

課題番号 : F-18-NU-0011
利用形態 : 機器利用
利用課題名(日本語) : 細胞培養環境の剛性が細胞機能に及ぼす影響の解明
Program Title (English) : Effects of substrate stiffness on cell functions
利用者名(日本語) : 前田英次郎, 松本健郎
Username (English) : E. Maeda, T. Matsumoto
所属名(日本語) : 名古屋大学大学院工学研究科
Affiliation (English) : Grad. Sch. of Eng., Nagoya Univ.
キーワード/Keyword : リソグラフィ・露光・描画装置, 細胞, マイクロピラー基板

1. 概要(Summary)

増殖や遊走, 分化などの細胞の機能は生化学的因子のみならず, 細胞が接着する基板の剛性という力学的因子にも強く影響を受けることが知られている. 本研究では微細加工技術を用いて剛性の操作が可能な PDMS 製細胞培養基板を作製し, ウサギアキレス腱から採取した腱細胞の機能に及ぼす基板剛性の影響を検討した.

2. 実験(Experiment)

【利用した主な装置】

3次元レーザ・リソグラフィシステム一式

【実験方法】

シリコンウエハにネガティブフォトレジスト SU-8 を用いたフォトリソグラフィで半径 3 μm , 中心間距離 6 μm (六方格子状に配置), 高さ 2, 4, 8 μm のマイクロピラー鑄型(オス型)を外注により作製した. 次に PDMS でメス型を作製し, さらに再度 PDMS で型取りすることで設計値通りの PDMS 製マイクロピラー基板を作製した. 作製した 3 種類の高さのうち, 8 μm のマイクロピラーはメス型から剥離した際に静電気等でピラー同士が接着したり倒れたりしてしまう. そこで 3次元レーザ・リソグラフィシステム(超臨界乾燥機)を使用することで接着あるいは倒れたピラーを垂直に立たせ, 細胞培養に使用できるように仕上げた.

細胞培養実験にマイクロピラー基板を使用するに先立って, 細胞が接着するピラー頂部にフィブロネクチンをコートし, ピラー側面はウシ血清アルブミンを 2% 含むリン酸緩衝溶液でコートした.

ウサギアキレス腱から採取した腱細胞は継代数 1-3 の間で使用し, マイクロピラーには所定の細胞密度で播種した.

3. 結果と考察(Results and Discussion)

作製した SU-8 鑄型から転写した PDMS マイクロピラーデバイスに, ウサギアキレス腱から採取した腱細胞を播種し, 更に炎症性サイトカイン IL-1 β を投与して細胞のコラーゲン分解酵素 MMP-1 の遺伝子発現量の変化を調

べた(Fig.1). その結果, マイクロピラーが高くなる(剛性が下がる)と MMP-1 遺伝子発現量が増加すること, また発現する細胞数も増加することがわかった.

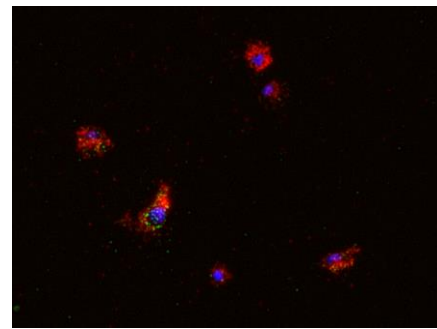


Fig.1 Representative image of tenocytes on micropillar substrates expressing MMP-1 gene. Gene expression was detected as fluorescence signals with fluorescence in situ hybridization.

4. その他・特記事項(Others)

科研費基盤 C 16K01346, 科研費挑戦的萌芽 17K20102

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

(1) 前田英次郎, 安東頼子, 松本健郎, 腱細胞への炎症性サイトカイン刺激により惹起される細胞形態変化およびコラーゲン分解酵素 MMP-1 遺伝子発現に及ぼす培養基質剛性の影響, 日本機械学会 第 31 回バイオエンジニアリング講演会, 平成 30 年 12 月 15 日.

(2) E. Maeda, K. kuroyanagi, Y. Ando, T. Matsumoto, Effects of substrate stiffness on morphology and MMP-1 gene expression in tenocytes stimulated with interleukin-1b. 2019 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2019/2/2-5.

6. 関連特許(Patent)

なし.