

課題番号 : F-20-KT-0148  
利用形態 : 技術代行、機器利用  
利用課題名(日本語) : 微細メッシュ構造基板を用いた細胞接着機能制御  
Program Title (English) : Cell Adhesion Modulation Using a Microfabricated Mesh Substrate  
利用者名(日本語) : オケヨケネディ<sup>1)</sup>, 安藤悠太<sup>2)</sup>, 木部善清<sup>3)</sup>, 玉井龍太郎<sup>2)</sup>, 下平剛司<sup>2)</sup>  
Username (English) : K. Okeyo<sup>1)</sup>, Y. Ando<sup>2)</sup>, Y. Kibe<sup>3)</sup>, R Tamai<sup>4)</sup>, T Shimodaira<sup>4)</sup>  
所属名(日本語) : 1) 京都大学ウイルス・再生医科学研究所, 2) 京都大学大学院工学研究科, 3) 京都大学大学院生命科学研究所  
Affiliation (English) : 1) Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University 2) Graduate School of Engineering, Kyoto University 3) Graduate School of Biostudies, Kyoto University  
キーワード/Keyword : リソグラフィ・露光・描画装置、PDMS デバイス、細胞シート、バイオ&ライフサイエンス、

## 1. 概要(Summary)

近年、細胞が周囲の物理的刺激を感知し、その情報をもとに自己の挙動や遺伝子発現等を適応的に調節する、いわゆる細胞メカノバイオロジーが注目を集めている。本研究では、微細マイクロパターンを施した基板上で細胞を培養し、基板の力学的特性や幾何学的形状が細胞的応答や組織形成に及ぼす影響を調べることで、細胞のメカノレスポンス機構(力学応答)の解明を目指している。今回、基板の形状や曲率が、多細胞組織の形成と組織後の組織ダイナミクスに及ぼす影響を検討した。そのため、京都大学ナノテクノロジーハブ拠点の技術員の方々の協力を得て、Deep RIE (reactive ion etching)法により深さ 150  $\mu\text{m}$  および 200  $\mu\text{m}$  のシリコンモールドを作製、さらにそれを用い、高低差 150  $\mu\text{m}$  および 200  $\mu\text{m}$  の凹凸形状の PDMS デバイスを作製した。このデバイス上で細胞を培養したところ、高さ 150  $\mu\text{m}$  の凸の直立壁に沿って細胞組織が形成されることが確認された。また、通常のフラットな面で形成される細胞組織と比較してアクチン骨格構造の発達が見られた。

## 2. 実験(Experimental)

### 【利用した主な装置】

レーザー直接描画装置、高速マスクアライナー、両面マスクアライナー、基板接合装置、深堀りドライエッチング装置 1、レジスト現像装置、ウエハスピン洗浄装置、回路&レイアウト設計ツール等。

### 【実験方法】

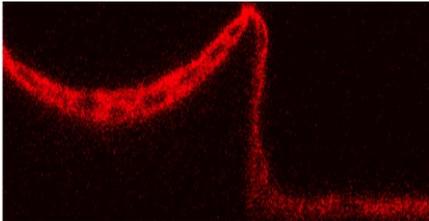
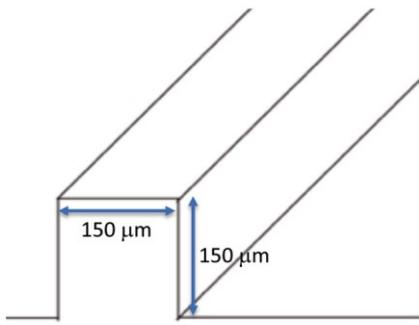
まず、パターンデザイン、レーザー描画、レジスト現像、

クロムエッチング、レジスト除去のプロセスによりマスクを作製した。次に、深さ 150  $\mu\text{m}$ /200  $\mu\text{m}$  のモールドを作製するために、陽極ボウディングにより 200 $\mu\text{m}$  厚シリコンウェーハと TEMPAX float を接合した。バックエッチングを行って 150 $\mu\text{m}$  厚みとした。その後、予め洗浄した Si ウェーハ上にレジストを塗布し、プリバーク、露光、ポストバーク、現像のプロセスを経て、深絞りエッチング装置により上述のモールドを作製し、離型剤を塗って完成させた。PDMS デバイスの作製は通常ソフトリソグラフィ法で行った。得られたデバイスを collagen でコーティングし、細胞を播種して培養を行った。

## 3. 結果と考察(Results and Discussion)

Fig. 1(上)に示すライン型凹凸 PDMS デバイスを作製し、細胞培養に用いた。具体的には、幅 150  $\mu\text{m}$ 、高さ 150  $\mu\text{m}$  のラインパターンの PDMS デバイス上に HaCaT keratinocytes を培養し、アクチン細胞骨格構造を phalloidin で染色した。その結果の画像を Fig.1(下)に示す。

画像から明らかのように、これだけの高さ(細胞の約 10 倍)のパターンにおいても、通常のフラットな面で細胞組織が形成されるのと同様に、凸部の側面にも細胞がきちんと接着し、パターン表面全体で cell sheet が形成されることが確認された。しかし、PDMS の成型に問題があったためか、モールドの底部がフラットに形成されなかったためか、Fig.1(下)に示すように、凸部の上面が大きくぼんでいることが分かった。今後、deep RIE の工程を見直す必要がある。



## **yz slice**

Fig 1. Keratinocytes forming a cell sheet on a collagen-coated linear topography pattern (width: 150  $\mu\text{m}$ , height: 150  $\mu\text{m}$ ) and stained for F-actin (red).

### 4. その他・特記事項 (Others)

本報告書に記載の細胞培養実験は名古屋大学大学院医学系研究科の平田宏聡先生が行ったものである。この場をお借りして謝意を表明したい。

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

なし

### 6. 関連特許 (Patent)

なし