



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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-
Author(s)	菊池, 裕子; Kikuchi, Hiroko E.; 菊池, 佑二 他
Citation	ヘモレオロジー研究会誌, 3, 121-132
Issue Date	2000
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/28021">https://hdl.handle.net/2115/28021</a>
Type	journal article
File Information	Hemorheology3-121.pdf



# 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—

菊池裕子<sup>1</sup>、菊池佑二<sup>2</sup>、久保木芳徳<sup>3</sup>

- 1) 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座
- 2) 農林水産省食品総合研究所食品工学部
- 3) 北海道大学大学院歯学研究科口腔健康学講座

## 抄録

深さ 10  $\mu\text{m}$  のマイクロピットアレイを加工したシリコン単結晶基板上でラット骨髄間質細胞を培養した結果、細胞がピット内により多く分布すること、ピット内で細胞の増殖が速まることを見出し、我々はこの効果を「マイクロピット効果」と名づけた。このマイクロピット効果をより明確にし、かつ、視覚化することを目的に、本研究では、新たに稠密型マイクロピットアレイを製作し、さらに、アクリジンオレンジ染色による蛍光観察法を導入した。継代2代目 (P2) の細胞の4日間培養では 50  $\mu\text{m}$  四方のマイクロピットが最大のマイクロピット効果を示し、ピットサイズの増加と共にその効果は減弱し、400  $\mu\text{m}$  四方のピットではほぼゼロになった。継代4代目 (P4) の細胞に対してはマイクロピット効果が減弱し、また、最適サイズも 100  $\mu\text{m}$  四方ないし 200  $\mu\text{m}$  四方のサイズに変わった。

## 緒言

組織を構成する細胞は、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) に接着してはじめて生存が可能である<sup>1)</sup>。このECMとの接着には接着分子が関わるだけでなく、ECM表面の物理化学的性状と幾何学的形状が重要になる<sup>2)</sup>。さらに、ECMの幾何学的形状によって細胞の増殖と分化が制御され、それによって、組織の正常な形態が形成および維持されることが近年明らかになってきた<sup>3)</sup>。腫瘍形成はこの制御に異常が生じた結果と見ることもできる。

Singhvi ら<sup>4)</sup> および Chen ら<sup>5)</sup> は、フォトリソグラフィを用いて接着分子のパターニングを行い、細胞の形態と生存を制御することに成功した。このような方法でECMの幾何学的形状の意味について解明を進め、さらに立体的パターニングを可能にし、それによってより望ましいECM形状を人為的に与えることが出来れば、組織細胞の培養技術は大きく進展するものと期待される。

一方、骨は絶えず再形成が行われている組織である。破骨細胞が造った骨マトリックス中の孔を骨芽細胞が認識し、そこに入って分化・増殖すなわち骨形成が行われる。そのため、この骨形成はECMの幾何学的形状の役割に関するこれまでの研究においても最も多く用いられる材料になった。例えば、Sampath ら<sup>6)</sup> は脱灰した骨マトリックスコラーゲ

ンの荒い粉末が骨形成を誘導するのに対して細かい粉末は誘導しないことを示している。さらに、久保木ら<sup>7, 8)</sup>は、多孔質のハイドロキシアパタイトの粒子およびブロックを bone morphogenetic protein (BMP)と共に使用して、300–400  $\mu\text{m}$ の孔が骨芽細胞の接着、分化、増殖さらに血管新生に最も効果的であることを明らかにした。

我々は、ECM を立体的にパターンニングする一つの方法として、シリコン単結晶基板表面に加工した微細空間構造を ECM 蛋白質コラーゲンでコートすることを検討してきた。最初の試みとして、血液レオロジー測定用に開発されたマイクロチャネルアレイを用い、繊維芽細胞と骨芽細胞の伸展・通過挙動の違いを観察した<sup>9)</sup>。次に、最も単純な構造のマイクロピットアレイを新たに加工し、そこで培養したラット骨髄間質細胞がピットを認識してピット内に集まり、さらにピット内で増殖率の増加を示すことを観察した<sup>10)</sup>。我々はこの効果を「マイクロピット効果」と名付けた。

本研究では、稠密型マイクロピットアレイを加工し、さらにアクリジンオレンジ染色による蛍光観察を導入して、骨芽細胞様細胞に対するマイクロピット効果をより明確にし、かつ視覚化することを目的とした。

## 方法

### (a) 稠密型マイクロピットアレイの製作

フォトリソグラフィおよびエッチング技術を用いて (100) 方位のシリコン単結晶基板表面に一辺の長さが 50、100、200、400  $\mu\text{m}$ で深さが 10  $\mu\text{m}$ の正方形のピットを 10  $\mu\text{m}$ 間隔あるいは 20  $\mu\text{m}$ 間隔で配置した構造を作製した。前回のマイクロピットアレイと同様に、8  $\mu\text{m}$ までドライエッチングで、次に残り 2  $\mu\text{m}$ をウエットエッチングで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) 内では同様に同一サイズのピットとした。以下、今回製作した各マイクロピットアレイを、その形が田の字に似ていることから、T-(ピットサイズ)・(仕切り壁巾)、例えば、T-100-10 のように表した。それに対して、前回製作したマイクロピットアレイは、ピット部分の総面積と仕切り壁の上面部分の総面積を等しく取ったことから、E-(ピットサイズ)で示した。

