



Title	ニワトリ胚線維芽細胞のマイクロピットアレイにおける増殖挙動
Author(s)	谷, 和俊; Tani, Kazutoshi; 菊池, 裕子 他
Citation	日本ヘモレオロジー学会誌, 5(2), 57-61
Issue Date	2002
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/28014
Type	journal article
File Information	Hemorheology5-2-57.pdf



ニワトリ胚線維芽細胞のマイクロピットアレイにおける増殖挙動

谷和俊¹⁾、菊池裕子²⁾、菊池佑二³⁾、久保木芳徳¹⁾

¹⁾ 北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻口腔健康学講座

²⁾ 北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻口腔病態学講座

³⁾ 独立行政法人食品総合研究所マイクロチャネルアレイ工学チーム

【要約】

コラーゲンコートしたマイクロピットアレイを用いて、ニワトリ胚線維芽細胞を培養したところ、これまでの骨髄間質細胞とは反対に、ピット内ではなく、ピットを仕切る壁の上面で増殖がより速くなることが観察された。さらに細胞は壁の長軸方向に配列することが見られた。この配列はコンタクトガイダンスによるものとは異なることが推定された。ピットサイズが 200 x 200 μm 、仕切壁幅が 80 μm のマイクロピットアレイを用いた時、ピット内の細胞数が最小となり、仕切壁上の細胞数が最大となった。これらの結果から線維芽細胞と骨髄間質細胞とはそれぞれ足場依存性が異なることが示唆された。

緒言

組織を構成する細胞は、細胞外マトリックス (ECM: Extracellular Matrices) に接着してはじめて生存が可能である¹⁾。近年の細胞生物学的研究は、ECM の物理化学的性状および幾何学的形状が細胞の分化・増殖の制御に重要な役割を果たし、それによって組織の形態形成とその維持が行われることを明らかにしてきた^{2), 3)}。また、その制御の機序、すなわち、ECM の情報がどのように核に伝わり遺伝子発現を制御するののかに関して、現在活発に研究が進められている。さらに、*in vivo* においては、細胞自身が ECM を合成・分泌し足場を確保するという相互関係が存在する。

組織工学は細胞を培養し組織を人為的に再生することを目指している。そこでは、生分解性高分子により形成された足場の中に細胞を注入し、生体内に埋め込む方法が活発に試みられている。それによって、細胞が分泌した ECM が主役を演ずる一部の支持組織の再生には目覚ましい成果を挙げてきている。しかし、細胞が主役を演ずる実質組織の再生には未だ程遠いのが現実である。ECM と細胞の関係のさらなる詳細な解明と、それに基づいた足場の構築によって、種類の異なる細胞の共培養系を確立していくことが求められている。

その中で注目されるのが、Singhvi ら⁴⁾ および Chen ら⁵⁾ によるフォトリソグラフィを用いた接着分子のパターニングである。それによって彼らは

細胞の形態と生存を人為的に制御することに成功した。しかし、そこでのパターニングは平面的なものに限られたため、立体的なパターニング法の開発が求められてきた。

われわれは、立体的なパターニング法の一つとして、フォトリソグラフィとエッチングの手法でシリコン基板表面に微細加工された空間を ECM 蛋白質コラーゲンでコーティングする方法を検討した。最も単純な空間構造としてマイクロピットアレイを加工し、ラット骨髄間質細胞を培養した結果、細胞がピットを認識してピット内に入り、その中で増殖率を高めることを見出した^{6), 7)}。さらに、稠密型マイクロピットアレイと蛍光染色観察を導入して、そのマイクロピット効果をより明瞭に確認した^{8), 9)}。

本研究はマイクロピットアレイを加工した基板上でニワトリ胚線維芽細胞 (CEFs: Chicken Embryo Fibroblasts) を培養し、その挙動が骨髄間質細胞と同様かどうかを検討した。

