

光応答性ハイドロゲルを利用した オンデマンド細胞アレイ化技術

2015年 3月

古賀 晴香

光応答性ハイドロゲルを利用したオンデマンド細胞アレイ化技術

目次

第1章：序論

1.1 「生体類似構造を構築する」本研究の構想	1
1.2 細胞アレイ化技術	2
1.3 培養基板表面の設計技術	3
1.4 インテリジェントマテリアルによる培養基板加工技術	6
1.5 本研究の目的	9
1.6 本研究のコンセプト	10
1.7 本技術の意義 応用展開	13
1.8 本論文の構成	14
参考文献	15

第2章：カーボンナノチューブと金ナノロッドの細胞への影響評価

2.1 本章の目的	18
2.2 カーボンナノチューブの細胞への影響評価	18
2.2.1 本節の目的	
2.2.2 実験方法	
2.2.3 実験結果および考察	
2.2.4 本節のまとめ	
2.3 金ナノロッドの細胞への影響評価	31
2.3.1 本節の目的	
2.3.2 実験方法	
2.3.3 実験結果および考察	
2.3.4 本節のまとめ	
2.4 本章のまとめ	37
参考文献	38

第3章：NIR 応答性アガロースゲルの開発とその特性	
3.1 本章の目的	40
3.2 NIR 照射システム	40
3.2.1 NIR 照射装置の概略	
3.2.2 NIR 照射システム各部の詳細	
3.2.3 NIR レーザのスポット径	
3.3 カーボンナノチューブ複合アガロースゲルの作製とその特性	44
3.3.1 本節の目的	
3.3.2 実験方法	
3.3.3 実験結果および考察	
3.3.4 本節のまとめ	
3.4 金ナノロッド複合アガロースゲルの作製とその特性	53
3.4.1 本節の目的	
3.4.2 実験方法	
3.4.3 実験結果および考察	
3.4.4 本節のまとめ	
3.5 本章のまとめ	56
参考文献	57
第4章：NIR 応答性アガロースゲルによる段階的細胞アレイ化技術	
4.1 本章の目的	58
4.2 CNT 複合アガロースゲルを用いた段階的細胞アレイ化技術	59
4.2.1 本節の目的	
4.2.2 実験方法	
4.2.3 実験結果および考察	
4.2.4 まとめ	
4.3 肝細胞と線維芽細胞の共培養による生体類似構造の構築	63
4.3.1 本節の目的	
4.3.2 実験方法	
4.3.3 実験結果および考察	
4.3.4 本節のまとめ	

4.4 本章のまとめ	71
参考文献	72

第5章：NIR 応答性アガロースゲルによるマイクロ細胞組織体形成

5.1 本章の目的	74
5.2 初代ラット肝細胞スフェロイド形成におけるアガロースゲルの効果	76
5.2.1 本節の目的	
5.2.2 実験方法	
5.2.3 実験結果および考察	
5.2.4 本節のまとめ	
5.3 株細胞スフェロイド形成におけるアガロースゲルの効果	86
5.3.1 本節の目的	
5.3.2 実験方法	
5.3.3 実験結果および考察	
5.3.4 本節のまとめ	
5.4 NIR 応答性アガロースゲルによるマイクロ細胞組織体形成	91
5.4.1 本節の目的	
5.4.2 実験方法	
5.4.3 実験結果および考察	
5.4.4 本節のまとめ	
5.5 本章のまとめ	102
参考文献	103

第6章：結論

6.1 本論文のまとめ	105
6.2 今後の展開	107

謝辞

第1章

序論

1.1 「生体類似構造を構築する」本研究の構想

「生体外で組織や臓器を創る」—近年、再生医療や細胞アッセイをはじめとする細胞培養分野では、人類の大きな目標とも言えるこの試みが大きく進歩し、手の届く技術になりつつある。

ヒトをはじめとする多細胞生物は、生命の最小単位である「細胞」から形作られている。ひとつの受精卵から細胞分裂を繰り返した細胞群は、精密な遺伝子発現制御によって、多彩な機能を持つに至る（分化）。ヒトの成体は、約 200 種類、60 兆個もの細胞から構成されると言われ、同様の機能、および形態を持つ細胞が集まって「組織」を形成し、さらに様々な性質を持つ組織が集まって「臓器（器官）」となり、個体を形作るといった階層的な構造を作り上げている（Fig.1.1）¹⁾。組織や臓器の中で細胞は、無秩序に並んでいるわけではなく、複数の細胞と相互作用しながら、秩序をもって配置され「細胞の社会」を形成し、生命活動を維持するための機能を発揮している。

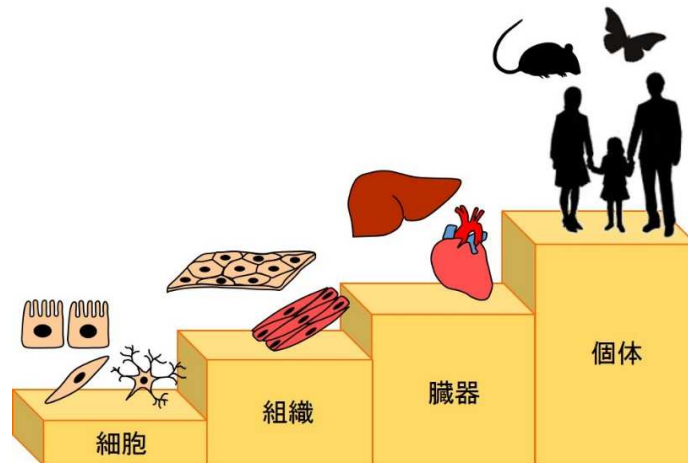


Fig.1.1 生体の階層構造

例として、肝臓の構造を Fig.1.2 に示す。肝臓は、肝小葉と呼ばれる多角形の柱に分かれており、小葉の中心にある中心静脈の周囲をスポンジ状の組織が放射状に取り囲んでいる。さらにこの構造を詳しく見てみると、肝細胞は規則正しい列をなし（索状構造）、その列の間に血管内皮細胞が存在し、類洞という幅の広い毛細血管を形成している。血

液は類洞を通して肝細胞の列に浸透し、この血液から栄養素と毒素を取り出し、栄養素は貯え、毒素を排出するという精密なる過機の役割を果たしている。肝細胞への血液の流量を最大にするため、肝小葉が幾重にも重なった構造になっている²⁾。

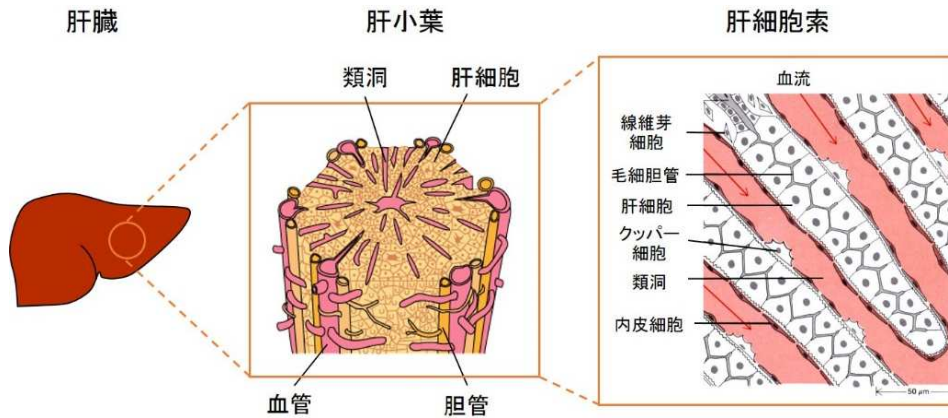


Fig.1.2 肝臓の構造の模式図^{3), 4)}

生体外で、組織や臓器が有する、このような美しい規則的な構造（＝生体類似構造）を創るためには、以下に述べる2つの技術の発展が鍵である。

一つ目は、組織や臓器の主原料である細胞が作り出す「細胞の社会」の中で、細胞がどのようにふるまっているのか基礎的知見を得ることである。胚から発生した細胞はどのように分化してその機能を獲得するのか、異種の細胞同士でどのような相互作用をしているのか、などの基礎的知見は、生体類似構造を構築する上で大変重要である。

二つ目に、生体類似構造を模倣すること、すなわち人工的な材料と細胞を用いて生体本来が持つ複雑な構造を模倣することである。先に述べたように、細胞がその機能を発揮するためには、生体そのものの複雑な内部構造が大きく関わっているためである。これらの2つの進歩があつてこそ、「生体本来の機能を有する」生体類似構造の構築が実現できる。

本研究では、これらの2つの発展を促進出来る技術の開発に取りくむべく、培養基板上で細胞の状態や配列を意のままに操ることが出来ないかと考え、「細胞のアレイ化(配列化)」というキーワードに着目した。基礎的知見の収集から、生体類似構造の構築といった幅広い細胞操作を実現できる新規の細胞アレイ化技術を作ることが、本研究の大きな構想である。

1.2 細胞アレイ化技術

多くの動物細胞は足場依存性を有するため、細胞の支持体となる基板上に細胞を接着させた状態で培養を行うことが一般的である。

ポリスチレンのシャーレやフラスコに培地と細胞の懸濁液を入れて培養する「単層培

「単層培養法」は、簡便で安価であるため、汎用的な培養手法として広く用いられている。しかしこの手法は、細胞が基板上にランダムに接着し、細胞の分布に偏りが生じる (Fig.1.3 (A))。そのため、細胞の形状や配置が個々の細胞で異なり、様々な状態の細胞を含んでいる。また、細胞は過度に基板に接着・伸展し、生体内とかけ離れた環境におかれてしまうため、細胞の持つ活性や特性を十分に引き出せているとは言い難い。

細胞の配置や状態をコントロールするため、同一基板上に細胞接着面／非接着面を規則的に配置する、または規則的な微細構造を設けることによって、細胞を配列させる「細胞アレイ化技術」は有効な手段のひとつである (Fig.1.3 (B))^{5)~7)}。アレイ化させることで、細胞の分布を均一に出来、特に細胞-細胞間や細胞-細胞外マトリクス (ECM) 間との相互作用の均質化を達成出来る。また、細胞分布が均一になることにより、外部からの刺激 (サイトカインやホルモン、力学的ストレスなど) も均一に細胞に与えることが出来る。

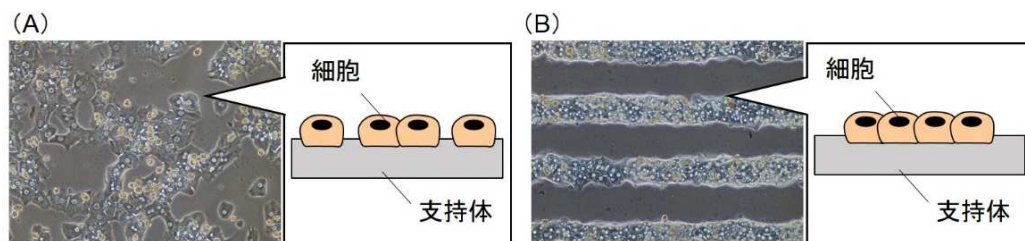


Fig.1.3 (A)単層培養法、および(B)アレイ化培養法における初代ラット肝細胞の状態

さらに、パターンの形状・距離・大きさといった様々な「アレイ化条件」を任意に変化させることによって、細胞の特性や配置を制御することが可能になる。

以上のように、細胞の配置や状態を制御できる細胞アレイ化技術は、「細胞の社会を理解する」、および「生体類似構造を構築する」ためのキーテクノロジーと言える。

1.3 培養基板表面の設計技術

1.2 節で述べたように、アレイ化技術は細胞の特性を制御する有効な手段であり、この技術を用いた生命現象の解明・分化特性の制御など、様々な取り組みが行われている。

細胞を基板上にアレイ化する方法として、半導体分野を中心に発展してきた微細加工技術を応用し、様々な基板表面の加工技術が報告されている。本節では、主に用いられている培養基板表面の設計技術について、その特徴をまとめた。

(1) フォトリソグラフィ

フォトリソグラフィは微細加工技術の代表的な手法であり、主に半導体などの分野で発展してきた。基本的な原理は、フォトレジスト (感光性樹脂) を支持体にコートし、マスクを介して UV を照射すると、光が当たった部分のみフォトレジストの溶解性が変

化し、現像液に浸すことによって光照射部位のみ完全に溶解するというものである。

マスクの形状を忠実に転写可能であるため、凹凸のある微細構造を表面に作り込む、また、フォトリソグラフィーで作製したマスクを利用し、細胞接着分子／非接着分子のパターニングに応用することが出来る (Fig.1.4)。Tarlov らは、フォトリソグラフィーで作製したフォトマスクを介して自己組織化単分子膜 (SAM) に UV を照射し、光照射部分の部分酸化を行うことで細胞接着面のパターンを形成する手法を確立している⁸⁾。

フォトリソグラフィーは、マイクロメートルオーダーの表面加工を再現性良く行うことが可能で、精度が高い。一方で、加工には高額な装置を必要とし、使用する薬剤 (有機溶剤) に細胞毒性があるといったデメリットもある。

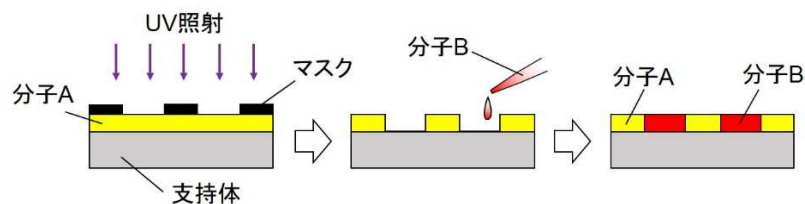


Fig.1.4 フォトリソグラフィーを利用したアレイ化基板の作製

(2) ソフトリソグラフィー

ソフトリソグラフィー技術は、ポリジメチルシロキサン (PDMS) などのエラストマーで作製した微細な鋳型を利用する手法である。

ハーバード大学の Whitesides らが発案した、最も代表的である「マイクロコンタクトプリンティング法 (μ CP 法)」は、PDMS で作製した鋳型を「はんこ」とし、鋳型の先端に「インク」となる分子をつけて基板表面に分子を転写する方法である。分子 A を μ CP 法で転写した後、周りに分子 B を修飾することにより、マイクロメートルオーダーで制御されたアレイ化基板を簡便に作製することが出来る (Fig.1.5 (A))⁹⁾。

例えば Zhang らは、オリゴエチレングリコール溶液 (細胞非接着分子) を金基板に転写し、その他の領域にアルギニン - グリシン - アスパラギン酸配列 (RGD 配列、細胞が接着するための認識部位) を持つオリゴペプチド (細胞接着分子) を修飾して、細胞接着／非接着特性をパターンニングした培養基板を作製している¹⁰⁾。

