

論文内容の要旨

博士論文題目

Guidance of axon outgrowth activated by femtosecond laser processing in a microfluidic device

(マイクロデバイスのフェムト秒レーザー加工によって制御された神経細胞の軸索伸長誘導)

氏名 Dian Anggraini

(論文内容の要旨)

The study of guided axon outgrowth is essential in neuroscience, both in vitro and in vivo. Femtosecond (fs) laser is a tool that allows precise guided axon outgrowth and axonal integration due to its spatiotemporal resolution, low heat production, and less collateral tissue damage. In addition, the incorporation of the microfluidic device has also been reported can increase the effectiveness and reliability of observation. In this dissertation, the research aims to develop a precise and real-time fs laser penetration on a 4 μm thick thin-glass sheet to allow guided axon outgrowth of neurons by molecular gradients in a microfluidic device.

In Chapter 2, it demonstrated the methods for guided axon outgrowth by molecular gradients generated from laser-fabricated micro-holes. The microfluidic device was fabricated to provide the introduction of an axon guidance molecule (i.e., netrin-1) and the embedded of a culture substrate (i.e., a 4 μm thin-glass sheet) penetrated by fs laser pulses. Simulation and experimental characterization of gradient generation were conducted to profile the generated molecular gradient through the micro-holes. The hippocampal neurons were cultured on the microfluidic device. An amplified femtosecond laser pulse was focused and irradiated the thin-glass sheet through a 10x objective lens (NA. 0.25) to fabricate the micro-holes to release the netrin-1. The repetition rate and pulse energy density of the fs laser were 1 kHz and 5.3 J/cm², respectively. Afterward, time-lapse imaging was performed to investigate continuous guided axon outgrowth towards the fabricated micro-holes.

In Chapter3, the neurons were manipulated by irradiating the thin-glass sheet to fabricate the micro-holes in one area in the center of the thin-glass sheet. The netrin-1 gradient was generated on the microfluidic device, affecting axon elongation and axon outgrowth. Higher axon outgrowth rate and guided axon outgrowth towards the micro-holes were observed. Guided axon outgrowth was indicated as a positive turn of axon

before and after laser processing.

In Chapter 4, to realize precise guided axon outgrowth on the scaffold, the fabrication of micro-holes in the multiple areas of the thin-glass sheet by fs laser pulses was performed. This experiment enabled the spatial control to induce guided axon outgrowth towards varied locations. Similar to one-area scheme, guided axon outgrowth towards each micro-hole with higher axon outgrowth rate was shown. These phenomena were significantly higher than control group. Finally, axons' responses, such as guided time, guided length, and axon outgrowth rate, were also dependent on the distance to the micro-holes.

Chapter 5 gave the analysis after single-cell manipulation is indispensable to gather cellular and subcellular information at a single-cell level. In this study, we conducted selective sorting of immortalized megakaryocyte progenitor cell lines (imMKCLs) and myoblast cell lines (C2C12) by fs laser scanning.

Chapter 6 summarized that a system integrating femtosecond laser and microfluidic device could achieve guided axon outgrowth of neurons with precise, non-invasive, and real-time actuation. In addition, femtosecond laser scanning allowed a short processing time with a high success rate of cell detachment and sorting. The laser scanning had a negligible effect on the behavior of the sorted cells.

氏名	Dian Anggraini
----	----------------

(論文審査結果の要旨)

本研究は、高い時空間分解能を有するフェムト秒レーザー操作技術と超薄板ガラスの特性を組み合わせ、マイクロ流体デバイス中に、局所的な誘導試薬の勾配を能動的に形成させることによって、生きた神経細胞の伸長する方向を誘導する技術を開発したものであり、下記のような成果を得た。

動物などの神経系統を構成する神経細胞は軸索と呼ばれる突起を伸ばし、互いにつながりあうことで神経回路を形成するため、複雑な組織の中でいかに軸索を正確な標的細胞・場所へ誘導するかが重要な課題となる。これまでの技術では、事前に用意したマイクロ流体デバイスや、マイクロスケールのパターン、または直接の細胞操作を用いて、上記の軸索誘導を実現しているが、治療現場・脳組織などで想定とされる、任意配置にある多様な神経細胞に合わせて低侵襲で能動的に軸索を誘導できる技術は存在しない。本研究は任意配置にある細胞の周辺に能動的に誘導試薬の濃度勾配を形成し、任意方向への軸索誘導の実現を目標にしている。

本提案手法では、まず、高い時空間分解能と低熱拡散作用を特徴とするフェムト秒レーザーを用いて、誘導試薬と神経細胞の間にある厚さ 4 μm 超薄板ガラスにマイクロスケールの貫通穴 (< 10 μm) を開けた。開けられた微小な穴から試薬が細胞側に拡散し、細胞の周囲に試薬の濃度勾配ができ、その濃度勾配により軸索を誘導することに成功した。

さらに、加工されたマイクロスケールの穴のサイズ、数、と加工場所から神経細胞の軸索の伸長誘導への影響を調査した。結果として、複数の穴の加工条件において、誘導実施時間、誘導された距離、軸索伸長率などの軸索の応答から、穴のサイズ、数、加工場所から細胞への距離に依存することがわかった。よって、本手法により軸索誘導を制御することが可能であることを実証した。

さらに、他の神経細胞と異なる挙動を行う細胞の特異性を分析・原因究明するため、フェムト秒 (fs) レーザーの描画加工による、不要な細胞を破壊し、目標細胞のみ残す・増殖が可能な指定接着細胞の無侵襲な単離と増殖技術を開発した。

上記のとおり、本論文には、マイクロ流体デバイス中に、局所的な誘導試薬勾配を能動的に形成し、任意配置にある目標神経細胞の任意方向への軸索誘導で

きるレーザー加工システムの原理検証、設計と開発に成功し、異なる共同する細胞の特異性を分析できる細胞の無侵襲な単離と増殖技術も実証できた結果が示されている。本システムを利用することによって、創薬、疾病治療、生命科学研究の質や効率の向上が期待される。その成果は、学術的に新しい知見を見出していると判断され、審査委員一同は、本論文が博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。