

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24810002

研究課題名(和文) マイクロ流路システムの構造パターンによる細胞移動の方向性コントロール

研究課題名(英文) Using Structural Patterns of Microchannel Systems for Directional Control of Cell Migration

研究代表者

久代 京一郎(Kushiro, Keiichiro)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90632539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：代表者の先行研究で、二次元マイクロパターンで細胞移動の速度や方向がコントロールできることが分り、今回それを三次元マイクロ構造で同様のことを試みた。このような、勾配や流体の流れを必要としない構造のみの細胞移動誘導には様々な利点や用途があり、再生医療用の足場材料等の開発にも繋がると思われる。

成果として、特定の表面構造の壁際で細胞の移動速度や持続性が飛躍的上がることが分り、さらに正常細胞とがん細胞で構造の影響が違ってくる事が分かった。また、機械的シグナル伝達を調べ、アクチン繊維の平行化等が起因していることが分かった。しかし、本来の目的である方向性がコントロールできる表面構造は見つかっていない。

研究成果の概要(英文)：From the previous research of the representative, it was found that specific 2D micropatterns can enhance the cell migration speed or control the direction of movement. Based on these results, similar experimentation to manipulate cell migration using 3D microstructures were attempted in this project. Such cell migration guidance, without the use of chemical gradients or flow, have many advantages and applications, including the development of novel scaffolds for tissue engineering.

As for the achievements, it was found that specific surface structures promote a drastic increase in cell speed and persistence. Furthermore, it was found that the effect of the structures was different on normal cells and cancerous cells. Also, looking at the mechanotransduction signaling, it was found that the alignment of actin fibers due to the presence of the wall plays important roles. However, it has been difficult to identify surface structures that can control the directionality of cell movement.

研究分野：細胞工学・バイオマテリアル

キーワード：細胞移動 材料表面構造 マイクロ流路 マイクロパターン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 材料表面のマイクロパターンや構造を駆使して、細胞挙動(移動、増殖、分化等)を制御する研究が近年注目されている。研究代表者の二次元の先行研究では、図形走性制御が確立されており[1,2]、さらに細い線状パターン上での細胞移動速度と持続性の向上や涙型パターン分岐による細胞流動変化等、様々な興味深い現象が見いだされてきたが、これらがより重要かつ生理学的にもより相応しい三次元システムでも引き起こされるのかは確認されていなかった。そこで、本研究ではこれまで二次元の表面で細胞の方向性誘導に成功した各種マイクロパターンをマイクロ流路システム用に改造し、これを達成しようと考えていた。このような、勾配や流体の流れを必要としない構造のみの細胞移動誘導には様々な利点や用途があり、再生医療用の足場材料等の開発にもつながると思われる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の当初の目的では細胞の様々な挙動を、単なる二次元マイクロパターンではなく、三次元の非対称なマイクロ流路を用い、三次元の非対称性が細胞挙動、特に細胞方向性移動、に与える影響を調べることを目的としていた。

(2) また、新たな機能性生体材料を開発するには細胞-材料間相互作用をより理解する必要があり、中でも三次元表面構造がどのように細胞の様々な挙動に影響を与えるかは殆ど知られていなかった。今回の研究では、異なる材料・表面・構造特性を有するマイクロトポグラフィーを作製し、その基板上で細胞の移動性や形態の変化を測定・解析することで、三次元構造体が細胞に与える機械的伝達シグナル等の影響を理解し、自然界で起きるトポグラフィー依存の細胞移動現象(例:

癌転移)を理解するだけでなく、細胞移動をコントロール・診断できる構造を駆使した新たな機能性生体材料・デバイスの創製を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 基板の作成方法

二つの異なる物性を持った材料、tetra-(polyethylene glycol) (Tetra-PEG) のと polydimethylsiloxane(PDMS)を使用し、三次元溝構造体や二次元ラインパターンを作製した。本来マイクロ流路を形成したかったが、これら材料の透過率不足から、流れの無い流路内で細胞が壊死してしまったため、マイクロ流路から溝構造に切り替えた。溝構造は PDMS や SU-8 の鋳型でそれぞれ Tetra-PEG ハイドロゲルや PDMS の型を取り、RGDC ペプチド 1mg/mL やフィブロネクチン (FN) 10 $\mu$ g/mL でコーティングした。比較対象の二次元のマイクロパターンは半形成したハイドロゲルや PDMS 流路にそれぞれ RGDC や FN 溶液を流し込み、流路を取り除くことで得られた。

