OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Design and Dynamics of a Valve-based Microfluidic Platform for Single Cell Secretion Analysis Applied to Immunotherapy Response Monitoring
Author(s)	Briones, Campos Jonathan
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82264
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （BRIONES JONATHAN CAMPOS）	
Title	Design and Dynamics of a Valve-based Microfluidic Platform for Single Cell Secretion Analysis Applied to Immunotherapy Response Monitoring (免疫療法応答モニタリングに適用される単一細胞分泌解析のための、バルブベースのマイクロ流体プラットフォームの設計とダイナミクス)

Abstract of Thesis

This study presents a detailed discussion on the design and fabrication of a high-throughput microfluidic device for single cell secretion analysis and its application to immunotherapy response monitoring. A potential biomarker in predicting the efficacy of immunotherapies like checkpoint inhibitors is granzyme B (GrB). This protease is an essential cytotoxic effector in cancer immunotherapy and monitoring this could help determine a patient's clinical response to treatment that can lead to better treatment strategies. However, in biomedical research, most reports on GrB quantification make use of bulk samples in conventional approaches and analyses that are not enough to extract deeper information on cells as variations in protease secretions and cell subsets with overexpression are masked with the stochastic average. The lack of reports on single cell analysis is mainly due to the absence of a simple assay platform for single-cell measurement that can do long term monitoring and on-demand media exchange for repeated measurements of individual cells, post-treatment. This served as our motivation to development of new single cell analytic tool.

Microfluidic technology has provided miniaturized devices with fast isolation speeds, high efficiency, and precision of liquid manipulation that conventional bench-top approaches can't perform. Microfluidic assays using patient derived cells can provide information on targeted immunotherapeutic approaches as it can be designed to test the immunotherapy efficacy. In single cell enzymatic activity assay that aims to quantify extracellular protein secretions like GrB, a valve-based platform that is capable of compartmentalization, on-demand media exchanges for washing and reagent introduction, and real-time monitoring is best suited. However, the throughput of this technique is limited by the number of available compartments that can be sealed by actuated valves below critical pressure.

This work explored the design, modeling, and optimization of the valving system of the microfluidic platform to achieve a high-throughput single cell compartmentalization as applied to single-cell enzymatic assay. Higher throughput devices give a better representation of the sample population and is suited for single cell analysis experiments that investigate heterogeneities to identify unique cell subsets from thousands of cells. Design modeling through COMSOL Multiphysics was utilized to determine the circular microvalve's optimized parameters, achievable within the device's constraints. Multiphysical modeling results demonstrated the relationships of geometry, valve dimensions, and sealing pressure, which were applied in the fabrication of a microfluidic device comprising of up to 5000 hydrodynamic traps and corresponding microvalves. Larger valve radius was found to result to lower sealing pressure. A step or bell like shape valve was found to have less von Mises stress and shear stress values, implying a more durable structure. Using oil as actuation media was found to have lower sealing pressure as compared to air. Comparing the effects of geometry, actuation media and fabrication technique, a sealing pressure as low as 0.04 MPa was achieved.

The optimized chip was then applied to model cells and human PBMC samples from healthy donors and lung cancer patients, including anti-PD-1 antibody-treated patients. Immunostaining, a standard cell study tool, and other optical imaging analysis were successfully demonstrated in the fabricated device as well as it's applicability in immunotherapy response monitoring. GrB expression from the model cells was found to be markedly different. NK-92 cells were found to have higher GrB activity than the GrB-transduced Jurkat cells. THP-1 was found to have relatively no significant activity. A marked increase in GrB expression was also observed in anti-PD-1 treated lung cancer patient sample in comparison to PBMC from a healthy donor. TCR+ Ig-G4+ PBMC cells were found to have high activity which signifies a clear response to PD-1 blockade. Meanwhile, a significant decrease in GrB activity was found PD1+CD3+CD8+ or PD1 expressing T-cells which signifies dysfunction or a state of T-cell exhaustion.

With this study, it is expected that the developed microfluidic chip can aid in the understanding of immune cell activity, cancer immunotherapy efficacy, treatment personalization, and drug discovery.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（BRIONES, JONATHAN CAMPOS）	
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	藤田 克昌
	副 査　教授	関谷 毅
	副 査　教授	竹内 俊文（神戸大学大学院工学研究科）
	副 査　准教授	石飛 秀和

論文審査の結果の要旨

本論文では、生物の基本単位である細胞を１細胞レベルで操作及び解析するための１細胞解析デバイスとして、とくに単一細胞から分泌される活性因子を分析解析するためのマイクロ流体プラットフォームを設計・作製し、免疫細胞の機能・ダイナミクス解析さらには臨床応用へと展開したものである。以下にそれらの結果をまとめる。

(1) 単一細胞分泌因子分析用のハイスループット解析デバイスを実現するため、バルブベースのチャンバーアレイシステムの設計、モデリング、およびそれらの最適化を行っている。マルチフィジックスモデリングソフトウェアを利用して、バルブベースのマイクロチャンバー駆動のダイナミクスを評価するため、形状、作動媒体、および製造技術の影響を評価した結果、0.04 MPa の低いシール圧力要件を達成でき、デバイス設計パラメータを決定している。これをもとに、微細加工技術を駆使し、単一細胞の分離が可能な 5000 個のマイクロチャンバーを備えたハイスループットプラットフォームとしてのチップデバイスを作製している。

(2) 抗腫瘍細胞活性物質として免疫における重要な機能性分子として知られているグランザイム B を用い、作製したデバイスを用いてリンパ球モデルを用いたプロファイリングを行うことで、デバイス性能の実証を行っている。捕捉した１細胞を表面マーカーにて同定・識別するとともに、バルブ機能によって閉鎖空間を作り出すことで単一細胞のグランザイム B 発現を定量可能であることを実証している。さらに、均一と思われるモデル細胞においてもサンプル集団内やサンプル集団間のグランザイム B 発現に不均一性がある可能性を見いだしている。

(3) 作製したチップデバイスの臨床応用も実施している。医学部の協力のもと、健康な患者と肺がん患者ドナーからのヒト血液サンプルのグランザイム活性を比較している。患者サンプルにおいて、PD-1 ブロックした TCR(+)IgG4(+)細胞においてグランザイム B 発現プロファイルの増加（活性化）が見られたことや、PD-1 発現免疫細胞においてグランザイム発現プロファイルの減少（免疫細胞の疲弊）がみられたことなど、特定の免疫チェックポイント阻害治療に対する患者の反応を 1 細胞レベルで示すことを可能にしている。これらの情報が免疫療法のモニタリングと評価に資する可能性があることを示している。

以上のように、本論文は、工学をベースに、生化学、医学と広範囲な分野をカバーし、一細胞解析のための新たな分析デバイスとしてのみならず、癌免疫療法の反応モニタリングなど新たな可能性を示したもので、関連する応用物理学研究に貢献するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。