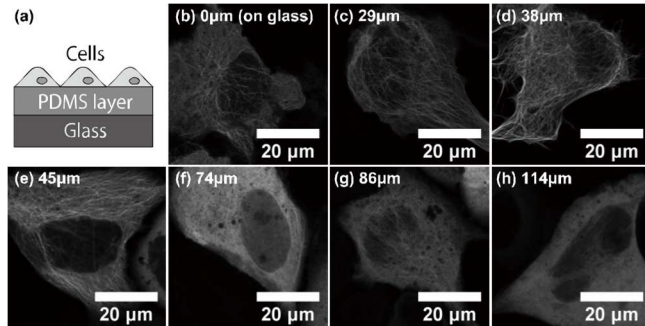


Fig.6 (a) Schematic of the experimental system. (b)~(h) Fluorescent imaging of microtubules of MDCK cells on a coverglass and on PDMS-coated glasses with various PDMS thicknesses.

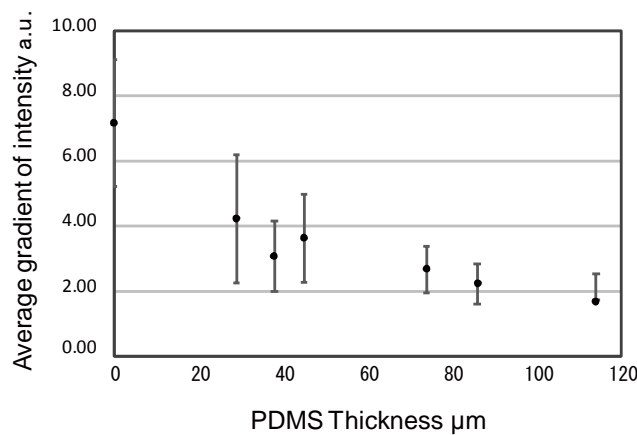


Fig. 7 Effect of PDMS layer thickness on imaging resolution.

4. 閉流路デバイスを用いた縦断面観察実験

4.1. 実験の概要

ガラスと細胞の間に PDMS 層を挟まない系での高解像度縦断面観察を目的として, 閉流路デバイスを用いた縦断面観察を行った. 一般的に, 狭い閉流路内では細胞への培地供給が不十分になり, 細胞は死んでしまうので一般的な培養をすることができない. 幅や高さが 10 ~ 100 μm の狭い流路を持つデバイスでの培養を行うには, ポンプなどを用いて培地を供給する必要があり煩雑である⁽³⁾.

本研究では, ポンプなどを必要としない閉流路内での簡便な培養の可否を判断する目的として, 通常ガラス上で培養したときの細胞増殖率と, 1000 ~ 5000 μm の広い流路を持つデバイス内で培養したときの細胞増殖率を比較した. そして流路幅を 7 mm に拡張したデバイスを用いて, 節 2.4 に記した手法により流路側面に接着する細胞の縦断面像の解像度

を評価した.

最終的に, 提案手法の応用例として, 閉流路デバイスを用いた MDCK 細胞のタイトジャンクション (密着結合装置, 以下 TJ と表記する) を構成するタンパク質のイメージングを行った. 動物の表皮や胃腸管を構成する上皮細胞の細胞間には, TJ と呼ばれる, 複数のタンパク質から成る強い結合が存在し, 体内への物質の侵入や漏出を防止し, かつ制御している (Fig. 8a)^(4,5). TJ は上皮細胞の頂端側に局在し, 隣り合う細胞膜がところどころで密着させている. また, この構造の横側には, TJ ストランドと呼ばれる紐状の構造が細胞同士を縫い付けるように存在している (Fig. 8b). 以上の構造は, 細胞を固定し縦方向にスライスしたものを電子顕微鏡で観察することにより明らかとなったが, この方法ではその動態や機能を生きた細胞内でライブイメージングすることはできない. 本研究では, 流体デバイスを用いてこれらの構造をライブ観察することができるかを検討した.

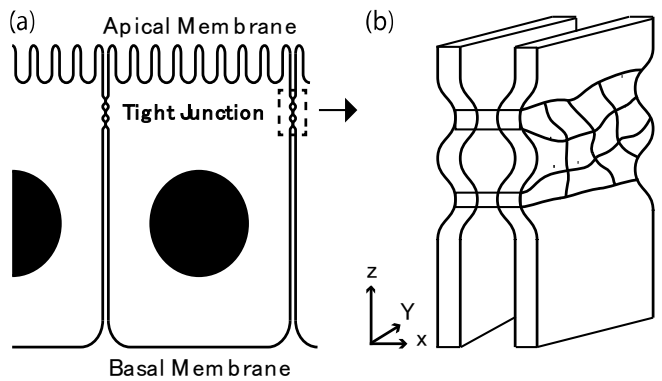


Fig. 8 Schematics of (a) the tight junction and (b) close-up view of the tight-junction.