方法

【マイクロピットアレイ】今回使用したマイクロピットアレイは、我々が最初に製作したピット内の総面積とピット外の総面積が等しいタイプのもので、前回使用した稠密型のものである。ピットは一辺の長さが 25, 50, 100, 200, 400 μm の正方形で、その深さは 10 μm である。シリコン単結晶基板表面をドライエッチングで 8 μm 、続いてウェットエッチン

1) 〒060-0813 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

2) 〒060-0813 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

3) 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 1-2-12

グで残り 2 μm をエッチングすることにより作製した。

各チップ (12 x 12 mm 角) 内では同一サイズのピットとした。ピット間の幅、すなわち、フェンス幅を 10、20 μm としたものが稠密型であり、ピットの一边の 0.4 倍をフェンス幅にしたものがピット内の総面積とピット外の総面積が等しくなるタイプである。前者を、例えばピットの一边の長さが 100 μm でフェンス幅が 10 μm のものを T100-10 と表し、後者を E100 と表した。また、対照として表面を何も加工していない同じ大きさのシリコン単結晶基板 (Plain) を用意した。なお、E シリーズはピットサイズ 600 x 600 μm のものも作製したので今回も使用した。

【ECM コラーゲンコーティング】マイクロピットアレイ基板及び平板 (Plain) を、オートクレーブ可能なカップに入れて滅菌し、その容器内で無菌的操作により 0.1% コラーゲン (Cellmatrix IA type、新田ゼラチン) を含む氷冷 0.1 M 酢酸溶液に 30 分間漬けてコラーゲンコーティングした。

【細胞の調製】ニワトリ受精卵 9 日目の胚から切り出した心臓をメスで細切し、PBS で余分な赤血球などを取り除いた後、細胞片を 0.1% トリプシン-PBS で処理し、その細胞浮遊液を遠心分離 (1,000 rpm、5 分間、4°C) して得られた沈殿物に培養液を加え、細胞破片の除去、単細胞の分離のため 150 ステンレスメッシュによりろ過した。ろ過したものを 10% FBS 添加 Minimum Essential Medium Alpha Medium (GIBCO BRL) により 5×10^5 個/ml になるように希釈後、10 ml を 90 mm 口径培養ディッシュに入れて、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C) 中で培養した。この細胞 (CEF) の継代 3 代目 (P₃) をトリプシン-EDTA (Sigma 1X solution : 2 分) 処理により剥がし培養液中に 5×10^5 cells/ml の濃度で浮遊させた。

【シリコンチップ上での細胞培養】チップを載せるスぺーサーディスクをオートクレーブで滅菌後 35 mm 口径の培養用ディッシュ内にあらかじめセットした。このスぺーサーディスクはチップ上の細胞を作動距離の短い対物レンズを用いてもそのまま顕微鏡観察できるようにするためのものである。

コラーゲンコーティングしたチップ 4 枚 (マイクロピットアレイ 3 枚及び平板 1 枚) を pH 7.0 の PBS 及び培養液でリンス後 35 mm 口径の培養用ディ

ッシュ内のスぺーサーディスク上に置いた。細胞懸濁液 (5×10^5 cells/ml) 2 ml を各ディッシュ内に加え、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C) で 2 日間培養し、P₄ 細胞とした。

【アクリジンオレンジ染色】培養 2 日目に培養ディッシュ内の培養液に最終濃度 1.8 μM (0.53 ppm) となるようにアクリジンオレンジ (Research Organics Inc. Ohio) 溶液 100 μl を加えることにより細胞を蛍光染色し、チップ内の細胞の分布を金属蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【蛍光観察】蛍光顕微鏡 (Nikon, OPTIPHOT) を用いて B 励起でチップ上のランダムに選んだ 5 ヶ所を観察した。それぞれカラー CCD カメラ (Hitachi KP-C550) で撮影した画像をビデオプリンター (Mitsubishi Color Video Copy Processor CP710A) で印刷し細胞数を計数した。以上の実験方法の概要を図 1 に示した。

