

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26889051

研究課題名(和文)細胞発達定量評価のための三次元細胞位置制御技術の確立

研究課題名(英文)Initial cell position control for evaluating cell developments

研究代表者

萩原 将也(Hagiwara, Masaya)

大阪府立大学・21世紀科学研究機構・講師

研究者番号：00705056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：従来の細胞培養においては細胞培養時の初期位置が制御できていないため、細胞発達時に行われている細胞間コミュニケーションの定量評価ができない問題がある。そこで本研究では、培養空間における細胞の初期位置を制御することにより、細胞発達の定量評価を行うことを目的とし、二次元および三次元空間における細胞の位置制御手法の開発と肺気管支上皮細胞を用いた発達評価を行った。本技術を用いて細胞を一行に並べた状態から気管支上皮細胞の分岐形成を計測したところ、分岐は全て初期細胞群と直交方向に伸びていることが新たに確認できた。

研究成果の概要(英文)：One of the main difficulty to evaluate the cell-cell communications in vitro experiments is associated with variation of initial cell culture conditions. Here, we proposed the three- and two- dimensional cell position control methods for evaluating cell developments. By controlling the initial cell position on the glass slide, we have achieved to quantitatively evaluate the branching direction of bronchial epithelial cells. The cells formed the branching structure in perpendicular to the original cell positions. The results was stable and the proposed technologies can contribute the developmental biology fields.

研究分野：細胞発達制御

キーワード：細胞位置制御 マイクロナノデバイス 細胞発達 分岐形成

1. 研究開始当初の背景

細胞は自ら形態形成因子を放出し、空間的に濃度勾配を生成することで他の細胞とコミュニケーションを取り、自らの位置情報を得ていることが知られている。そしてこの形態形成因子の空間的シグナル相互作用によって、細胞は自ら移動・増殖を繰り返して全体として固有のパターンを形成する。その細胞から発せられる形態形成因子が空間的にどのように広がり、お互いに反応するかを数値的に表現することで、細胞パターン形成のモデルを可能としたのが反応拡散系モデルである。反応拡散系モデルを用いることにより生命の発達という非常に複雑で曖昧なシステムを計算することを可能とし、細胞組織発達のメカニズム解明に大きく寄与することが期待される。しかし一方、in vitro における細胞培養実験は培養空間に細胞を一様に分布させることで行われることがほとんどであるため、細胞間距離などの培養初期条件をシミュレーションと完全に一致させることができない。その結果、シミュレーションの評価は定性的なものが主体となるため詳細な解析ができず、この分野における技術の発展を阻害する大きな要因となっている。特に初期条件としての細胞の相対位置は細胞間コミュニケーションがどのように行われているかを知る上で非常に重要な要素であるにもかかわらず、細胞間距離を制御した細胞組織発達の定量評価に関してはこれまでほとんど行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、体外の生体模倣ゲル内における細胞の2次元および3次元的位置を、マイクロデバイスによって制御する加工技術を確立し、細胞発達における定量評価を行うことを目的とする。培養初期条件における細胞の位置関係を微細加工技術により厳密に制御することにより、細胞発達の際に細胞間のコミュニケーションがどのように行われているかをより詳細に評価することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、培養初期条件である細胞の空間位置制御を行い、細胞発達の定量評価を行う為、以下の手順で実験を進める。

(1) 2次元細胞位置制御

ガラス基板上における細胞接着性を微細加工技術により制御し、細胞をガラス基板上の特定位置に固定する。

(2) 3次元細胞位置制御

シリコン基盤を用いて作製したマイクロデバイス上に、表面張力を利用してゲル薄膜を作製し、これを積層することにより細胞の3次元位置制御を行うための手法を確立する

(3) 気管支上皮細胞における発達定量評価
培養初期における気管支上皮細胞の位置

を制御した状態で、気管支の分岐形成を発生させ、その分岐方向の評価を行う。また反応拡散系モデルによるシミュレーションとの比較により、分岐方向の決定メカニズムについて解析する。

