

細胞配向のための市松マイクロパターンの作製

Ichimatsu Micro Pattern Manufacture for Orientation of the Cell

○ 杉本健太（工学院大） 高橋優輔（工学院大） 日野遥（工学院大） 橋本成広（工学院大）

Kenta SUGIMOTO, Kogakuin University
Yusuke TAKAHASHI, Kogakuin University
Haruka HINO, Kogakuin University
Shigehiro HASHIMOTO, Kogakuin University

Abstract: The effect of the pattern of micro ridges on orientation of the cell culture has been studied in vitro. Ichimatsu pattern has been designed with micro quadrangular prisms in the square area of 1 mm × 1 mm on a disk of glass for a scaffold by the photolithography technique. C2C12 (mouse myoblast cell line) was used in the test. Cells were seeded on the micro pattern. The cells were observed with a microscope. The experimental results show that the orientation of myoblast can be controlled by the aspect ratio of the Ichimatsu pattern of the surface of the scaffold.

Key Words: Orientation, Regenerative Medicine, Photolithography, C2C12

1. 緒言

再生医療とはこれまで治療が困難であった疾患や病気に対して、細胞を用いて組織を再生させる治療のことである。細胞の配向は再生医療に役立てられる可能性がある。また、配向はバイオアクチュエータの収縮力の増強にも役立てられると考えられる。これまで様々な方法を用いて細胞の配向を促す研究がされてきた。しかし多くの研究では細胞に刺激を与え、多少なりともダメージを与えてしまうという欠点があった。細胞に損傷を与えずに配向させる手段として、マイクロパターン上で培養する方法がある。マイクロパターン上で培養を行い、細胞の配向を制御する研究も数多く行われているが、細胞が配向するための適切な寸法や形状はいまだに明らかになっていない。また、それらの研究の多くが、細胞の大きさに対するマイクロパターンの大きさが無限大となる直線的なパターンであった⁽¹⁾⁽²⁾。本研究では細胞に対するパターンの大きさが重要であると考え、従来とは異なる市松模様のマイクロパターンを用いることで、細胞の配向の性質が明らかになるのではないかと考えた。

2. 実験方法

培養基板に市松模様のマイクロパターンを作製し、細胞を培養する。同一培養基板上に同じパターンを9個作製した。培養基板はφ35 テンボックスガラスで、PDMS (polydimethylsiloxane) のリングで培養面積を限定した。PDMS リングの外形はφ35 であり、内径はφ20 である。細胞培養期間は24時間とし、その時の細胞の向きを画像解析により算出し、評価を行った。評価はパターンなしのエリアとアスペクト比の異なるパターン3つの計4つをそれぞれ比較して行った。

2.1 マイクロパターン作成方法

市松模様のマイクロパターンは1mm×1mm の範囲の中に異なる4つの条件で作製した。それぞれ500μm×500μm に4分割し、パターンなしのエリア、パターンの縦×横が10μm×5μm のエリア、10μm×8μm のエリア、10μm×10μm のエリアとした (Fig. 1)。

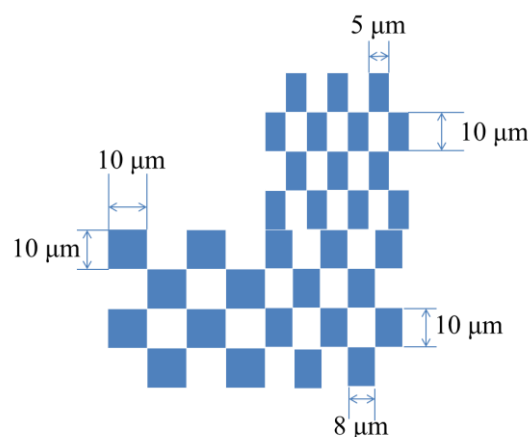


Fig. 1 Model of the micro pattern

マイクロパターンの作製にはフォトリソグラフィートクニックを用いた。まず、テンボックスガラスにSU-8 2を塗布し、スピニングにより均一化する。均一化された状態でベイクを行い、SU-8を硬化させる。その後、あらかじめ用意しておいた市松状のパターンがエッチングされたマスクを使い、マスクアライナーにてUVライトを照射する。再びベイクを行い、架橋反応を起こし、現像を行うことによってパターンが作製される。