### (b) ECM コラーゲンコーティング

チップをオートクレーブ可能なカップに入れて滅菌し、その容器内で無菌操作によって冷 0.1%コラーゲン (新田薬品、cell matrix I-A type) を含む氷冷 0.1M 酢酸溶液に 30 分間漬けてコラーゲンコーティングした。

### (c) 細胞の調製

エーテル麻酔したウィスター系ラット (三協ラボサービス、WKAH/HKmslc、♂、6 週齢) の長骨を骨切断用ニッパにて切断し、骨髄液を 23G 針と 1 ml シリンジを用いて採取した。その中の細胞を 10 % FBS 添加 Minimum Essential Medium Alpha Medium (GIBCO BRL) を用いてディッシュ培養 (5 %  $\text{CO}_2$ 、37°C) した。80 %コンフルエントになったところでトリプシン EDTA 処理 (Sigma 1x solution ; 2 分) で細胞を剥がし、培養液中に移した。遠心分離 (1000 回転 5 分) で細胞を集め、培養液中に  $2.5 \times 10^4$  cells/ml

濃度で浮遊させ、これを継代1代目 (P1) 細胞浮遊液とした。

(d) 稠密型マイクロピットアレイ上での細胞培養

コラーゲンコーティングしたマイクロピットアレイチップと同じくコラーゲンコーティングした対照となる 12 mm 角の平板チップを、それぞれ pH 7.0 の PBS および培養液でリンス後、一つの 35 mm 径培養ディッシュ内においた。上記 P1 細胞の浮遊液 2 ml を各ディッシュに加え、細胞が均一に分布するように穏やかに振揺後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養は 2 日毎に培養液を取り替えて 4 日間ないし 7 日間培養した。

(e) アクリジンオレンジ染色

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 を加えた。室温で 5 分間静置後、染色を止めるため、培養液を吸引・除去し、新しい培養液 2 ml を加えた。さらに再度それを吸引・除去し、新しい培養液 1 ml を加えた。

(f) 蛍光観察と細胞計数

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 か所を観察した。それぞれカラー CCD カメラ (Hitachi) で撮影した画像を、ビデオプリンター (Mitsubishi, color video copy processor CP 710A) で印刷し、マーカーペンで印を付けながら細胞数を計数した。

以上の実験方法の概要を図 1 に示した。

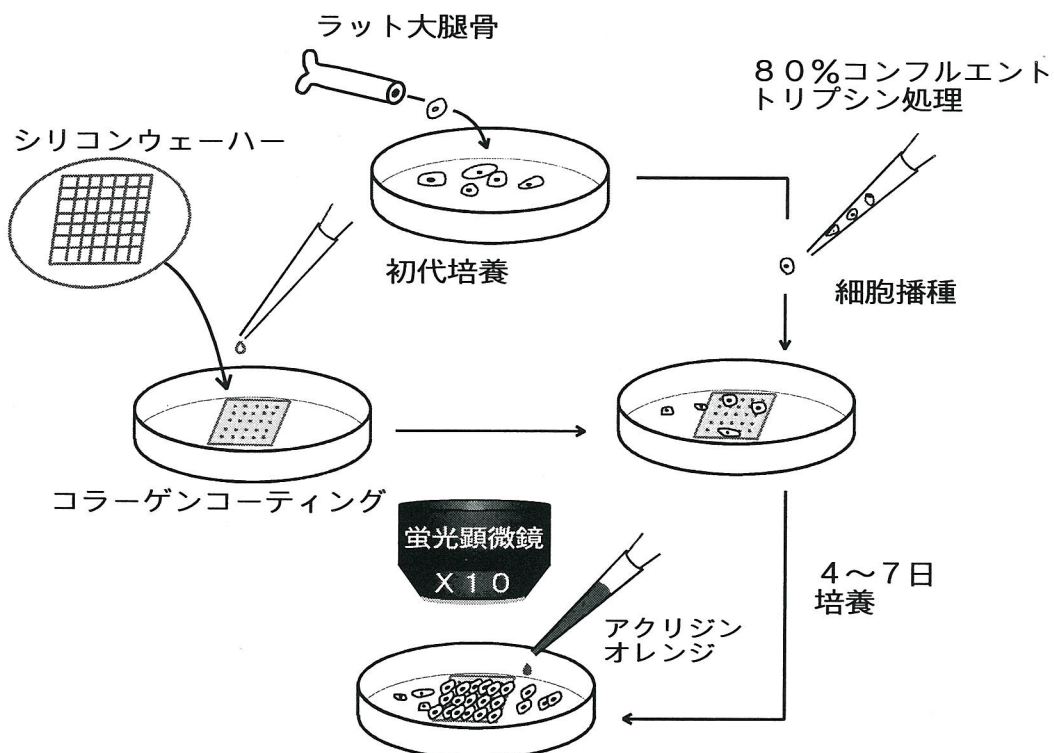


図 1. 実験の概要

## 結果

### [明視野観察と蛍光観察]

ピットサイズ 50  $\mu\text{m}$  四方、仕切り壁の巾 10  $\mu\text{m}$  の稠密型アレイ上で P2 細胞を 4 日間培養したものについて明視野観察および蛍光観察した画像を図 2 に示した。蛍光観察によりピット内でも細胞が極めて明瞭に観察されることが一目瞭然であり、チップから細胞を剥がすことなくそのまま細胞数を正確に計数することが可能である。

