

課題番号 : F-15-UT-0013
利用形態 : 機器利用
利用課題名(日本語) : 多機能性酸化物薄膜におけるマイクロパターン構造及び電気刺激における細胞応答研究
Program Title (English) : Study on cellular response against the micro pattern structure and electrical stimulation using multi-functional oxide thin films
利用者名(日本語) : 山原弘靖¹⁾, 浅田洋行¹⁾, 戸梶啓規¹⁾, 呉祺深¹⁾, 黎学思¹⁾, 関宗俊²⁾, 田畑 仁^{1,2)}
Username (English) : H. Yamahara¹⁾, H. Asada¹⁾, H. Tokaji¹⁾, Q. Wu¹⁾, G. Lili¹⁾, M. Seki²⁾, H. Tabata^{1,2)},
所属名(日本語) : 1) 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
2) 東京大学大学院 工学系研究科 電気系工学専攻
Affiliation (English) : 1) Department of Bioengineering, The University of Tokyo
2) Department of Electrical Engineering, The University of Tokyo

1. 概要(Summary)

再生医療においてメインとなるのは細胞であるが、細胞を播種する足場(Scaffold)にも注目が集まっている。この足場に対し微細加工を施した足場上に細胞を播種・培養を行うことで、細胞形状・増殖率・分化誘導が著しく影響を受けることが報告されている。これにより、ナノ加工表面上と細胞や生体、生体関連物質との相互作用が大きく注目されており、盛んに研究がされている。

一方、微細加工技術はエレクトロニクスやフォトニクス分野においても急速に発展してきており、バイオ分野に応用されている[1]。特に半導体作製技術を用いて作製された足場上に播種した細胞に対しての細胞形状・増殖率・分化誘導が著しく影響を受けることが報告されている。

本研究では高速電子線描画装置等のナノ加工技術を駆使して、酸化物材料のナノ構造を制御形成し、そのナノ構造の電気・磁気・光学特性などの優れた多機能物性を利用して、(幹)細胞培養環境を制御することで人為的な時間・空間制御を目的とした。細胞足場材料には酸化インジウムスズ(Indium tin oxide:ITO)を用いた。ITOは酸化物でありながら電気伝導性($1.5 \times 10^{-4} [\Omega \text{cm}]$)がある。またワイドギャップ半導体(バンドギャップ 3.75eV)としても知られており可視光を透過する。そのため、液晶パネルやタッチパッドなどの透明電極に用いられている。またバイオ分野においても透明性というのは重要なものであり、光学顕微鏡を用いて観察できる利点がある。この多機能性酸化物材料であるITOを用い、半導体作製プロセス技術によりマイクロパターン溝構造足場である透明電極を作製した。

さらに、作製した電極上にマウスの間葉系肝細胞を播種した。間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell:MSC)とは中胚葉性組織(間葉)由来の体性幹細胞である。特徴としては自己複製と骨、軟骨、脂肪、腱、筋肉、及び骨髄を含む間葉組織系統に分化する能力を有している。また生体組織内では真皮、骨格筋、脂肪組織などの結合組織や骨髄間質に存在しており、結合組織の修復や恒常性の維持、造血幹細胞の増殖や分化の制御に関わっている。ES細胞などの万能細胞と呼ばれる細胞においては倫理的問題や拒絶反応の課題があるが、患者自身の間葉系幹細胞を用いた自家細胞移植であれば拒絶反応のリスクが少ないことが報告されている[2,3]のため再生医療への応用が期待されている。この播種したマウスの間葉系幹細胞細胞に対し人為的な時間・空間制御を目的として、電

気・磁気刺激を付加した後の細胞を評価した結果を報告する。

・物理刺激による細胞分化制御(Concept)

定電位印加による細胞への影響は様々である。 $+400[\text{mV}]$ 以上(vs Ag/AgCl)の定電位印加培養時に膜の流動性の減少が確認されている。これは膜流動性の減少は温度低下や圧力上昇に伴う相転移や細胞膜中のコレステロール増加でも生じる。このように電位印加による膜の流動性減少は圧力上昇に伴う膜成分の相転移のように負に帯電している細胞膜が静電的に電極へ押し付けられることが原因とされている[4]。

また、細胞には電位依存イオンチャネルを持つ細胞は興奮細胞と呼ばれており、神経細胞や筋細胞、ホルモンシグナル伝達に関連した多くの細胞がこれに含まれている。

細胞の内外では電位差が常に存在している。これは細胞内外での電荷を持つイオン分布が異なることから活性化していない静止状態の細胞では一般的に電位はマイナスとなっている。活動電位とはこの電位差が刺激によって一時的に逆転する現象である。

このように生体内の電気信号を模倣した刺激を付加することで細胞形状、細胞配列、分化へ影響を与えることが知られている。

2. 実験方法(Experimental)

【利用した主な装置】

_電子線描画装置(ADVANTEST F7000S-VD01)、マスクアライナー(Suss MA6)、フォトリソグラフィー装置

【実験方法】

・透明ナノ電極作製

電子線描画装置、マスクアライナー、フォトリソグラフィー装置等を用いてガラス基板上にマイクロパターン溝構造を作製した。溝幅と溝同士の幅は各1, 3, 5, 7 $[\mu\text{m}]$ である。その後、高周波スパッタリング法によりITOを堆積させ透明電極を作製した。この方法を用いることで、マイクロパターン溝構造を鋳型として任意の材料を表面へ堆積させることが可能となっている。

作製条件は以下の通りである。(Table 1)

