

平成 25 年度 (2013 年度)  
卒業論文

高分子ゲルマイクロパターン界面を用  
いる三次元培養細胞塊の構築

指導教員 橋詰 峰雄 准教授

吉本 敬太郎 准教授

飯島 一智 助教

東京理科大学 工学部

工業化学科 複合工業化学第一研究室

4210053 鈴木 雅也

## 目次

第一章.....	3
1-1 細胞培養技術とその応用 .....	4
1-2 三次元培養（スフェロイド培養） .....	5
1-3 生体適合性材料ポリエチレングリコール（PEG） .....	7
1-4 本研究の目的 .....	8
第二章.....	9
2-1 諸言 .....	10
2-1-1 シランカップリング処理 .....	11
2-1-2 フォトリソグラフィ技術による光重合 .....	12
2-1-3 PEG ゲル表面の性質 .....	13
2-2 実験方法・結果 .....	14
2-2-1 ガラスの前処理（ピラニア洗浄、シランカップリング処理） .....	14
2-2-2 PEG ゲルマイクロパタン表面の作製 .....	15
2-2-3 PEG ゲルマイクロパタン基板作製条件の最適化 .....	16
2-2-4 タンパク吸着試験 .....	16
2-2-5 Hoechst による核染色 .....	19
2-2-6 スフェロイドの三次元立体構造 .....	20
2-3 考察 .....	22
2-4 使用試薬・機器 .....	23
第三章.....	24
3-1 間葉系幹細胞 .....	25
3-2 ADSC の医療分野での可能性 .....	25
3-3 今後の展望 .....	26
第四章.....	27
4-1 結言 .....	28
4-2 謝辞 .....	28

# 第一章

## 序論

## 1-1 細胞培養技術とその応用

細胞とは生体を構成する最小単位として知られている。((培養の歴史))。こうして動物細胞がある条件下で飼育＝培養できるようになった。細胞培養は、細胞のために調製した培養液に浸すことで可能にする。一般的な培養液は、様々な塩類・アミノ酸・養分を配合した培地をベースに、生体由来のタンパクや微量成分をほど良く含んだ血清、菌類の感染・繁殖を抑えるための抗生物質を添加して行われている。さらに、滅菌状態を保持した空間での作業や培養液の pH を一定に保つために炭酸ガス、または体温を想定した温度管理が必要になる。こうして細胞を飼育＝培養が可能になるが、培養と一口に言っても様々な方法がある。例えば、細胞接着面にコラーゲン、フィブロネクチンといった血清以外の細胞接着性タンパクをあらかじめ培養表面に吸着させて細胞の接着性や活性の向上を図る方法や、細胞シグナル性の分子を表面修飾することで細胞の状態を制御する工夫もある<sup>1</sup>。また巡回培養のように浮遊状態で培養することで細胞同士の接着のみを維持することによる臓器の構築を試みる研究や、温度・炭酸濃度・酸素濃度・血清成分を各種調節することで実に多彩な細胞種の培養とその培養方法を模索・確立する現在にまで至り、細胞培養の需要は高まっている。このように培養方法をデザインすることで材料・生化学・医学といった幅広い研究分野の融合がなされ同時に細胞を用いた新しいアプリケーション面の期待が高まっている。例えば、薬物や新規化合物の毒性・代謝をモニターするスクリーニングツールとして細胞チップ技術が挙げられる。これは生物が受ける外部刺激を細胞レベルにスケールダウンして観察する方法である<sup>2</sup>。つまり細胞を優秀なセンサーと見立てることで、生物のもつ能力に着目し生物のおかれた周囲の環境を評価する。そのためには細胞の応答を臓器によように高感度化するための「材料」設計と、創薬や臨床の現場における「医学」的な応用という二面性を有する。他には無血清培地といった一見単純に見えるがユニークな培養法もある。抗体などのタンパク産生や細胞そのものを応用したい場合、血清成分は避けるべき成分になってしまう。細胞培養のほとんどは培地に血清を添加することで知られているが、血清成分を使用することで他動物種のタンパクが混じってしまう。このような細胞から抽出したタンパクもしくは細胞そのものを利用したい場合、人体に免疫反応等の副作用を引き起こしてしまう恐れがあるため、無血清な環境下で培養する技術も有用である。

こうして細胞培養は多くの分野を巻き込み、研究のみならず生活を豊かにする技術として大変重要な役割を担っていると言える。

---

<sup>1</sup> *Nature method, vol.5, no.7, July(2008)*

<sup>2</sup> 軽部征夫、バイオセンサー<未来の生物化学シリーズ④> 共立出版(1992)

## 1-2 三次元培養（スフェロイド培養）

細胞工学における「スフェロイド」とは、同種の細胞同士による凝集塊のことである [Figure 1-1, 1-2]。通常の細胞培養はシャーレを代表するように平面上で行われるため細胞が単層構造（2D）になるのに対して、スフェロイド培養ではそれ自体が立体的構造であるので三次元培養とも呼ばれる。スフェロイド培養が通常の培養よりも優れている点は細胞の活性と生存率である。一般的に、細胞は生体から分離された時点でその活性は消失していくとともに、通常の単層培養では細胞の機能低下を免れない。スフェロイド培養では、3次元的な細胞同士の接着により細胞間相互作用が働くことが知られており、単層培養と比較して高い細胞活性を数週間にわたって維持できると考えられている<sup>3 4</sup>。

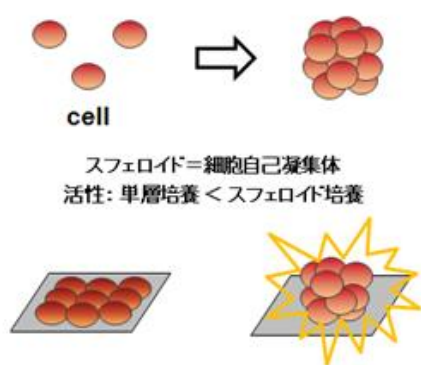


Figure 1-1  
スフェロイドの形成と  
スフェロイドが持つ高い活性

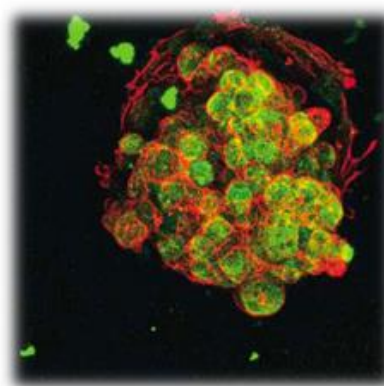


Figure 1-2  
ラット成熟肝スフェロイドの蛍光写真  
赤：F-アクチン、緑：アルブミン

1976年に Seglen がコラゲナーゼを使用して高い機能を維持した成熟ラットの肝細胞分離法（コラゲナーゼ灌流法）を確立<sup>5</sup>して以来、分離肝細胞を使用した研究が盛んに行われてきた。しかし、通常の細胞培養法では肝細胞採取後 1 週間ほどしか生存を維持できず、機能面でも肝細胞に特異的なアルブミン産生、アンモニア除去および様々な基質を水酸化するシトクロム P-450 活性などが 2-3 日で低下し、やがて消失する。細胞培養液や培養基質の改良が検討され、肝細胞の長期培養に関する成果も多数報告されるようになったが、しかし、本来の肝機能を長期的に十分に発現させるという点では困難であった。生体外での肝細胞培養が困難とされている理由として、生体内で肝細胞は肝細胞同士や肝非実質細胞、細胞外基質と高度に相互作用をしているためであるといわれる。また、生体組織では細胞は三次元的な組織構築の中に存在しており、細胞密度は極めて高くなっている。それまで広く行われてきたのは二次元的な単層培養方法であり、一定以上の細胞密度を再現するこ

<sup>3</sup> *BIO INDUSTRY* 1号 特集細胞アレイ、p.24, Jan, 2006 CMC 出版

<sup>4</sup> *Journal of Photopolymer Science and Technology* vol.19, no.4(2006), 451-454

<sup>5</sup> Seglen, *Methods in Cell Biology* (Prescott, D.M., ed.), vol 13, 29-83, 1976