また同様の PDMS の鋳型を用いた手法に、Khademhosseini らが報告したキャピラリーフォースリソグラフィーがある (Fig.1.5 (B))¹¹⁾。支持体 (ガラス) 上に分子 A をスピンコートし、その上に凹構造をもつ PDMS の鋳型を載せてしばらく静置すると、溶液と PDMS・ガラス・空気の三つの界面における界面自由エネルギー差によって、PDMS の先端とガラスの接近した領域にのみ溶液が集まる。結果として、分子 A とガラスが露出した面のパターンが形成される。彼らはこの手法を用い、NIH 3T3 細胞や ES 細胞などのアレイ化を達成している。

ソフトリソグラフィーは、簡便で容易にアレイ化を達成することが出来るため、現在最も汎用的に用いられている手法である。

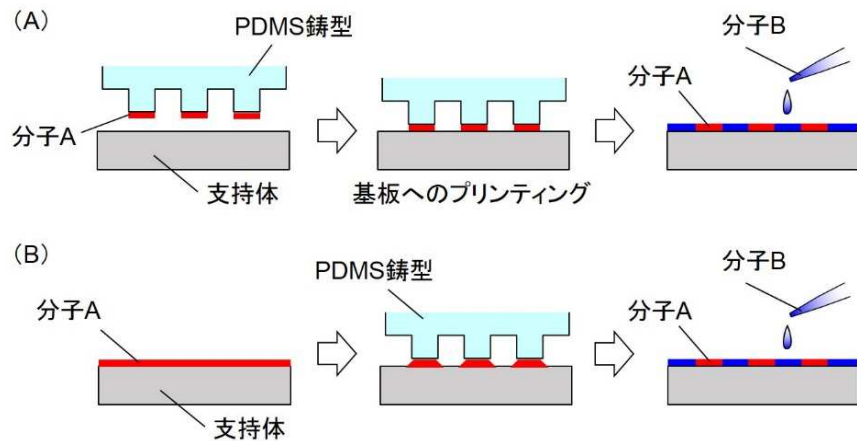


Fig.1.5 (A)マイクロコンタクトプリンティング(μ CP)法、および(B)キャピラリーフォースリソグラフィーによるアレイ化基板の作製

また、基板に微細な孔を有するマスク（ステンシル）を用いて細胞のアレイ化を行う手法が、マイクロステンシル法である。以前は金属のマスクも使われていたが、現在では基板との密着性の良い PDMS が主流である。PDMS で作製したマスクを基板に貼り付け、その上から目的の分子（直接、細胞の懸濁液を添加しても良い）を添加してマスクをはがすと、分子（または細胞）のアレイ化を行うことが出来る（Fig.1.6）。Folch らは、PDMS 製のマスクを利用して初代ラット肝細胞のパターニングに成功している¹²⁾。Wright らは、PDMS だけでなく parylene-C（医療機器やエレクトロニクス分野で用いられている、パラキシリレン系ポリマーコーティング剤）で作製したマスクで、共培養を達成している¹³⁾。

さらに、マスクの上から細胞を播種して細胞のパターンを形成後、そのままマスクを剥離させることで、細胞遊走アッセイなどへの応用も試みられている¹⁴⁾。

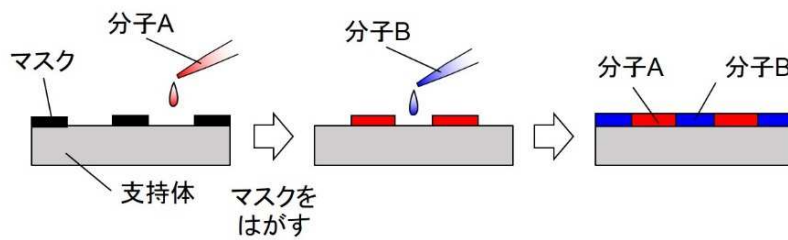


Fig.1.6 マイクロステンシル法によるアレイ化基板の作製

1.4 インテリジェントマテリアルによる培養基板加工技術

1.3 節で述べた手法は、「鋳型」や「マスク」等を巧みに利用し、同じパターン形状を有する基板を大量に形成出来る優れた技術である。これらの手法により、細胞の分布・形状の厳密な制御、また、作製方法によっては2種類の細胞を基板に規則的に配置することが出来る。そのため、個々の細胞の形状が細胞特性に与える影響や異種細胞間の相互作用の評価、生体類似構造の構築など様々な応用が試みられている (Table 1.1)。

Table 1.1 細胞アレイ化技術の応用例

目的	ターゲット	詳細	文献
基礎的知見	幹細胞の分化	hMSC(ヒト由来間葉系幹細胞)は、接着面積が広い(10000 μm^2)と骨、狭い(1000 μm^2)と脂肪に分化する	15
	細胞の遊走	太いライン状の接着面(幅 40 μm)では、CHO 細胞が前進(ゴルジ複合体側)し、細いライン(幅 6 μm)では後進する	16
	細胞の増殖	四角の接着パターンの一辺が 10 μm 以下であると、ヒト由来ケラチノサイトのアポトーシスが誘導される	17
生体類似構造の構築	神経ネットワーク	海馬のニューロンをアレイ化することで、アレイ化しない条件と比較して、シナプスの形成が見られる	18
	肝組織	初代肝細胞をアレイ化することで、アレイ化しない条件と比較して、高いアルブミン分泌活性を発現する	19

一方で、これらの手法ではマスクや鋳型を「基板に直接接触」させてパターンを作りこむことが必要である。そのため、マスクや鋳型に依存したパターンしか形成出来ず、パターンの自由度に欠ける、つまり、あらかじめ作製したパターン形状のみに依存してしまい、培養中に2次的に培養表面を加工することは不可能であった。

細胞を培養基板上で培養したまま基板の細胞接着/非接着性を変える、または細胞をトラップ出来る微細構造(ウェル・溝構造)を作り込むことが可能になれば、より自由度の高い細胞のアレイ化が達成出来る。その結果、今までの技術では困難だった、複数種の細胞を自由に配置する・細胞を動かす・はがすなどの操作が実現できる。

そこで、基板に非接触で温度、光、磁力などの外部刺激によってその特性を制御可能な「インテリジェントマテリアル」が、新たなアレイ化技術のひとつとして注目されている。材料変化のトリガーとなる外部刺激はエネルギー的観点、化学的観点からみて様々あるが (Table 1.2)、培養基板材料には、温度、電気、光といったエネルギーを与える手法が主に用いられている。以下、代表的なインテリジェントマテリアルと細胞培養基板への応用についてまとめた。

Table 1.2 インテリジェントマテリアルにおける外部刺激の例²⁰⁾

エネルギー観点	化学的観点
光	pH
温度	溶媒
電気	イオン(金属イオン)
磁力	生体分子(グルコース、インスリンなど)

(1) 温度応答性ポリマー

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) は、代表的な温度応答性ポリマーであり、相転移温度以下ではポリマー鎖は水和して膨潤(親水性)しているが、相転移温度以上になると脱水和し、ポリマー鎖同士が凝集(疎水性)する。Okanoらは、このPNIPAAmの相転移挙動を巧みに利用し、細胞をシート状に得る技術を開発した²¹⁾。PNIPAAmをポリスチレンディッシュ上に修飾して細胞を播種すると、37°Cで細胞を培養している間は表面が疎水性のため細胞が接着するが、コンフルエントになった後に基板の温度を下げると、表面が親水性になりシート状に剥離する(Fig.1.7)。現在では、心筋シート移植を含む、多くの臨床応用が試みられている。相転移温度が異なるポリマーをあらかじめ基板にパターンングすることで、異種細胞からなるパターンの形成も行うことが可能になっている²²⁾。

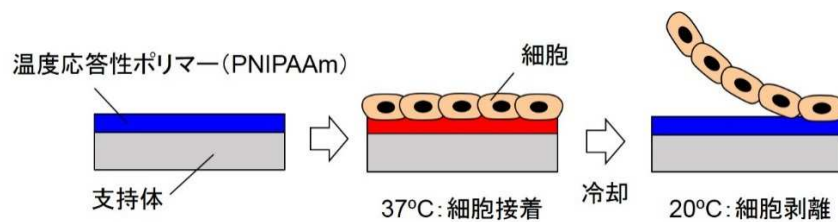


Fig.1.7 温度応答性ポリマーによる細胞シートの形成

(2) 電気化学的手法

電気化学的手法を用い、培養基板表面を加工する技術も多数報告されている。例えばNishizawaらは、アルブミンを固定化した基板の上に、微小電極を作用させることにより、細胞パターンを形成することに成功している²³⁾。アルブミン固定化基板は細胞非接着性であるが、ここに微小電極を接近させて活性ハロゲン種を発生させることによって、その部分のみ細胞接着性となる。アルブミンは酸化されやすいチオール基を多く有しており、発生したBr⁻でアルブミンが酸化されて3次構造が変化し、基板表面物性に影響を与えたと考えられている。単一細胞レベルのパターンングが可能であり、さらに、培養期間中にパターンを追加することが出来る画期的な手法である(Fig.1.8)。

また、Shahらは酸化インジウムスズ(Indium Tin Oxide、ITO)をガラス基板上にパターン化し、その上からチオール基を有するポリエリレングリコール(PEG:細胞非接着面)を修飾した基板に電圧を印加すると、チオール基の還元反応によってPEGが取り

除かれ、接着面にスイッチングする技術を報告している²⁴⁾。それぞれの ITO パターンに独立で電圧を印加できるため、段階的に接着面のスイッチングを行うことが可能となっている。

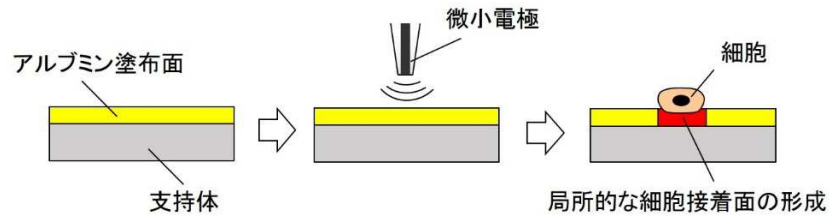


Fig.1.8 微小電極を用いた細胞のアレイ化

(3) 光応答性材料

Edahiro らは、光照射によって構造が変化するニトロスピロピラン修飾をした PNIPAAm で、表面をコートした培養基板を開発している。この基板上的細胞に UV (波長: 365 nm) を照射した後に冷却しながら洗浄すると、照射部位の細胞のみを捕捉することが出来る²⁵⁾。UV の照射領域のみに細胞を接着させて、パターニングすることが可能である (Fig.1.9)。また、可視光 (波長: 400~440 nm) の照射によって細胞接着性が元に戻るため、選択的に細胞を回収することにも応用できる。

また、Nakanishi らのグループは、UV に応答して細胞接着/非接着性がスイッチング可能な材料を次々に開発している。例えば、光分解性のニトロベンジル基で保護された COOH 基を有するシランカップリング剤や、ニトロベンジル基にポリエチレングリコールを共有結合させた光分解性分子などを開発し、細胞パターニング、細胞遊走などへの応用を精力的に行っている²⁶⁾。

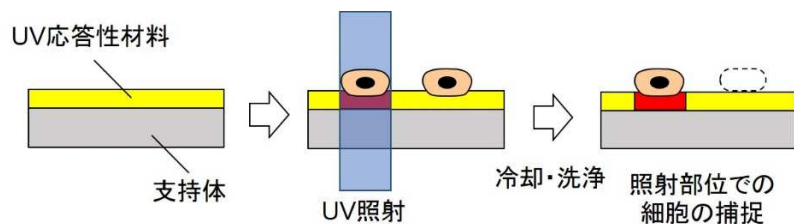


Fig.1.9 光応答性材料を用いた細胞のアレイ化

(4) その他の外部刺激による細胞操作

培養基板加工技術という観点では少し異なるが、誘電泳動、および磁気によって細胞をアレイ化させる技術が報告されているので、以下に挙げておく。

誘電泳動 (Dielectrophoresis, DEP) は、電気的に中性な粒子に非一様電界を印加した時に、粒子が移動する現象である (Fig.1.10)。Ho らは、DEP を利用して肝細胞を基板上に配列し、肝小葉に類似した構造を構築することに成功した²⁷⁾。

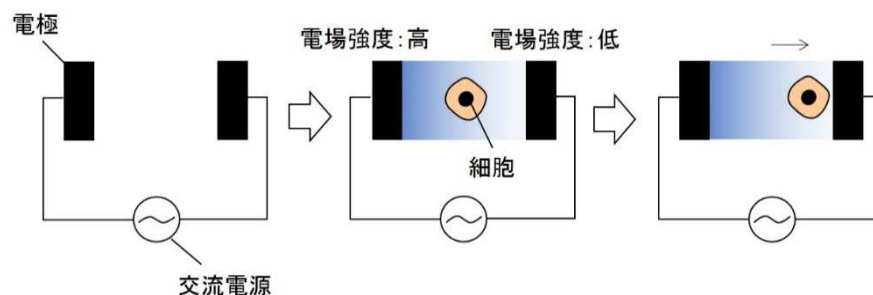


Fig.1.10 DEP の原理

また、Ino らは、表面にカチオン性のリポソームを修飾して生体親和性を高めたマグネタイト（磁性微粒子）を細胞内に取り込ませ、外部設置の永久磁石の磁力を利用して細胞のアレイ化を達成している（Fig.1.11）²⁸⁾。

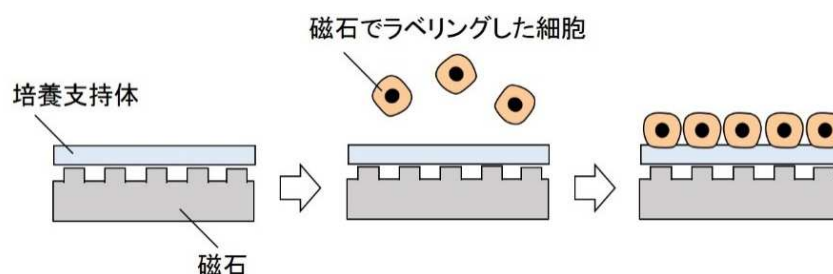


Fig.1.11 磁力による細胞のアレイ化

1.5 本研究の目的

1.4 節で述べたように、インテリジェントマテリアルを培養基板として用いれば、基板に非接触で培養表面の特性を変化させることが可能である。しかし、培養中にもパターンの追加が出来るような、自由度の高い細胞アレイ化を達成するには、クリアしなければならない条件がある。

温度は、比較的温和な条件下でアレイ化を達成出来そうだが、培養期間中に基板の局所的な温度変化を起こすことは困難である。相転移温度の異なるポリマーを利用する手段もあるが、あらかじめポリマーを基板上にパターンニングする必要があるため、自由度の高い細胞のアレイ化技術には適していないと考えられる。

また、電気化学的手法において、Shah らのような手法は、ITO 基板をあらかじめパターン化しておく必要があるため、自由度に欠ける。また、導電性の基板は、心筋・神経などの電気信号の解析など、研究目的によっては適さない場合が生じる²⁹⁾。Nishizawa らの手法は後からパターンを追加可能であるが、細胞非接着面を形成するアルブミンはタンパク質であるため、培養に伴い培地中に含まれる別のタンパク質と置換し、非接着面の長期維持が困難、用いる分子が限られるといった課題がある。