実際に作製したパターンのレーザー顕微鏡での撮影画像を示す (Fig. 2)。マイクロパターンには確かな凹凸が存在し、その高さはおおよそ1μmほどである。

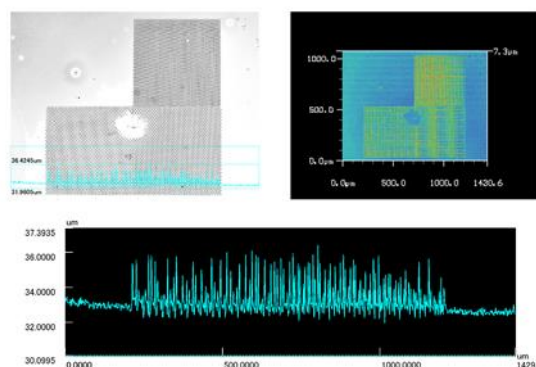


Fig. 2 Image of the micro pattern by laser microscope

2.2 細胞培養

細胞は C2C12(マウス横紋筋由来筋芽細胞)を使用した。播種密度は 2000cells/cm² で培地は D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) に 10% の FBS (fetal bovine serum), 1% の penicillin/streptomycin を添加したものをを使用した。培養基板は 37°C で 5% の CO₂ 環境のインキュベータ内で培養した。培養は 24 時間行い，その後固定・脱水処理を行った。固定・脱水にはパラフォルムアルデヒドと，エタノールを使用した。まず 20 分間パラフォルムアルデヒドに浸すことで細胞を固定した。パラフォルムアルデヒドを取り除いた後はエタノールにより脱水を行った。エタノールの濃度は 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99.5% と徐々に上げていき，それぞれ 5 分間培養面に浸し，取り除くことで脱水した。これらの処理を行うことで培養状態とほとんど変わらない状態で位相差型以外での顕微鏡観察も行うことができる。従来の細胞観察に適した倒立型位相差顕微鏡ではマイクロパターンの凹凸が細胞を観察しにくくすることがある。そこで今回は画像解析が行いやすいようにマイクログラフにより観察を行った。倒立型顕微鏡の使用を避けることで上から直接細胞を見ることができ，細胞の輪郭が分かりやすくなる (Fig. 3, Fig. 4)。

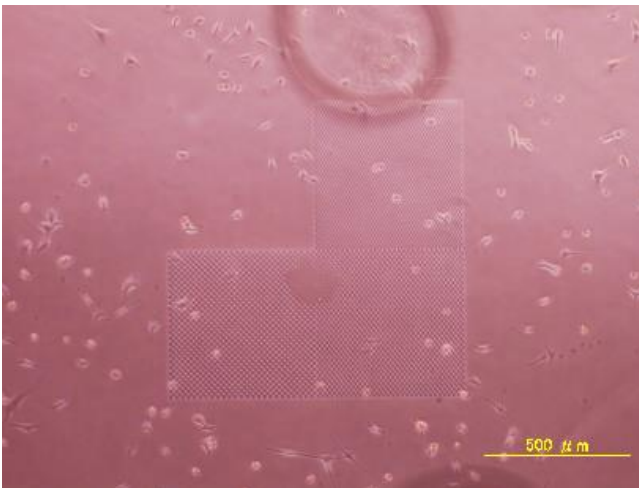


Fig. 3 Image of the phase contrast microscope



Fig. 4 Image of the microscope

2.3 解析方法

画像解析ソフト Image J を用いて解析を行った。画像上

の細胞を手動で囲っていき，自動で算出された角度を配向角とした。配向角は水平方向を 0° と定義した。さらに，評価の際には 90°~180° の方向を向いた細胞は 180° で引いた値の絶対値を使用した。細胞を囲う際にルールを設けた。1 つ目はサイズの異なるパターンをまたいでいる細胞やパターン上とパターンなしのエリアをまたいでいる細胞は囲わないこととした。また，別の細胞と接触している細胞も囲わないこととした。これらの細胞はマイクロパターン以外の影響を受けている可能性があるため除外した。実際に細胞を囲った画像を示す (Fig. 5)。