とはできなかった。1950年代にモスコーナにより、マウスの悪性細胞が凝集塊を成し、構造的にヒトの腫瘍に類似していることが発見され<sup>6</sup>、1970年代初期にはサザーランド等により腫瘍細胞の本格的な機能解析が行われた<sup>7</sup>。また1985年ランドリー等により肝細胞が浮遊球状の三次元的に凝集した肝細胞スフェロイドの機能解析について報告がされた<sup>8</sup>。従来の二次元的な単層培養に比較して三次元培養は細胞密度が高かい点で長期培養、機能維持に適しているといわれる。スフェロイドの調製方法も検討されてきており、それは2つに大別できる。ひとつは培養液を磁気攪拌子で攪拌し、培養容器をローテーターで回転させるなどする方法で、物理的な力（培養液の攪拌など）で細胞を強制的に浮遊状態に保ち、細胞同士の接着確を誘導するものである<sup>9</sup>。もう一つは、細胞培養容器の表面状態もしくは培養器の形状それ自体を改質することによりスフェロイド化を促進する<sup>101112</sup>という二通りの手法が存在する。この二種の方法にはそれぞれ長所と短所が存在し、前者においては極端に接着依存性の細胞には適用できないし、物理的な力が細胞に及ぼすストレスも無視できない、等の点に問題がある。一方後者においては大量調製が困難であること、細胞によっては初期接着によって細胞極性を失い脱分化する、接着スフェロイドを正常な状態で回収することが困難、等の点が問題として存在する。また両者共通の欠点として、得られる細胞スフェロイドは浮遊状態である。これにより高度なスフェロイド培養のために培養表面上への固定化が必要となる。また、スフェロイドそれ自体のサイズを規定する機構が存在しないため、スフェロイドサイズがそろわない。そして、浮遊状態であるがために、スフェロイド同士の衝突によるスフェロイドの癒合が生じることが挙げられる。

この様な手法に対し、細胞接着領域をマイクロレベルで制御したマイクロパタンを用いてスフェロイドを構築する手法がある<sup>13</sup>。マイクロパタン表面に細胞を適切な濃度で播種すると、細胞接着領域にサイズのそろったスフェロイドを大量生産することができる。過去には、石英製のフォトマスクを用いてマイクロパタンを作製した先行研究がある。<sup>13</sup>しかし、石英製のフォトマスクは高価であるという欠点がある。本研究では安価なフィルム製のフォトマスクを使用して高分子ゲルマイクロパタン界面作製を作成することで低コスト化を図るとともに、モデル細胞を用いて大きさの異なるスフェロイドを大量構築する条件の探索とスフェロイド化した細胞の評価を目的とした。

---

<sup>6</sup> Moscona A, *Proc Natl Acad Sci*, 43, 184-194, 1957

<sup>7</sup> Sutherland, *J Natl Canc Inst*, 46:113-120, 1971.

<sup>8</sup> Landry J, *J Cell Biol*, 101, 914-923, 1985

<sup>9</sup> Wu et al., *Biotech. Bioeng.*, 50, 404-415, 1996

<sup>10</sup> Matsushita et al., *Cytotechnology*, 42, 57-66, 2003

<sup>11</sup> Matsushita et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 324, 1991

<sup>12</sup> Yamauchi et al., *J. Reprod. Dev.* 47, 165-171, 2001

<sup>13</sup> *Lab on a Chip*, 9, 1991-1993 (2009)

### 1-3 生体適合性材料ポリエチレングリコール (PEG)

Poly(ethylene glycol)はエチレンとエーテルを骨格に有する直鎖状の構造を取り [Figure 1-3]、疎水性エチレンと親水性エーテルが交互に結合していることから疎水性・親水性のバランスがとれた両親媒性の高分子である。PEG はタンパク質吸着の抑制効果が最も高い<sup>14</sup>とされている。PEG の骨格構造を見ると、単結合のまわりの回転運動が容易であるため、通常の高分子に比べ、極めて柔軟な構造であり、かつ分子の熱運動によって溶液中では極めて高い運動性を示すため、タンパク質が吸着すると立体構造の自由度が減少して、エントロピーが減少するため熱力学的に不安定になる。このためタンパク質吸着の抑制効果が高いといえる。特に、抗体やその他タンパクの吸着を制御する表面の設計が、バイオセンサーや微粒分散表面への応用がなされている<sup>15</sup>。これらの性質によって PEG は生体分子との相互作用が小さく（主にタンパク質の吸着）や細胞への毒性・刺激性が少なく、生体適合性を有する高分子材料であることが知られている。

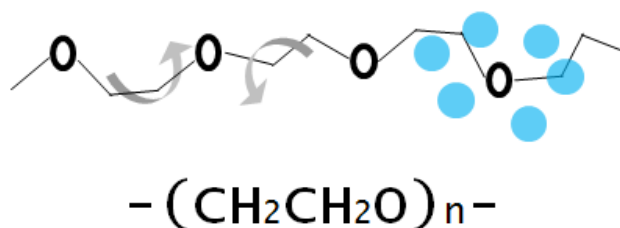


Figure 1-3

ポリエチレングリコール (PEG) はその構造より運動性に優れ、また酸素分子によって周囲の水分子が引き寄せられると考えられる。また PEG そのものはノニオン性である。したがって生体物質との相互作用が極めて低く、生体適合性材料として幅広く利用されている。

生体適合性とは、タンパクのような生体物質や細胞のような組織との反応をしない。PEG 鎖の両末端には、それぞれ官能基を導入することができるため、その官能基由来の機能を付加した材料が合成できるため、PEG を用いた生体模倣材料を設計する研究が盛んである。例えば、ドラッグデリバリーのキャリア材料や人工組織のための材料として用いられるが<sup>16</sup>、例を挙げれば枚挙に暇がない。現在市販されている化粧品や洗顔などに使用されているだけでなく、アメリカ食品衛生局(FDA)で認可され、薬品の成分としても使用されている。本研究では、ガラス表面に PEG 修飾を施すことで特殊な培養表面を構築している。

<sup>14</sup> *Lab on a chip* **9**, 1286-9 (2009)

<sup>15</sup> *Langmuir*. **25**(20), 12243-12249 (2009)

<sup>16</sup> *Macromolecular Bioscience*(**2007**), 7,23-39

#### 1-4 本研究の目的

本研究の目的は、安価なフィルム製のフォトマスクを使用して高分子ゲルマイクロパターン界面作製を作成することで低コスト化を図るとともに、モデル細胞を用いて大きさの異なるスフェロイドを大量構築する条件の探索とスフェロイド化した細胞の評価をすることである。従来の研究では、高価な石英製のフォトマスクを用いてマイクロパターンを作製しており、コストがかかるのが欠点であった。しかし、今回安価なフィルム製のフォトマスクで容易にかつ大量にスフェロイドが構築される条件が確立できれば、長期培養が必要な幹細胞研究への足がかりになるのではないかと考えている。

以下の挿絵は本研究の全体図を表している[Figure. 1-4]。PEG ゲルマイクロパターン表面を構築し、そこに細胞を播種することで写真のようなスフェロイドが構築される[Figure. 1-5]。PEG ゲルマイクロパターン表面の作製条件の検討・評価に始まり、スフェロイドに関する考察をまとめた。

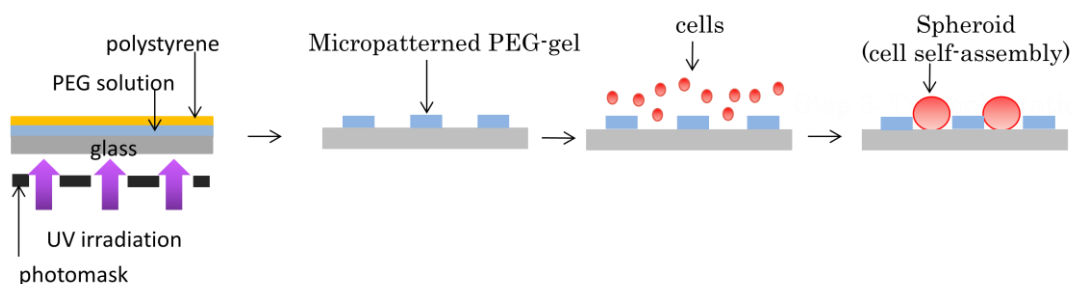


Figure 1-4

本研究の UV 照射からスフェロイド培養までの手順の図。はじめにフォトリソグラフィー技術で PEG ゲルマイクロパターンチップを作製し、そこに細胞を播種することで細胞接着領域であるガラス部分にスフェロイドが構築される。