そこで本研究では、外部刺激としての「光」が有する、以下4つの特徴に着目した。

- ①空間制御能 マイクロメートルオーダーの集光が可能であり、局所的な反応を起こすことが出来る
- ②反応制御能 シャッターや光の強度を調節することによって、反応時間や強さをコントロールすることが出来る
- ③操作性 外部からの ON/OFF の切り替えが容易であり、既存の顕微鏡システムに組み込みやすい
- ④応用性 波長を変えることで、目的に応じた分子設計や、階層的な反応を起こすことが可能である

以上の点から、自由度の高い細胞アレイ化技術には「光反応」による培養基板加工が最も適していると考えた。

そこで本研究では、細胞を培養中にも基板の加工が可能な、自由度の高い培養基板加工技術の創生を目指し、「新たな光応答性材料の開発とそれを用いた細胞アレイ化技術の開発」を大きな目的とした。

1.6 本研究のコンセプト

光を用いた新たな培養基板加工技術として、本研究では光照射によってハイドロゲルのゲル-ゾル転移を誘導し、培養基板表面に微細構造を形成する手法を考案した。

細胞非接着性のハイドロゲルに光を照射することによって、照射領域のみにゲル-ゾル転移を誘導する。その結果、照射部位のみゲルがエッチングされ、ゾル化部分のみに細胞をトラップ出来るという発想である (Fig.1.12)。以下、この発想を実現するための具体的な戦略について述べる。

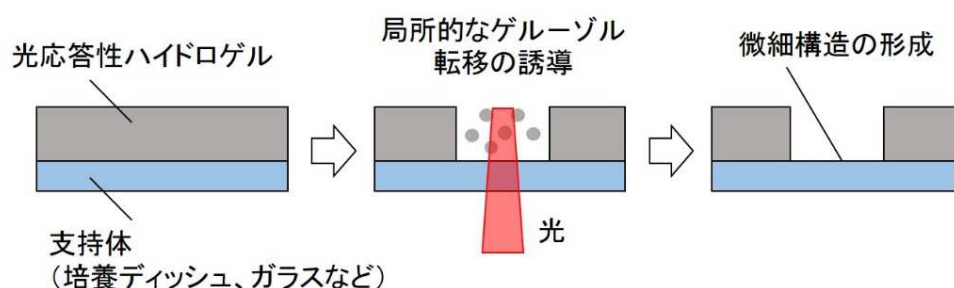


Fig.1.12 NIR 照射による培養基板加工技術のコンセプト

(1) ハイドロゲル

ベースとなるハイドロゲルには、生体適合性はもちろんのこと、細胞に特異的なシグナルを示さず、細胞非接着性を有するハイドロゲルが必要となる。そこで本技術では、アガロースゲルを用いることとした。アガロースは紅藻類から抽出される多糖であり、1,3-結合のβ-D-ガラクトースと1,4-結合の3,6-アンヒドロ-α-L-ガラクトースの繰り返しからなる高分子である (Fig.1.13)。アガロースゲルは、OH 基を多数有しているため、水素結合で架橋し、加熱によってゾル化する³⁰⁾。また、多量の水を含むことにより親水性を有しているため、タンパク質の吸着を抑制し、良好な細胞非接着性を示す。そのため、ゾル化して形成した微細構造の部分のみに細胞をトラップ可能であると考えた。

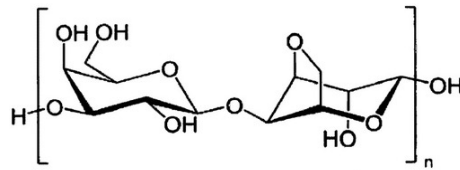


Fig.1.13 アガロースゲルの構造式

(2) 照射光

Fig1.14 (A) に、光の波長域とその大きな特徴を示す。従来の光応答性材料では、主に UV~可視光領域の光が多く用いられている。UV は、DNA、タンパク質などの生体分子の吸収領域であるため、細胞への悪影響が懸念される。直接細胞死や DNA へのダメージには至らずとも、メラノサイトやケラチノサイトなどの、UV に対して感受性の高い細胞培養³¹⁾には不適であると考えられる (Fig1.14 (B))。また、可視光領域はマイルドな条件下であるが、培養操作 (培地交換・顕微鏡による観察) を繰り返すことで、材料が変化する恐れがある。さらに、中・遠赤外線領域まで波長域が拡大すると、水そのものが大きな吸収を持つため、水を多く含む細胞に直接的なダメージを与えてしまう可能性がある (Fig1.14 (C))。

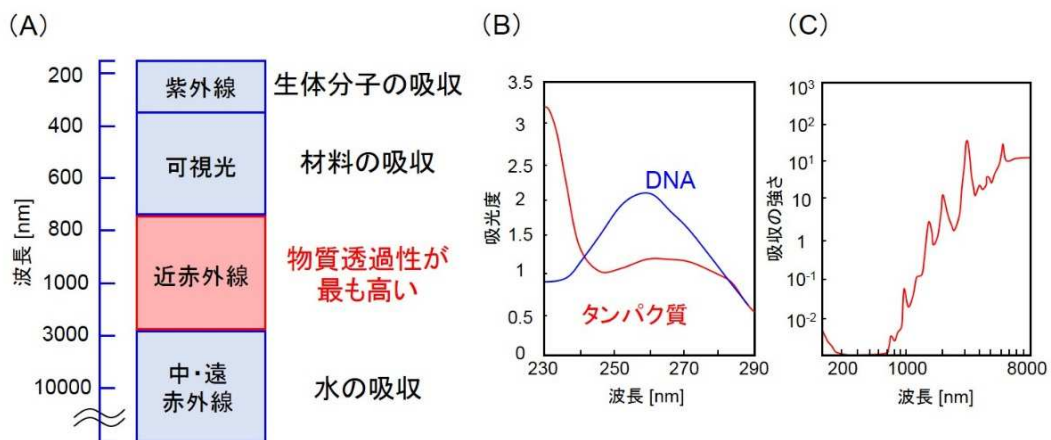


Fig.1.14 (A)各波長の光とその特徴、(B)生体分子の吸収スペクトル、および(C)水の吸収スペクトル(文献 32 を参考に作図)

そこで本研究では、「生体の窓」と呼ばれ、生体透過性の高い近赤外線 (Near-Infrared、NIR) (波長域：700～3000 nm) を熱源として利用し、NIR 照射部位のアガロースゲルのゲル-ゾル転移を誘導することにした。あらゆる細胞への影響が少なく (=汎用性、低細胞刺激性)、不用意に材料の変化を起こしにくい (=安定性) ことが期待できる。

(3) 分子ヒーター

しかし、高い物質透過性ゆえに、NIR はゲル-ゾル転移を誘導するための十分な熱源を確保することは難しい。そこで NIR 領域において高い「光熱交換能」を有する材料をハイドロゲルに複合させることで、効率的にゾル化を促進することを考えた。NIR を吸収し、光熱交換作用を有する材料は、大きく分けて以下の三つに分類できる (Table 1.3)。

Table 1.3 NIR 領域に光熱交換性を示す材料の例

大分類	具体例
有機系色素	インドシアニングリーン、フタロシアニン、ポルフィリン
カーボン材料	カーボンブラック、フラーレン、カーボンナノチューブ
金属ナノ粒子	貴金属ナノ粒子(球状)、貴金属ナノロッド(棒状)

一般的に、多くの NIR 吸収色素は光発生時に活性酸素が発生するため^{33), 34)}、細胞への毒性が懸念される。また、培養期間中の退色、酸化などの化学的安定性を考慮すると、有機系色素は培養基板材料としては不適であると考えられる。

そこで、近年バイオ分野での応用が盛んに取り組まれている、カーボン材料のひとつである単層カーボンナノチューブ (CNT) と、金属ナノ粒子のひとつである金ナノロッドを「分子ヒーター」としてハイドロゲルに組み込み、高い NIR 応答性を付与することにした。カーボン材料や金属ナノ粒子は有機系色素に比べて吸光係数が高いため (Table 1.4)、より効率的な光熱交換性が期待できる。

Table 1.4 代表的な光熱交換材料のモル吸光係数

光熱交換材料	モル吸光係数 [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]
インドシアニングリーン	1.7×10 ⁵ ³⁵⁾
単層カーボンナノチューブ	6.2×10 ⁶ ³⁶⁾
金ナノロッド	1.4×10 ⁹ ³⁶⁾

1.7 本技術の意義 応用展開

本技術を用い、段階的に NIR 照射して新たな接着面を形成することによって、様々な細胞操作へ展開することが出来る。例えば、異種細胞が規則的に並んだ共培養や細胞ネットワークの構築を実現出来る。原理的には、何種類もの細胞を基板の上にアレイ化できる。また、細胞の増殖や遊走方向を制御出来るため、より簡便・定量的な細胞増殖・遊走アッセイ技術を構築出来、細胞の経時的な変化を追うことが可能になる。

さらに本技術では、ハイドロゲルで光応答性材料を作製しているため、目的によってゲルを成形したり、厚みを制御したりすることが出来る。そのため、厚みのある微細構造を形成出来れば、三次元的な細胞の集合体（マイクロ細胞組織体）の形成も可能になると考えられる。

以上のように、NIR の生体適合性・透過性の高さと、ハイドロゲルの「ゲル-ゾル転移」を巧みに利用することによって、従来の細胞アレイ化技術では実現できなかった幅広い応用が期待される (Fig.1.15)。

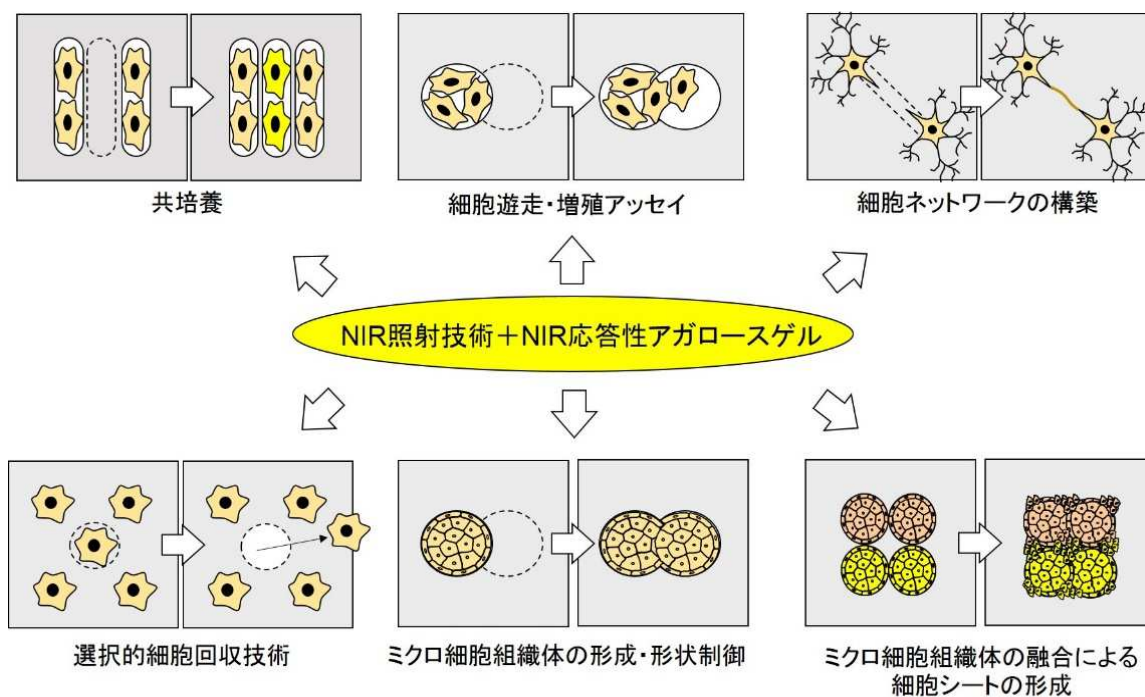


Fig.1.15 本技術の応用展開

1.8 本論文の構成

第1章では、生体外で生体類似構造を構築するための有効なアプローチとして「アレイ化技術」に着目し、本論文の大きな構想について述べた。また、既存の鋳型・マスクを用いたアレイ化技術の特徴と、その技術の課題を指摘した。その課題を基に、本研究の意義と目的、そして本研究の基盤となる光応答性ハイドロゲルのコンセプトについて述べた。

第2章では、第1章で述べたコンセプトに基づいて、NIR 領域で光熱交換性を有する分子ヒーターとして、「カーボンナノチューブ (CNT)」と「金ナノロッド」を選定した。これらの分子ヒーターそのものが、細胞培養へ応用できるのかどうか、材料特性や細胞毒性について評価した。

第3章では、第1章で述べたコンセプトに基づいて、CNT とアガロースを複合した「CNT 複合アガロースゲル」、および金ナノロッドとアガロースゲルを複合した「金ナノロッド複合アガロースゲル」を作製することを目的とし、複合ゲルの作製方法の確立、およびゾル化温度、強度、NIR 応答性といった複合ゲルの特性を評価した。

第4章では、第3章で作製した CNT 複合アガロースゲルを段階的細胞アレイ化技術へ応用することを目的とした。厚さ数 μm の CNT 複合アガロースゲルを作製し、段階的な細胞アレイ化技術への取り組みとして「異種細胞のアレイ化」、および「細胞遊走技術」のデモンストレーションを行った。また、初代ラット肝細胞と線維芽細胞を用いて二次元的な生体類似構造を構築し、本技術の有効性について評価した。

第5章では、段階的細胞アレイ化技術を三次元的なマイクロ細胞組織体である「スフェロイド」の形成に展開することを目的とした。まず、スフェロイド形成におけるアガロースゲルの効果を評価し、厚さが数百 μm の CNT 複合アガロースゲルを作製させ、マイクロ細胞組織体形成について検討した。