Table1 Condition of lithography

レジスト	OAP	
	JSR	
スピコート	回転数	3000 [rpm]
	時間	90 [s]
プリベーク	温度	110 [°C]
	時間	90 [s]
露光	時間	2.5 [s]
現像	TMAH	
	時間	90 [s]
ポストベーク	温度	120 [°C]
	時間	90 [s]

・細胞培養

培養する細胞にはマウス胎仔由来の間葉系幹細胞である C3H10T1/2 と ST2 を用いた。細胞を電極上で 24 時間培養した後、倒立型位相差顕微鏡を用い細胞の形態を観察した。同時に無作為に写真撮影を行い、単位面積当たりの細胞数を計測した。

同様に細胞を 24 時間培養した後、電気・磁気刺激を印加した。電気刺激には作製した ITO 透明電極を作用極とし、培養液中に浸した白金電極を対極、銀/塩化銀電極を参照極として 3 電極系を用いた。与える電位は 100[mV] vs Ag/AgCl とした。また、刺激パターンは定電位、矩形波(Square wave : SW)1 [Hz]と 100 [Hz]を用いた。磁気刺激には電磁石を用い面内方向かつ、マイクロパターン溝構造に平行な方向へ静磁場(Static magnetic field : SMF)を印加した。刺激印加から 24 時間後、倒立型位相差顕微鏡を用い細胞の形態を観察した。同時に無作為に写真撮影を行い、単位面積当たりの細胞数とアスペクト比を計測した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

マイクロパターン溝構造足場上において 3 [μm]の溝幅において細胞接着数において有意であった。1~30 [μm]のマイクロ構造において、3 [μm]幅の構造が骨分化誘導に有効であることが先行研究により報告されており、これは生体内の細胞外マトリクスを模倣する際に、3 [μm]というサイズが重要な因子であることを示唆している。また、マイクロパターン溝構造のない平面電極上での細胞はランダムに配列されているが、マイクロパターン溝構造により細胞は溝に対して平行に配列した。溝幅の中でも 3 [μm]が細胞伸長において有意であった。この結果より、電極のマイクロパターン溝構造の幅を 3 [μm]と決定した。

平面な基板をコントロールとし、3 [μm]マイクロパターン溝構造上で細胞を培養し、電気・磁気刺激印加した。平面基板とマイクロパターン溝構造上の細胞の接着数を比較すると溝構造上の細胞接着数は低下傾向にある。このことから溝構造による細胞増殖能の阻害が考えられる。また、刺激印加による細胞接着数は矩形波(1 [Hz])電気刺激を印加したものが少なかった。刺激印加による細胞増殖能の阻害が考えられる。

次に刺激付加 24 時間後、3 [μm]のマイクロパターン溝構造上の細胞に対してのコントロールと電気刺激を印加したもののついて細胞の溝と平行方向への伸長かつ配向が見られた。また、矩形波(1 [Hz])電気刺激を印加したものが細胞伸長能において優れていた。磁場刺激を印加したものは細胞配向並びに伸長は見られなかった。平面基板

上においてコントロールや電気刺激と磁気刺激を比較したところマイクロパターン溝構造のような顕著な変化が見られないことから、材料の表面形状が配向性の因子になっていると考えられる。このことから、マイクロパターン溝構造上の細胞の細胞接着面積は溝上部のみに接着していると仮定すると、平面基板に比べ接着面積は半分となる。また、間葉系幹細胞はコラーゲンを生成する。平面基板上にてコラーゲン播種し面内方向へ静磁場を印加すると磁場対して垂直に配向する。また、細胞とコラーゲンを共培養することによって磁場に対して細胞も垂直に配向することが報告されている[4]。このことから間葉系幹細胞から生成されたコラーゲンが磁場に対して垂直に配向し、その後、細胞接着面積が平面に対して半分になっている細胞は磁化率異方性により磁気トルク回転を受け磁場配向したため、マイクロパターン溝構造に平行に配向しなくなったと考えられる。

・まとめ

細胞の人為的な時間・空間制御を目的として、フォトソグラフィ法によりマイクロパターン溝構造を作製した。この構造を鋳型として、高周波スパッタリング法により ITO 薄膜を堆積させ、透明電極を作製した。

マイクロパターン溝構造が 3[μm]のものが他の溝幅の構造のものより細胞接着能、細胞配向能においても有意であった。マイクロパターン溝構造と磁場刺激によって細胞の再配向の可能性が示唆された。

4. その他・特記事項(Others)

・参考文献

- 1) K. Anselmea, P. Davidsona, A.M. Popab, c, M. Giazzonec, M. Lileyc, L. Ploux., . “The interaction of cells and bacteria with surfaces structure at the nanometer scale”, Acta Biomater. 6, 10, (2010), pp.3824-3846.
- 2) Arinzech, T.L. et al, “Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect”. J. Bone Joint. Surg. Am., 85-A (2003) 1927.
- 3) Aggarwal, S. & Pittenger, M.F. “Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses” Blood , 105 (2005) 1815.
- 4) Yawara Eguchi, Mari Ogiue-Ikeda, Shoogo Ueno., “Control of orientation of rat Schwann cells using an 8-T static magnetic field.”, Neuroscience Letters., 351 (2003) 130.

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

- (1)浅田洋行、山原弘靖、関宗俊、田畑 仁、“多機能性酸化物質膜におけるマイクロパターン構造及び電気・磁気刺激における細胞応答研究”、第1回 Core-to-Core 学生研究講演会(JSPP)(2015年12月17日)

6. 関連特許(Patent)

なし。