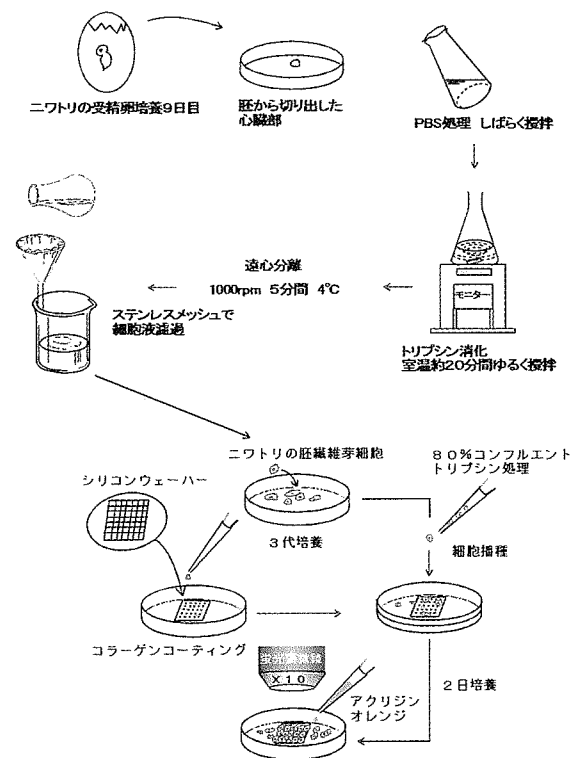


図 1. 実験の概要

結果

それぞれのピットサイズのアレイ上で培養した P₄ の CEFs 細胞を明視野観察及び蛍光観察した画像を図 2 から図 5 に示した。

前回行ったラット骨髄間質細胞では細胞はピット

内に集まり増殖したが（マイクロピット効果）、今回用いた CEFs ではピット内よりもピット間を仕切る仕切壁上でより良く増殖した。しかも、仕切壁上での細胞は長軸方向に沿って配列していることが観察された。

しかし、その様子は仕切壁幅が 10 μm では確認できず（図 2）、幅が 20 μm で少し兆しが見え始める程度であった（図 3）。コントロールの平滑なチップとの比較では、細胞総数は少なく、低い増殖率となった。E シリーズで仕切壁幅が 40 μm 以上になると上記の傾向は顕著になった。特に一辺のピットサイ

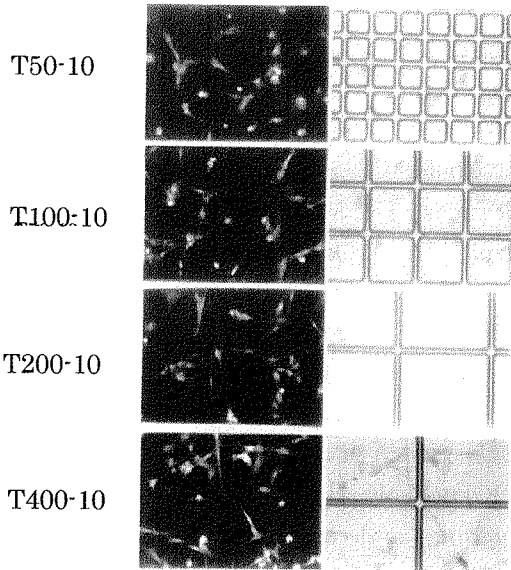


図 2. 仕切壁幅 10 μm のマイクロピットアレイ上での培養細胞 (P4)

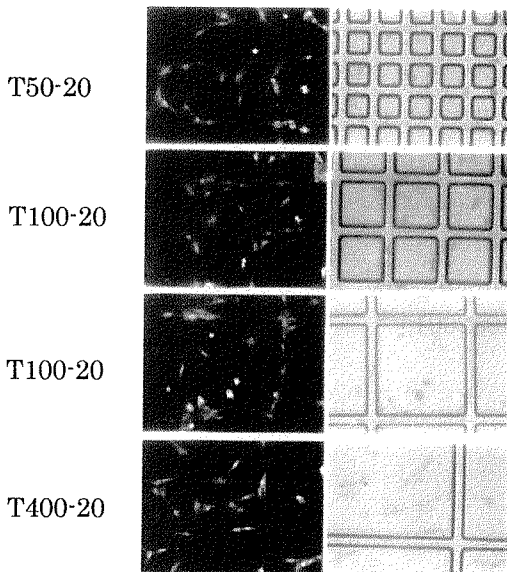


図 3. 仕切壁幅 20 μm のマイクロピットアレイ上の培養細胞 (P4)