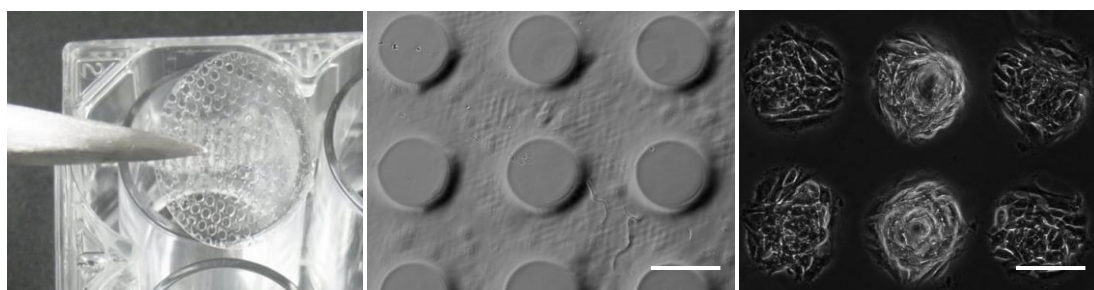


Figure 1-5

マイクロパターン図と位相差顕微鏡画像。

写真は左から、自作マイクロパターン ( $r=500\mu\text{m}$ )、PEG ゲルマイクロパターン表面 ( $r=200\mu\text{m}$ ) の顕微鏡画像、スフェロイド ( $r=200\mu\text{m}$ ) の顕微鏡画像。



## 第二章

### PEG ゲルマイクロパターンを有する 細胞チップ構築の表面処理

## 2-1 諸言

本研究では微細加工した PEG ゲルを作製してスフェロイド培養を試みた。微細加工は新しいバイオデバイスの開発に直結しており、細胞培養技術に関しても例外ではない。マイクロメートルオーダーで微細加工した表面に必要な働きは、細胞の接着・固定化を制御することである。そのための微細加工技術としてフォトリソグラフィ、レーザーフォトリソグラフィ、マイクロコンタクトプリンティングが挙げられ、これらを駆使して基盤の濡れ性・表面電位・分子修飾といった表面の物性を改質することで細胞の接着状態・伸展、ゆくゆくは機能の解析へと期待できる。このような技術は、分子生物学の観点からも興味深いと思われ、細胞間相互作用研究への応用や臨床検査へも期待される。

スフェロイド培養をするために、ガラス基板上に PEG ゲルマイクロパタンを形成させる。PEG ゲルマイクロパタンは、フォトリソグラフィによる UV 照射で PEG の光重合を行いガラス表面上にゲル化させパタンを形成させる。ガラス表面はゲルの固定と疎水性改質を目的としてメタクリロイル基をシラン処理によって修飾させる。用いる PEG は分子量  $M_w \sim 575$ 、両末端アクリロイル(diacryloyl)基の PEG-DA である。この両末端アクリロイル基が PEG どちらの重合とガラス表面メタクリロイル基への固定を実現させる。PEG ゲルマイクロパタンの形状は、直径  $r(r=50 \sim 500)\mu\text{m}$  円、縁間隔  $r(r=50 \sim 500)\mu\text{m}$  であり、円形内は UV 非照射部でガラス表面の露出部分 (以下、スポット) となり細胞接着部となる。

円形外は UV 照射部でゲル部分となり細胞やタンパク質の接着を抑制させる。ガラスは直径 15mm の円形カバーガラスなのでガラス一枚あたりスポットが約 4400 個のパタンを作製できる。PEG ゲルマイクロパタン作製時のゲル溶液の延伸にはポリスチレン板を用いている。ガラス基板上にゲル化溶液を滴下し、その上にポリスチレン板を乗せることで液滴を延伸させる。この利点は、均等に素早く延伸することが可能、かつ、光重合 (ラジカル重合) の反応阻害剤となる酸素の取り込みを抑制できることである。他の延伸方法として従来のスピコート法があるが、これはとても時間がかかってしまう。また、直径 15mm の円形カバーガラスを用いる理由として、24well カルチャーインサートプレートにちょうど挿入できる大きさということがある。詳しい手順は以下に示す [Table 2-1]。

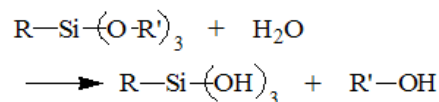
	処理	役割
手順 1	ガラス基板の洗浄・シラン処理	ゲル固定のための反応性表面の構築
手順 2	フォトリソグラフィ技術による PEG ゲルマイクロパタンの構築	PEG ゲル性質を利用したスフェロイドアレイ培養用表面の構築
手順 3	上記構築物に細胞播種	細胞接着領域でのスフェロイド構築
手順 4	上記構築物による培養開始	スフェロイド構築

Table. 2-1 PEG ゲルマイクロパタンの作製手順

### 2-1-1 シランカップリング処理

シランカップリング反応とは、シラノール基同士が反応してシロキサン結合をつくる反応である。この反応をする材料をシランカップリング剤と呼ぶが、たいていはエーテル結合を含むメトキシ、エトキシシランなどのアルコキシシランから成る。反応は、まずアルコキシシランの加水分解によってシラノール基が生成し、このシラノール基がシランカップリング剤同士もしくはその他の材料由来のシラノール基と縮合反応し、シロキサンを形成して強固な結合をする。[Figure 2-1]はトリアルコキシの場合のシランカップリング反応の図である。ガラス表面には多数のシラノール基を有するためシランカップリング剤によって官能基を表面に修飾することが可能になる。縮合反応は平衡反応であり、pH4.0 付近で最もシラノール基生成側に傾く。一般的に、シランカップリング剤の機能として表面修飾や表面改質があり、官能基の種類によりさまざまな特性を付与することができる。また、無機材料 (Si) と有機材料をつなぐ材料として有用であり、複合材料として幅広く応用されている<sup>17</sup>。本実験で用いるシランカップリング剤である(3-(methacryloyloxy)propyl)trimethoxysilane がガラス表面と反応、結合させることでガラス表面にアクリロイル基が修飾される [Figure 2-2]。

#### Hydrolysis Reaction



#### Condensation Reaction

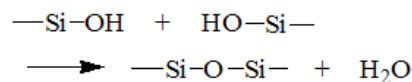


Figure 2-1

シランカップリング反応

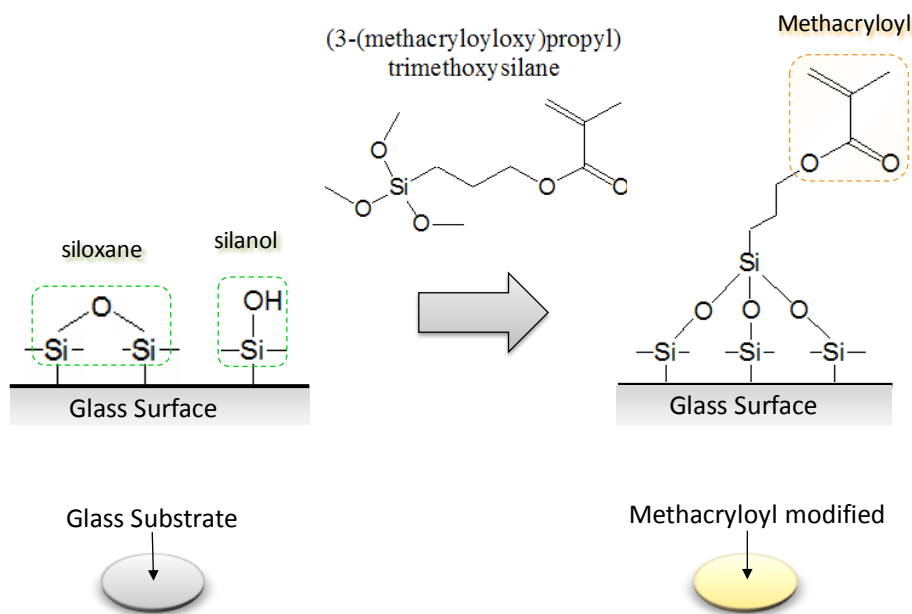


Figure 2-2 シランカップリング処理によるガラス表面上のメタクリロイル基修飾図

<sup>17</sup> 東亜合成研究年報 TREND1999 第s2号

### 2-1-2 フォトリソグラフィー技術による光重合

微細加工技術のひとつとしてフォトリソグラフィーが挙げられる。感光素材のサンプルはマスクで描かれた領域以外の場所に UV 光が照射され、照射部のみ化学反応が起きる。フォトリソグラフィーは、もともと、電子回路などの微細加工に使用されている技術であり、精密加工技術でありながら扱いやすいという利点がある。本研究では、PEG-DA(575)、Irgacur2959 (正式名 : 2-hydroxy-4'-hydroxyethoxy-2-methylpropiophenone) [Figure 2-3] をそれぞれマクロモノマー、光重合開始剤としてポリマーゲルを合成させる。Irgacur2959 は 270~280nm の波長に強い吸収ピークを持ち、UV 光に曝されること [Figure 2-5] でラジカルを発生させる分子として高分子の光重合に用いられる。これらの材料とフィルム製のフォトマスクを用いることでゲルパターンが形成される<sup>4</sup>。光重合開始剤を含んだ PEG 溶液をシラン処理した表面に滴下し、ポリスチレン板で圧着させることで均一に伸展させる。以下は PEG ゲルマイクロパタンの構築の図である [Figure 2-4,2-5]。