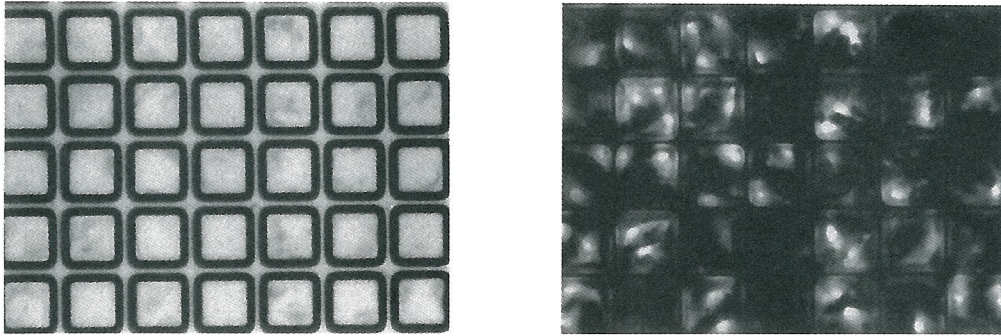


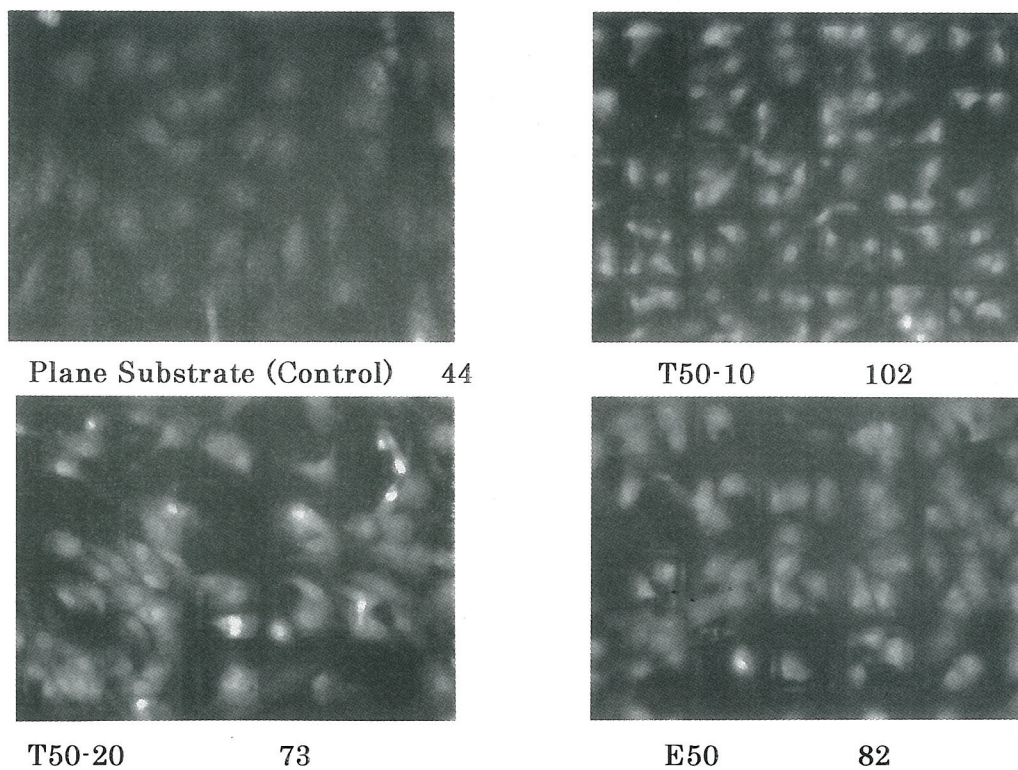
図 2. マイクロピットアレイ内の細胞に対する明視野観察（左）および蛍光観察（右）