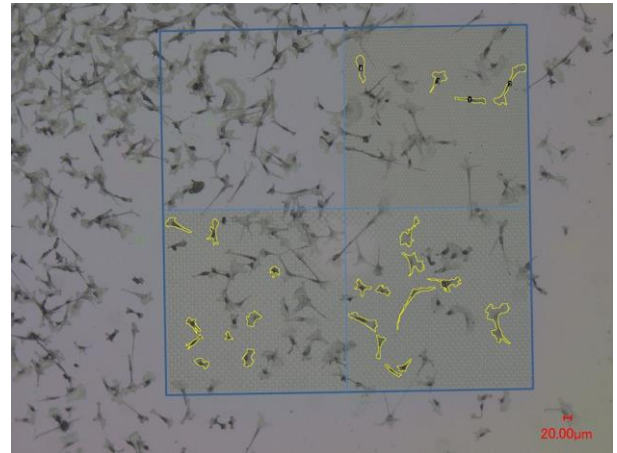


Fig. 5 Image of the analysis by image J

2.4 配向予測

配向の角度は事前に予測を行った。C2C12 はマイクロパターンの凸部に接着すると考えた。そのため各パターンの arctan 値に依存すると考えられる。つまりパターンの縦×横が 10μm×5μm のエリアでは 63.4°，10μm×8μm のエリアでは 51.3°，10μm×10μm のエリアでは 45° に配向することが予測できる (Fig. 6)。

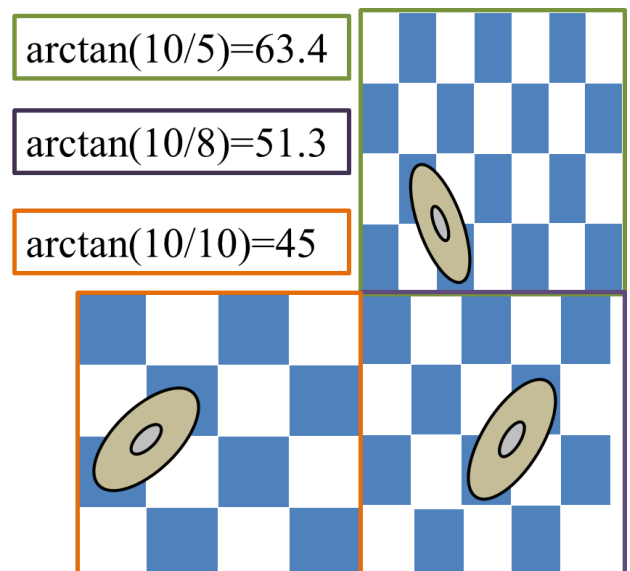


Fig. 6 Expected orientation angle

3. 結果

画像解析の結果，8μm のエリアと 10μm のエリアでは配向性が見られた。数値としては配向予測角度の前後 15° の中におよそ 50% ほどの細胞が存在した。しかし，5μm の部分では配向性が見られなかった。

4. 考察

8 μm のエリアと 10 μm のエリアでは予測した値付近に細胞が多く存在した．そのため配向の傾向があるといえる．今回は 5 μm のエリアでは配向が見られない結果となった．このことから市松形状ではパターンが細かいと配向を示さない可能性がある．精度の良いデータを出すためにはさらに実験回数を重ねていく必要がある．

5. 結言

本研究では市松模様のマイクロパターンを作製し，細胞の培養を行った．播種から 24 時間後の細胞を観察し，画像解析を行ったところ，パターンごとに配向の有無や角度に違いが見られた．ただし，今後は信頼性を上げるために引き続き実験を行うべきである．

参考文献

- (1) SUN JianGuo, TANG Jian & DING JianDong, Cell orientation on a stripe-micropatterned surface, Chinese Science Bulletin, vol. 54, No. 18 pp. 3154-3159, 2009.
- (2) Haruka HINO, Shigehiro HASHIMOTO, and Fumihiko SATO, Effect of Micro Ridges on Orientation of Cultured Cell, Proc. 18th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol. 2, pp. 138-143, 2014.