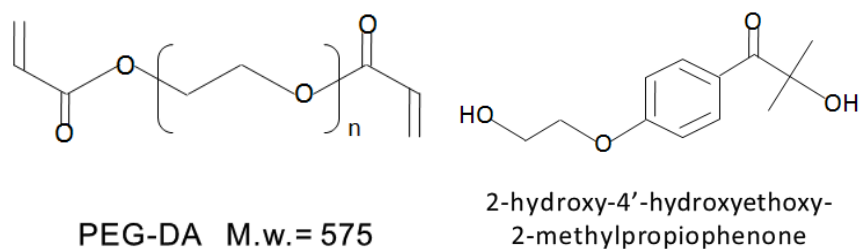


Figure 2-3

左 : PEG ゲル用マクロモノマー (両末端アクリロイル基)  
右 : ゲル化用光重合開始剤

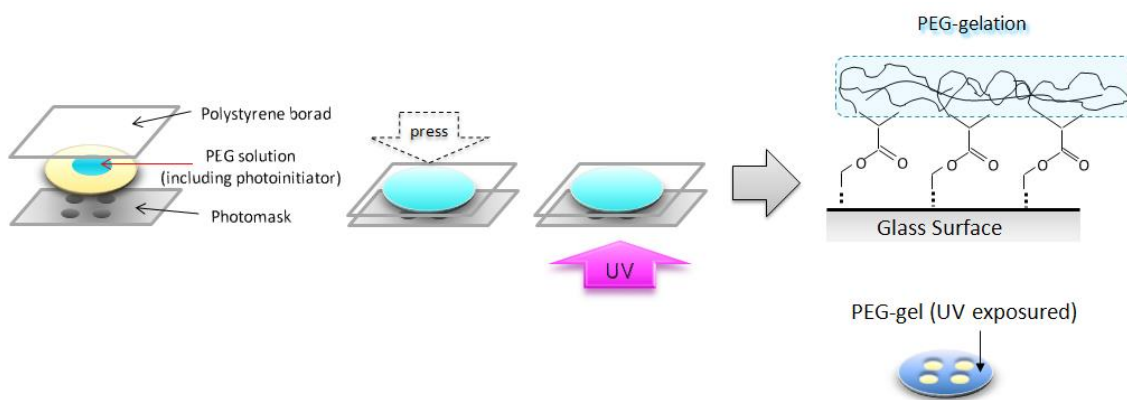


Figure 2-4

フォトリソグラフィー技術によるマイクロパタンの作製

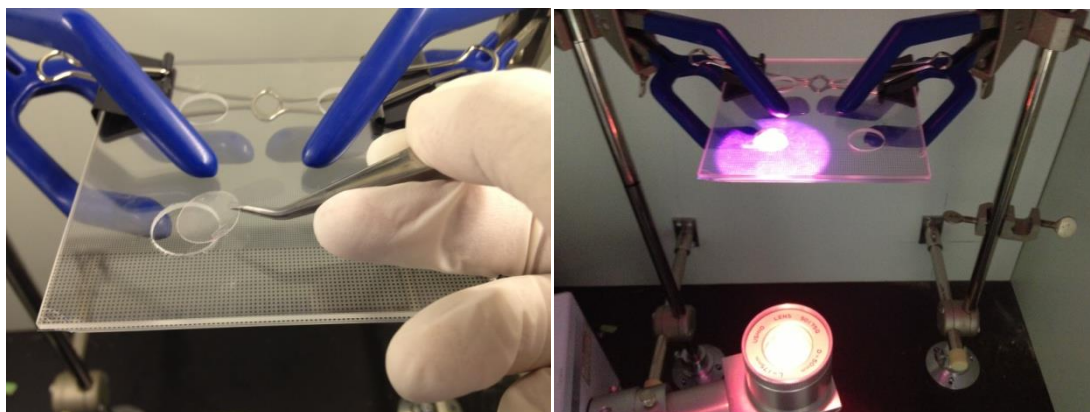


Figure 2-5

左：ガラスチップをフォトマスクの上に置く図

右：UV 照射の図

### 2-1-3 PEG ゲル表面の性質

本研究で用いる PEG は 1-3 にあるように、運動性、両親媒性、不活性であるため生体適合材料として知られている。生体適合性とは、ここではタンパク質や細胞といった生体物質の吸着を抑制し、生体物質との化学反応および相互作用を示さない効果を指す。生体適合性を有する PEG を表面に固定化することで基材に生体適合性の性質を与えることができる。したがって、PEG が固定された表面には生体物質の吸着を抑制できると考えられる [Figure 2-6]。本研究では PEG のゲルを光重合によって作製するが、両末端にアクリロイル基が導入された PEG-DA (略：DiAcryloyl)を用いることでゲルの重合と基板上への固定が可能になっている。ゲルということは、絡み合った PEG が水和していると考えられる。これは PEG 中のエーテル分子が  $H_2O$  分子を吸着させ、絡み合った PEG 中に  $H_2O$  を保持させていると考えられる。PEG の運動性は水和することで高まり<sup>18</sup>、生体物質の吸着抑制が期待できる。本研究では実際にタンパク吸着や細胞の接着を検討した。

<sup>18</sup> Plenum Press, NewYork, 361-374, 1984

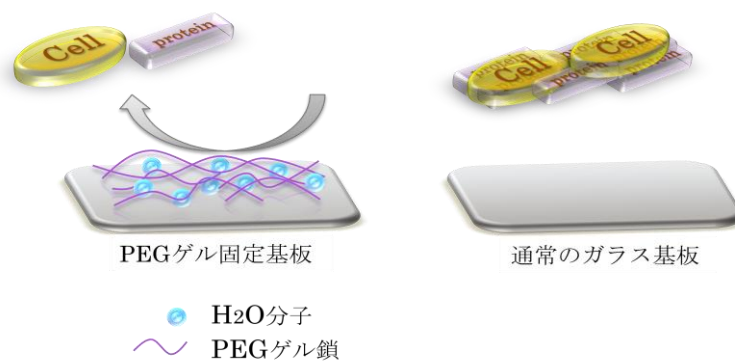


Figure 2-6

ゲル表面における生体物質（タンパク質・細胞）の吸着抑制の図

## 2-2 実験方法・結果

まず初めにシラン処理によってガラス表面にメタクリロイル基を修飾させる。次に PEG ゲルマイクロパタンをフォトリソグラフィ法によって作製する。

通常の基板作製の手順は、ガラスの前処理（ピラニア洗浄、シラン処理）、UV 照射による光重合を用いた PEG ゲルマイクロパタン作製である。また PEG ゲル表面の性質等を評価する。

### 2-2-1 ガラスの前処理（ピラニア洗浄、シランカップリング処理）

直径 15mm 丸型カバーガラス（松浪硝子工業株式会社）をピラニア洗浄によってガラス表面の僅かな有機物を取り除く。ピラニア洗浄は過酸化水素と濃硫酸をともに 100mL ずつ混合させた溶液で、50°C で 60 分間浸漬させることで行った。この際、注意すべき点として、両面ピラニア処理をすると、PEG ゲルマイクロパタン作成の際にガラス基板裏側もゲル化が固定されてしまう。このため、ピラニア洗浄は片面処理にした。ピラニア洗浄後、MilliQ でよく洗浄し、ピラニア洗浄した面に調製したシラン溶液を滴下し、室温で 90 分間静置した。その後、エタノールと MilliQ でよく洗浄し、160 °C の減圧乾燥庫で 12 時間静置することで縮合反応 を完全に進行させた<sup>19</sup>。

<sup>19</sup> *Biomacromolecules*, 2000, 1, 39-48

### 2-2-2 PEG ゲルマイクロパタン表面の作製

ゲル化溶媒として脱気済み MilliQ 水と窒素置換済み Methanol をそれぞれ 2.5mL、5.0mL 用意しておく。これに PEG-DA(575) と Irgacure2959 をそれぞれ 3.75mL、75mg 溶かす(それぞれ 2-1 に示した)。また、PEG-DA(575) と Irgacure2959 は 33%(v/v)、1%(w/v) としている。溶液は冷暗保存として 4°C 冷蔵庫に保管しておく。