### [P2 細胞 4 日間培養に対するマイクロピット効果]

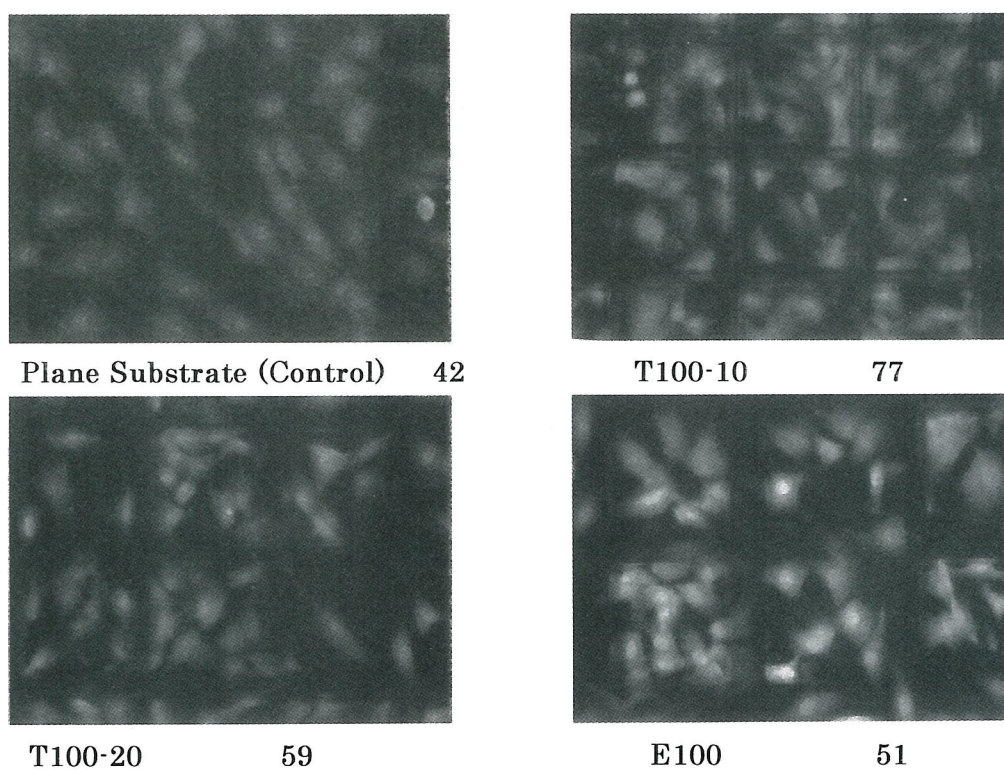
平板チップ上およびマイクロピットアレイチップ上の P2 細胞の観察例を図 3～6 に示した。各図は、同一ディッシュ内に置かれた 4 枚のチップについて、それぞれチップ内 5 カ所の内最大数が得られた場所の比較である。各画像に付けた数は画像内の細胞数である。平板上ではディッシュが異なってもほぼ同程度の細胞数であった。それに対して、T-50-10 のマイクロピットアレイ上では平板に比べて 2 倍以上の細胞数に達している。100  $\mu\text{m}$ 、200  $\mu\text{m}$  とピットサイズが増加すると平板に比べての細胞数の増加は減少し、400  $\mu\text{m}$  では細胞数の増加は認められなくなった。また、仕切り壁巾が 20  $\mu\text{m}$  のマイクロピットアレイ上の細胞数に比べて、仕切り壁巾が 10  $\mu\text{m}$  のマイクロピットアレイ上の細胞数が上回った。

### [P4 細胞 4 日間および 7 日間培養に対するマイクロピット効果]

図 7 から 10 に各サイズ毎の比較を示した。比較は同様に同一ディッシュ内に置かれたチップについて、また、各チップ内任意の 5 カ所の内最大細胞数を示した場所についてのものである。アクリジンオレンジ染色を行うため培養 4 日目での観察後そのまま培養を続けることはできない。そのため、4 日間培養と 7 日間培養は異なるディッシュのものである。図 3～6 と比較して明らかなように、P4 細胞は P2 細胞に比べて低い増殖率を示した。マイクロピット効果が認められたのは、4 日間培養では T-100-20 および T-200-20、7 日間培養では T-50-20 および T-100-20 であった。このように、P2 細胞とは反対に、P4 細胞では仕切り壁巾 20  $\mu\text{m}$  のアレイ上で仕切り壁巾 10  $\mu\text{m}$  のアレイ上と比べて増殖が速いように見えた。



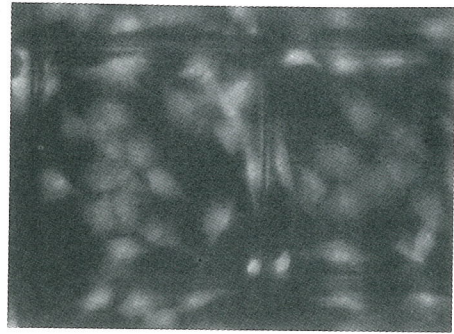
**Fig. 3.** Culture (day 4) of bone-marrow derived cells (P2) in arrays of 50  $\mu\text{m}$  square pits. The four substrates were in the same culture dish.



**Fig. 4.** Culture (day 4) of bone-marrow derived cells (P2) in arrays of 100  $\mu\text{m}$  square pits. The four substrates were in the same culture dish.