第6章では本論文の総括を行い、本論文の成果を基に、今後の本研究の展開について述べた。

参考文献

- 1) 村松正實, 分子細胞生物学辞典, 東京化学同人, p.477 (1997)
- 2) 中西真人, 別冊日経サイエンス 先端医療をひらく, 日経サイエンス社, pp.48-55 (2011)
- 3) AJIMED, <https://www.ajinomoto-seiyaku.co.jp/ajimed/member/info/> (2015.01.19 アクセス)
- 4) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell* second edition, Newton Press, p.961 (1989)
- 5) D. Falconnet, G. Csucs, H. M. Grandina, M. Textor, Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays, *Biomaterials*, **27**, 3044–3063 (2006)
- 6) N. Li, A. Tourovskaia and A. Folch, Biology on a Chip: Microfabrication for Studying the Behavior of Cultured Cells, *Crit. Rev. Biomed Eng.*, **31**, 423–488 (2003)
- 7) M. Théry, Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions, *J. Cell Sci.*, **123**, 4201–4213 (2010)
- 8) M. J. Tarlov, D. R. F. Burgess, Jr. and G. Gillen, UV Photopatterning of Alkanethiolate Monolayers Self-Assembled on Gold and Silver, *J. Am. Chem. SOC.*, **115**, 5305-5306 (1993)
- 9) 成瀬恵治, ソフトリソグラフィーを用いた細胞研究・医療用チップの開発, *表面科学*, **28**, 204–210 (2007)
- 10) S. Zhang, L. Yan, M. Altman, M. Lasse, H. Nugent, F Franke, D. A. Lauenburger, G. M. Whitesides and A. Rich, Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation, *Biomaterials*, **20**, 1213–1220(1999)
- 11) A. Khademhosseini, K. Y. Suh, J. M. Yangb, G. Eng, J. Yeha, S. Levenberg and R. Langer, Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-l-lysine for patterned cell co-cultures, *Biomaterials*, **25**, 3583–3592 (2004)
- 12) A. Folch, B. H. Jo, O. Hurtado, D. J. Beebe and M. Toner, Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures, *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 346–353 (2000)
- 13) D. Wright, B. Rajalingam, S. Selvarasah, M. R. Dokmeci and A. Khademhosseini, Generation of static and dynamic patterned co-cultures using microfabricated parylene-C stencils, *Lab Chip*, **7**, 1272–1279 (2007)
- 14) M. Poujade, E. Grasland-Mongrain, A. Hertzog, J. Jouanneau, P. Chavrier, B. Ladoux, A. Buguin and P. Silberzan, Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound, *PNAS*, **104**, 15988–15993 (2007)
- 15) R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju and C. S. Chen, Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment, *Developmental Cell*, **6**, 483–495 (2004)
- 16) F. Pouthas, P. Girard, V. Lecaudey, T. B. N. Ly, D. Gilmour, C. Boulin, R. Pepperkok and E. G. Reynaud, In migrating cells, the Golgi complex and the position of the centrosome depend on geometrical constraints of the substratum, *J. Cell Sci.*, **121**, 2406-2414 (2008)
- 17) F. M. Watt, P. W. Jordan and C. H. Oneill, Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 5576-5580 (1988)
- 18) M. S. Ravenscroft, K. E. Bateman, K. M. Shaffer, H. M. Schessler, D. R. Jung, T. W. Schneider, C. B. Montgomery, T. L. Custer, A. E. Schaffner, Q. Y. Liu, Y. X. Li, J. L. Barker and J. J. Hickman, Developmental Neurobiology Implications from Fabrication and Analysis of Hippocampal Neuronal Networks on Patterned Silane-Modified Surfaces, *J. Am. Chem. SOC.*, **120**, 12170-12177 (1998)

- 19) R. Singhvi, A. Kumar, G.P. Lopez, G.N. Stephanopoulos, D. I. C. Wang, G. M. Whiteside and D. E. Ingher, Engineering Cell shape and function, *Science*, **264**, 696–698 (1994)
- 20) M. A. Cole, N. H. Voelcker, H. Thissen and H. J. Griesser, Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein–surface and cell–surface interactions, *Biomaterials*, **30**, 1827–1850 (2009)
- 21) M. Yamato and T. Okano, Cell sheet engineering, *Materials today*, **7**, 42–47 (2004)
- 22) M. Yamato, C. Konno, M. Utsumi, A. Kikuchi and T. Okano, Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture, *Biomaterials*, **23**, 561–567 (2002)
- 23) H. Kaji, K. Tsukidate, T. Matsue and M. Nishizawa, In Situ Control of Cellular Growth and Migration on Substrates Using Microelectrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15026–15027 (2004)
- 24) S. S. Shah, J. Y. Lee, S. Verkhoturov, N. Tuleuova, E. A. Schweikert, E. Ramanculov, and A. Revzin, Exercising Spatiotemporal Control of Cell Attachment with Optically Transparent Microelectrodes, *Langmuir*, **24**, 6837–6844 (2008)
- 25) J. Edahiro, K. Sumaru, Y. Tada, K. Ohi, T. Takagi, M. Kameda, T. Shinbo and T. Kanamori and Y. Yoshimi, In Situ Control of Cell Adhesion Using Photoresponsive Culture Surface, *Biomacromolecules*, **6**, 970–974 (2005)
- 26) 中西淳, バイオマテリアル—生体材料—, **32**, 298–307 (2014)
- 27) C.T. Ho, R. Z. Lin, W. Y. Chang, H. Y. Chang and C. H. Liu, Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap, *Lab Chip*, **6**, 724–734 (2006)
- 28) K. Ino, M. Okochi, N. Konishi, M. Nakatochi, R. Imai, M. Shikida, A. Ito and H. Honda, Cell culture arrays using magnetic force-based cell patterning for dynamic single cell analysis, *Lab Chip*, **8**, 134–142 (2008)
- 29) 西澤松彦, 梶弘和, 田光公康, 末永智一, バイオチップ表面への細胞のマイクロパターンニング, *表面科学*, **25**, 290–295 (2004)
- 30) 飯島美夏, 高橋正人, 畠山立子, 畠山兵衛, 熱可逆性多糖ヒドロゲルの熱的性質, *Netsu Sokutei*, **34**, 104–112 (2007)
- 31) 赤坂英二郎, 中野創, 神可代, 木村一之, 六戸大樹, 芋川玄爾, 澤村大輔, 紫外線防御機構におけるメラノサイト, ケラチノサイトのエンドセリン-1/幹細胞因子を介した相互作用, *弘前医学*, **62**, 138–142 (2011)
- 32) 山田幸生, 第3章 健康なくらしに寄与する光, 光を用いた非侵襲生体診断
http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/attach/1333543.htm (2015.01.06 アクセス)
- 33) H. Tsujimoto, Y. Morimoto, R. Takahata, S. Nomura, K. Yoshida, H. Horiguchi, S. Hiraki, S. Ono, H. Miyazaki, D. Saito, I. Hara, E. Ozeki, J. Yamamoto and K. Hase, Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer, *Cancer Sci.*, **105**, 1626–1630 (2014)
- 34) S. A. Chechetka, B. Pichon, M. Zhang, M. Yudasaka, S. Begin-Colin, A. Bianco and E. Miyako, Multifunctional Carbon Nanohorn Complexes for Cancer Treatment, *Chem. Asian J.*, **10**, 160–165 (2015)
- 35) 小川 栄司, 光アシスト超音波イメージング技術に関する研究 (第1報), 滋賀県工業技術総合センター研究報告書, 22–28 (2010)
- 36) J. W. Kim, E. I. Galanzha, E. V. Shashkov, H. M. Moon and V. P. Zharov, Golden carbon nanotubes as multimodal

photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents, *Nature Nanotechnology*, **4**, 688-694 (2009)

第2章

カーボンナノチューブと金ナノロッドの細胞への影響評価

2.1 本章の目的

本技術の発想は 1.6 節で示したように、NIR 応答性アガロースゲルに NIR を照射し、照射領域のみにゲルゾル転移を誘導して、ゲルのエッチングを行うという原理に基づいている。アガロースゲルのゾル化を効率的に誘導するためには、NIR 領域の光を吸収し、効率的に熱変換する「分子ヒーター」が必要である。本研究では、アガロースゲルに複合する分子ヒーターとして「カーボンナノチューブ」と「金ナノロッド」という 2 つの材料に着目した。

そこで本章では、カーボンナノチューブと金ナノロッドをアガロースゲルに複合する前に、分子ヒーターそのものの細胞への影響を検討することを目的とした。

具体的に、2.2 節では、カーボンナノチューブを通常の組織培養ディッシュ上に固定化した「カーボンナノチューブ固定化ディッシュ」を作製し、初代ラット肝細胞の形態、機能活性を評価した。2.3 節では、金ナノロッドの細胞親和性を高めるために、金ナノロッド表面への分子修飾方法を検討し、細胞への毒性を評価した。

2.2 カーボンナノチューブの細胞への影響評価

2.2.1 本節の目的

カーボンナノチューブ（以下、CNT と表記する）は、単原子層のグラファイト（グラフェン）が円筒状に丸まった、中空のチューブ構造を有する炭素材料である。直径が数ナノメートルであるのに対し、長さは数～数百マイクロメートルにもなる大きなアスペクト比を有しており、この直径と長さは金属触媒の種類に依存している。CNT はカイラリティ（円筒の巻き方）によって多彩な立体構造を持ち、それぞれが固有の特徴を有している¹⁾。また、円筒形の層が 1 層の CNT を単層ナノチューブ（single wall carbon nanotube ; SWNT）と呼び、1 層以上巻いた CNT を多層ナノチューブ（multi wall carbon nanotube ; MWNT）と呼ぶ（Fig.2.1）。炭素原子間は sp^2 結合による強固な結合で構成されているため、優れた機械的強度、電気伝導度、熱伝導度などを有しており、幅広い分野での応用が期待されている。

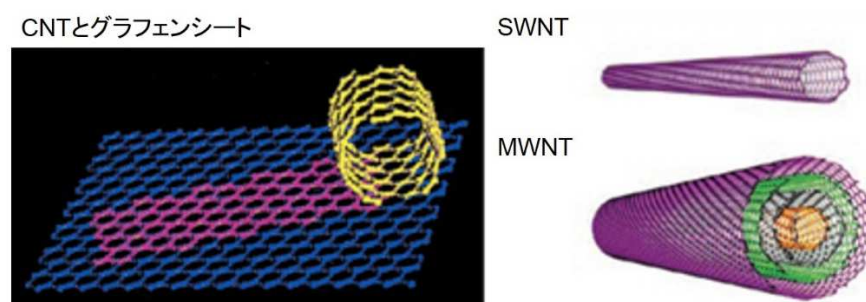


Fig.2.1 CNT の構造(シグマアルドリッチ社 HP より引用)

前述したように、CNT は多数の sp^2 結合を有するため、一種の共役系高分子とみなすことが出来る。CNT の光学的な特徴に着目すると、この発達した π 共役系により、CNT の吸収波長は赤外波長域まで広がっている。特に NIR 領域の光は、生体を含む物質に対する透過性が高いため、この領域に吸収や発光を持ち、退色のない SWNT は生体内プローブなどへの応用が期待されている。しかし、その発光効率は 3~5 % と小さく、吸収したエネルギーのほとんどは無輻射失活し、熱運動に変換される²⁾。近年では、NIR 領域における CNT の高い光熱交換性を利用し、ガン細胞をターゲットにした温熱療法³⁾や、CNT から発生する熱・ラジオ波を利用して選択的に細胞を剥離する技術⁴⁾に利用されている。

一方、新材料として期待されている CNT には、その細胞毒性も懸念されている。CNT の細胞毒性には様々な議論がなされており、CNT の形状 (アスペクト比、凝集状態)、CNT を良好に分散させるための分散剤、CNT に残留している触媒などが細胞へ影響を与えるといった原因が指摘されている^{5)~7)}。つまり、CNT が毒性を示す、という要因は単純に CNT にあるだけではないため、その実験系で使用する CNT で細胞毒性に対する検討を行っておくべきだと考えられる。そこで本節では、CNT そのものが細胞にどのような影響を与えるのか、初代ラット肝細胞を用いて評価することを目的とした。

2.2.2 実験方法

(1) CNT 固定化培養ディッシュの作製

CNT 固定化培養ディッシュは、一般的な組織培養ディッシュ (Corning 430165、 $\phi 35$ mm、Corning 社) にエタノール中に分散した SWNT (直径: 1.0~2.5 nm、長さ: 5~10 μm) (名城ナノカーボン社) を繰り返し表面に塗布・乾燥し、ディッシュ表面に物理吸着で CNT を固定化して作製した。本検討では、約 1 (0.1)、3 (0.3)、および 6 $\mu\text{g}/\text{dish}$ (0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) の CNT が表面に固定化されたディッシュを用いた。以下、CNT 固定化量が 1 $\mu\text{g}/\text{dish}$ の条件を CNT1、3 $\mu\text{g}/\text{dish}$ を CNT3、および 6 $\mu\text{g}/\text{dish}$ を CNT6 と表記する。このディッシュ表面の状態を評価するため、SEM による観察と、表面接触角計、および $\theta/2$ 法を用いた接触角の測定 (Drop Master、協和界面化学社) を行った。

(2) 初代ラット肝細胞の培養

Wister ラット (雄、7 週齢、約 200 g、九動株式会社) の肝臓から、コラゲナーゼ灌流法を利用して初代肝細胞を調製した⁸⁾。ラットの腹腔内にネンブタール (ABBOTT laboratories 社) を約 0.35 mL 注射し、麻酔が効いた後にラットを手術台に固定した。腹部を 70 % エタノールで消毒、開腹して門脈を露出させ、ピンセットを用いて門脈に縫合糸のループをかけた。門脈を半切後、カニューレ (17 G) を挿入してループを縛った。ペリスタックポンプを用い、門脈側から前灌流液 (組成: Table 2.1) を 20~30 mL/min で流し、前灌流開始と同時に下大静脈を半切して肝臓内部の脱血を行った。前灌流終了後、コラゲナーゼ溶液 (組成: Table 2.1) に切り替え、20~30 mL/min で流した。肝臓内部がペースト状になったところで肝臓を切除し、冷やしたガラスシャーレに入れ、クリーンベンチ内に移した。ペースト状になった肝臓をメスで細かくし、HDM (Hormone-defined medium) 培地 (組成: Table 2.2) で懸濁した。ガーゼを 4 枚重ねたフィルター、続いて孔径 45 μm の金属メッシュフィルターで細胞懸濁液を濾過した。600 rpm で 90 秒間、遠心分離を行い、沈殿した細胞を新鮮培地で再懸濁した。この操作を計 3 回行い、血球計算板による細胞数計数、およびトリパンブルー染色により生存率を測定した。生存率が 80 % 以上のものを培養に用いた。

Table 2.1 前灌流用緩衝液及びコラゲナーゼ溶液の組成

試薬	前灌流用緩衝液 [g/L]	コラゲナーゼ溶液 [g/L]
NaCl	8	8
KCl	0.4	0.4
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.078	0.078
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.151	0.151
HEPES	2.38	2.38
EGTA	0.19	-
NaHCO ₃	0.35	0.35
CaCl ₂	-	0.56
Glucose	0.9	-
Penicillin	0.059	0.059
Streptomycin	0.1	0.1
Collagenase	-	0.5
Trypsin inhibitor	-	0.05

Table 2.2 HDM 培地の組成

試薬	培地組成
DMEM 基本培地 (GIBCO Cat. No. 12800-017)	13.5 g/L
EGF	50 µg/L
Insulin	10 mg/L
Hydrocortisone	7.5 mg/L
Proline	60 mg/L
Copper (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.1 µM
Selenium (H ₂ SeO ₃)	3.0 µg/L
Zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	50 pM
Linoleic acid	50 µg/L
Penicillin	58.8 mg/L
Streptomycin	100 mg/L
NaHCO ₃	1.05 g/L
HEPES	1.19 g/L