シラン処理済ガラス基板上に上述の PEG ゲル化溶液を 10~15ul 滴下する。1cm 角のポリスチレン板を上から被せて溶液をガラス全体に進展させる。このとき、溶液はガラス板とポリスチレン板の間に挟まれて延びている状態である。この系をフィルム製フォトマスクの上に乗せて UV を照射する。照射強度、照射時間、照射距離等を変化ながら作製条件の最適化を図った。その後、PEG ゲルマイクロパタン基板を滅菌、また細胞毒性のある Irgacure2959 の除去するために 70%Ethanol で 2 時間ほど浸漬させておく。その後、エタノールをアスピレーターで除き、血清なし培地で 3 回 wash し、血清入り培地で 2 回 wash した後、さらに血清入り培地に一晚静置しておいた。

上記条件のもと UV 照射時間を 1.0 秒で作製した写真を以下に示す[Figure 2-7]。また異なる照射時間の PEG ゲルマイクロパタン表面の写真を示す[Figure 2-8]。

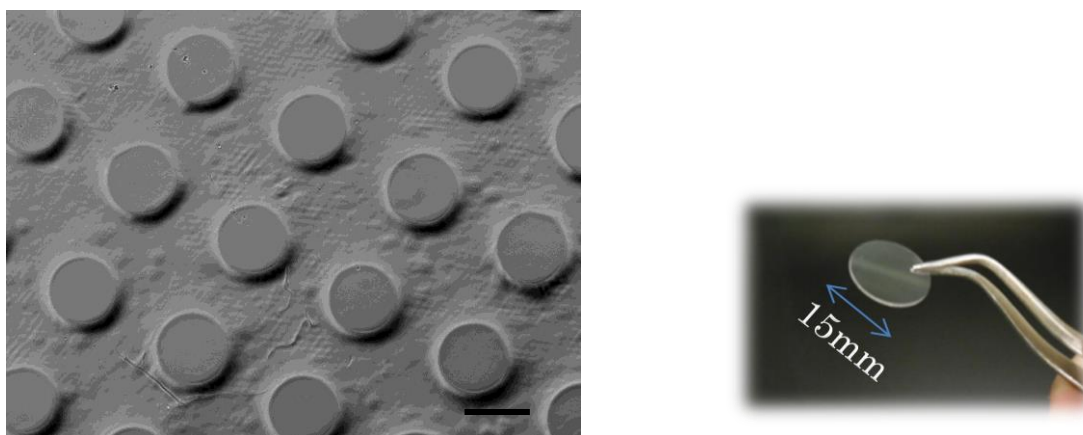


Figure 2-7

UV 照射時間 1.0 秒で作製 PEG ゲルマイクロパタン

左：ゲル表面(位相差顕微鏡画像)

右：PEG ゲルチップの全体写真

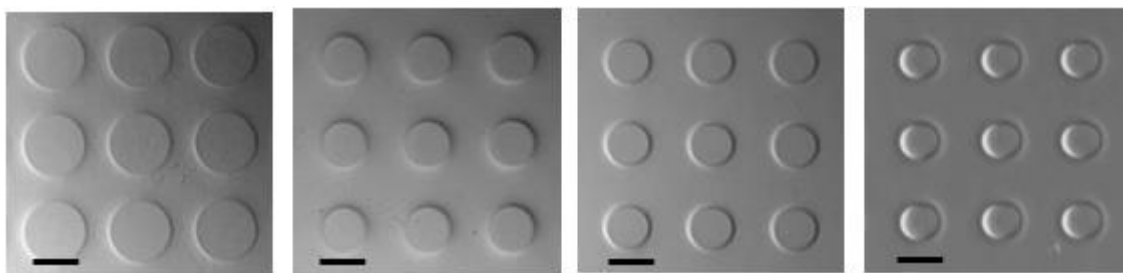


Figure 2-8

UV 照射が異なる表面

左から、1.0 秒, 1.5 秒, 2.0 秒 ,3.0 秒

### 2-2-3 PEG ゲルマイクロパターン基板作製条件の最適化

2-2-2 で解説した手順で、円形の細胞接着領域を有する PEG ゲルマイクロパターン表面の作製が可能である。光重合反応を利用しているため、UV 照射強度 (UV 照射装置の出力および照射距離で可変) と照射時間を最適化し、適切な作製条件の検討を行った。

PEG ゲル溶液 10 $\mu$ L を用いて 15 mm 径の円形カバーガラス上に PEG ゲルマイクロパターン表面を作製する場合、UV 照射強度を 103.5~107.1 $\mu$ W/cm<sup>2</sup> (60%UV、照射距離 15.3cm) に固定し、照射時間を 1.0 秒に設定すると PEG ゲルマイクロパターン表面が最適な条件であることを見出した。UV 照射強度を 60%UV 以下もしくは 60%UV で照射時間を 1.0 秒以下にすると、一部マイクロパターンが形成されないエリアが観察された。これは、光重合反応が十分に進行しなかったことが原因であると考えられる。また、UV 照射強度を 60%UV 以上もしくは 60%UV で照射時間を 1.0 秒以上照射すると、マイクロパターンは、形成されるが、非細胞接着領域 (PEG ゲル部分) への細胞の接着が確認された。これは、光重合反応が進みすぎたために、PEG の運動性が失われたことが原因であると考察できる。

### 2-2-4 タンパク吸着試験

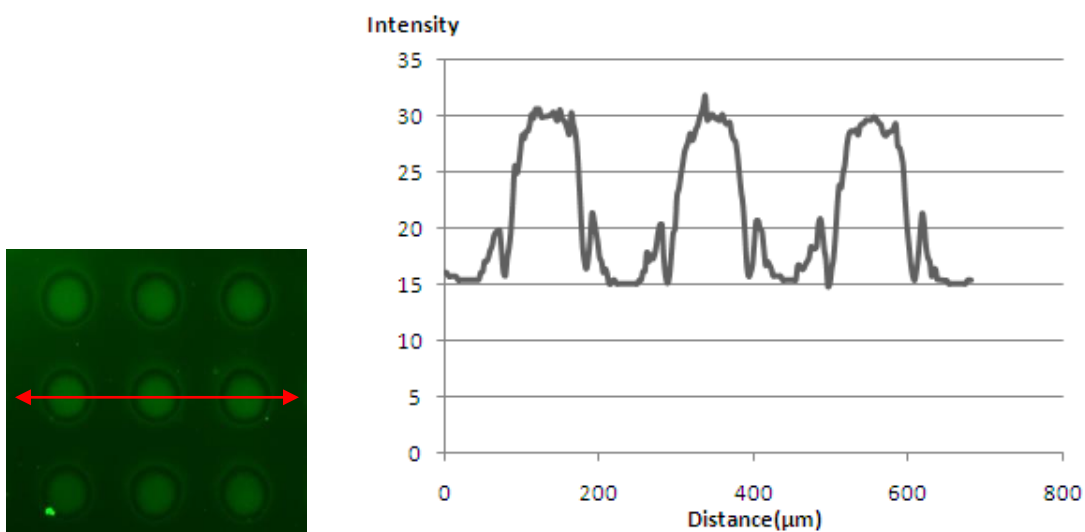
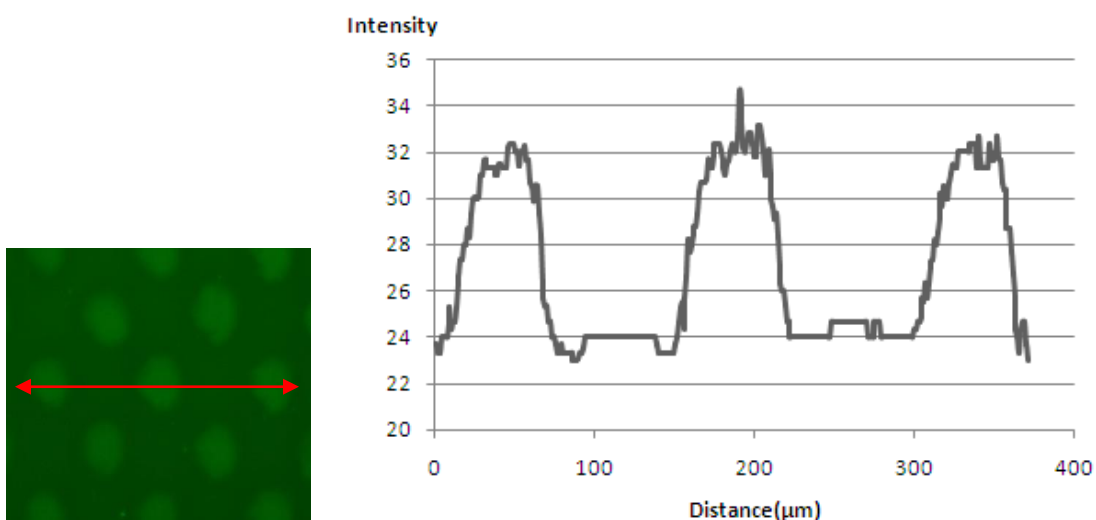
PEG ゲル表面のタンパク吸着能を調べる。PEG ゲルはさまざまな大きさのマイクロパターン化した表面 (r=50~300 $\mu$ m) で評価した。上記で述べた通り、マイクロパターン化 PEG ゲル表面を光重合で作製するが、使用する UV 照射強度は、103.5~107.1 $\mu$ W/cm<sup>2</sup> (60%UV)、照射距離 15.3cm、照射時間 1.0 秒である。ここらを一定に保ち、マイクロパターンの大きさ