4.2. 結果と考察

4.2.1. 閉流路デバイス内の細胞増殖率

各系の細胞数の増加率を Fig. 9 に記す. ガラス上の細胞では, 二日目では初日の 1.70 倍, 三日目では 3.29 倍に増加した. 閉流路デバイスでもほぼ同様に, 今回検証したすべての流路内で細胞培養を行うことができた. この結果より, ミリスケールの流路幅を持つデバイスでは, ガラス上と同様の増殖率で培養することが可能であると判断した. 以降の実験では, さらに流路内に細胞を多く入れるために流路幅を 7 mm のものを用いた.

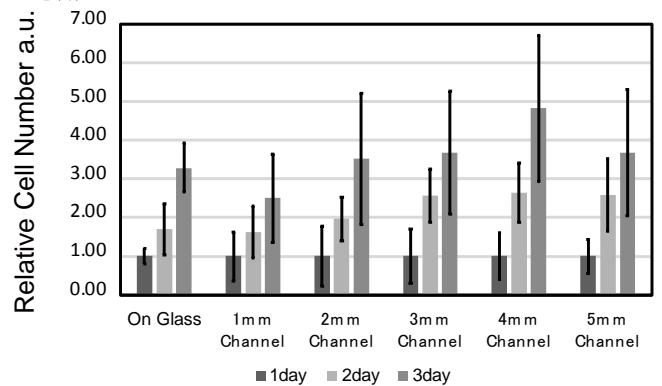


Fig. 9 Relative density of cells cultured on a coverglass and in a closed channel devices.

4.2.2. 解像度評価

Fig. 10 に, ガラス上細胞の水平断面像(a), 再構成縦断面像(b)

および閉流路デバイスで取得した縦断面像(c)を示す。閉流路デバイスを用いた場合、縦断面における微小管の繊維構造を、ガラス上の細胞の水平断面像と同様に極めて明瞭に確認することができた。また節 2.4 に記した方法で解像度評価した結果、閉流路デバイスを用いた場合の解像度指標は水平断面像に比べ約 0.96 倍でほぼ等しく、再構成縦断面像に比べ 1.74 倍の好成績であった(Fig. 11)。このことから、ガラス上細胞の水平断面像と同等の高解像度で縦断面観察が可能であることを確認した。

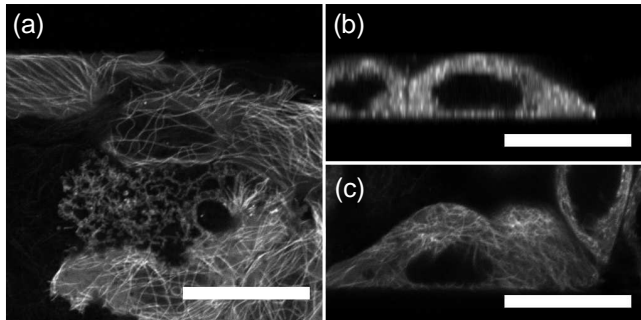


Fig. 10 (a)The horizontal image on glass (b)The reconstructed vertical section image (c)The vertical section on a closed channel device. All scale bars represent 20 μm .

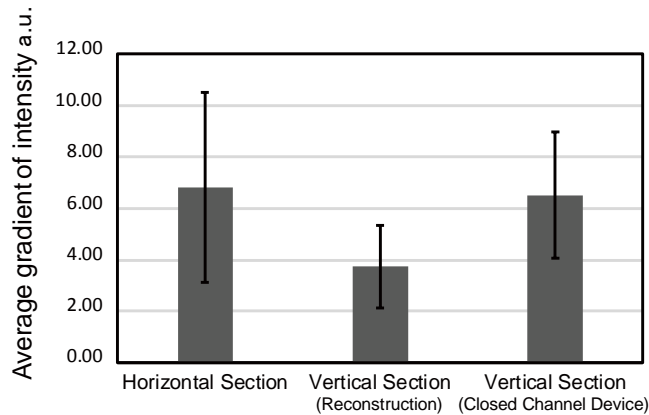


Fig. 11 The resolution of cells in a closed channel device.

