

博士学位論文要旨

培養細胞に対する機械的刺激の影響

機械工学専攻

日野 遥

目次

- 1章 緒論
- 2章 細胞の配向に対する培養足場凹凸形状の影響
- 3章 細胞に対するせん断流れ刺激の影響
- 4章 細胞に対する超音波振動刺激の影響
- 5章 結論

本論文は、表面微細加工技術と細胞培養技術を利用して、力学刺激環境に培養足場形状環境を組み合わせた実験システムを用いて、定量的な力学刺激に対する細胞の挙動を解析したものである。すなわち、ポアズイユ型およびクエット型の流れ刺激、超音波振動刺激などの機械的刺激と微細加工表面形状に対する細胞応答についての実験結果をまとめたもので、以下の5章で構成される。

第1章 緒論

本章では、*in vivo* で発生している機械的な刺激や、*in vitro* での機械的刺激および培養足場形状の細胞への影響に関して既に知られていることがらについて概観し、本研究で取り上げる「培養細胞に対する機械的刺激の影響」の意義および位置づけについて述べている。*in vitro* で細胞を操作する方法として、*in vivo* 環境を模擬して、培養足場形状を工夫する方法と機械的な刺激を加える方法が考えられる。また、近年では非生理的な機械的刺激もふくめて、新たな細胞応答制御方法の開発が期待されている。しかし、*in vitro* における細胞の制御や組織の作製技術は、定量化が十分にできておらず、*in vitro* での組織の作製においては、まだ課題が多い。また、組織を構成する前の段階として、単一の細胞の足場形状及び機械的刺激に対する応答の理解が必要である。本研究では、足場形状に対する細胞の配向応答を明らかにするため、微小縞の高さに着目して実験を行った。また、機械的刺激に対する応答を明らかにするため、流れ刺激および超音波振動に対する細胞の応答について研究した。すなわち、本研究では、足場形状と機械的刺激を定量的に組み込んだ新たな培養細胞観察システムを開発し、細胞に対する足場・機械刺激の影響を実験的に調査した。

第2章 細胞の配向に対する培養足場形状の影響

本章では、培養足場の形状が細胞の配向方向に与える影響について論じている。細胞は足場形

状の影響を受けて形状を変化させる。近年では、細胞の形状が分化に影響を与えることも報告されており、足場形状の細胞への影響の調査の重要性が増している。足場形状に対する細胞の応答の定量的な評価は不十分で、例えば、微細構造の高さと細胞の挙動の関係は定量的には評価されていない。そこで、微細構造の幅を固定し、細胞の配向に対する微細構造の高さの影響について検討した。MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術であるフォトリソグラフィを用いて微細な加工を施した鋳型を作製し、作製した微細形状をシリコン樹脂 (PDMS, Poly-di-methyl-siloxane) に転写して、細胞の培養足場を作製した。培養足場は浮遊細胞直径 (20 μm 前後) よりも小さい寸法のマイクロメートルオーダーのラインアンドスペース形状とし、凸部の高さを 0.3 μm から 3.5 μm の間で変化させた。足場に接着した細胞の方向は画像解析を行うことで評価し、足場の高さが及ぼす細胞への影響について検討した。次に、足場の凸部の幅を 3, 5, 7 μm で変化させた場合の、細胞の配向を評価し、足場の寸法の影響について検討した。その結果、培養足場の高さが 0.7 μm 未満になると C2C12 (マウス横紋筋由来筋芽細胞) は足場形状に対する配向を示さなくなり、足場の高さが 3.5 μm の条件では、ほぼ全ての細胞が足場のライン方向に配向を示すことがわかった。また、数種類の株細胞を幅の異なる微細構造上で培養することにより、株細胞の由来部位や由来動物によって、足場に対する応答に多少の差があることがわかった。

第3章 細胞に対するせん断流れ刺激の影響

本章では、培養液の流動が細胞の挙動に与える影響について論じている。生体内では血流を代表として生理流体の流動が存在する。常に血流にさらされている血管内皮細胞は、流れに応じて形状を変化させることが知られており、血流の乱れは様々な疾患の原因となることが指摘されている。流れ環境における血管内皮細胞の挙動については、従来から、研究が行われており、流れ刺激の方向と細胞の配向方向に関係があることが知られている。生体内において、細胞は、力学場にさらされており、細胞が機械的刺激に応答することが生命活動につながっている。流れ刺激場においては、細胞へ加わる力をせん断応力として算出できることから、機械的刺激に対する応答の調査に向いている。しかし、流れの方向と細胞の長軸方向との関係については、定量的に検討されていなかった。そこで、第2章で用いた微細加工技術を応用し、細胞の方向をあらかじめ制御し、流れ刺激に対する細胞の長軸方向の影響を定量評価できる実験システムを作製した。幅 4 mm, 高さ 0.1 mm, 長さ 30 mm の矩形の直線流路を作製し、細胞に流れ刺激を負荷した。平行平板間における Poiseuille 流れ型の流速分布の式を用いて、細胞培養面におけるせん断応力を算出した。流路の底面には 3 μm 間隔の浅い微小凹凸縞模様 (マイクロパターン) を、流れの方向に対して 0°, 45°, 90°となるように作製した。経時的な観察画像において同一細胞の応答を追跡した。その結果、培養基板上における細胞の長さ、伸展方向、遊走方向は、縞模様の方向毎に異なることがわかり、流れの方向に対する細胞長軸の角度が増加すると、流れ刺激の影響が大きくなることがわかった。また、1, 2, 3 Pa とせん断応力の大きさを変化させたところ、3 Pa においては足場の影響よりも流れの影響が大きくなるが、1 Pa では足場縞模様の方向に応じて細胞応答が変化した。以上のことから、微細加工面を流路内に設置することで、細胞の方向を制御した上での流れ刺激への応答を調査することが可能であることがわかった。

