

C306

マイクロ流路内での細胞パターンニングと細胞遊走試験

(筑波大)○(学)奥山 智章・(産総研)山添 泰宗・(筑波大)鈴木 博章・(正)福田 淳二*

[目的]

近年、マイクロマシーニングを生物医学領域へと応用し、従来不可能であった細胞の機能評価を実現する新しいデバイスの開発が活発に行われている。これらの研究では、液性因子を中心とする培養環境の制御に重点が置かれている一方で、デバイス内での細胞パターンニングや共培養系を作製する技術については未だ報告が少ないのが現状である。本研究では、Fig. 1 に示す濃度勾配形成流路による液性因子の制御に加え、独自に開発した架橋アルブミンを用いた細胞パターン化技術を組み合わせ、流路内の特定の位置からの細胞遊走試験を行うデバイスを開発した。さらに、このデバイスを用いて2次元および3次元の共培養系を作製した。

[方法と結果]

1) 細胞遊走試験：流路中の特定の位置に細胞を配置するため、架橋アルブミン固定表面を利用した。この表面は、細胞やタンパク質の吸着を抑制するが、ポリエチレンイミン(PEI)のような正電荷ポリマー溶液に曝露すると細胞接着性へと変化する性質を持つ。そこで、細胞培養流路に架橋アルブミンをコートした後、層流により特定の位置にのみ PEI を送液することで、細胞培養流路の任意の位置に帯状の細胞パターンを形成した。その後残った細胞非接着面は、培養流路に再び PEI を送液することで接着性に変換した。この状態から線維芽細胞 3T3 をウシ胎児血清(FBS)の濃度勾配下に置き、応答を評価したところ勾配方向への遊走と増殖が確認された。(Fig. 2)

2) 2次元パターン化共培養：同様に層流を用いることで、段階的に基板表面の細胞接着性を変化させ、2次元のパターン化共培養を実現した。(Fig. 3) この方法はゲルなどを用いたパターンニング方法と異なり、異種細胞間に細胞結合が存在している。

3) 3次元共培養系の作製：疎水性材料表面に形成した微細な well 構造は well 中の空気により内部への溶液の侵入を妨げる。これを利用してアルブミンコートすることで、3次元共培養系を作製した。つまり、PDMS により作られた培養流路底面に、直径 100 μ m の円形 well 構造を設けておき、そこに架橋アルブミン溶液を注入すると well の外側のみを細胞非接着性にすることができる。ここに細胞を播種すれば well の内部にのみ細胞が接着し、3次元にパターン化して培養することが可能である。またパターン作製後、培養流路内に PEI を送液すれば well の外側にも細胞が接着できるようになる。この手法により肝がん由来細胞

HepG2 をスフェロイド状に培養し、3T3 との共培養を行うことが可能であった。(Fig. 4) この方法はパターン形状やサイズ、well の深さなどの条件を変化させることで様々なパターンニングに柔軟に対応できる。

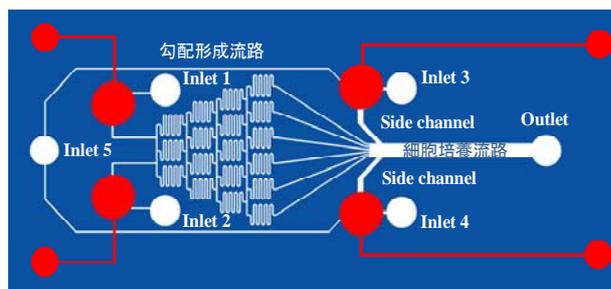


Fig. 1 マイクロ流路デバイスの概略

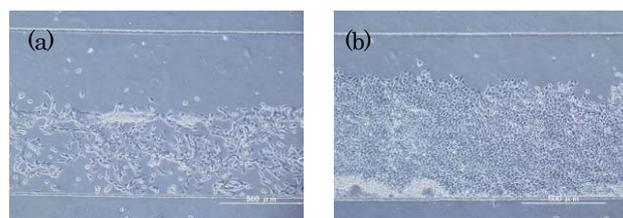


Fig. 2 FBS勾配下での細胞遊走の様子

(a) 培養48時間後 (b) 培養96時間後

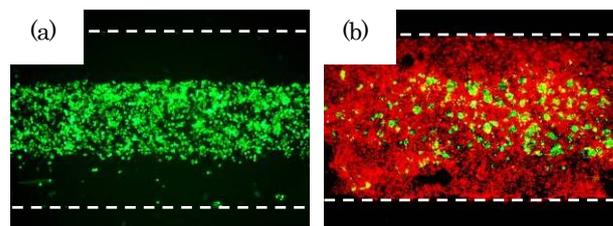


Fig. 3 層流を用いた2次元細胞パターンニング

(a) 細胞パターンニング (b) 共培養(緑:PC12 赤:3T3)

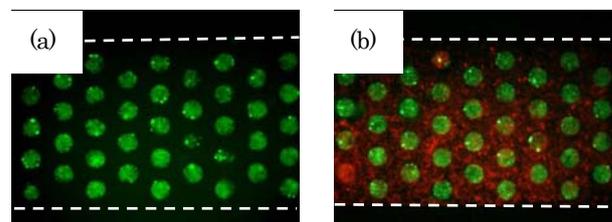


Fig. 4 3次元細胞パターン共培養

(a) 3次元パターン (b) 共培養(緑:HepG2 赤:3T3)

*Tel: 029-853-4995 Fax: 029-853-4490

e-mail: fukuda@ims.tsukuba.ac.jp