機能、遺伝子発現の評価では、Table 2.3 に示す 4 条件で検討を行い、肝細胞がコンフルエントになるように高密度で播種した。形態の評価は Table 2.4 に示す 4 条件で検討を行い、1 つ 1 つの細胞の形態を測定できるように、低密度で播種を行った。

Table 2.3 機能、遺伝子発現の評価における実験条件

表記	条件	播種密度
TC	組織培養ディッシュ	
CNT	CNT 固定化ディッシュ	5×10 ⁵ cells/dish
Col	コラーゲンコートディッシュ	(5×10 ⁴ cells/cm ²)
CNT/Col	CNT 固定化ディッシュ表面にコラーゲンコート	

Table 2.4 形態の評価における実験条件

表記	条件	播種密度
TC	組織培養ディッシュ	
CNT	CNT 固定化ディッシュ	5×10 ⁴ cells/dish
Col	コラーゲンコートディッシュ	(5×10 ³ cells/cm ²)
CNT/Col	CNT 固定化ディッシュ表面にコラーゲンコート	

(3) コラーゲンコートディッシュの作製

コラーゲンコートディッシュは、3 mg/mL の type I のコラーゲン溶液 (Cellmatrix type I-C、新田ゼラチン) を PBS (-) (以下、PBS と表記、組成 : Table 2.5) で 10 倍希釈し、この溶液を組織培養ディッシュに 1 mL 塗布、余分な液を回収、という操作を 2 回繰り返して作製した。UV 下に約 1 時間静置後、表面を PBS で洗浄し、PBS を 2 mL 入れてインキュベータに保存した。CNT 固定化ディッシュにも同様の操作を行い、CNT/Col のディッシュを作製した。これらのディッシュに初代ラット肝細胞を HDM 培地にて播種し、5 % CO₂、95 % air、37 °C の雰囲気下で培養した。培地交換は 2 日に一回行った。

Table 2.5 PBS の組成

試薬	組成 [g/L]
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9
KH ₂ PO ₄	0.2

(4) 細胞伸展率

各ディッシュ上での肝細胞の形態を定量的に評価するため、細胞の伸展面積を測定した。培養 0、1、3、5、7、10、および 15 日目の形態写真から、30 個の細胞を無作為に抽出し、画像解析ソフト (WinROOF Ver.5.02、三谷商事) で伸展面積の測定を行った。細胞の懸濁液 (浮遊状態の細胞の大きさ) を基準とし、細胞の伸展率を算出した。それぞれの培養日数で ANOVA 検定を行い、CNT と比較したときの有意差 $p < 0.05$ で示した。

(5) アクチン繊維、および核染色

アクチン繊維の分布を評価するため、アクチン繊維と核の染色を行った。培地を抜いたディッシュに、2.5 % のグルタルアルデヒドと 2.0 % のパラフォルムアルデヒドを添加し、10 分間、室温で反応させた。0.1 % Triton-X 100 で 5 分間処理し、1 % の BSA を含む PBS で 20 分間ブロッキングした。5 units/mL rhodamine-phalloidin (Molecular Probes 社) を 20 分間反応させてアクチン繊維を染色後、1 µg/mL の 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI、和光純薬) を 5 分反応させて核を染色した。染色したサンプルは蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000™、キーエンス) で観察した。

(6) 細胞接着率、および細胞数の測定

細胞接着率は、浮遊細胞と接着細胞をそれぞれ回収して算出した。培養 24 時間後に、浮遊細胞を 1.5 mL のキャップ付きチューブに回収、遠心して上澄みの培地を抜き、DNA 抽出液 (組成 : Table 2.6) に交換した。その後、ディッシュに残った接着細胞に DNA 抽出液を添加して、別のチューブに回収した。また、培養 1、5、10、および 15 日目の細

胞を約 1 mL の DNA 抽出液で回収し、培養日数に伴う細胞数変化を測定した。回収した細胞は、37 °C で 24 時間以上インキュベート、ホモジナイズを繰り返して細胞を完全に溶解させた。抽出した DNA 溶液と DAPI 溶液（組成：Table 2.6）を 100 μ L ずつ 96 ウェルプレート内で混合し、蛍光プレートリーダー（Fluoroskan Ascent Thermo Labssystem、Thermo Fisher Scientific 社）で測定した（Ex. 355 nm / Em. 460 nm）。播種時の計数後の細胞懸濁液から調製した DNA 溶液を使用し、 $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mL の範囲で検量線を作製し、検量線から細胞数を算出した（Table 2.7、2.8）。

Table 2.6 DNA 抽出液、および DAPI 溶液の組成

試薬	DNA 抽出液の組成	DAPI 溶液の組成
Tris-HCl	6.06 g/L	6.06 g/L
NaCl	5.86 g/L	5.86 g/L
EDTA	1.86 g/L	1.86 g/L
Protinase K	0.1 mg/mL	-
DAPI solution	-	1 μ g/mL

Table 2.7 DNA サンプルの希釈(高濃度)

目的細胞密度 [$\times 10^5$ cell/mL]	DNA 含サンプル液 [μ L] (1×10^6 cells/mL)	DNA 抽出液 [μ L]
0.5	10	190
0.75	15	185
1	20	180
2	40	160
3	60	140
4	80	120
5	100	100
6	120	80
7	140	60
8	160	40
9	180	20
10	200	0

Table 2.8 DNA サンプルの希釈(低濃度)

目的細胞密度 [$\times 10^4$ cell/mL]	DNA 含サンプル液 [μ L] (1×10^5 cells/mL)	DNA 抽出液 [μ L]
0.5	10	190
0.75	15	185
1	20	180

2	40	160
3	60	140
4	80	120
5	100	100

(7) 遺伝子発現解析

RNA 抽出用のスピнкаラム (NucleoSpin® RNA II、ニッポンジーン) を使用して、使用説明書に従い、肝細胞調製時に採取した肝組織、培養 5、15 日目の培養肝細胞から total RNA を抽出した。サンプルは分析するまで -20 °C で保存した。High-capacity cDNA reverse- transcription kit (Applied Biosystems) を使用して、total RNA から相補的 DNA (cDNA) を合成した。TaqMan® Gene Expression Assay kits (Applied Biosystems) を使用し、PCR (StepOne™ real-time PCR system、Applied Biosystems) を実施した。以下の Table 2.9 に解析した遺伝子を示す。遺伝子発現レベルは、比較 Ct 法 (Comparative cycle-time method) によって定量した。GAPDH をハウスキーピング遺伝子として標準化し、肝組織を基準として発現レベルを比較した。それぞれの培養日数で ANOVA 検定を行い、CNT と比較したときの有意差 $p < 0.05$ で示した。

Table 2.9 本検討で解析した遺伝子

分類	遺伝子名	TaqMan Assay no.
ハウスキーピング	GAPDH	Rn01775763_g1
細胞-ECM 結合	Integrin β 1	Rn00566727_m1
細胞-ECM 結合	Integrin α 6	Rn01512702_m1
細胞間結合	E-cadherin	Rn00580109_m1
細胞間結合	Connexin 32	Rn01641031_s1

(8) 肝細胞の機能活性評価

培養 1、5、10、および 15 日目のアンモニア代謝能とアルブミン分泌能を評価した。アンモニア代謝速度を評価するため、サンプリングの前日に 1 mM 塩化アンモニウムを添加した新鮮培地に交換した。培地交換直後と 24 時間後の培地中のアンモニア濃度を、分析キット (アンモニアテストワコー、和光純薬) を使用して求め、減少したアンモニア濃度からアンモニア代謝量を算出した。また、新鮮培地に交換してから 24 時間で培地中に分泌したアルブミン濃度を ELISA 法により求め、アルブミン分泌量を算出した。

アンモニア代謝速度、およびアルブミン分泌量は細胞数で標準化し、細胞数あたりの機能活性を算出した。計 3 点のデータから、それぞれの培養日数で ANOVA 検定を行い、CNT と比較したときの有意差 $p < 0.05$ で示した。

2.2.3 実験結果および考察

(1) CNT 固定化培養ディッシュの表面状態と初代ラット肝細胞の接着

まず、SEM による CNT の固定化状態の観察を行ったところ、CNT が分散した状態でディッシュ表面に固定され、CNT の量が多い程 CNT が密に表面上を覆っていた (Fig.2.2)。このときの CNT 固定化ディッシュの接触角を測定すると、組織培養ディッシュ (TC) よりも CNT 固定化ディッシュの接触角が大きい、すなわち疎水面を形成していることがわかった。また、CNT の濃度が高い程、高い疎水性を有していることが明らかとなった (Fig.2.3 (A))。

次に、表面状態が細胞に与える影響を評価するため、培養 24 時間後における初代ラット肝細胞の接着率を測定したところ、CNT 量が高くなるほど接着率が下がることがわかった (Fig.2.3 (B))。細胞は接着タンパク質を認識して基板に接着するため、タンパク質が吸着しやすい表面には、細胞が接着する。このとき、材料表面の接触角が 40~70°付近でタンパク質が一番吸着しやすい、すなわち細胞の接着率が最も高いことが知られている。肝細胞に関して言えば、Grant らは疎水性が高い表面で肝細胞の接着性が下がることを見出しており¹⁰⁾、本結果は他の報告とも一致している。つまり、CNT 固定化ディッシュ表面の高い疎水性が、タンパク質の吸着を抑制し、その結果肝細胞の接着を妨げていることが示唆された。このとき、CNT3 と 6 における接着性の違いは見られなかったため、以下の検討では CNT3 のみを用いて評価を行った。

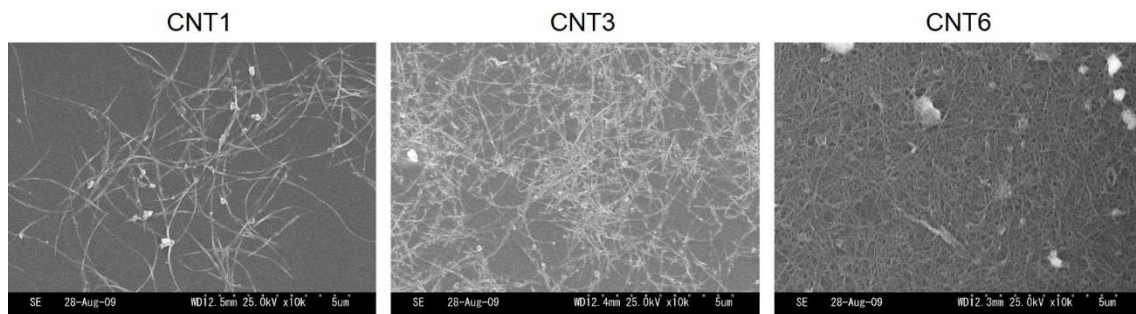


Fig.2.2 CNT 固定化培養ディッシュ表面の SEM 像⁹⁾

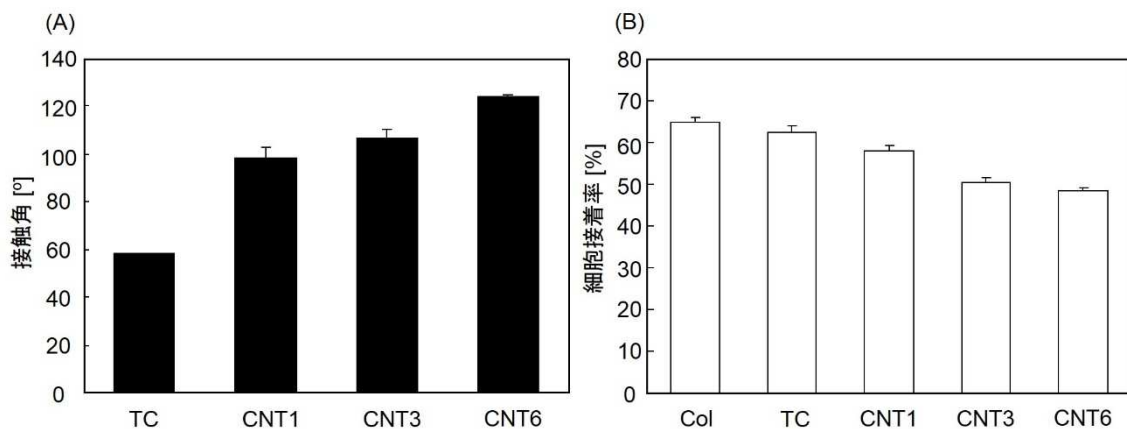


Fig.2.3 (A)CNT 固定化ディッシュの接触角、および(B)初代ラット肝細胞の接着率⁹⁾

(2) 初代ラット肝細胞の形態の変化

肝細胞形態の特性をより詳しく評価するため、一般的に細胞培養で用いられている組織培養ディッシュ (TC)、肝細胞培養で汎用されているコラーゲンコートディッシュ (Col)、そして CNT 固定化ディッシュ (CNT)、およびコラーゲンコート CNT 固定化ディッシュ (CNT/Col) の4条件で、肝細胞の形態の変化を観察した。

TC と CNT 上の肝細胞は基板表面でわずかに伸展したものの、球状の形態を維持し、細胞同士が凝集・集合した細胞塊 (スフェロイド) を形成した。一方、Col と CNT/Col では、肝細胞は基板に完全に接着、伸展して広がっていた (Fig.2.4)。

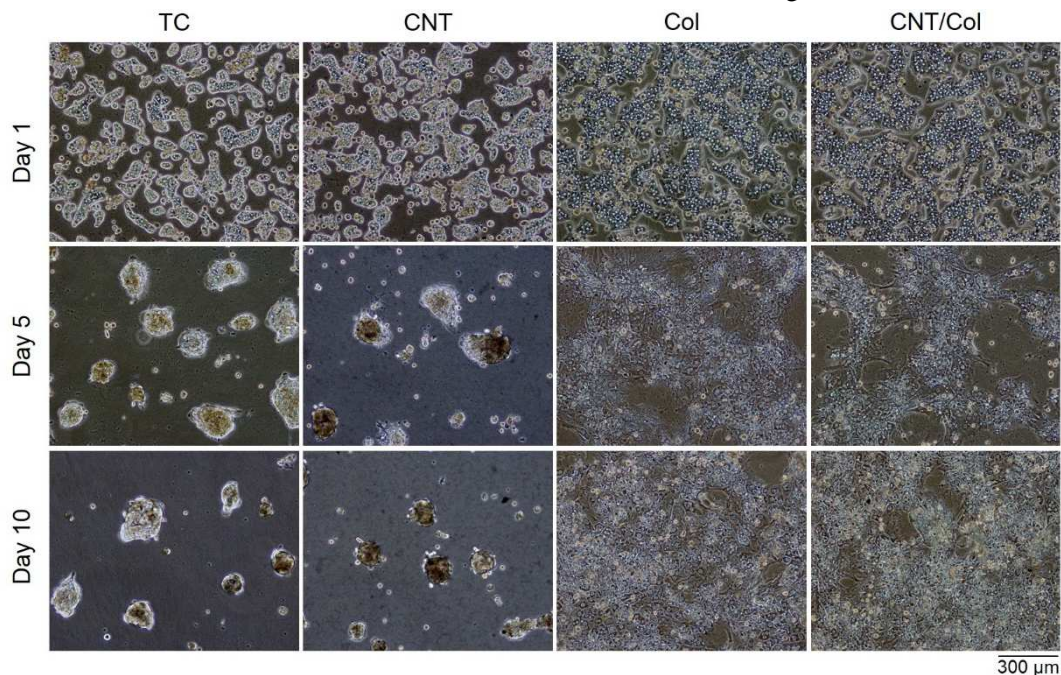


Fig.2.4 培養日数に伴う初代ラット肝細胞の形態変化⁹⁾

細胞形態の維持に関わっているアクチンの染色を行ったところ、Col と CNT/Col では、赤く染色されたアクチンが細胞内を縦横に走っているのが観察され、TC と CNT に比べて、ストレスファイバーが発達していることがわかった (Fig.2.5)。