を変化させてタンパク吸着の評価を行った。

使用したモデルタンパクは FITC-BSA である。BSA(Bovine serum albumin)は分子量約 67kDa、等電点 4.7、で血清タンパク中の約 60%を占める。したがって血清(FBS)を添加している培地条件では適したサンプルであると考えられる。

まずあらかじめ作製しておいた PEG ゲルマイクロパタン基板を 24well セルカルチャープレートに組み込む。その後 PBS 洗浄を 2 回行ったのち、このゲル表面を組み込んだウェル内に調製した FITC-BSA(300 $\mu$ g/mL)/PBS(-)溶液を 250 $\mu$ L 添加する。4 $^{\circ}$ Cで一晩静置し固定化した、アスピレーターで溶液を除去、PBS で 3 回洗浄し、蛍光を観察する。共焦点顕微鏡を使用した蛍光画像の取得および蛍光強度からタンパク吸着を調べる。



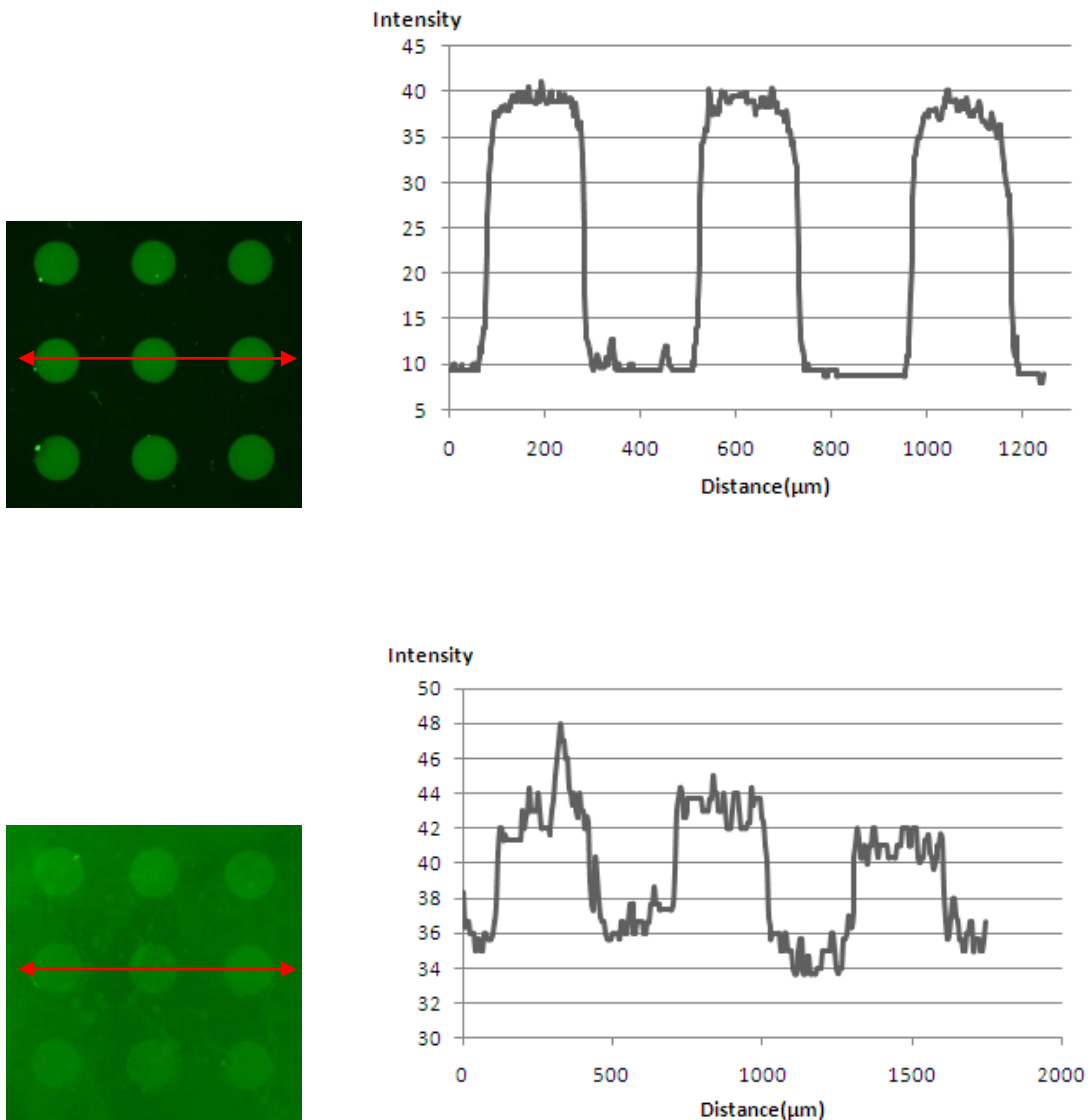


Figure 2-10

PEG ゲルマイクロパターン表面上における FITC-BSA 吸着量  
 上から 50 $\mu\text{m}$ (x20)、100 $\mu\text{m}$ (x10)、200 $\mu\text{m}$ (x10)、300 $\mu\text{m}$ (x4)

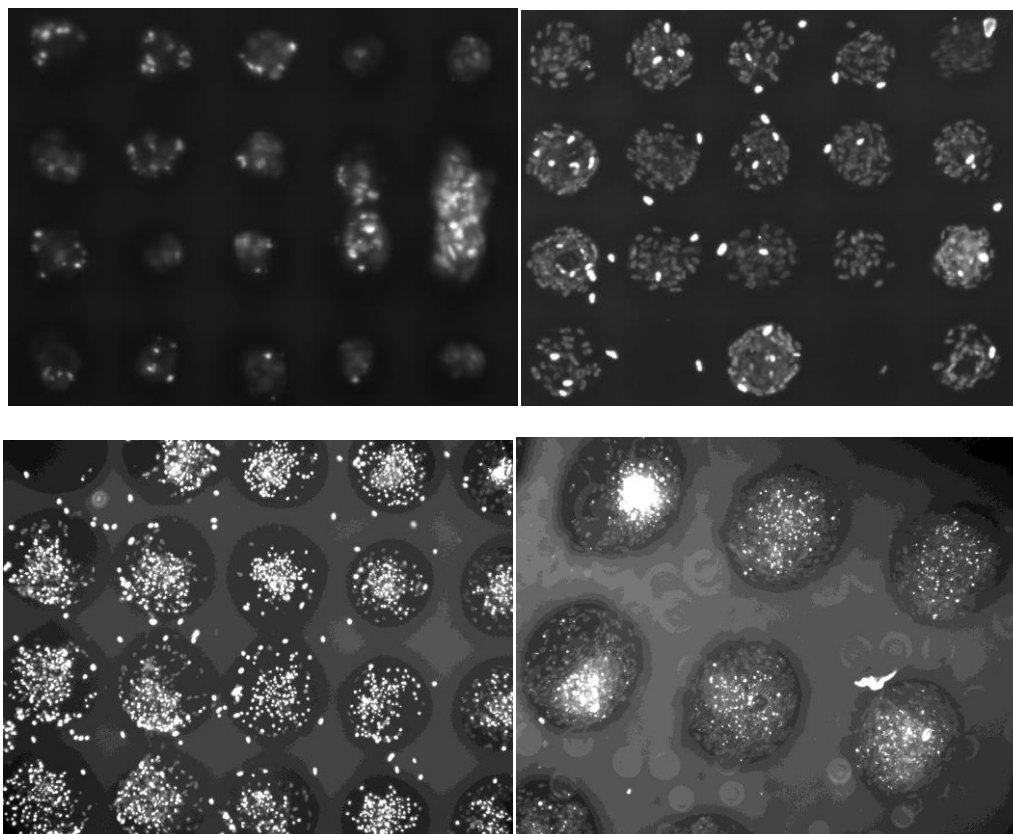
これより接着ドメイン内部にのみタンパク吸着が起こっていることがわかる。蛍光強度と FITC-BSA の濃度の関係より、ゲル部分はバックグラウンドとして蛍光を発していると考えられる。[Figure 2-10]の強度分布図は左図の赤い矢印に沿った蛍光強度、つまりタンパク吸着量を示していて構造的な解析となっている。この結果から、どの大きさでもゲル領域(非細胞接着領域)とガラス露出領域(細胞接着領域)で、はっきりと差別化されていることが明らかである。したがってゲル領域ではタンパク吸着が抑制され、かつガラス露出領域のみにタンパクが吸着している。細胞は基本的に膜タンパクとの特異的な認識がない限り接着タンパク質を介して基材に接着することが知られている。

