

課題番号 : F-18-KT-0163  
利用形態 : 技術代行  
利用課題名(日本語) : 細胞間コミュニケーションのライブイメージング  
Program Title(English) : Live Imaging of Inter-Cellular Communication  
利用者名(日本語) : 小長谷由美、松田道行  
Username(English) : Y. Konagaya, M. Matsuda  
所属名(日本語) : 生命科学研究科、京都大学  
Affiliation(English) : Graduate School of Biostudies, Kyoto University  
キーワード/Keyword : リソグラフィ・露光・描画装置、生物学、細胞間コミュニケーション

## 1. 概要(Summary)

我々は細胞間の情報伝達を解き明かすことを目的としている。生体内の組織では、多くの細胞において極性が存在しており、腸管上皮や筋線維、皮膚の層構造などで知られている。また、極性の破綻は、癌化や恒常性維持機構の破綻につながる。これらの実験系を *In vitro* で再構築することは、平面上に細胞を播種しても得られず、その解析を進めることが困難である。そこで、京都大学 ナノテクノロジーハブ拠点ユニットに相談・依頼し、任意の細胞集団形態の再構築を試みている。

(A) 生体蛍光イメージングをより簡便にこなすための機械工作を相談した。

(B) 筋芽細胞の配向性を持たせた *in vitro* の系の構築の為に、細胞のパターニング可能なデバイスを作製した。

(C) 上記と同様に、犬上皮細胞に配向性を持たしたマイクロパターニングの構築した。

## 2. 実験(Experimental)

(B)と(C)について

### 【利用した主な装置】

回路&レイアウト設計ツール(E27)

ウェハースピン洗浄(A11)

厚膜フォトレジスト用スピンコーティング装置(A7)

高速マスクレス露光装置(A4)

レジスト現像装置(A10)

真空乾燥器(E7)

### 【実験方法】

#### プラットフォーム支援機関で実施

まず回路&レイアウト設計ツールを用いてマイクロパターンを設定した。次にウェハ基板を洗浄したのち、厚膜フォトレジスト用スピンコーティング装置を用いて密着強化

処理を行った。密着強化処理後のウェハにポジ型のフォトレジスト(TCIR-ZR8800PB)を塗布した。続いてマスクレス露光装置を用いて、設計したマイクロパターンを描画した。現像した。高速マスクレス露光装置を用いてパターンを描画、現像し、分散剤を塗布した。以上の方法で作成したレジスト原盤に PDMS を流し込み、真空乾燥器で脱泡、加熱することで、マイクロパターンをもつ PDMS を作成した。

## 3. 結果と考察(Results and Discussion)

(B)と(C)について

下記のような形状を持つ PDMS 鋳型を作製した。

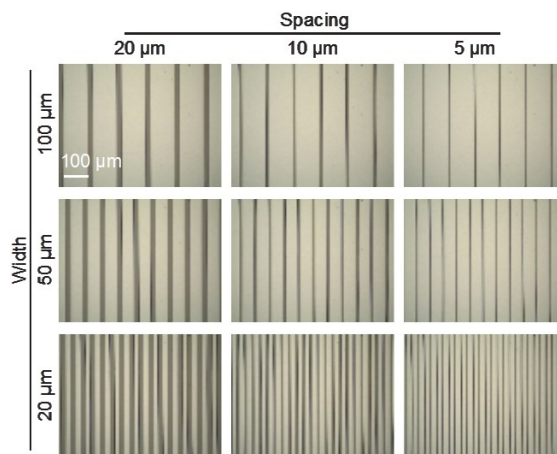


Fig. 1 PDMS template with fine strip patterns.

これらの PDMS 鋳型をフィブロネクチン溶液に浸して室温で 1 時間静置した。フィブロネクチンコートした PDMS 鋳型を Non-coated 24-well plate 底に接着させて 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータで一晩静置した。上記の plate に 5x10<sup>5</sup> cells/mL で C2C12 細胞を播種し、10%FBS 含有 DMEM 培地で 2 日間培養した。

希望通りの実験を行うことができたのか

細胞を播種してから1日後、width 20  $\mu\text{m}$  x spacing 20, 10  $\mu\text{m}$  のサンプルでストライプパターンに沿って細胞が接着していた。しかし細胞播種から2日後には細胞の配向性は低下し、ストライプパターンにコートしなかった時と同じ程度にランダムに接着していた。他のサンプルでは、ストライプパターンに沿った細胞接着が確認できなかった。

#### 今後どのような改善点を必要とするか

ストライプパターンに沿った細胞接着が全てのサンプルではみられなかった原因として、PDMS 鋳型と plate の表面についたゴミのせいで十分に均一なフィブロネクチンが接着していなかったことが原因だと考える。これには、フィブロネクチンコート前にPDMS 鋳型と plate の表面を洗浄する操作が有効と考える。また培養日数が進むにつれて細胞の配向がランダムになってしまったが、これを防ぐには最初に播種する細胞密度を高くする、細胞が接着しにくい表面加工のされた plate を使う、などが有効と考える。

#### 4. その他・特記事項 (Others)

特になし。

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

なし。

#### 6. 関連特許 (Patent)

なし。