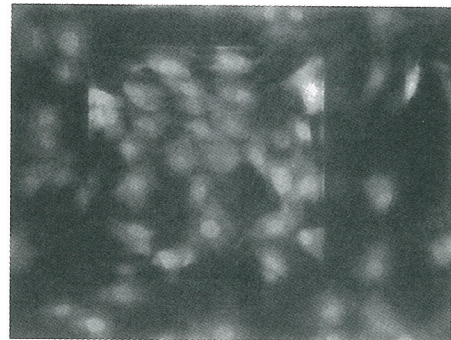
Plane Substrate (Control) 47



T200-10 58

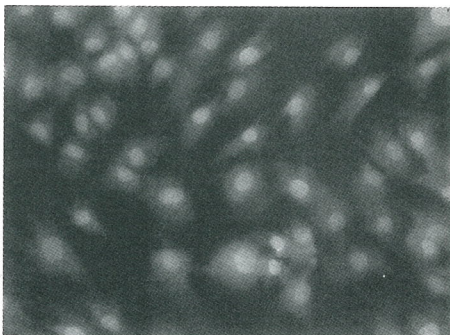


T200-20 53

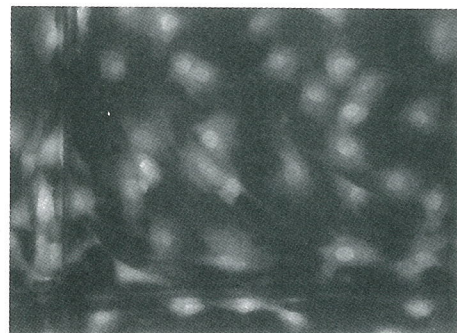


E200 57

**Fig. 5. Culture (day 4) of bone-marrow derived cells (P2) in arrays of 200  $\mu\text{m}$  square pits. The four substrates were in the same culture dish.**



Plane Substrate (Control) 55



T400-10 47



T400-20 63

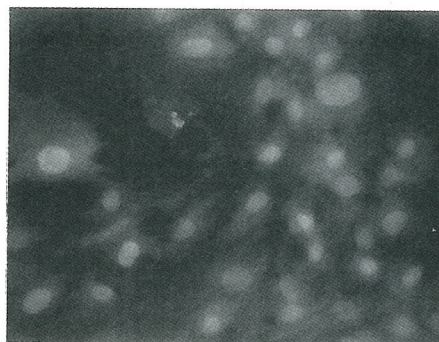


E400 57

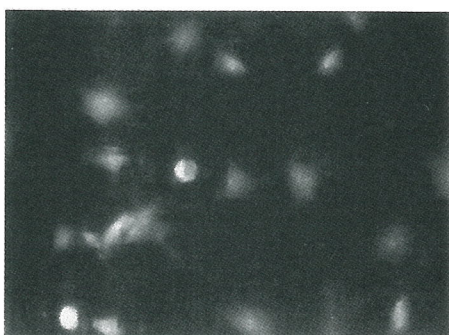
**Fig. 6. Culture (day 4) of bone-marrow derived cells (P2) in arrays of 400  $\mu\text{m}$  square pits. The four substrates were in the same culture dish.**



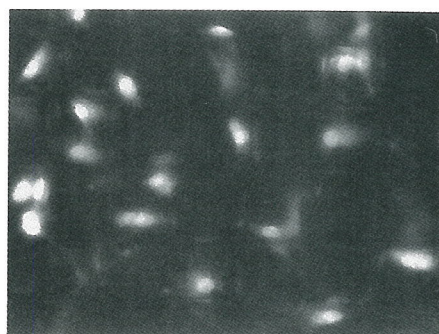
Plane Substrate (day 4)



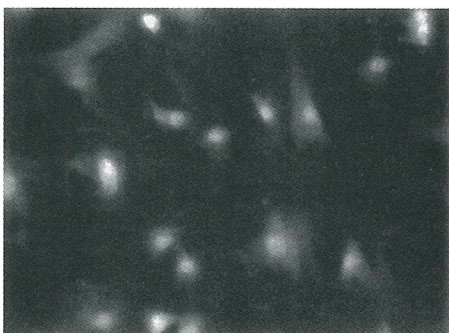
Plane Substrate (day 7)



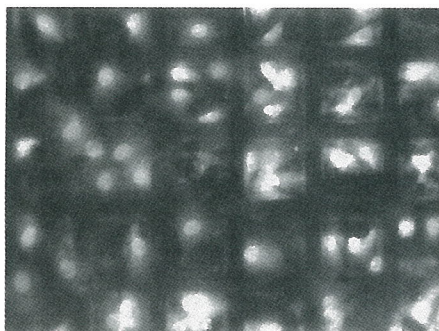
T50-10 (day 4)



T50-10 (day 7)



T50-20 (day 4)

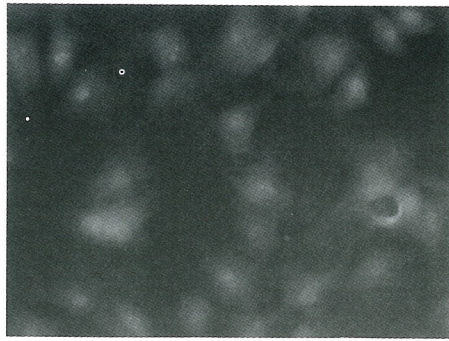


T50-20 (day 7)