4.2.3. タイトジャンクションのイメージング

タイトジャンクションの構成タンパクであるクローディンを観察した。流路側壁に接着する細胞の縦断面観察を行った結果、細胞の輪郭を明瞭に観察することができた。また細胞上部に局所的に蛍光が強くなっている TJ らしき構造を確認できた(Fig. 12)。

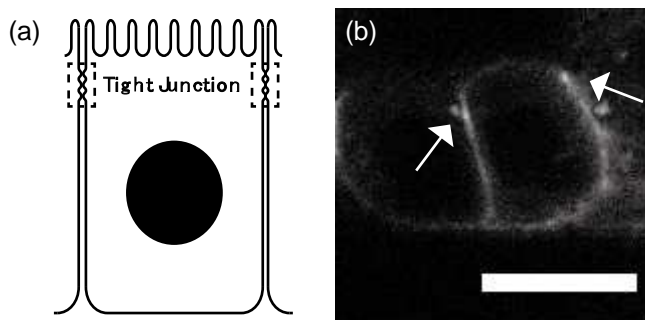


Fig. 12 (a) Schematic of the tight junction. (b) Cross sectional image of MDCK cells grown on the sidewall. Claudin4 protein localized at the tight junction can be seen as a bright spot between cells. Scale bar represents 10 μm .

また、ガラス面に接着する細胞と流路の側壁に接着する細胞との間を水平断面観察した結果、クローディンによって網目上の TJ ストランドのような構造が形成されている様子が確認できた (Fig.13)。

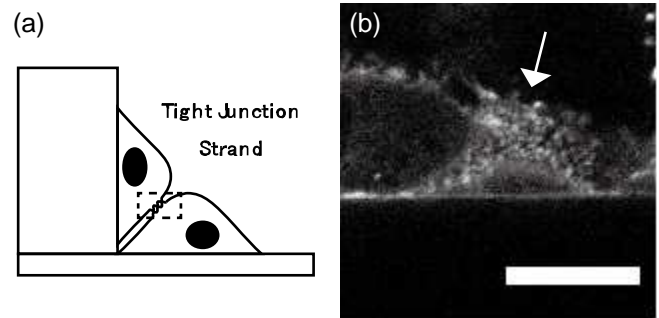


Fig. 13 Close-up view of the tight junction on the horizontal section of MDCK cells. (a) Schematic and (b) actual image. Scale bar represents 10 μm .

5. 結言

開流路デバイスを用いた実験では、通常の培養手法と同じ簡便な方法で、共焦点顕微鏡による再構成縦断面像よりも解像度が向上した縦断面像を 1 スキャンで得ることに成功した。また、本研究手法において、細胞とレンズ間に存在する、デバイス材料としての屈折率の異なる物質が、最小限となることが望ましいことを確認した。

閉流路デバイスを用いた実験では、カバーガラスと対象物の間に余分な物質が存在しないため、更に解像度の高い縦断面像の取得が可能であることを確認した。そして MDCK 細胞側面からのタイトジャンクション構造の高解像度ライブイメージングを可能にしたことで、本研究手法の更なる有用性を示した。

本研究で試作・検討した 2 種類のデバイスの特徴を比較すると、簡便さにおいては開流路に優位性があり、解像度においては閉流路に優位性がある。閉流路デバイスでは、従来の縦断面観察手法である共焦点顕微鏡の再構成手法に比べ、輝度分布の微分値で定義した指標において約 1.7 倍の解像度の向上がみられた。

本研究では、シンプルな構造のマイクロデバイスを用い、細胞の培養面垂直方向の構造や動態解析への適用可能性を示した。マイクロデバイス以外は、新たな設備投資なく既存の顕微鏡設備で使用できるため、細胞生物学を専門とする研究開発者の利用が期待される。

参考文献

- (1) R. Thuenauer et al., Four-dimensional live imaging of apical biosynthetic trafficking reveals a post-Golgi sorting role of apical endosomal intermediates, *PNAS*, 111(2014), pp. 4127-4132.
- (2) E. K. Sackmann et al., The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature*, **507** (2014), pp.181-189.
- (3) M. M. Grafton et al., Breast on-a-chip: mimicry of the channeling system of the breast for development of theranostics, *Integrative Biology*, **3** (2011), pp.451-459.
- (4)久保亮治, 皮膚表皮が持つバリア構造と機能からみたアレルギー疾患治療戦略, *薬学雑誌*, 134-5 (2014), pp. 623-627.
- (5)古瀬幹夫, タイトジャンクションの分子構築と機能, *生化学* 78 巻 7 号 (2006), pp. 601-608.