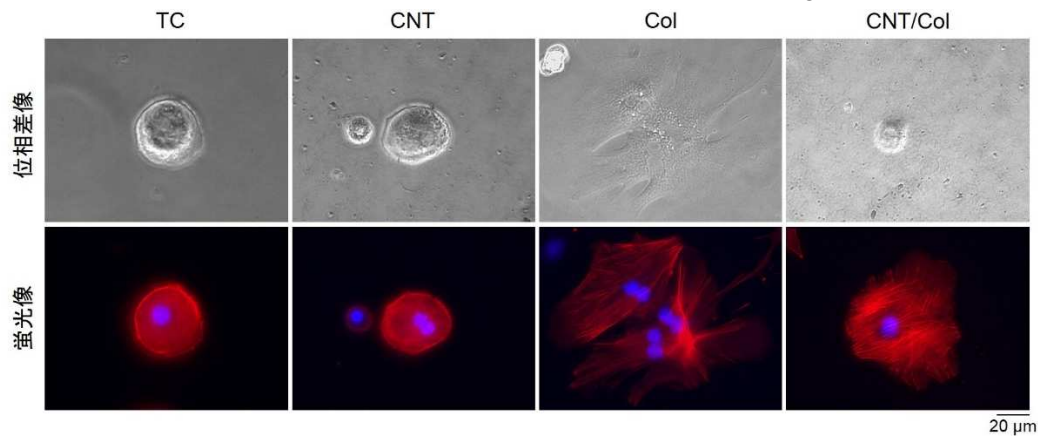


Fig.2.5 初代ラット肝細胞のアクチン(赤)、および核(青)染色⁹⁾

また、このときの肝細胞の形態を定量的に評価するため、細胞の伸展面積を測定した。TC と CNT では、培養 1 日目にわずかに面積が増加したが、その後は一定の値となった。一方、Col と CNT/Col では、伸展面積が培養 5 日目までに大幅に増加し、その後はゆるやかに増加した。しかし、培養 5 日目から CNT/Col の伸展面積が Col よりも抑制されている傾向があった (Fig.2.6)。

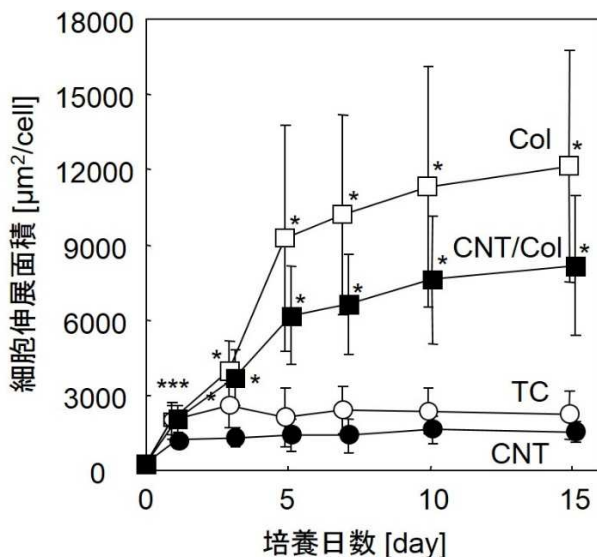


Fig.2.6 各基板上での初代ラット肝細胞の伸展面積⁹⁾

これは、CNT のもつ高い疎水性の影響だけではなく、CNT が固定化されていることによる表面の微小な凹凸の影響だと考えられる。培養基板表面に、微小なピラー形状や溝のような凹凸を形成させることによって、細胞と基板の接着点に形成される「接着斑」の形成が困難となり、細胞の伸展が抑制される現象が報告されている^{11), 12)}。接着斑は、細胞質側でストレスファイバーに連結しており、接着斑の発達はストレスファイバーの発達につながる。Fig.2.5 の結果からも、Col よりも CNT 上ではストレスファイバーの発達が抑制されており、これらの結果から、基板表面に CNT が存在することによって、肝細胞の基板上への伸展が抑制され、肝細胞同士が凝集することがわかった。

(3) 初代ラット肝細胞の接着タンパク質の遺伝子発現評価

これらの 4 条件で肝細胞形態に大きな違いが見られたため、細胞-ECM 間、および細胞-細胞間の接着を担うタンパク質の遺伝子発現を比較した。

大部分の組織では、細胞が細胞間結合により互いに直接結合している。また、ECM は細胞を支持する足場として細胞と接着している。これらの接着は、様々な接着タンパク質を介して行われ、細胞の形態とも関わっている (Fig.2.7)¹³⁾。

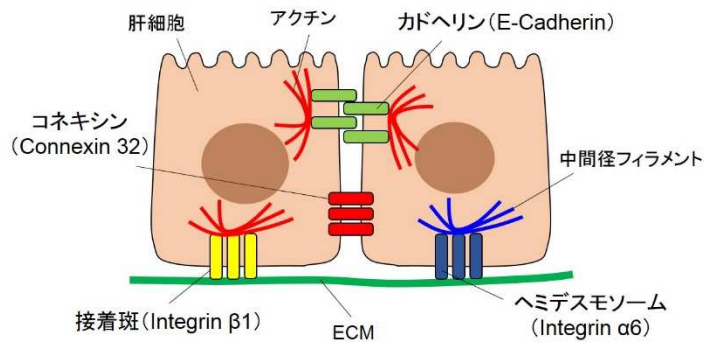


Fig.2.7 細胞－細胞、および ECM 間にはたらく接着タンパク質の模式図

インテグリンは細胞表面に存在し、細胞外では ECM と、細胞内では細胞骨格（アクチンなど）と結合して細胞と ECM をつないでいる糖タンパク質である。α と β の 2 つのサブユニットが 1:1 で会合しており、これらの組合せパターンにより 22 種類のインテグリンが知られている¹⁴⁾。上皮細胞における接着斑を形成する Integrin β1、ヘミデスマソームを形成する Integrin α6 の遺伝子発現を見てみると (Fig.2.8)、培養 5 日目には、4 条件の間であまり差が見られなかったが、培養 15 日目では、Col と CNT/Col で発現が大きく上昇していた。これは、Col と CNT/Col 上では肝細胞が大きく伸展し、基板と接する面積が大きくなり、インテグリンが強く発現しているものと考えられる。

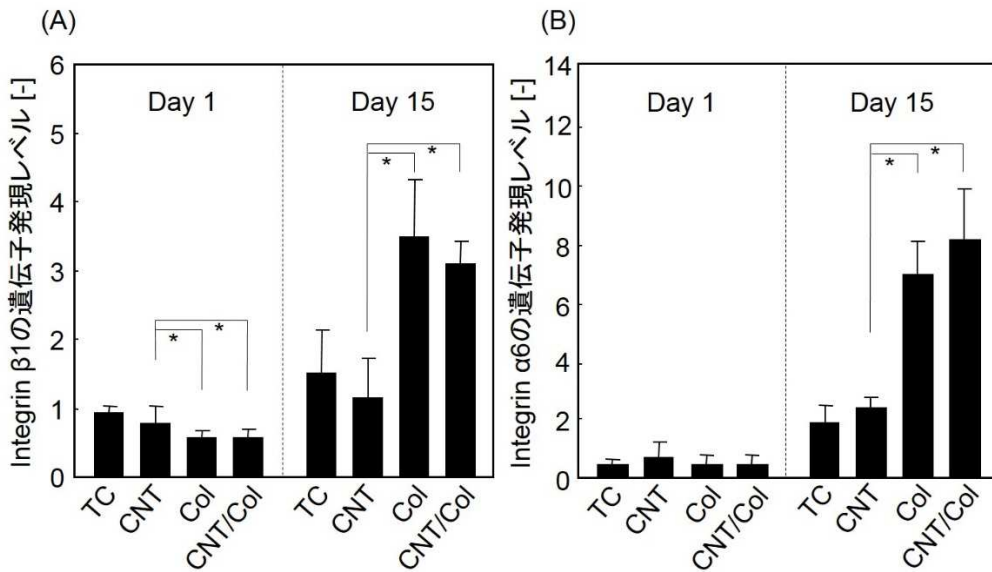


Fig.2.8(A) Integrin-β1、および(B) Integrin-α6 の遺伝子発現レベル⁹⁾

また、カドヘリンは細胞外で隣り合う細胞のカドヘリンと結合して、細胞間の接着を担う代表的な細胞間接着タンパク質である。また、コネクシンは細胞-細胞間の情報伝達を担う、ギャップジャンクションを形成する重要なタンパク質である。これらの遺伝子発現を見ることで、細胞間の結合の度合い、肝細胞間のコミュニケーションの発達度合いを評価することが出来る。

E-Cadherin と Connexin 32 の遺伝子発現を見てみると (Fig.2.9)、インテグリンの発現とは逆で、Col や CNT/Col より、TC と CNT が高い発現レベルを示した。肝細胞の形態は (Fig.2.4)、TC と CNT において、細胞が凝集したスフェロイドを形成していた。スフェロイド内では細胞間の結合が密になり、細胞間結合タンパク質の発現が上昇することが知られている^{15), 16)}。TC と CNT ではスフェロイドを形成しているため、これらの細胞間結合が発達していると考えられる。

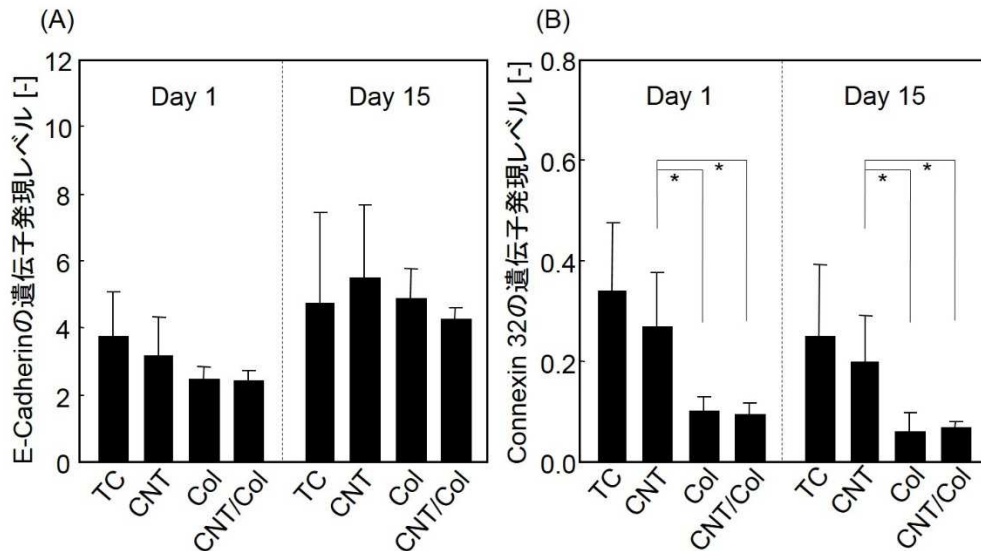


Fig.2.9(A)E-Cadherin、および(B)Connexin 32 の遺伝子発現レベル⁹⁾

形態、および遺伝子発現レベルの結果から、CNT コートディッシュではタンパク質の吸着が起りにくく、CNT の微小な凹凸によって細胞の接着が抑制され、スフェロイドを形成することがわかった (Fig.2.10)。

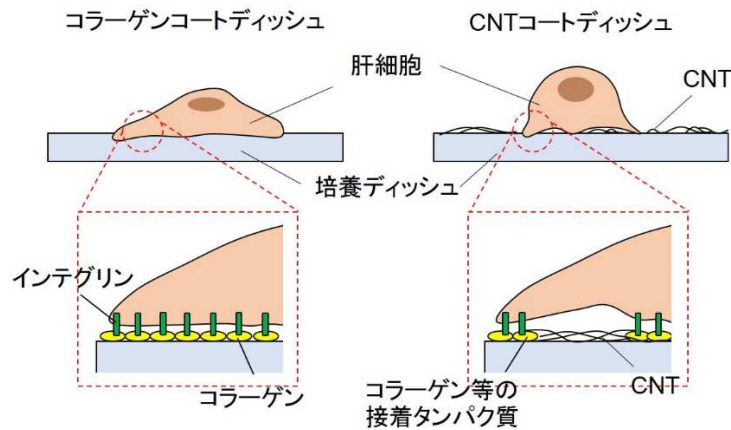


Fig.2.10 コラーゲンコートディッシュとCNT コートディッシュ上での肝細胞の接着挙動の考察

また、形態が類似していた Col と CNT/Col、および CNT と TC では遺伝子発現に差がないため、CNT の存在は、肝細胞-ECM 間、および肝細胞間の結合に影響しないことがわかった。

(4) 初代ラット肝細胞の肝特異的機能活性

形態、および遺伝子発現の結果から、TC と CNT、Col と CNT/Col で肝細胞の形態的な特徴が類似していることがわかった。そこで、肝特異的機能（アンモニア代謝活性、アルブミン分泌活性）を評価してみたところ（Fig.2.11）、Col、CNT/Col では培養日数とともにアンモニア代謝活性、およびアルブミン分泌活性は低下する一方で、TC と CNT では、少なくとも培養 15 日間はその活性を維持していた。

これらの違いは、各基板が与える肝細胞形態の違いであると考えられる。一般的に、過度に基板上に伸展・接着した肝細胞の機能活性は、数日の内に消失してしまうことが知られている。細胞間のコミュニケーションが不十分で、*in vivo* の環境とかけ離れてしまうためである。一方、スフェロイドのように細胞が密に詰まって細胞間のコミュニケーションが活発になることにより、E-cadherin や Connexin 32 が発達し、肝細胞の機能活性を維持できることが知られている¹⁵⁾⁻¹⁸⁾。TC や CNT では特に Connexin 32 の遺伝子発現が Col や CNT/Col よりも高くなっており、細胞間のコミュニケーションが活発に行われ、その結果機能活性が上がったものと考えられる。この機能発現の結果は、肝細胞の形態を反映した結果であり、CNT が肝細胞の肝特異機能に直接影響しないことがわかった。