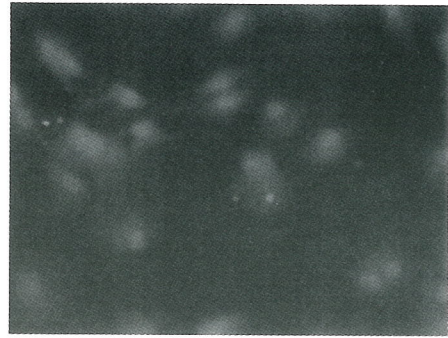
**Fig. 7. Culture of bone-marrow derived cells (P4) in arrays of 50  $\mu\text{m}$  square pits.**

### 考察

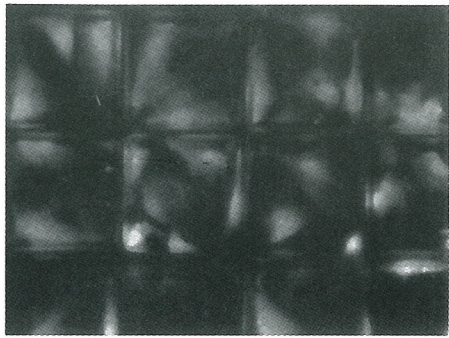
ここでの結果により、培養骨髄間質細胞の増殖率がマイクロピットのサイズによって明らかに異なることが示された。特に P2 細胞に対してはマイクロピット効果が明瞭であった。今回、前回製作したチップも用いたが、前回のチップでは上述のようにピット部分の総面積とピット外の部分の総面積を等しく取った。簡単な計算により、正方形のピットの場合、ピット間の間隔をピットサイズの 0.4 倍に取ればそうなることが示される。したがって、E50 のマイクロピットアレイでのピット間の仕切り壁巾は 20  $\mu\text{m}$  であり、E50 は



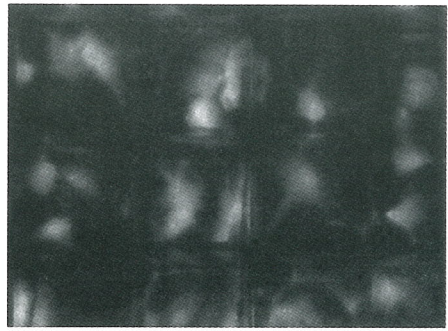
Plane Substrate (day 4)



Plane Substrate (day 7)



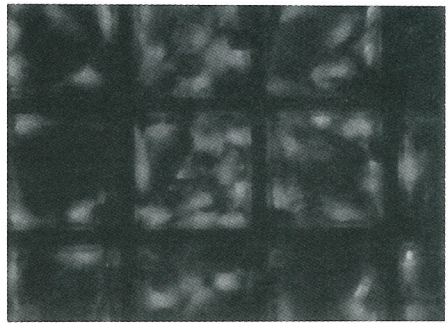
T100-10 (day 4)



T100-10 (day 7)



T100-20 (day 4)

