

細胞配向制御のための表面微細構造の役割

The Role of Surface Micro Structures for Cells Orientation

○ 日野 遥 (工学院大) 橋本 成広 (工学院大)

Haruka HINO, Shigehiro HASHIMOTO, Kogakuin University

Abstract: The effect of micro ridges on orientation of cultured cells has been studied *in vitro*. Several patterns of micro ridges have been fabricated on a transparent polydimethylsiloxane disk with the photo lithography technique. The ridges consist of several lines of rectangular column: width of $0.3 \mu\text{m}$, interval of $0.5 \mu\text{m}$. Variation has been made on the height of the ridge between $0.3 \mu\text{m}$ and $3.0 \mu\text{m}$. C2C12 (mouse myoblast cell line originated with cross-striated muscle of C3H mouse) was cultured on the disk with the micro ridges for one week and was observed with an inverted phase contrast microscope. The experimental results show that cells adsorb on the top of the ridge and align to the longitudinal direction of the micro ridges.

Key Words: Cell Culture, C2C12, Lithography, Micro Ridge and Polydimethylsiloxane.

1. 緒言

細胞培養技術の発展は著しく、再生医療の現場において、更なる発展に期待がもたれている。細胞は増殖、移動、配向、分化と様々な性質を有しており、それらの性質は外環境の影響を受けて促進、抑制され変化することが知られている。細胞の性質を変化させる要因として、培養基板の形状変化が挙げられる。細胞と培養表面は直に接触し合い密接であることから、培養表面は細胞挙動に常に影響を及ぼしている。近年、様々な形状を持つ基盤を作成し、その上で細胞培養を行うことで、細胞の挙動に変化を与える実験が行われている。又、方向性のあるパターン構造を付与した基板上での培養細胞は、パターン方向に配向するという実験結果も報告されている。しかし、細胞のサイズに焦点を絞ると、細胞よりも大きな構造を付与した実験が多く、細胞単体での挙動は不明瞭である。本研究では、細胞単体よりも小さな構造を付与したマイクロ構造を基板に付与し、細胞単体での挙動を調査した。

2. 実験方法

マイクロ構造を付与した培養基板を作成し、その上で培養を行うことで、細胞の配向に対する微小構造の役割を調査した。微小構造の形状は複数の線を並べて配置し、凸部幅 $5 \mu\text{m}$ 、凹部幅 $5 \mu\text{m}$ として設計し、高さをパラメーターとし、微小構造の高さによる細胞への影響を調査した。

2-1 培養基板の作成

細胞培養用基板の作成はフォトリソグラフィ技術を用いた。ポジティブ型のレジスト剤を塗布した Si ウェハ基板上にレーザー直接描画装置を用いて微小パターンを付与し、現像、エッチングを施して Si ウェハを異方的に掘り込む。

本研究では生体適合材料であり透明性を有する PDMS (poly-di-methyl-siloxane) に作成した基板の型を用いて転写を行い、それぞれ高さは $0.3 \mu\text{m} \sim 3.0 \mu\text{m}$ の微小構造を持つ細胞培養基板を作成した。

2-2 培養表面処理

PDMS は細胞適合性を持ち、透明性が高いことから染色を用いない、観察を行いながらの培養を行うことが可能であるが、表面のぬれ性は低く細胞培養に不向きである。

酸素プラズマエッチングによる表面改質は、細胞接着に適したぬれ性の高い表面へと改質が可能である。本研究では作成した PDMS 製培養基板酸素プラズマエッチングを施し

細胞培養に適した表面への改質を行った。

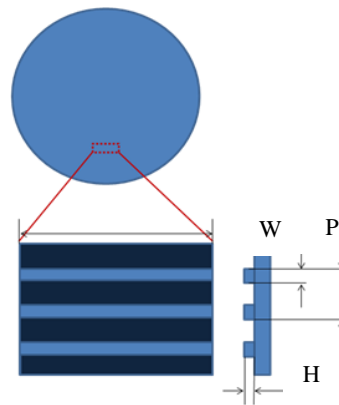


Fig. 1 Typical location of ridges

2-3 培養

作成した微小構造基板を 6-well プレートに入れ、細胞を播種した。細胞は C2C12 (マウス横紋筋由来筋芽細胞) を用い、培養液は、DMEM (Dalbecco's Modified Eagle Medium) にウシ血清と抗生物質を添加し用いた。培養液の交換は 2 日に 1 度行った。基板上部・近辺の観察には位相差顕微鏡を用い、培養は 37°C 、 CO_2 インキュベーター内で行われた。

3. 結果および考察

細胞と微小構造方向との関係を調べるために、位相差顕微鏡より取得した画像を画像解析ソフト Image-J を用いて細胞の長軸方向と微小構造の成す角を測定した。

細胞が基板に接着し伸展する課程において、細胞が微小構造を認識して自身の方向を変化させていくが、高さ $1.5 \mu\text{m}$ の微小構造上では明らかに向きをパターン方向に向けている細胞とパターンに関係なく伸展をしている細胞が見られる。これは $1.5 \mu\text{m}$ の高さが細胞が微小構造を認識できる高さに近いことを示唆している。又、細胞の接着に関して、細胞の核に近い幅まで変形をして微小構造の溝に落ち込み向きを変えるような接着方法と、微小構造山をまたぐように接着し、細胞質が溝を感知して細胞の向きを変える方法の 2 種類の存在することが示唆された。 $3.5 \mu\text{m}$ 高さを持つ微小構造は細胞の向きを確実にそろえることができるが、細胞が微小構造を認識して方向を変えているとは

言えないため、配向制御方法としては今後の検討が必要である。

謝辞

文部科学省戦略的研究拠点形式支援事業（工学院大学FMS）の支援を受けた。

参考文献

[1] S. Hashimoto, F. Sato, R. Uemura and A. Nakajima, “Effect of Pulsatile Electric Field on Cultured Muscle Cells in Vitro”, *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 10, No. 1, 2012, pp. 1-6.

[2] S. Hashimoto and K. Tachibana, “Effect of Magnetic Field on Adhesion of Muscle Cells to Culture Plate”, *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol. 11, No. 4, 2013, pp. 7-12.

[3] S. Hashimoto and M. Okada, “Orientation of Cells Cultured in Vortex Flow with Swinging Plate in Vitro”, *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 9, No. 3, 2011, pp. 1-7.

[4] S. Hashimoto, H. Hino and T. Iwagawa, “Effect of Excess Gravitational Force on Cultured Myotubes in Vitro”, *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol. 11, No. 3, 2013, pp. 50-57.

[5] T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “Cell Sheet Engineering for Myocardial Tissue Reconstruction”, *Biomaterials*, Vol. 24, No. 13, 2003, pp. 2309-2316.