

「細胞挙動に影響する表面構造の創出」

(独)産業技術総合研究所・斎藤隆雄、寺岡 啓 (株)太武製作所・太田和義



研究目的

我々は、基板表面にnm~ μ mオーダーの3次元幾何構造(凹凸、段差、傾斜)を構築し、細胞パターンの形成と維持に関する細胞の増殖と運動が制御可能か、検討している。この物理的な細胞排除原理に基づく新規な細胞パターンニング技術は、細胞パターンの経時的安定性が優れているだけでなく、3次元幾何構造の形状・寸法の多様な組み合わせが可能であるため、PEGなどの表面処理剤を用いた従来技術より格段にフレキシブルな細胞パターンニングが可能で、細胞チップ、再生医療技術やバイオ人工臓器開発等の発展に大いに貢献することが期待される。

ここでは、3次元幾何構造の一つであるディンプル構造をポリスチレン表面に切削加工で作製し、得られた表面上でマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞を培養することによって、細胞の増殖と運動へのディンプル構造の影響を調べた。

材料と方法

ディンプル構造加工

ディンプルは、超微細加工用ボールエンドミル(NSMB100-R0.05、日進工具(株))を装着した超精密微細加工機(Nano-21、碌々産業(株))により、10x10x1 mmの市販ポリスチレン板上に1 mm間隔で形成した。本加工の場合、3次元形状データを作成し、3軸制御による加工を行った。尚、3次元データの作成にはRhino4.0(Robert McNeel & Associates)、NCデータの作成にはPowerMill(DELGAM)を使用した。

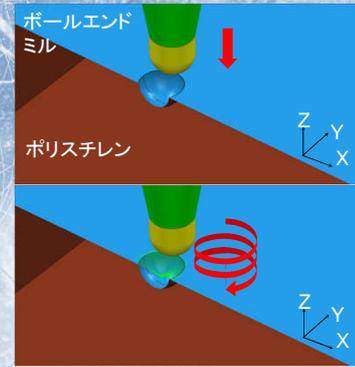


図1. 3軸制御マイクロ切削によるディンプル構造加工の模式図

細胞培養

ディンプル付きポリスチレン基板は、真空紫外光(UER20-172V、ウシオ電機)の10分間照射により親水化処理、つづいて70%エタノールに5分間浸漬することで滅菌処理して細胞培養に用いた。ディンプル付きポリスチレン基板に 1×10^4 cells/cm²の細胞密度でMC3T3-E1 cellsを播種し、5% CO₂インキュベータ内で4日間培養した。アクチンフィラメント染色、電子顕微鏡による細胞形態観察、Live-dead染色によりディンプル内外の細胞の増殖、運動性を評価した。

実験結果

ディンプル

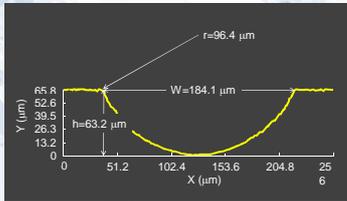


図2. ディンプルの寸法

アクチンフィラメント(AF)

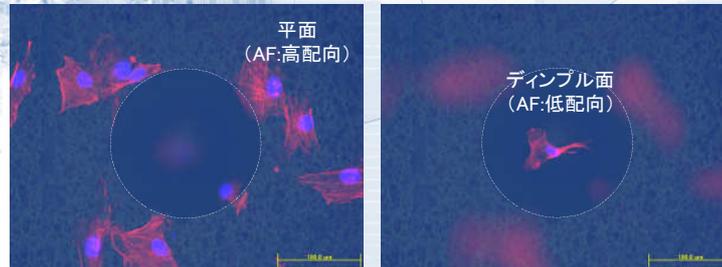


図3. ディンプル面と平面上での培養1日後の細胞のアクチンフィラメント(赤色);核(紫色)の蛍光像

細胞形態

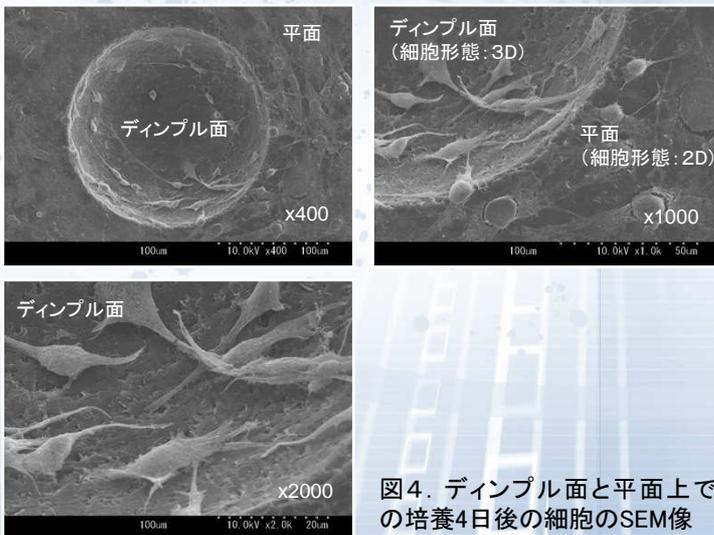


図4. ディンプル面と平面上での培養4日後の細胞のSEM像

増殖細胞数

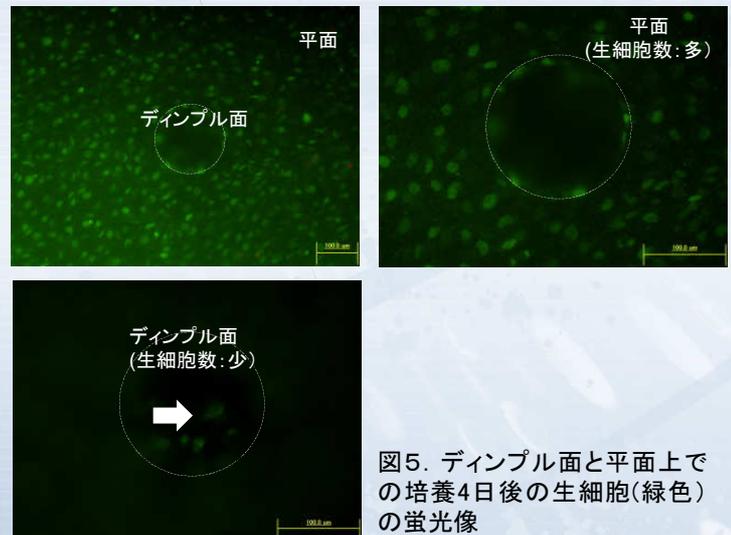


図5. ディンプル面と平面上での培養4日後の生細胞(緑色)の蛍光像

結論

3軸制御マイクロ切削加工によってポリスチレン表面にディンプル構造を形成し、ディンプル面と平面における細胞の増殖と運動性を比較した。その結果、ディンプル面においてはアクチンフィラメントの配向性は低く、細胞伸展も弱かった。培養経過とともにディンプル面では増殖が抑制され、2つの面で生細胞数の差が大きくなった。今回のディンプル面の結果より、3次元幾何構造による物理的な細胞排除原理に基づく細胞パターン形成の可能性が明らかになった。