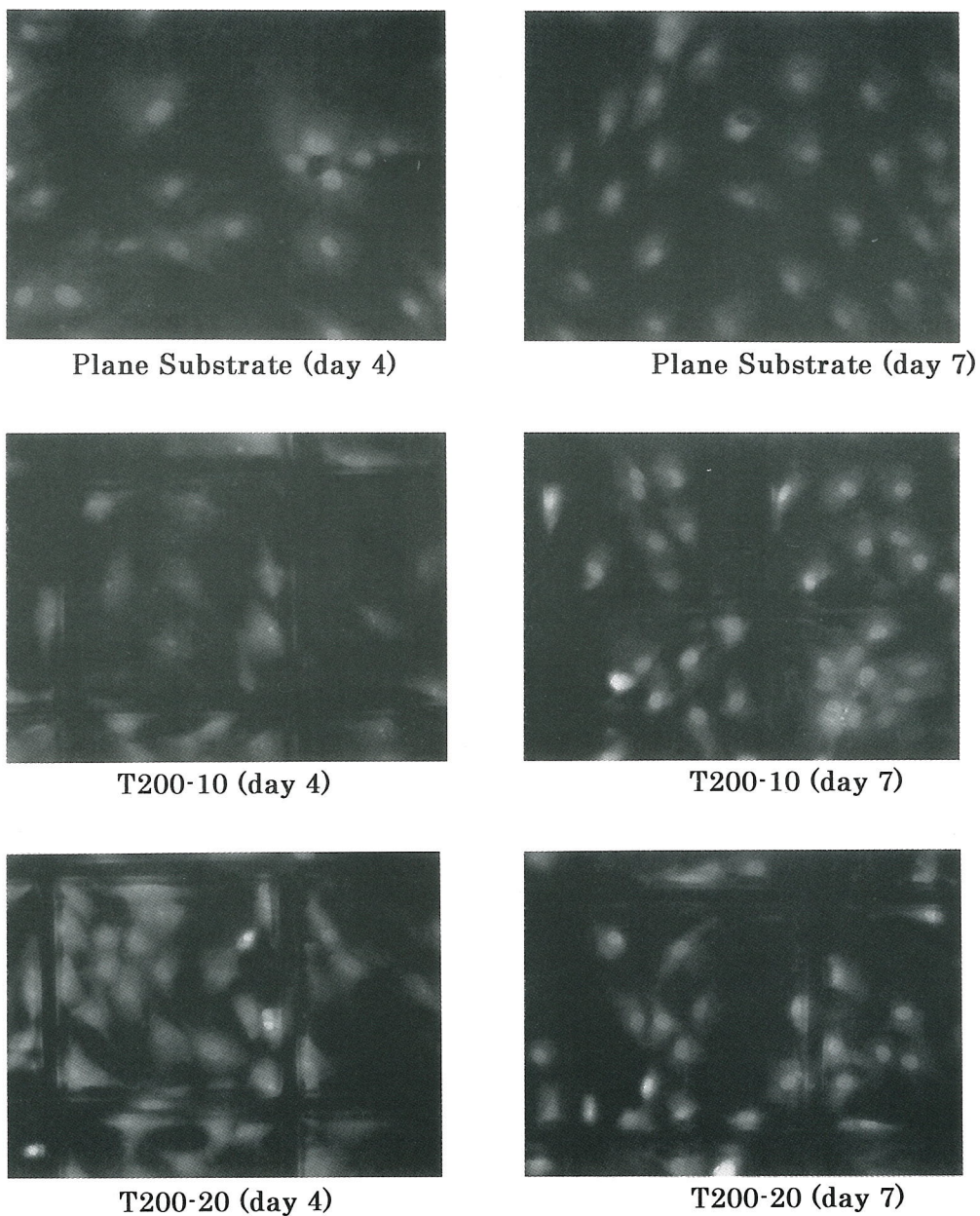


T100-20 (day 7)

**Fig. 8. Culture of bone-marrow derived cells (P4) in arrays of 100 μm square pits.**

T50-20と同じになる。実際両者で細胞数はほぼ一致している。

前報<sup>10)</sup>で、細胞がピット内により多く分布し、特に 50 μm 四方のピットでは 90%以上の細胞がピット内に集中すること、チップ上の細胞総数は、顕微鏡計数では 50 μm から 100 μm サイズのマイクロピットアレイで、チップから剥がして数えた場合では 200 μm サイズのマイクロピットアレイで最大になったことを記したが、今回の結果と基本的に一致しているものと思われる。細胞数が最大になるピットサイズの違いは、前回の顕微鏡計数が明視野のものであり、特に 50 μm サイズ以下のピット内に対して数え落としが大きかったこと、また、チップから剥がして計数した場合、100 μm 以下のサイズのピット内から



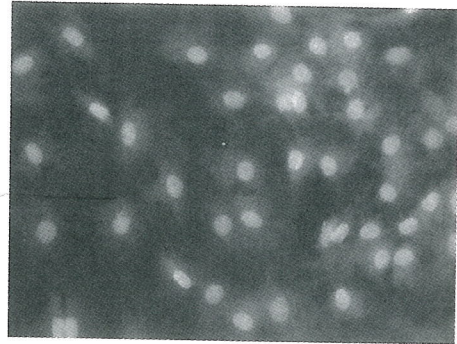
**Fig. 9. Culture of bone-marrow derived cells (P4) in arrays of 200  $\mu\text{m}$  square pits.**

は細胞が完全に剥がれずかなりの細胞数がチップに残ったと考えられることから説明されよう。これらの点からも今回蛍光観察を用いたことの利点がより明らかになる。

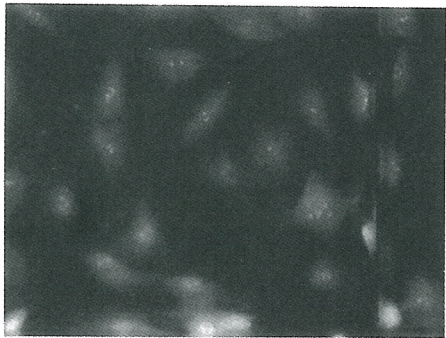
細胞播種数は約  $6/(300 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m})$  である。ここで  $300 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$  は各画像のサイズである。4日間培養により平板上では6-8倍に  $50 \mu\text{m}$  サイズのマイクロピットアレイ内では約15倍になっている。したがって、細胞数が倍になる時間は平板上で約32時間、ピット内で約24時間となる。また、 $50 \mu\text{m}$  サイズのマイクロピットアレイの場合、播種数は5-6個のピットに1個の細胞に相当し、細胞は活発にピット間の高さ  $10 \mu\text{m}$  の仕切り壁を乗り越えて増殖したことになる。その際、 $20 \mu\text{m}$  巾の仕切り壁よりも  $10 \mu\text{m}$  巾の仕切り



Plane Substrate (day 4)