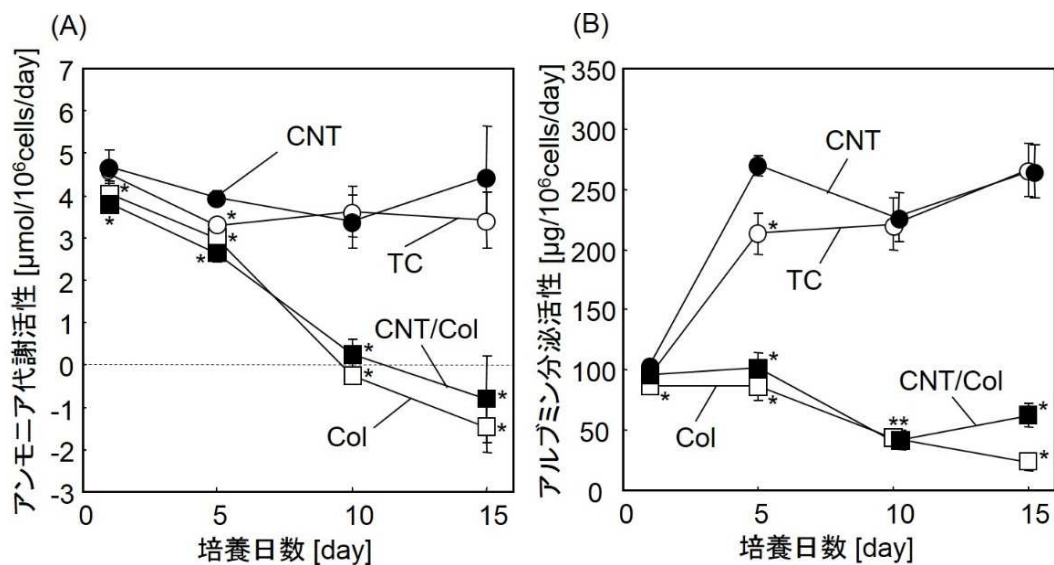


Fig.2.11 (A)アンモニア代謝活性、および(B)アルブミン分泌活性⁹⁾

2.2.4 本節のまとめ

本節より、以下の結果を得た。

- (1) CNT は、自身の強い疎水性、またその微小な凹凸によって、初代肝細胞の接着と伸展を抑制し、スフェロイドの形成を促進した。
- (2) CNT コートディッシュ上の肝細胞の形態、それに伴う接着タンパク質の遺伝子発現、機能活性は一般的な組織培養ディッシュと差がなかった。

これらの結果から、CNTの存在は、細胞間の結合やECMとの結合、およびアンモニア代謝活性、およびアルブミン分泌活性といった肝特異機能に影響しないことが明らかとなった。従って、今回用いているCNTは、肝細胞の結合状態・機能活性の点から見ると、細胞へ悪影響を及ぼさないことがわかった。

次節では、CNTと同様な機能を有する分子ヒーターとして、「金ナノロッド」が細胞に及ぼす影響について評価した。

2.3 金ナノロッドの細胞への影響評価

2.3.1 本節の目的

CNT同様、光熱交換性を有する材料に「金ナノ粒子」がある。1~100 nm程度の直径を有する金ナノ粒子は、高い生体適合性や化学的安定性、バルクの金とは異なる特異的発色性を持つことから、バイオアプリケーションへの利用が盛んに研究されている¹⁹⁾。

この金ナノ粒子の光熱交換特性を活かし、薬剤放出システムや温熱療法、細胞培養基板材料などに応用されている。例えばZhuらは、細胞接着分子を修飾した球状金ナノ粒子をパターン化した培養基板を開発し、細胞近傍へのレーザー照射技術と組み合わせることにより、細胞遊走の制御に成功している²⁰⁾。Kolesnikovaらは、金ナノ粒子を基板に修飾、レーザー照射によって細胞を剥離する技術を確立している²¹⁾。また、Shiotaniらは、金ナノロッドを複合化したPNIPAAmゲルを開発し、NIR照射によって誘導されるゲルの相転移を利用して薬物を放出させるドラッグデリバリーシステムを確立している²²⁾。

金ナノ粒子の形状に着目すると、球状の金ナノ粒子は可視光領域に吸収を示すが、棒状の「金ナノロッド」では、ロッドの短軸に由来する可視光領域の吸収と、長軸に由来するNIR領域の2つの吸収を示すことが知られている²³⁾。

一般的な金ナノロッド溶液は、ロッド形成の過程、および良好な分散性を維持するためにCTAB（臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム）を含んでいるが、CTABは陽イオン性の界面活性剤であるため、細胞毒性を示すことが知られている²³⁾。本研究では、アガロースゲル中での分散性を維持したまま、生体適合性を向上する必要がある。加えて本技術では、細胞パターンニング技術へ応用するため、アガロースの細胞非接着性を損なわない分子修飾が必要である。

そこで、細胞毒性がなく、かつ細胞非接着性を示し、金ナノロッドへの修飾方法が確立されているポリエチレングリコール（PEG）に着目した。Fig.2.12に示すように、金ナノロッド表面にPEG修飾を施し、PEG修飾の有無や細胞毒性について評価した。

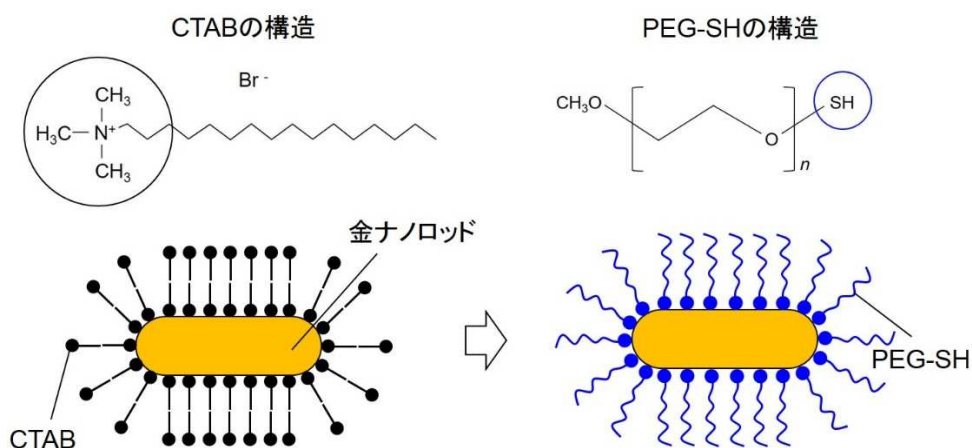


Fig.2.12 金ナノロッドへの PEG 修飾の概念図

2.3.2 実験方法

(1) 金ナノロッド表面への PEG 修飾

長軸 67 nm、短軸 10 nm (アスペクト比 6.7) で、1064 nm に SPR ピークを有する金ナノロッド溶液 (濃度 : 0.04 mg/mL、分散剤 : CTAB) (NANOPARTz 社) を用い、Niidome らの手法²⁴⁾を参考にして表面に PEG を修飾した。金ナノロッド原液 (CTAB-GNR) を 1.5 mL チューブに入れ、15000 rpm (約 32000×g)、1 時間遠心分離 (KUBOTA3740、久保田製作所) し、金ナノロッドを沈殿させた。片末端にチオール基を有する PEG-SH (分子量 5000) (SUNBLIGHT ME-050-SH、日油) を 50% エタノールで 5 mM に調製し、金ナノロッドの沈殿に加えて 5 時間振とうさせた。15000 rpm (約 32000×g)、1 時間遠心分離後、上澄みを取り除いて蒸留水を加えてさらに 5 時間振とうし、この溶液を PEG 修飾金ナノロッド溶液 (PEG-GNR) とした。

(2) 金ナノロッド表面への PEG 修飾の評価 (FT-IR)

PEG-SH 溶液、CTAB-GNR、および (1) の方法で調製した PEG-GNR について、FT-IR 測定 (IRAffinity、島津製作所) を行った。臭化カリウム粉末に微量のサンプルを滴下して混ぜ、粉末が乾燥後にプレスして錠剤に成型し測定サンプルを作製した。

(3) PEG 修飾による吸光スペクトルの変化

CTAB-GNR、および (1) の方法で調製した PEG-GNR について、紫外可視分光光度計 (UV-1800、島津製作所) にて測定した。プラスチックセルに 800 μL の溶液を入れ、ブランクとして蒸留水を用いた。測定条件は以下の Table 2.10 に示す。

Table 2.10 吸光スペクトル測定条件

Measure mode	Abs
Scan range /nm	1100.0-350.0
Scan pitch /nm	0.5
Scan speed	Fast
Slit width /nm	1.0

(4) 金ナノロッドの分散性の評価

1mL の CTAB-GNR を、15000 rpm (約 32000×g)、1 時間遠心処理した後、1 mL の蒸留水にて振とう・分散させ、さらに 15000 rpm (約 32000×g) で遠心処理をしたものを「CTAB-H₂O-GNR」とした。また、PEG-GNR を同様の方法で処理したものを「PEG-H₂O-GNR」とした。このサンプルを用いて、目視での沈殿の有無の確認、および OD600 測定 (SmartSpec Plus、BIORAD) を行った。OD600 測定は、50μL の溶液をプラスチックセルに入れ、「OD600 モード」で測定を行った。

(5) 細胞毒性評価

コンフルエントに達した NIH 3T3 細胞を、0.05 % トリプシン溶液 (Invitrogen) で処理して細胞懸濁液を得た。この懸濁液を 96 ウェルプレート (Cell culture treatment、Becton, Dickinson and Company) に 1×10^4 cells/well (100μL/well)、DMEM+10 % FBS 培地を用いて播種した。5 % CO₂、95 % Air、37 °C、飽和湿度のインキュベータにて培養 24 時間培養した。DMEM 培地 (組成: Table 2.11) をコントロールとし、DMEM 培地に CTAB-GNR (最終濃度: 0.2 μg/mL) を添加した培地、また DMEM 培地に PEG-GNR (最終濃度: 0.2 μg/mL) を添加した培地の 3 種類を作製し、培地交換を行った。さらに 24 時間培養後、細胞の形態観察、および細胞数を測定した。

細胞数の測定は、2.2.2 項 (6) と同様に、200μL/well の DNA 抽出液にて細胞を回収し、DAPI 蛍光測定法にて DNA 量を測定、検量線から細胞数を算出した。

Table 2.11 DMEM 培地の組成

試薬	培地組成
DMEM 基本培地 (GIBCO Cat. No. 12800-017)	13.5 g/L
NaHCO ₃	3.7 g/L
Penicillin	58.8 mg/L
Streptomycin	100 mg/L

2.3.3 実験結果および考察

(1) 金ナノロッド表面への PEG 修飾の評価 (FT-IR)

本手法による金ナノロッド表面への PEG 修飾の有無を確認するため、PEG-SH 溶液、CTAB-GNR、および PEG-GNR について FT-IR 測定を行った (Fig.2.13)。その結果、PEG-SH 溶液では、 2900 cm^{-1} 付近に PEG の CH_2 -結合を示す特徴的なピーク²⁵⁾、²⁶⁾が見られた (グラフ中の矢印)。CTAB-GNR では確認出来なかったが、PEG-GNR でこのピークが確認され、PEG が金ナノロッド表面に修飾されていることがわかった。

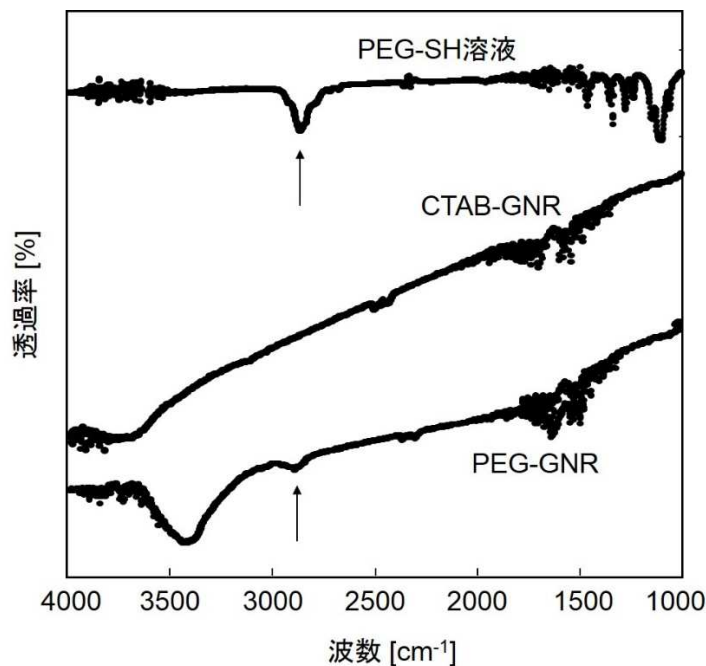


Fig.2.13 PEG-SH 溶液、CTAB-GNR および PEG-GNR の FT-IR スペクトル

(2) PEG 修飾による吸光度の変化

PEG 修飾によって、金ナノロッドの吸収波長に影響が出ないか確認するため、CTAB-GNR、PEG-GNR について、吸光度測定を行った。2.3.1 項で述べたとおり、金ナノロッドは、ロッドの短軸方向、および長軸方向に由来する 2 つのピークが見られることが知られている。2 つのサンプルの吸光度を測定した結果、CTAB-GNR (Fig.2.14 (A))、および PEG-GNR (Fig.2.14 (B)) の両方で、ロッドの短軸由来の 500 nm 付近のピーク、および長軸由来の 1100 nm 付近のピークが観察された (グラフ中の矢印)。両者のピークの位置には、ほとんど違いが見られなかったため、PEG 修飾による金ナノロッドの吸収波長への影響はないことがわかった。

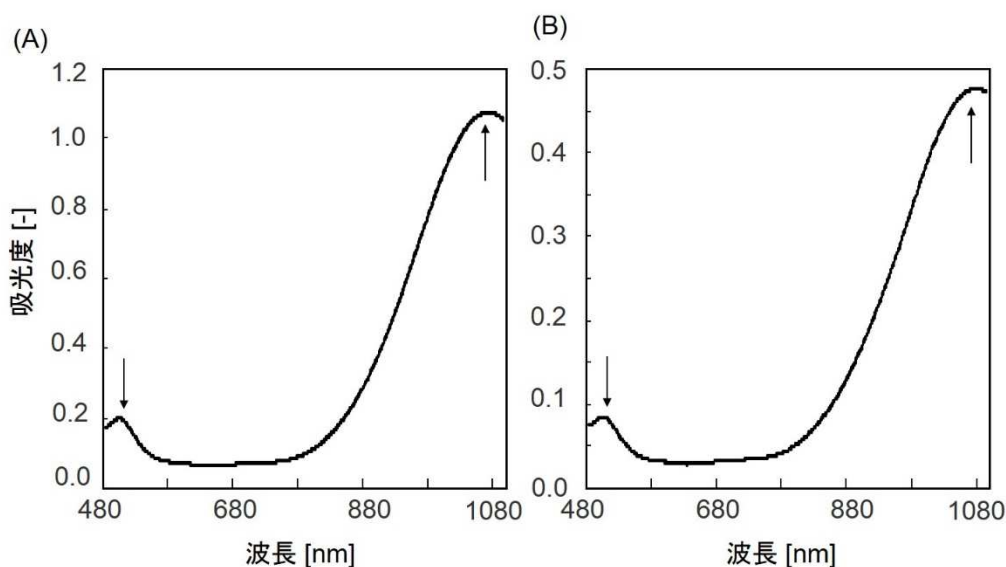


Fig.2.14 (A)CTAB-GNR、および(B)PEG-GNR の吸収スペクトル

(3) 金ナノロッドの分散性の評価

次に、PEG 修飾による分散性を評価するため、分散性の指標として①目視での確認、および②OD600 での吸光度測定を行った。CTAB-GNR を遠心後、上澄みを抜き蒸留水に再分散させ、さらに遠心分離を行うと、金ナノロッドが底面に沈殿していることが確認された (Fig.2.15 (A) 中央の写真)。一方、PEG-GNR に対し同様の操作を行っても、金ナノロッドの沈殿は見られなかった (Fig.2.15 (A) 右端の写真)。