### (2) MCF-10A 細胞の移動性測定及び免疫染色

本実験は主にヒト乳腺上皮細胞 MCF-10A を基板に播種し、インキュベーター付き顕微鏡で細胞移動性測定(スピードや持続長)を行った。後に、がん化ヒト乳腺上皮細胞 MCF-7 との比較も行った。アクチン繊維や接着班分子のヴィンキュリン等の免疫染色はホルマリンやトリトーン X 等を使った標準的なプロトコルを使った。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロトポグラフィーによる細胞移動の変化

細胞は三次元的溝構造や二次元の各基板でそれぞれ違う移動性を示した(図1)。平坦

なコントロール基板では普通のランダム移動を行い、二次元ラインパターン基板ではパターンの軸にそって移動した。対して三次元溝構造の壁際では細胞の移動性が劇的に高まり、スピードや持続長(図2)がコントロールと比べ約3倍以上にも膨れ上がった。また、形態も細胞移動に特化したコンパクトなものに変化した。これらの傾向は Tetra-PEG と PDMS 両方に同等に現れ、構造による細胞移動性の変化は材料の種類に依存しないと思われる。

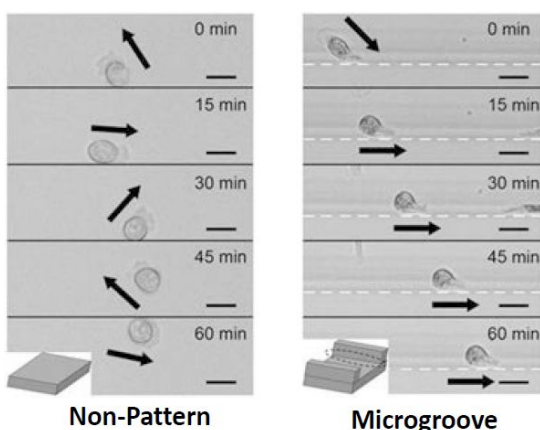


図1 平坦な表面(左)と溝構造(右)上でのMCF-10A細胞移動。

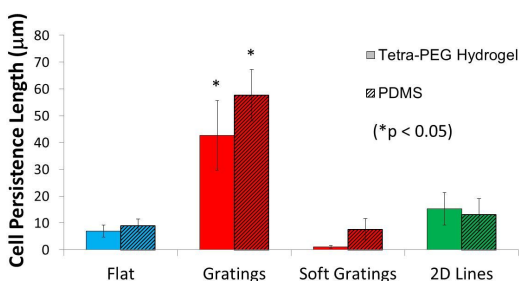
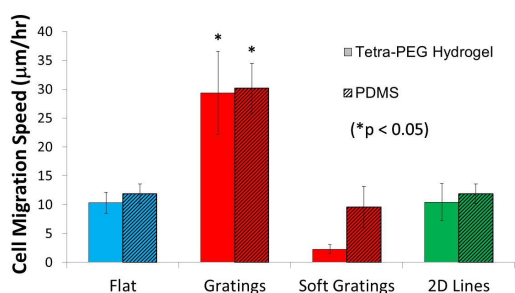


図2 PDMSやTetra-PEGハイドロゲルの各種基板上での細胞移動速度(上)と持続長(下)。

## (2) 免疫染色による細胞移動上昇のメカニズムの解明

上記の現象の機械的シグナル伝達メカニズムを調べるために免疫染色を行った。詳しくは、アクチンやヴィンキュリンの免疫染色(図3)により、溝構造での細胞骨格変化や基板との接着を調べることで、形態変化に伴う移動性向上の原因を探った。平坦な基板ではアクチン繊維が色々な方向に展開され、ヴィンキュリンの焦点接着も多々観察された。対して溝構造ではアクチン繊維が超収束・平行化することで、つまりは膜状仮足が同じ方向に伸びることで、スピードや持続性が高まったと思われる。また、焦点接着の数が下がっていたことから、細胞は基板に強く接着せず、スムーズに移動でき、持続性が高まったと思われる。

