

Title	人工的にがんの微小環境を再現するマイクロ流体細胞培養デバイスの開発
Sub Title	Development of a microfluidic cell culture device that artificially mimics cancer microenvironment
Author	塚田, 孝祐(Tsukada, Kosuke)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本年度は腫瘍微小環境を再現するための細胞培養用マイクロ流体デバイスの作製を行った。またその実用実験に先行して腫瘍内への薬物動態に関する数値シミュレーションを行い、それぞれ以下の成果を得た。</p> <p>まず、腫瘍微小環境に存在する低分子化合物の濃度をマイクロ流体デバイス内で自在に制御するために、細胞培養層に化学勾配を形成する機構を考案し、シミュレーションと実測から有効性を実証した。具体的には、有限要素法を用いた移流拡散シミュレーションから培養層および培地流路の形状を決定した。高い生体適合性を有するPDMSポリマーを用いて培養装置を作製し、蛍光色素を灌流することで実際の化学濃度勾配を定量した。さらに、流路長と液体流量を変化させることで自在な化学濃度勾配を形成することに成功した。さらに、培養層に腫瘍細胞を播種し、生細胞率の定量から装置の有効性を実証した。</p> <p>次に、マイクロ流体デバイスを用いた細胞実験に先駆けて、腫瘍への薬物動態に関する数値シミュレーションを行った。運動性細菌は腫瘍に浸透する特徴を有するため、細菌を薬物送達媒体として利用することが期待されている。特に、治療用細菌と従来の化学療法の組み合わせは劇的に高い抗腫瘍効果をもたらす可能性があるが、その相乗効果のメカニズムは不明のままである。そこで、マイクロ流体デバイスを用いた化学濃度勾配負荷によって併用療法の相乗効果のメカニズムを理解する。まず、腫瘍におけるC. novyi-NTと化学療法剤の同時送達を数学的にモデル化した。ドキソルビシン濃度の計算値が実験文献一致することを確認した。またDoxilとC. novyi-NTの組み合わせによる腫瘍内のドキソルビシン濃度の計算値はDoxil単独の場合の2倍以上であった。この濃度上昇は細菌のタンパク質分解活性による細胞外マトリックスの分解によるものであることが示唆された。</p> <p>We fabricated a microfluidic device for cell culture to reproduce the tumor microenvironment. Prior to the practical experiments, we performed simulations on pharmacokinetics into tumors and obtained the following results.</p> <p>In order to control the concentration of chemicals in the tumor microenvironment, we designed a device that forms a chemical gradient in the cell culture layer, and demonstrated its effectiveness through simulations and measurements. The shapes of the culture layer and the medium channels were determined using advection-diffusion simulation using the finite element method. A culture device was prepared using PDMS polymer with high biocompatibility, and the concentration gradient was quantified by perfusing a fluorescent dye in the device. In addition, a flexible chemical concentration gradient was successfully formed by changing the flow path length and liquid flow rate. Tumor cells were seeded in the culture layer, and the quantification of the viable cell rate showed the effectiveness of the device.</p> <p>Next, we simulated the pharmacokinetics of tumor-environmental tumors prior to cell experiments using microfluidic devices. Motile bacteria are one of the candidate drug delivery vehicles because they can penetrate tumors. The combination of therapeutic bacteria and chemotherapy may have dramatically higher antitumor effects, but the mechanism of their synergistic effect has been unknown. Chemical concentration gradients using microfluidic devices may elucidate the mechanisms of the synergistic effect. Co-delivery of C. novyi-NT and chemotherapeutic agents in tumors was mathematically modeled. The concentration of doxorubicin in the tumor caused by the combination of Doxil and C. novyi-NT was more than twice that of Doxil alone. These results suggested that the degradation of extracellular matrix by the proteolytic activity of bacteria contributed to the increased concentration.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000009-20190401

研究代表者	所属	理工学部	職名	准教授	補助額	1,200 千円
	氏名	塚田 孝祐	氏名（英語）	Kosuke Tsukada		
研究課題（日本語）						
人工的ながんの微小環境を再現するマイクロ流体細胞培養デバイスの開発						
研究課題（英訳）						
Development of a microfluidic cell culture device that artificially mimics cancer microenvironment						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
塚田 孝祐 (Kosuke Tsukada)		理工学部・物理情報工学科・准教授				
山本 雄広 (Takehiro Yamamoto)		医学部・医化学教室・講師				