4. 研究成果

(1) 細胞二次元空間位置制御

ガラス基板上における細胞の接着性を、フィブロネクチンをフォトリソグラフィにより選択的にパターンニングを行うことで培養初期における細胞の二次元位置制御を達成した。図1にファブリケーションプロセスを示す。

ガラス基板を HMDS により疎水化し、その上にポジティブフォトレジストである OFPR をスピコートする。細胞を固定したいパターンが描かれたフォトマスクを用いて露光・現像を行い、プラズマにより不要な HMDS を除去する。アセトン、IPA によりレジストを除去した後にポリエチレングリコール溶液(PEG)に基盤を4時間浸し、HMDS が付着していない部位に PEG をコーティングすることで親水化させる。次にフィブロネクチンを基盤に滴下することで、HMDS の疎水面にのみフィブロネクチンが付着するようになる。その上から細胞を滴下することで、フィブロネクチン面と PEG 面との細胞の接着力の違いにより細胞のパターンニングを達成した。図2に細胞群位置関係と幾何形状を制御した例を示す。このように基盤上の親疎水制御を行い細胞の位置を制御することで、予め決めた細胞間距離や細胞群幾何形状から分岐発達を行うことができるようになる。

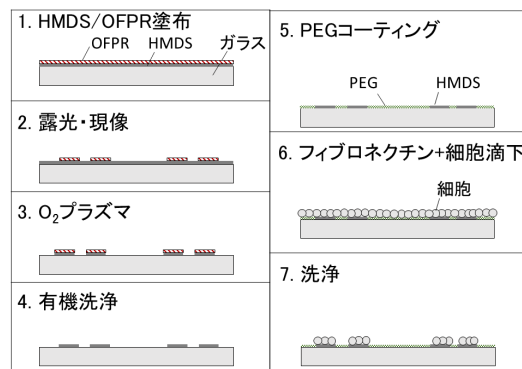


図1. 細胞2次元位置制御のファブリケーションプロセス

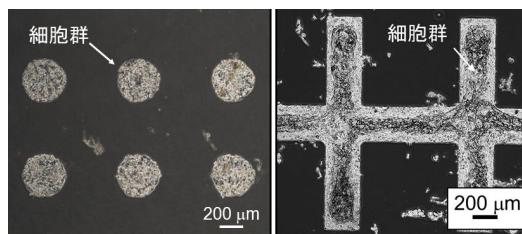


図2. ガラス基板接着制御による細胞群初期位置関係と幾何形状の制御結果例

(2) ゲルシートを用いた細胞三次元制御
 アルギン酸ナトリウムのようなサポート剤を間に挟まずに細胞を三次元的に配列するためには、理論上2次元のゲル薄膜上に細胞をパターンニングしてそれを積層することで達成可能である。しかしながら、ゲルは液体状態からゲル化する際に基板との接着力を増すため、ゲル薄膜を積層する為に基板からゲルを引きはがそうとすると、薄膜が破れてしまったり膜厚が変化したりするため積層化が困難である。そこで本研究では表面張力を利用して、液体状態のゲルをシリコンフレームに吊るした状態、いわば「ゲルが宙に浮いた状態」にするためのデバイスを作製し、ゲル薄膜を積層することで三次元位置制御を行う手法を提案する。

作製手順としては、200 μm 厚みのシリコン基盤に Deep Reactive Ion Etching により中央に貫通穴と四方にアライメント用の穴を開ける。そして中央の貫通穴に液状のマトリゲルを満たしてピンセットで引き上げると、貫通穴にマトリゲル薄膜が表面張力により形成される(図3)。ゲル薄膜の2次元平面上に細胞を配列し、各シートを積層することにより三次元空間における細胞位置制御を達成することが可能となる。図4に各ゲル薄膜を四方にあけたアライメント穴に合わせて積層した図を示す。

