

利用課題番号 : F-13-KT-0143
 利用形態 : 技術代行
 利用課題名 (日本語) : 配向性を有する細胞シートの作製と評価
 Program Title (English) : Generation and Evaluation of Cell Sheets With Controlled Cell Orientation
 利用者名 (日本語) : オケヨ ケネディ, 矢鳴 里奈, 鷺津 正夫
 Username (English) : Kennedy O. Okeyo, Rina Yanaru, Masao Washizu
 所属名 (日本語) : 東京大学 大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
 Affiliation (English) : Department of Bio-engineering, Graduate School of Engineering,
 University of Tokyo

1. 概要 (Summary) :

近年、接着細胞をコンフルエントの状態まで培養し、一枚の細胞シートとして剥がして回収し、組織再生に使用する研究が進んでいる。

我々は、培養液中に宙吊りに設置した微細なメッシュパターンを細胞培養支持体として用い、基板と細胞のインタラクションを制御することにより、メッシュシート上で細胞シートを作製できることを確認している。また、メッシュの形状を設計することで配向性を持った細胞シートを作製できる。さらに、この方法を用いれば、体細胞のみならず、増殖能の高い幹細胞(胚性幹細胞)を継代することなしに安定的かつ長期的に培養できることが分かっている。

2. 実験 (Experimental) :

京都大学学際融合教育研究推進センター・ナノテクノロジーハブ拠点に、本研究で用いたフォトリソグラフィ用の微細パターンマスクの作製を依頼した。Fig.1 に実験装置の概略を示す。フォトリソグラフィを用いてSU-8製のメッシュパターンを作製し、直径4 mmの穴をあけたカプトンテープで補強した(Fig.1

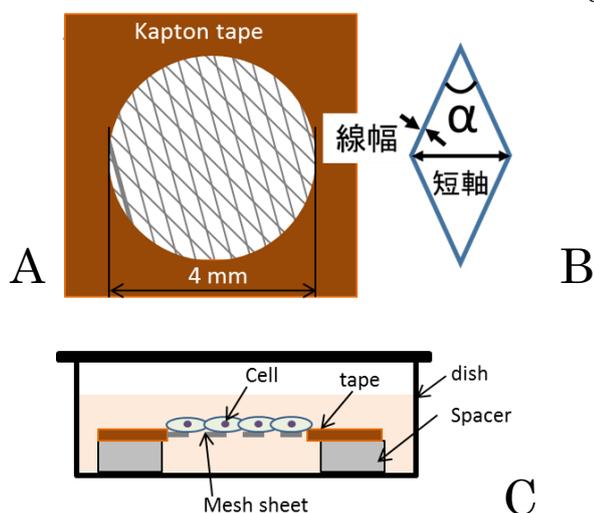


Fig. 1 Cell culture on a fine structure mesh sheet.

-A)。その後、フィブロネクチンをコーティングしたメッシュ上に細胞を播種して作製した細胞シートを観察した。本実験では、短軸 200 μm、線幅 3 μm で角度 α が 50° と 90° の 2 種類の菱形形状のメッシュ(Fig. 1-B)を使用し、メッシュ形状が細胞の配向に与える影響を調べた。厚さ 1 mm のゴムシートをスペーサーとする事により、底面から浮いた状態で培養した(Fig. 1-C)。細胞は TIG120 (ヒト皮膚線維芽細胞) と MEF (マウス胎児線維芽細胞) の 2 種類を使用し、細胞種と配向性の関係を評価した。

3. 結果と考察 (Results and Discussion) :

Fig. 2-A, C は角度 50°、90° の菱形形状のメッシュに TIG120 を播種後 15 日目の図、B は A の蛍光像、D は A と同形状のメッシュに MEF を播種後 15 日目の図である。菱形形状のメッシュの場合、角度が小さい部分から埋まりながら細胞シートが形成されて、短軸の方向に細胞が配向すると予想していた。しかし実

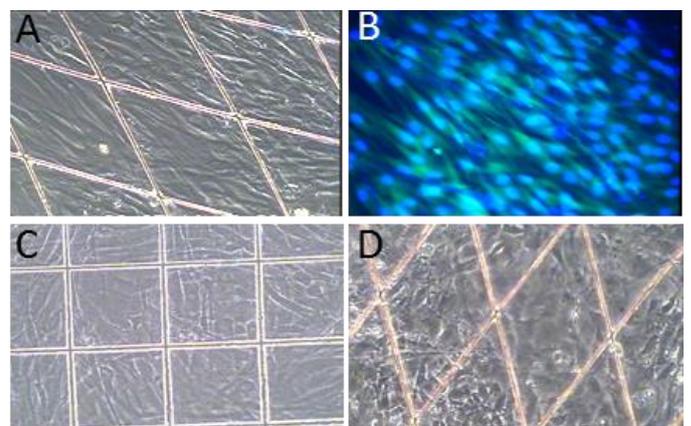


Fig. 2 Cell sheets formed on mesh sheets after 15 days of continuous culture. A: Rhombus mesh sheet ($\alpha=50^\circ$) with TIG120 cells, B: Fluorescence image of A, C: Square mesh sheet with TIG120 cells, D: Square mesh sheet with MEF cells. Scale bar: 100 μm

際は Fig. 2-A のように、長軸方向に配向する事が分かった。正方形形状では配向性は観察できなかった(Fig. 2-B)のは対角線の長さが等しかったためと考えられる。また MEF の細胞シートは配向性を持たない事が分かった(Fig. 2-D)が、これは TIG120 に比べて伸展する力が弱いためか、メッシュのサイズが大きすぎたためであると考えられる。今後さらにメッシュ設計を工夫し、さらに配向性を調べる予定である。また、細胞内骨格構造(アクチン細胞骨格)や接着分子の関与も検討し、配向性の詳細なメカニズムを調べる。

4. その他・特記事項 (Others) :

なし。

5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation) :

- (1) オケヨ ケネディ, 西垣内 康宏, 近藤 武宏, 黒澤 修, 小穴 英廣, 小寺 秀俊, 鷺津 正夫, 「電界集中型細胞融合法による抗体産生細胞のこう収率取得」, 静電気学会誌, Vol. 38, No.1, (2014), p.p:40-45.
- (2) 黒澤修, オケヨ ケネディ, 小穴英廣, 沖田圭介, 小寺秀俊, 鷺津正夫, 「オンチップエレクトロポレーションを用いた接着細胞核への遺伝子直接送達法の開発」, 静電気学会誌, Vol.38, No.1(2014), p.p.:28-33.
- (3) K. O. Okeyo, Y. Hayashi, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, "On-Chip Electroporation Device for Direct Introduction of Plasmids into Cell Nucleus and Observation of Cell Reprogramming Process", □Proc.17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro TAS 2013), p.p:113-115.
- (4) K. O. Okeyo, N. Omasa, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu, □"Cell Adhesion Control Initiate Cell Sheet Formation in a Medium Suspension", □Proc. 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro TAS 2013), p.p:1057-1059.

6. 関連特許 (Patent) :

特許出願済み。