梶村 眞弓 (Mayumi Kajimura)		医学部・生物学教室・教授				
白井 宏明 (Hiroaki Shirai)		理工学部・物理情報工学科・准訪問研究員				
1. 研究成果実績の概要						
<p>本年度は腫瘍微小環境を再現するための細胞培養用マイクロ流体デバイスの作製を行った。またその実用実験に先行して腫瘍内への薬物動態に関する数値シミュレーションを行い、それぞれ以下の成果を得た。</p> <p>まず、腫瘍微小環境に存在する低分子化合物の濃度をマイクロ流体デバイス内で自在に制御するために、細胞培養層に化学勾配を形成する機構を考案し、シミュレーションと実測から有効性を実証した。具体的には、有限要素法を用いた移流拡散シミュレーションから培養層および培地流路の形状を決定した。高い生体適合性を有するPDMSポリマーを用いて培養装置を作製し、蛍光色素を灌流することで実際の化学濃度勾配を定量した。さらに、流路長と液体流量を変化させることで自在な化学濃度勾配を形成することに成功した。さらに、培養層に腫瘍細胞を播種し、生細胞率の定量から装置の有効性を実証した。</p> <p>次に、マイクロ流体デバイスを用いた細胞実験に先駆けて、腫瘍への薬物動態に関する数値シミュレーションを行った。運動性細菌は腫瘍に浸透する特徴を有するため、細菌を薬物送達媒体として利用することが期待されている。特に、治療用細菌と従来の化学療法との組み合わせは劇的に高い抗腫瘍効果をもたらす可能性があるが、その相乗効果のメカニズムは不明のままである。そこで、マイクロ流体デバイスを用いた化学濃度勾配負荷によって併用療法の相乗効果のメカニズムを理解する。まず、腫瘍におけるC. novyi-NTと化学療法剤の同時送達を数学的にモデル化した。ドキソルビシン濃度の計算値が実験文献一致することを確認した。またDoxilとC. novyi-NTの組み合わせによる腫瘍内のドキソルビシン濃度の計算値はDoxil単独の場合の2倍以上であった。この濃度上昇は細菌のタンパク質分解活性による細胞外マトリックスの分解によるものであることが示唆された。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>We fabricated a microfluidic device for cell culture to reproduce the tumor microenvironment. Prior to the practical experiments, we performed simulations on pharmacokinetics into tumors and obtained the following results.</p> <p>In order to control the concentration of chemicals in the tumor microenvironment, we designed a device that forms a chemical gradient in the cell culture layer, and demonstrated its effectiveness through simulations and measurements. The shapes of the culture layer and the medium channels were determined using advection-diffusion simulation using the finite element method. A culture device was prepared using PDMS polymer with high biocompatibility, and the concentration gradient was quantified by perfusing a fluorescent dye in the device. In addition, a flexible chemical concentration gradient was successfully formed by changing the flow path length and liquid flow rate. Tumor cells were seeded in the culture layer, and the quantification of the viable cell rate showed the effectiveness of the device.</p> <p>Next, we simulated the pharmacokinetics of tumor-environmental tumors prior to cell experiments using microfluidic devices. Motile bacteria are one of the candidate drug delivery vehicles because they can penetrate tumors. The combination of therapeutic bacteria and chemotherapy may have dramatically higher antitumor effects, but the mechanism of their synergistic effect has been unknown. Chemical concentration gradients using microfluidic devices may elucidate the mechanisms of the synergistic effect. Co-delivery of C. novyi-NT and chemotherapeutic agents in tumors was mathematically modeled. The concentration of doxorubicin in the tumor caused by the combination of Doxil and C. novyi-NT was more than twice that of Doxil alone. These results suggested that the degradation of extracellular matrix by the proteolytic activity of bacteria contributed to the increased concentration.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Shirai, H., and Tsukada K.	Bacterial proteolytic activity improves drug delivery in tumors in a size, pharmacokinetic, and binding affinity dependent manner - A mechanistic understanding	J. Control. Release	in press			
Shirai, H., and Tsukada K.	Mathematical modeling of simultaneous penetration of liposomal doxorubicin and Clostridium in tumors - Implications for combination therapy.	Biomedical Engineering Society Annual Meeting Annual Meeting 2019	2019-10			