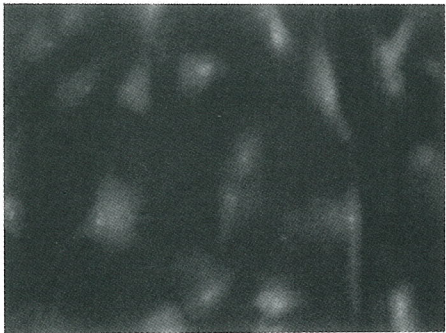
Plane Substrate (day 7)



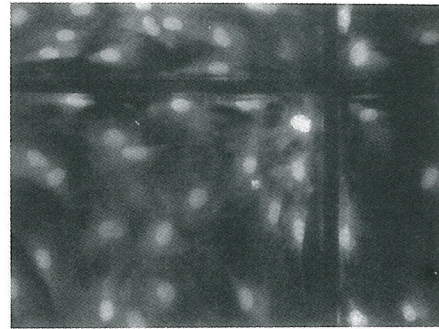
T400-10 (day 4)



T400-10 (day 7)



T400-20 (day 4)



T400-20 (day 7)

**Fig. 10. Culture of bone-marrow derived cells (P4) in arrays of 400  $\mu\text{m}$  square pits.**

壁をより速く乗り越えることが推定されたことは興味深いことであろう。

P4 細胞に対してはマイクロピット効果自体が減弱し、また、最適サイズも 100  $\mu\text{m}$  ないし 200  $\mu\text{m}$  に変わることが見られた。また、P2 細胞とは反対に、10  $\mu\text{m}$  巾の仕切り壁よりも 20  $\mu\text{m}$  巾の仕切り壁をより速く乗り越えることが推定された。これらのことから P2 細胞と P4 細胞では性質がかなり異なることが推定される。骨髓間質細胞は平板上でも培養を続けると骨化することが知られており、我々も 29 日間の培養で骨化を観察している<sup>10)</sup>。すなわち、継代によって分化の程度が異なる細胞が得られることが考えられる。P2 細胞と P4 細胞で性質が異なることはむしろ当然のことであり、研究者によっては全く別の細胞で

あると考えるべきと議論されている。継代の差がマイクロピット効果に現れたことは、マイクロピット効果が何らかのアーチファクトではなく本質的なものであることを支持するものでもあろう。

ここで用いたマイクロピットの深さは 10  $\mu\text{m}$  であり、ピット内とピット外で栄養条件その他の環境条件が大きく異なるとは考えにくい。細胞が認識したものは純粋に幾何学的なものとして推定される。それに対して、久保木らが示した 300–400  $\mu\text{m}$  の最適サイズは不定形の深孔についてのものであり、ここでの結果と矛盾するものではないと考えられる。

現在、骨芽細胞様細胞だけでなく他の細胞についてもマイクロピット効果とその現れ方の違いを検討している。その成績を次回に報告していく予定である。

### 参考文献

- 1) Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S. and Waxman, V. : Anchorage and growth regulation in normal on virus transformed cells. *Int. J. Cancer* 3: 683-693, 1968.
- 2) Folkman, J. and Greenspan, H. P. : Influence of geometry on control of cell growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 417: 211-236, 1975.
- 3) 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., 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) Sampath, T. K., and Reddi, A.H.: Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation. *J. Cell. Biology* 98: 2192-2197, 1984.
- 7) 久保木芳徳、藤沢隆一、水野守道 : 「硬組織再建の原理」 (出版連絡先 ; 北大・歯・口腔生化学) 1989.
- 8) Tsuruga, E., Takita, H. and Kuboki, Y.: Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem.* 121: 317-324, 1997.
- 9) 菊池裕子、久保木芳徳、小野雅昭、藤谷直樹、菊池佑二 : 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に対する伸展・通過挙動— ヘモレオロジー研究会誌 1: 69-78, 1998.
- 10) 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.

# **Study of Micropit Effect on the Growth of Osteoblast-like Cells Using Closely Arranged Micropit Arrays and Fluorescence Microscopy with Acridine Orange Staining**

Hiroko E. Kikuchi<sup>1</sup>, Yuji Kikuchi<sup>2</sup>, and Yoshinori Kuboki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-8586, Japan

<sup>2</sup>Food Engineering Division, National Food Research Institute, Tsukuba, 305-8642, Japan

<sup>3</sup>Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-8586, Japan

We cultured bone marrow-derived cells on a silicon substrate surface in which an array of micropits with 10  $\mu\text{m}$  depth was formed and found that cells preferred to enter into the pits and showed a higher growth rate compared to cells cultured on a plane surface. This effect was named “micropit effect”. In order to more clarify and visualize this micropit effect, we created an array of more closely arranged micropits and introduced fluorescence microscopy with Acridine Orange staining. The micropit effect was most marked when 50  $\mu\text{m}$  square pits were used for cells of passage 2 (P2) and decreased with increase in the pit size. The effect disappeared for 400  $\mu\text{m}$  square pits. The micropit effect weakened for cells of P4 and the size of the largest effect shifted to 100 $\mu\text{m}$  or 200  $\mu\text{m}$ .