次に、回転する円板を用いて Couette 流れ型せん断流れ装置を作製した。この装置では、回転速度に応じて、せん断速度を変化させながら、細胞を培養することができる。細胞はせん断応力に対して応答することが知られている。作製した装置を用いて筋芽細胞 (C2C12) と骨芽細胞 (MC3T3-E1) に対して、壁面せん断応力 2 Pa までの流れ刺激を負荷したところ、細胞の種類によって異なる応答を観察することができた。すなわち、C2C12 は流れの方向に対して斜め方向、MC3T3-E1 は流れと平行な方向に配向した。作製した装置を用いることで、細胞に対する流れのせん断応力の影響を定量評価できることを示した。

第 4 章 細胞に対する超音波振動刺激の影響

本章では、由来の異なる複数種類の細胞に対する超音波振動刺激の影響について論じている。超音波は、医療機関において診断等の目的で使用されており、細胞に対する影響についての評価は重要である。また、筋肉治療にも用いられているという観点から、単一の細胞においても増殖促進等への効果の可能性がある。第 4 章では、超音波振動刺激が細胞の増殖や分化に及ぼす影響について検討した。第 2, 3 章で明らかになったように、細胞の由来により機械的刺激に対する応答が異なる可能性がある。本章では、筋芽細胞 (C2C12), 線維芽細胞 (L929), 肝がん細胞 (Hepa1-6), 血管内皮細胞 (HUVEC), 神経芽細胞 (Neuro-2a) の 5 種類の株細胞に対する超音波刺激の影響を検討した。超音波刺激の振動数は 1 MHz に固定し、超音波の強度を $1.5\sim 65\text{ mW/cm}^2$ の間で変化させ、超音波の強度の違いが細胞の挙動に与える影響について調査した。細胞の接着数を評価したところ、 65 mW/cm^2 の強い刺激では、C2C12, Hepa1-6 が剥離する傾向があることがわかった。また、細胞の増殖について評価したところ 20 mW/cm^2 程度の刺激では細胞の増殖が促進された。さらに、Neuro-2a の場合には神経突起の長さが静置培養条件と比較して長くなったことから、分化が促進されることがわかった。これらのことから、超音波刺激は細胞の接着や増殖・分化に影響を与え、株細胞の種類によって応答が異なることがわかった。

第 5 章 結論

第 2 章「細胞の配向に対する培養足場凹凸形状の影響」では、マイクロ加工によって細胞の浮遊時の直径 ($20\text{ }\mu\text{m}$ 前後) よりも小さな幅の凹凸縞模様を付与した足場に付着した細胞の応答を調べ、配向方向を制御するための足場の凹凸の高さの閾値を見出した。すなわち、高さが $0.7\text{ }\mu\text{m}$ 未満になると C2C12 (マウス横紋筋由来筋芽細胞) は足場形状に対する配向を示さなくなる。第 3 章「細胞に対するせん断流れ刺激の影響」では、微小凹凸縞模様を伴う足場によってあらかじめ方向を制御した細胞に定量的にせん断流れ刺激を負荷する実験や、回転円板によるクエット流れ負荷装置における実験を行うことで、足場形状が細胞に及ぼす影響は、せん断応力の大きさにより変化することが分かり、2 Pa 以下の壁面せん断応力下で、筋芽細胞が流れの方向に対して斜め方向、骨芽細胞が流れと平行な方向に各々配向する様子を観察できた。第 4 章「細胞に対する超音波振動刺激の影響」では、持続的に 1 MHz の超音波刺激を与えながら培養した実験において、細胞の接着・増殖・分化に対する影響が、株細胞の種類毎に異なることを見出した。以上、本論文では、細胞の種類に応じて、足場凹凸形状および流れ・超音波振動などの機械的刺激の程度を

調節することによって，細胞の挙動を制御できることを見出した．本研究の成果は，*in vitro* における細胞の組織化の効率を上げる手法の開発につながり，再生医療などの分野への貢献が期待される．