### 2-2-5 Hoechst による核染色

細胞核を染色することで、細胞接着領域にスフェロイドが形成されているのかを調べる。今回用いた Hoechst33342 は細胞を浸している外液に加えるだけで細胞に取り込まれ、細胞内の DNA を特異的に染色する。DNA に結合したものが蛍光性となり、DNA に結合しない状態では蛍光を出さない。また Hoechst33342 は膜透過性が高く、短時間の染色でコントラストの高い画像が得られ、染色の保ちも良く、生細胞観察に適していることが特徴である<sup>20</sup>。

作製した PEG ゲルマイクロパタンに正常ヒト皮膚線維芽細胞(Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts : NHDF)を播種し 24 時間インキュベートした後、細胞から培地を除き、37°Cに温めておいた PBS(-)160 $\mu$ l で 2 回洗浄した。その後、PBS(-)で約 1000 倍希釈した Hoechst33342 をサンプルに 160 $\mu$ l 添加し、10 分間インキュベートした後に蛍光顕微鏡で観察した。[Figure 2-11]

スフェロイドの部分は特に強く光っていることが確認できた。蛍光画像の取得は蛍光顕微鏡 (オリンパス社製、型番 : TH4-100) を用いた。



<sup>20</sup> 実験がうまくいく 蛍光・発行試薬の選び方と使い方, p73, Oct 2007, 株式会社 羊土社

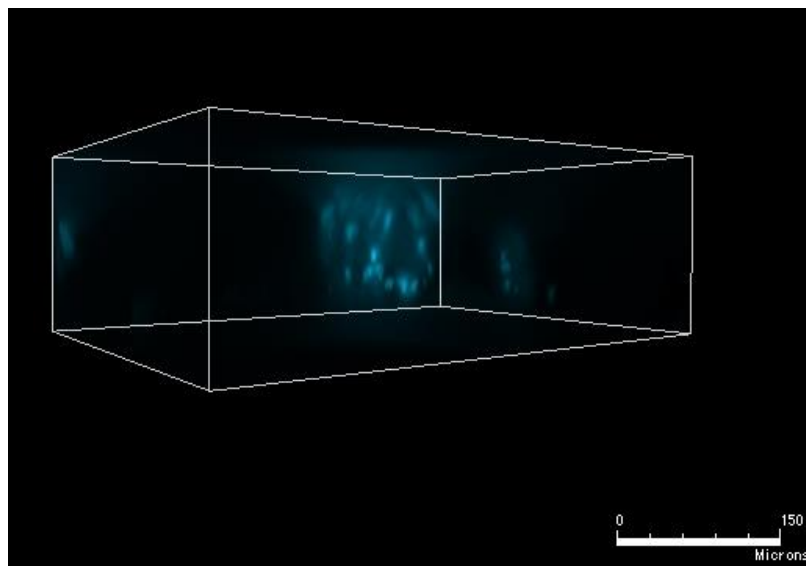
Figure 2-11

Hoechst33342 で染色後の NHDF スフェロイドの図  
左上から時計回りに 50 $\mu\text{m}$ (x10)、100 $\mu\text{m}$ (x20)、200 $\mu\text{m}$ (x20)、300 $\mu\text{m}$ (x10)

### 2-2-6 スフェロイドの三次元立体構造

NHDF を PEG ゲルマイクロパタンに播種してから、24 時間インキュベートした後に形成された NHDF スフェロイドの Hoechst 染色後の三次元立体構造を示す。蛍光画像の取得は蛍光顕微鏡（オリンパス社製、型番:TH4-100）を用いた。また三次元立体構造構築には、AutoQuant X3 を用いた。[Figure 2-12]

50 $\mu\text{m}$  のスフェロイドはきれいな円形であるのに対し、100 $\mu\text{m}$ 、300 $\mu\text{m}$  については、円形というよりはむしろおわん型に近い形をしていることが明らかとなった。



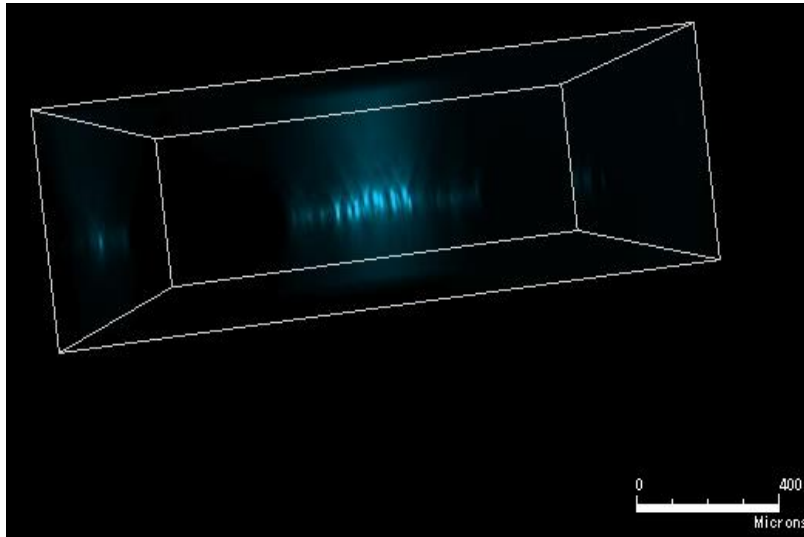
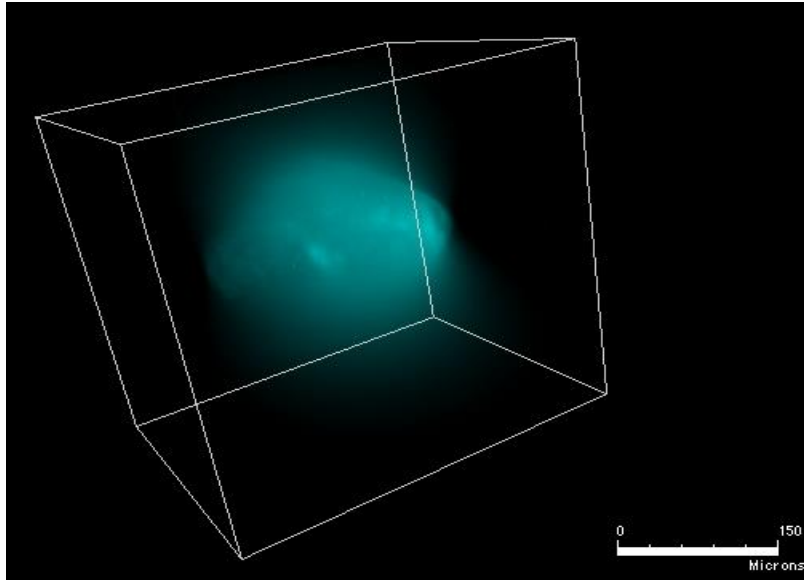