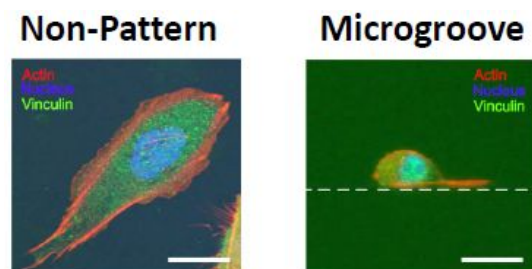


図3 平坦な表面(左)と溝構造(右)上でのMCF-10A細胞の免疫染色。赤がアクチン繊維、青が核、緑がヴィンキュリンである。

## (3) 細胞形態変化に影響する構造パラメータの特定

溝構造の壁の高さや角度を変化させ細胞の形態や移動性を確認した。高さが20ミクロン以下では細胞が壁を乗り越えてしまうことが分かり、40ミクロン以上ではこのような事は正常細胞では起こらなかった。また壁の角度が123°以上の場合、細胞は上記の特異的形態を失った(図4)。このことから、90°の壁の鋭い角がアクチン繊維の平行

化に参与していることが示唆された。また、形態変化が起こらない場合、移動性の変化も起こらないことが確認された。

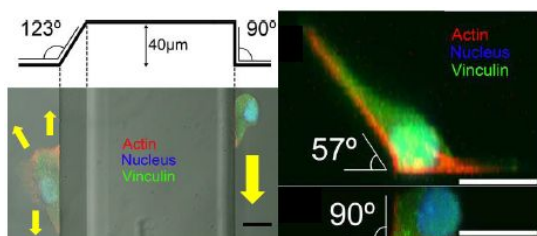


図4 壁の角度による形態変化への影響。

#### (4) がん細胞との比較

がん細胞でもこのような形態変化や移動速度の上昇が確認された。しかし、持続性の上昇は正常細胞ほど高くはなかった。また、がん細胞のみ乗り越えられる壁の構造も判明した(論文作成中のため、非公開)。これらの結果は、殆どのがん細胞が上手く極性化できない事に起因していると思われる。

#### (5) 非対称壁構造の効果

当初の目的である細胞方向コントロールを非対称な壁構造(例:ジグザグ壁構造(図5))で試みたが、いままで方向性制御の効果は殆ど無かった。引き続き、上記の研究と並行して違う構造で進めていく予定である。

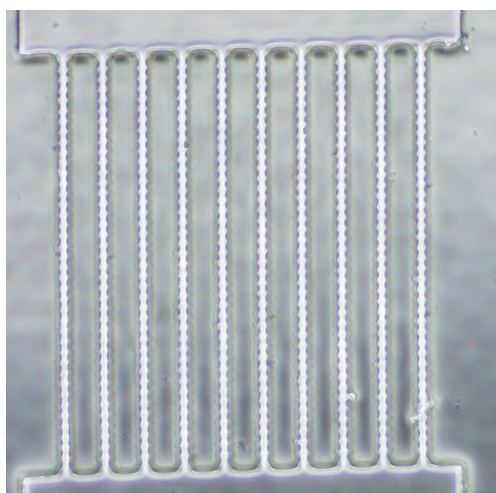


図5 非対称なジグザグ壁構造。

注：上記の一部研究成果は現在 Langmuir のジャーナルで査読が済み、現在リビジョン中である。

#### <引用文献>

- [1] K. Kushiro, et al., Modular Design of Micropattern Geometry Achieves Combinatorial Enhancements in Cell Motility. Langmuir, 28(9): 4357-4362 (2012).
- [2] K. Kushiro, et al., Reprogramming directional cell motility by tuning micropattern features and cellular signals. Advanced Materials, 22:4516-4519 (2010).

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

K. Kushiro and M. Takai, Enhancing Cell Motility Using Grating Microtopographies. MicroTAS 2014 18<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 1:636-638 (2015). [学会雑誌、査読無]  
<http://www.proceedings.com/24717.html>

[学会発表](計 3件)

K. Kushiro and M. Takai, Enhancing Cell Motility Using Grating Microtopographies. MicroTAS 2014, San Antonio, Texas, USA. (2014年10月26日~30日)

久代京一郎、高井まどか、「マイクロ溝構造におけるがん細胞と正常細胞の移動性の違い」化学とマイクロ・ナノシステム学会 (CHEMINAS 30) 北海道大学(札幌、北海道) [2014年10月2日~3日]

久代京一郎、高井まどか、「力学的強度の異なるマイクロ溝構造による細胞移動性」化学とマイクロ・ナノシステム学会 (CHEMINAS 29) 日本女子大学 (目白、東京) [2014 年 5 月 22 日 ~ 23 日]

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/takai/index.html>

## **6 . 研究組織**

(1)研究代表者

久代 京一郎 (KUSHIRO, Keiichiro)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

(高井研究室)

研究者番号 : 9 0 6 3 2 5 3 9