ズが 200 μm のときに仕切壁上で細胞の増殖が最も速くなることがみられた（図 5）。また、E シリーズではピット内の細胞数が少ないにもかかわらずチップ上での細胞数は表面を何も加工していないコントロールの平板 (Plain) と比較しても多くなった（図 5）。しかし、E シリーズでも 1 辺のピットサイズが 600 μm になると細胞総数や配列方向そしてピット内外に Plain との差は見られなくなった（図 5）。

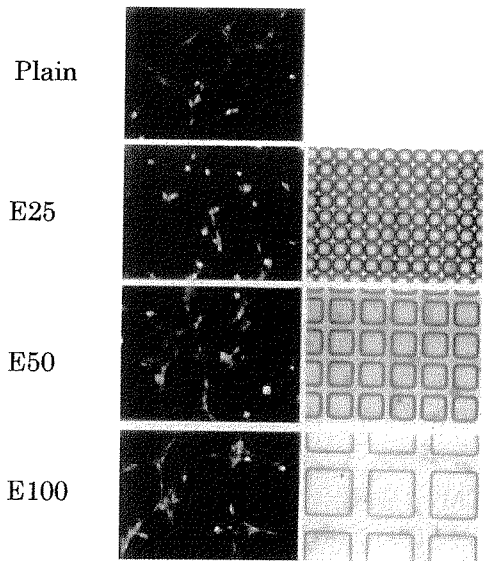


図 4. 仕切壁幅がピット幅の 0.4 倍のマイクロピットアレイ上での培養細胞 (P4)

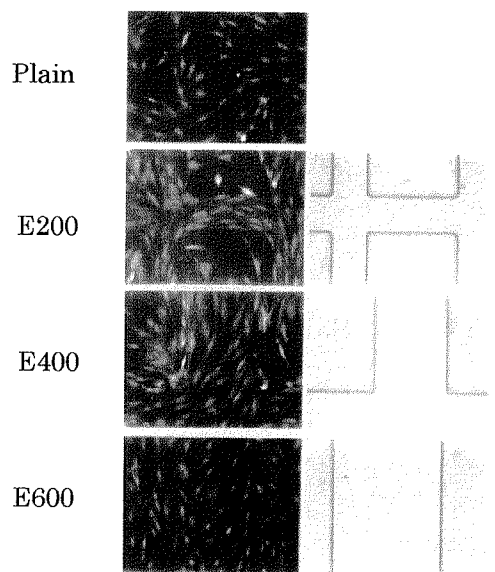


図 5. 仕切壁幅がピット幅の 0.4 倍のマイクロピットアレイ上での培養細胞 (P4)

考察

ここでの結果により、CEFs はピット内より仕切壁上面でより高い増殖率を示すこと、さらにその増殖率が仕切壁上面の幅により異なることが示された。前報の骨芽細胞様細胞の場合は、ピット内でより高い増殖率を認め、またその増殖率はピットサイズにより変化した。マイクロピットアレイ上でこのような細胞の特徴的な増殖をもたらしたのは、骨芽細胞様細胞は破骨細胞の造った孔に入り骨化を行うことや、線維芽細胞は固有の結合組織で一般に膠原線維束に沿って見られるという双方の特色を反映していると思われる。なお、線維芽細胞も同様にピット内で増殖が速く、ピット内が早く一杯になって細胞が死んで、その結果、仕切壁上で細胞が多く見えた可能性は残る。しかし、図2から図5に示した画像にはその可能性を示唆するものはない。いずれにしても細胞が分裂しやすい、あるいは分裂を促進させるスペースが存在することが今回の実験により明らかになった。CEFs の場合、最も増殖率が高くなったのは E200 の仕切壁上である。またフェンス幅が 10、20 μm の場合には増殖率が低下することから、CEFs の場合、分裂・増殖するにはある程度のスペースが必要であることも示唆された。以上のことより ECM の幾何学的形状が細胞の増殖・分化を促進させると同時に障壁となって抑制するという二面的な制御であることが推測された。今後、ECM の幾何学的形状を検討していく場合、促進と抑制の両面から追求していくことが必要であろう。