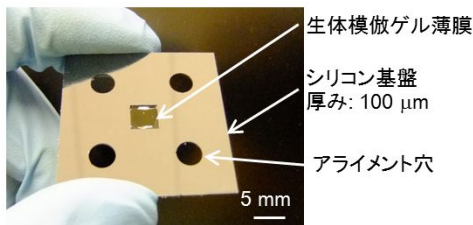


図3. 作製したゲル薄膜

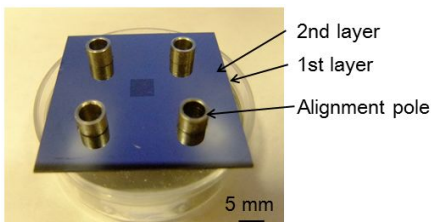


図4. アライメント柱に合わせることでゲル薄膜の積層が可能

(3) 培養初期条件下における細胞発達評価

次に細胞空間位置制御技術の応用として、2次元において細胞初期位置制御を行った状態で、気管支上皮細胞がどのように分岐形成を行うのかを解析した。細胞の位置関係としては、細胞群を一行に配列することにより細胞を一樣に分散させた場合と比較して、外乱が少なく分岐の方向が定量的に観測できるようにした。この状態で細胞をゲルで被覆して分岐形成が発生するまでインキュベートしたところ、分岐方向が全てもとの細胞群と直交方向に発生していることが確認できた(図5(A))。

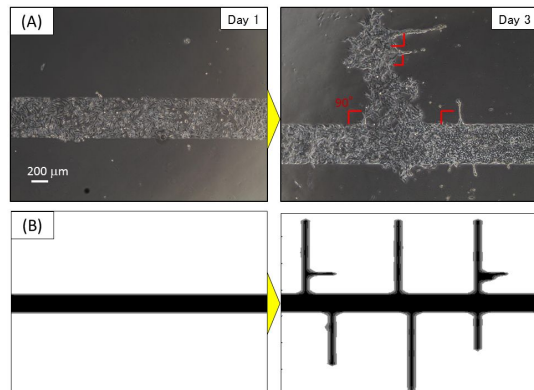


図5. 実験とシミュレーションによる細胞間コミュニケーション解析。(A) 細胞初期位置を一行に配列した場合の分岐形成結果 (B) 実験と同条件からスタートした反応拡散系モデルによる分岐形成結果

この原因を調べる為、Meinhardtの反応拡散系モデルを用いて分岐発達シミュレーションをおこなった。反応拡散系モデルは細胞が発する形態形成因子の空間的拡散と個々の因子の反応を数値モデル化したものであり、これを用いる事により細胞がどのように発達してパターンを形成しているのかを知る手掛かりになる非常に有効なツールである。しかし従来の反応拡散系モデルを用いた発達シミュレーションは、細胞培養実験と初期条件を厳密に合わせることが困難であった為、その応用は限定的なものであった。しかし、今回実験条件を厳密に制御することができたため、シミュレーションにおける細胞初期位置の条件を合わせこむことが可能である。

シミュレーション結果を図5(B)に示す。シミュレーションにおいても実験同様、一行に配列された細胞群と直交方向に分岐が発生し、2次分岐に関しても1次分岐の方向と直交して成長することが確認できた。細胞から発せられる形態形成因子は濃度の高いところから低いほうへと拡散するため、細胞を一行に配列した場合、直交方向により多くの形態形成因子が拡散する。これにより分岐の方向が直交方向に伸びていることが確認できた。

以上のように、細胞初期位置を制御することにより、従来は定量的な評価が困難であった細胞発達において、細胞間コミュニケーションが煩雑になるのを防ぎ、外来を抑えることにより発達方向を定量的に評価することができるようになった。さらに反応拡散系モデルをはじめとする数理モデルシミュレーションと実験条件を合わせこむことができる為、実験のみでは解析できない分子の時空間変化を解析することが可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

萩原将也, 培養初期条件制御による細胞間コミュニケーション解析, 日本機械学会バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月10日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

萩原将也, Fei Peng, Chih-Ming Ho, “培養初期条件制御と反応拡散系モデルによる細胞間コミュニケーション解明”, 第36回日本バイオマテリアル学会, 2014年11月17日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.nanosq.21c.osakafu-u.ac.jp/tsl_lab/m_hagiwara/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 将也 (HAGIWARA MASAYA)

大阪府立大学 21世紀科学研究機構・講師

研究者番号: 00705056