Figure 2-12

Hoechst 染色後の NHDF スフェロイドの三次元立体構造の図  
上から 50 $\mu$ m、100 $\mu$ m、300 $\mu$ m

### 2-3 考察

細胞接着は通常、タンパク質を介して接着するか細胞が表面基材を認識するかの 2 通りと考えられる。本研究では無電荷な高分子である PEG を用いており、かつその他特殊な修飾をしていないため細胞認識基材とは言えない。そのためタンパク質の吸着制御が細胞接着のポイントとなると考えられる。そこで PEG ゲルはタンパク吸着および細胞接着の抑制能を持つ材料である。実験結果より、UV 照射強度  $103.5\sim 107.1\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (60%UV)、照射距離 15.3cm で作製したゲル表面は数秒の違いで重合が変わってしまい、パタンの精度に影響を与えてしまう。照射時間が短いと重合時間が足りず、パタン内径が広がってしまったと考えられる。逆に、照射時間が長いと、パタン縁の部分の反応が進行してしまい、内径の縮小およびなめらかになってしまう。また BSA によるタンパク吸着量・細胞接着数の実験により UV 照射強度  $103.5\sim 107.1\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (60%UV)、照射距離 15.3cm、照射時間 1.0 秒の条件で、適切に細胞接着領域と非接着領域の差別化が明らかとなった。そもそもゲルの接着抑制能というのは、ゲルに含まれる水分子の交換によって発現されると言われている。したがって、重合が進んだゲルは網目が小さく含水率が下がってしまうためと考えられる。ゲル以外の表面に関しては、疎水性表面ほどタンパク吸着量・細胞接着数が小さく、親水性・イオン性の表面ほど逆の結果を示した。タンパク質はそれぞれ固有の等電点を有しており、溶液中ではイオン化しているため、静電相互作用によってその吸着量が決定され、その後細胞接着に影響を与えられる。特に等電点 4.7 の BSA が pH7.4 溶液中ではアニオン性になっているため、静電相互作用が大きく働き、より弱い疎水性相互作用の効果は見受けられないと言える。これは FBS を含む血清含有培地についても同じ挙動を示すと予想できる。また重合度の違いによってゲルの硬度が変化したことで、タンパクに関わらず、細胞の認識能に差が出たと考えられる。

## 2-4 使用試薬・機器

- MATSUNAMI カバーガラスΦ15mm
- sulfuric acid / 濃硫酸(95%) (特級、関東化学)
- hydrogen peroxide / 過酸化水素(30%) (特級、関東化学)
- (3-(methacryloyloxy)propyl)trimethoxysilane (Aldrich)
- 3-propyl trimethoxy silane (Aldrich)
- 3-propylamine trimethoxy silane (Aldrich)
- Ethanol / エタノール(99.5%) (一級、関東化学)
- PEG-DA(575) poly(ethylene glycol)-diacryloyl (Aldrich)
- Irgacure2959 (2-hydroxy-4'-hydroxyethoxy-2-methylpropiophenone) (Aldrich)
- methanol / メタノール(99.5%) (特級、関東化学)
- FITC conjugated BSA (Aldrich)
- 0.5%トリプシン-EDTA 溶液 (GIBCO)
- 細胞培養用 PBS(-) (GIBCO)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO)
- UV 照射器 ウシオ電機 スポット UV 照射装置 SPOT CURE SP-7
- 共焦点レーザー顕微鏡 Axio Observer Z1 (レーザー装置 : LSM700), Zeiss
- 紫外線積算光量計 UIT-150, USIO

## 第三章

### 今後の展望



### 3-1 間葉系幹細胞

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell:MSC) は40年ほど前にFriedensteinらによって骨髄液から発見され<sup>21</sup>、初めは造血幹細胞のフィーダー細胞として研究されていた。生体内でMSCは、組織の骨格筋・脂肪組織などの結合組織や骨格間質に存在し、結合組織の恒常性維持や修復を担う細胞である。その後、MSCが多くの細胞への分化能を有することが分かると、再生医療への応用が考えられるようになった。近年、MSCが中胚葉系や外胚葉系の細胞にも分化転換可能であるという報告もなされている<sup>22</sup>。また、MSCはコロニー形成能が有り、コロニー形成効率が良いMSCは多分化能を有していることが分かっている。ES細胞やiPS細胞はゲノムの不安定さと制御の難しさに起因する腫瘍形成やがん化という問題を抱えており、その懸念が払しょくされない限り臨床応用は難しい。MSCの場合はがん化の恐れのある細胞の寿命が短いため、がん化や腫瘍形成の危険性が非常に小さくなり、医療分野で注目されている。さらに近年ではMSCの持つ抗炎症作用や免疫調節作用の作用機構も明らかにされつつある。

### 3-2 ADSCの医療分野での可能性

現在、安価で操作性の高い間葉系幹細胞である脂肪幹細胞 (Adipose-derived stem cell:ADSC) が再生医療分野で注目されている。この細胞は中胚葉系の各細胞への分化能を持つなど骨髄由来幹葉系幹細胞 (Bone marrow stem cell:BMSC) とよく似た性質を示し<sup>23</sup>、内胚葉・外胚葉分化可塑性、炎症抑制効果<sup>24</sup>、障害部位へのホーミング能力<sup>25</sup>や栄養効果<sup>26</sup>などの能力を有する。

ADSCはMSCのなかでも臨床応用を考えるうえで大きなメリットがあり、一つ目に脂肪からの幹細胞採取は骨髄に比べてより低侵襲的であることがあげられる。二つ目に脂肪組織は骨髄液に比べはるかに多くの組織量を確保できるだけでなく、脂肪には骨髄に比べ500~1,000倍高頻度に幹細胞が存在することが分かっている。

このようにBMSCよりも多くの利点を持つADSCは今後、医療分野に大いに貢献すると期待されている。

本来分化しないとされてきた内胚葉である肝細胞や、外胚葉の神経細胞への分化能を持つという報告がなされており、このADSCの能力が医療分野で大きな話題となって

---

<sup>21</sup> *Experimental hematology* **4**, 267–274 (1976)

<sup>22</sup> *Immunology* **8**, 726–36 (2008)

<sup>23</sup> *Tissue engineering* **7**, 211–28 (2001)

<sup>24</sup> *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 2705–12 (2008).

<sup>25</sup> *Differentiation; research in biological diversity* **79**, 65–73 (2010).

<sup>26</sup> *Circulation Journal* **75**, 2260–2268 (2011).

いる<sup>27</sup>。しかし、多能性の面では MSC よりも ES 細胞や iPS 細胞の方が優れているため、今後医療分野における ADSC の利用を促進させるためには、安全かつ容易に ADSC の分化能を上方制御する培養法・分化誘導法の確立が必要不可欠である。

### 3-3 今後の展望

3-2 をふまえ、ADSC の利用を促進させるために、安全かつ容易に ADSC の分化能を上方制御する培養法・分化誘導法として今回本研究で行った PEG ゲルマイクロパタン表面を用いることで解決できるのではないかと考えている。低酸素状態で、ES 細胞や MSC の骨芽、脂肪への分化効率が上昇したという研究報告がある<sup>28,29</sup>。したがって今後の展望として、大きさの違う ADSC スフェロイドを作ることで、遺伝子の発現量や分化の制御、分化効率の上昇などが期待できるためこれらの検証をしたいと考えている。ADSC は医療分野へ大きな貢献ができる可能性を持つ細胞である。

---

<sup>27</sup> *Arthritis research & therapy* **9**, 204 (2007).

<sup>28</sup> *Reproduction (Cambridge, England)* **139**, 85–97 (2010).

<sup>29</sup> *Blood* **117**, 459–69 (2011).

## 第四章

### 結言

#### 4-1 結言

ガラスチップの前処理(ピラニア洗浄、シラン処理)からはじまり、安価なフィルム製のフォトマスクを用いた PEG ゲルマイクロパタン表面作製条件の構築に成功した。またマイクロパタン化のためにフォトリソグラフィ技術を応用したが、光重合時間を制御することで作製された PEG ゲル表面では細胞の接着を制御することが可能であることを示した。同時に PEG ゲルマイクロパタンの優れた細胞接着抑制能を有する条件があることがわかった。これによって PEG ゲルマイクロパタンの作製条件の最適化に成功したと言える。さらに実際にマイクロパタンに細胞を播種し、スフェロイドを形成させることに成功した。またそのスフェロイドの三次元立体構造を明らかにすることができた。

これからは ES 細胞や iPS 細胞、さらに最近では STAP 細胞という新たな細胞が出現してきた現在、細胞をそのまま治療に用いることや再生医療のための培養技術はより一層進歩していくであろう。そこで長期培養・分化誘導といった細胞を「制御」する高機能な培養技術としてスフェロイド培養法は期待できる培養法の一つである。

#### 4-2 謝辞

本研究を進めるにあたり、丁寧かつ的確なご指導を賜りました東京大学 教養学部 統合自然科学 吉本敬太郎准教授ならびに東京理科大学 工学部 工業化学科 複合工業化学第一研究室 橋詰峰雄准教授、飯島一智助教に心から感謝いたします。また外部研究生として受け入れていただいた吉本研究室、そして橋詰研究室の皆さんにも心から感謝いたします。最後に、これまで大学生生活を支えてくれた両親にも心から感謝いたします。