この結果を定量的に評価するため、CTAB-GNR、CTAB-H₂O-GNR、および、PEG-H₂O-GNR の上澄みの OD600 を測定したところ、CTAB-H₂O-GNR では値がほぼ 0 であったことに対し、PEG-H₂O-GNR ではもとの CTAB-GNR と同等の値を示した (Fig.2.15(B))。つまり、PEG が金ナノロッド表面に修飾されることにより、PEG-GNR は安定的に水中に分散していることを示している。

CTAB は窒素部位で金ナノロッド表面に吸着し、二分子膜構造を形成することで金ナノロッドの分散剤として機能することが知られている²⁷⁾。しかし、60°C 以上の熱やアルコールで容易に解離してしまうことがわかっており²⁸⁾、PEG-SH 溶液中のエタノールの効果によって表面の CTAB が解離したと思われる。一方、PEG は金ナノロッドの表面に金属-チオール結合で化学修飾されているため、遠心操作で解離することなく、良好な分散性を示していると考えられる。

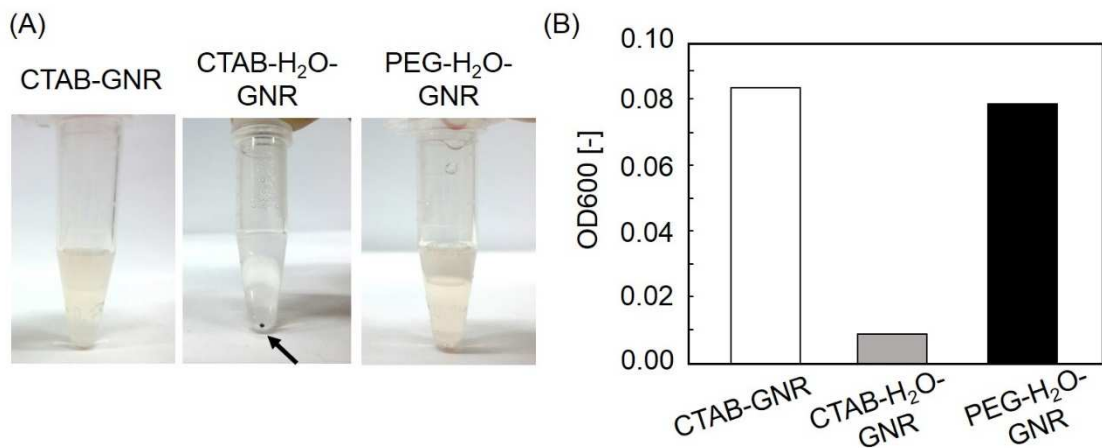


Fig.2.15 (A)各溶液の遠心・再分散処理後の外観(矢印は金ナノロッドの沈殿)、および(B)各溶液の遠心・再分散処理後の OD600

(4) 細胞毒性評価

さらに PEG-GNR の細胞への影響を評価するため、NIH 3T3 細胞による細胞増殖性試験を行った。試験開始から 24 時間後の形態を見ると、Control (通常培地) ではほぼコンフルエントであることに対し、CTAB-GNR では明らかに細胞が減少していた (Fig.2.16 (A))。一方、PEG-GNR では Control と同様に、良好に細胞が増殖していた。この結果を定量的に評価するため細胞数を測定したところ、CTAB-GNR は Control の 7 割しか細胞が生存していなかったが、PEG-GNR は Control と同等の細胞数を示した (Fig.2.16 (B))。

よって、この手法で CTAB が取り除けること、および金ナノロッド表面への PEG 修飾によって良好な細胞適合性が発揮できることが示された。

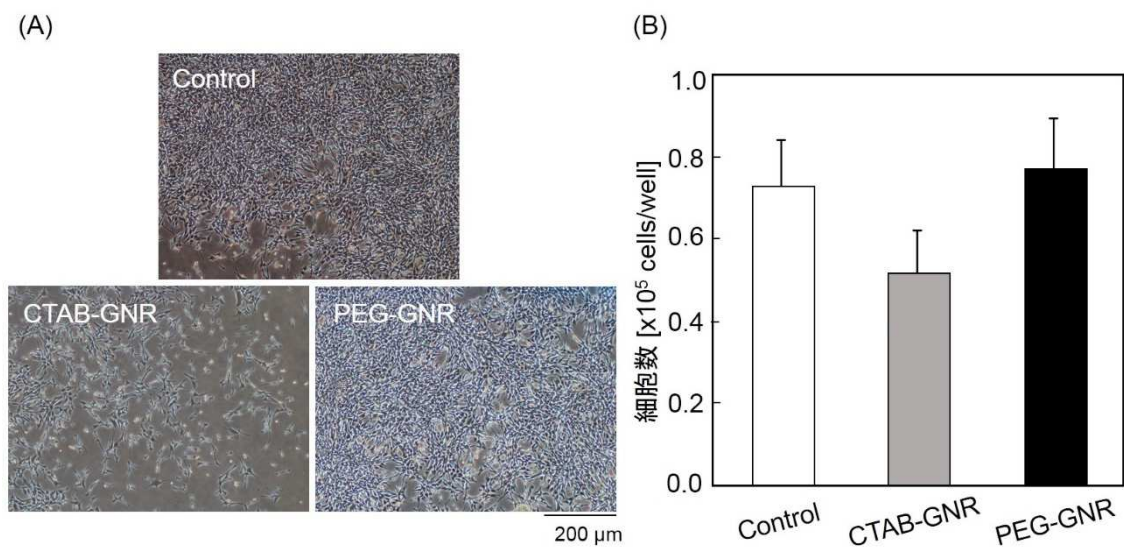


Fig.2.16 (A)各溶液暴露後の NIH 3T3 細胞の形態写真、および(B)DAPI 蛍光測定法による細胞数の変化

2.3.4 本節のまとめ

本節より、以下の結果を得た。

- (1) 本法を用いることにより、金ナノロッド表面に PEG が修飾可能であった。
- (2) PEG 修飾金ナノロッドは水中でも良好な分散性を保ち、細胞毒性を低減することが可能であった。

PEG 修飾金ナノロッドは、細胞親和性が高く、なおかつ水中で安定な分散を維持したことから、アガロースゲル中にも安定的に分散可能なことが期待できる。

2.4 本章のまとめ

これらの結果より、CNT は初代肝細胞の接着・伸展を抑制するものの、一般的な組織培養ディッシュと同等の形態や機能活性を示した。また、金ナノロッドの表面に PEG を修飾することにより、良好な分散性、および細胞親和性を示した。つまり、CNT、および金ナノロッドは、細胞培養基板に用いても、細胞への毒性を示さないことが明らかとなった。

従って、これら 2 つの材料は NIR 応答性アガロースゲル基板の分子ヒーターとして問題なく利用できると考えた。そこで次章では、これらの分子ヒーターとアガロースゲルを複合した「NIR 応答性アガロースゲル」の開発を試み、複合ゲルの特性を評価した。

参考文献

- 1) 齋藤弥八, 坂東俊治, カーボンナノチューブの基礎, コロナ社, p.58 (2005)
- 2) 中嶋直敏, 藤ヶ谷剛彦, 新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ, Dojin News
<http://www.dojindo.co.jp/letterj/146/review/02.html> (2015.01.06 アクセス)
- 3) J. R. Whitney, S. Sarkar, J. Zhang, T. Do, T. Young, M. K. Manson, T. A. Campbell, A. A. Poretzky, C. M. Rouleau, K. L. More, D. B. Geohegan, C. G. Rylander, H. C. Dorn and M. N. Rylander, Single Walled Carbon Nanohorns as Photothermal Cancer Agents, *Lasers in Surgery and Medicine*, **43**, 43-51 (2011)
- 4) T. Sada, T. Fujigaya, Y. Niidome, K. Nakazawa, and N. Nakashima, Near-IR Laser-Triggered Target Cell Collection Using a Carbon Nanotube-Based Cell-Cultured Substrate, *ACS NANO*, **5**, 4414-4421 (2011)
- 5) 森本泰夫, 田中勇武, ナノ粒子の有害性評価, *産衛誌*, **50**, 37-48 (2008)
- 6) F. Tian, D. Cui, H. Schwarz, G. G. Estrada and H. Kobayashi, Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts, *Toxicology in Vitro*, **20**, 1202-1212 (2006)
- 7) B. M. Rotoli, O. Bussolatia, M. G. Bianchia, A. Barilli, C. Balasubramanian, S. Bellucci and E. Bergamaschi, Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells, *Toxicology Letters*, **178**, 95-102 (2008)
- 8) P. O. Seglen, Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.*, **13**, 29-83 (1976)
- 9) H. Koga, T. Fujigaya, N. Nakashima, K. Nakazawa., Morphological and functional behaviors of rat hepatocytes cultured on single-walled carbon nanotubes, *J. Mater. Sci.: Mater. in Med.*, **22**, 2071-2078 (2011)
- 10) M. H. Grant, C. Morgan, C. Henderson, G. Malsch, B. Seifert, W. Albrecht, T. Groth, The viability and function of primary rat hepatocytes cultured on polymeric membranes developed for hybrid artificial liver devices, *J Biomed. Mater. Res. A.*, **73**, 367-75 (2005)
- 11) S.J. Liliensiek, J.A. Wood, J. Yong, R. Auerbach, P.F. Nealey, and C.J. Murphy, Modulation of Human Vascular Endothelial Cell Behaviors by Nanotopographic Cues, *Biomaterials*, **31**, 5418-5426 (2010)
- 12) E. Rebolgar, I. Frischauf, M. Olbrich, T. Peterbauer, S. Hering, J. Preiner, P. Hinterdorfer, C. Romanin and J. Heitz, Proliferation of aligned mammalian cells on laser-nanostructured polystyrene, *Biomaterials*, **29**, 1796-1806 (2008)
- 13) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, 細胞の分子生物学 第4版, p.1078 (2004)
- 14) 林正男, 新細胞接着分子の世界, 羊土社, pp.86-96 (2001)
- 15) K. Nakazawa, Y. Izumi and R. Mori, Morphological and functional studies of rat hepatocytes on a hydrophobic or hydrophilic polydimethylsiloxane surface, *Acta Biomaterialia*, **5**, 613-620 (2009)
- 16) Y. Sakai, S. Yamagami and K. Nakazawa, Comparative Analysis of Gene Expression in Rat Liver Tissue and Monolayer and Spheroid-Cultured Hepatocytes, *Cells Tissues Organs*, **191**, 281-288 (2010)
- 17) D. X. Hou, M. Arimura, M. Fukuda, T. Oka and M. Fujii, Expression of cell adhesion molecule and albumin genes in primary culture of rat hepatocytes, *Cell Biology International*, **25**, 239-244 (2001)
- 18) M. Vinken, T. Henkens, E. De Rop, J. Fraczek, T. Vanhaecke and V. Rogiers, Biology and Pathobiology of Gap Junctional Channels in Hepatocytes, *HEPATOLOGY*, **47**, 1077-1088 (2007)

- 19) Z. Zhang, J. Wang, C. Chen, Gold Nanorods Based Platforms for Light-Mediated Theranostics, *Theranostics*, **3**, 223-238 (2013)
- 20) M. Zhu, G. Baffou, N. Meyerbroker and J. Polleux, Micropatterning Thermoplasmonic Gold Nanoarrays To Manipulate Cell Adhesion, *ACS NANO*, **6**, 7227–7233 (2012)
- 21) T. A. Kolesnikova, D. Kohler, A. G. Skirtach and H. Mohwald et al., Laser-Induced Cell Detachment, Patterning, and Regrowth on Gold Nanoparticle Functionalized Surfaces, *ACS NANO*, **6**, 9585–9595 (2012)
- 22) A. Shiotani, T. Mori, T. Niidome, Y. Niidome and Y. Katayama, Stable Incorporation of Gold Nanorods into N-Isopropylacrylamide Hydrogels and Their Rapid Shrinkage Induced by Near-Infrared Laser Irradiation, *Langmuir*, **23**, 4012-4018 (2007)
- 23) Y. Y. Yu, S. S. Chang, C. L. Lee, and C. R. C. Wang, Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 6661-6664 (1997)
- 24) T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama and Y. Niidome, PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications, *J. Controlled Release*, **114**, 343–347 (2006)
- 25) B. W. Chieng, N. A. Ibrahim, W. M. Z. W. Yunus and M. Z. Hussein, Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets, *Polymers*, **6**, 93-104 (2014)
- 26) S. K. Seol, D. Kim, S. Jung, W. S. Chang and J. T. Kim, One-Step Synthesis of PEG-Coated Gold Nanoparticles by Rapid Microwave Heating, *Journal of Nanomaterials*, Article No. 531760 (2013)
- 27) C. J. Orendorff, T. M. Alam, D. Y. Sasaki, B. C. Bunker, and J. A. Voigt, Phospholipid Gold Nanorod Composites, *ACS NANO*, **3**, 971–983 (2009)
- 28) 柴田修一, 津田哲也, 瀬川浩代, 矢野哲司, 金ナノロッド含有／有機・無機ハイブリッド材料の創製, *The 18th Meeting on Glasses for Photonics*, 3-4 (2008)

第3章

NIR 応答性アガロースゲルの開発とその特性

3.1 本節の目的

前章では、本技術において、近赤外線（NIR）照射に対する分子ヒーターとしての利用が期待できる CNT、および PEG 修飾金ナノロッドの細胞培養における特性を評価した。これらの結果から、両者とも細胞に対する悪影響は見られないことがわかり、細胞培養に応用しても問題がないことを明らかにした。

本章では、第1章 1.6 節で述べた「NIR 応答性アガロースゲル」を用いたコンセプトを基に、CNT、および PEG 修飾金ナノロッドを分子ヒーターとしてアガロースに複合し、「NIR 応答性アガロースