

D118

肝細胞マイクロパターニング条件と機能発現の関係

(北九大院工)○(学)堺 裕輔・新村友佳子・(正)吉浦 由貴子・(正)中澤 浩二*

【緒言】

生命の基本単位である細胞を基板上に配列する細胞パターニング技術は、従来の細胞培養法と比較して細胞分布が均一になり、細胞の機能発現や分化状態が均質化するといった利点がある。このことから、創薬スクリーニングや再生医療などの細胞アッセイ分野への利用が期待されている。現在、細胞パターニング技術には、フォトリソグラフィーやマイクロステンシル法などの様々な手法が確立されている。一方で、細胞パターニングの形状や大きさ、パターニング間距離などのパターニング条件が、細胞機能に与える効果に関する報告は少ない。本研究では、パターニング条件の違いが細胞形態や機能発現に与える効果を評価した。

【実験方法】

マイクロコンタクトプリントティング技術を利用して、異なる細胞マイクロパターニング条件のチップ基板を作製した。具体的には、まず、微細加工機を用いてアクリル (PMMA) 製のスタンプ鋳型を作製後、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を硬化させてマイクロスタンプを作製した。作製したスタンプを用いて、Pt 蒸着をしたガラス基板上に細胞接着スポット (コラーゲンIV) を形成し、その周辺はポリエチレンリコール (PEG) を修飾して細胞非接着面を作製した (図 1)。本研究では、細胞のパターニングサイズ (スポット径) が与える効果を評価するために、細胞が接着する総面積を一定とし、スポット径が 200 μm 、500 μm 、800 μm である 3 条件の細胞チップ (それぞれ、チップ 200、チップ 500、チップ 800) を設計・作製した (表 1)。

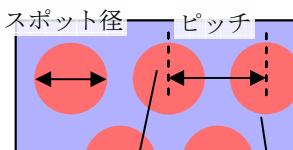


図1. 細胞チップの設計

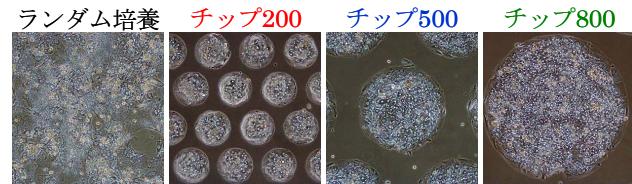
表1. 細胞マイクロパターニング条件

名称	チップ200	チップ500	チップ800
スポット径 [μm]	200	500	800
ピッチ [μm]	270	675	1050
スポット数 [個]	6364	1020	396

上記の 3 条件のチップと、細胞をパターニングしていない従来のランダム培養 (コントロール) の計 4 条件の培養基板上で初代ラット肝細胞を培養し、パターニング条件と細胞形態・機能発現の関係を評価した。

【結果・考察】

ラット肝細胞を培養した結果、ランダム培養では基板全体に細胞が伸展し、局所的に細胞密度が異なる細胞状態を示した。これに対し、各チップ培養ではコラーゲンスポット径に応じた肝細胞パターンが形成され、これらの形態は培養期間中維持された (図 2)。また、

図2. 細胞形態 (培養5日目) 500 μm

肝特異機能であるアルブミン分泌活性を測定した結果、ランダム培養よりもパターニング培養が高機能発現を維持した。さらに、スポット径が小さいほど、良好なアルブミン分泌活性を示すことが判った (図 3)。

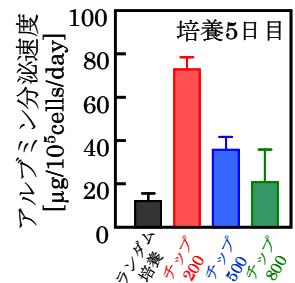


図3. アルブミン分泌活性

上述のパターニング径と肝細胞特性の関係をさらに解明するために、共焦点レーザー顕微鏡を利用した細胞の立体構造解析、およびリアルタイム PCR を利用した細胞接着因子および肝転写因子の遺伝子発現解析を行った。その結果、チップ 200 は他の条件に比べ、立体的な細胞形態を有し、細胞-細胞間結合や肝転写因子が高発現していることがわかった。これらの結果より、細胞の立体構造の維持や細胞間の強固な結合・連絡網の発達によって細胞内秩序が保たれ、その結果、安定した機能発現が維持されることが示唆された。

【結論】

ラット肝細胞を用いて、パターニング条件が細胞の形態や機能発現に与える効果を評価した結果、パターニングサイズが小さい方が、細胞は高機能発現を維持するとともに、立体構造や細胞-細胞間結合・連絡網が発達していることがわかった。これらの結果より、パターニング条件は、細胞の形態や機能発現に大きく影響することがわかり、細胞チップを作製する上で、重要なファクターであることが示された。

* E-mail: nakazawa@env.kitakyu-u.ac.jp