最適な細胞支持体の設計は、今後、大量培養や代用組織・人工臓器の設計上、欠かすことのできない条件になると思われる。微細加工されたシリコン基板表面を用いる我々の方法はこれからもその有用性を示していくことが期待される。

文献

1) Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S. and

Waxman, V.: Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int. J. Cancer*: 3: 683-693, 1968.

2) Folkman, J. and Moscona, A.: Role of cell shape in growth control. *Nature(Lond.)* 273: 345-349, 1978.

3) Gospodarowicz, D., Greenburg, G. and Bridwell, C. R.: Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* 38: 4155-4171, 1978.

4) Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G. P., Stephanopoulos, G. N., Wang, D. I. C., Whitesides, G. M., Ingber, D. E.: Engineering of cell shape and function. *Science* 264: 696-698, 1994.

5) Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., Ingber, D. E.: Geometric control of cell life and death. *Science* 276: 1425-1428, 1997.

6) 菊池裕子、菊池佑二、久保木芳徳：シリコンチップ上での細胞培養の試み—マイクロチャンネルとマイクロピットにおける繊維芽細胞および骨芽細胞の挙動—ヘモレオロジー研究会誌 2: 97-108, 1999.

7) Kikuchi, E. H., Kikuchi, Y. and Kuboki, Y.: Stretching and movement of fibroblasts and osteoblasts cultured in microchannel and micropit arrays. *Proc. SPIE* 3606: 150-157, 1999.

8) 菊池裕子、菊池佑二、久保木芳徳：骨芽細胞様細胞の増殖に対する「マイクロピット効果」—稠密型マイクロピットアレイを用いた検討と蛍光観察による視覚化—ヘモレオロジー研究会誌 3: 121-132, 2000.

9) Kikuchi, E. H., Kikuchi, Y. and Kuboki, Y.: Culture of bone-marrow-derived cells in microfabricated pit arrays. *Proc. SPIE* 4265: 40-49, 2001.

Growth of Chicken Embryo Fibroblasts in Micropit Arrays

Kazutoshi Tani¹⁾, Hiroko E. Kikuchi²⁾, Yuji Kikuchi³⁾, Yoshinori Kuboki¹⁾

- 1) Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0813, Japan
- 2) Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0813, Japan
- 3) Microchannel Array Technology Team, National Food Research Institute, Tsukuba, 305-8642, Japan

【Abstract】

Chicken embryo fibroblasts (CEFs) were obtained from the heart of a fertilized chicken egg incubated for 9 days by slicing and trypsin treatment and further culturing cells in α -MEM supplemented with 10% FBS. CEFs on the third passage culture were seeded on collagen coated micropit arrays (silicon chips) in the culture medium at a concentration of 50 cells per 1 mm². They were incubated for 2 days and subjected to observation under fluorescence microscopy with Acridine Orange staining. In contrast to bone marrow-derived cells so far studied, a higher growth rate was observed for cells on the top surface of the fence separating the pits than cells in the pits. Furthermore, cells aligned along the longitudinal direction of the fence; it appeared to be different from so-called contact guidance of cell alignment. Growth and alignment of CEFs was particularly marked when the top of the fence had a width of 80 μ m with least numbers of cells in the pits (pit size 200 x 200 μ m). These results suggested that fibroblasts might have a different scaffold dependence compared with osteoblasts.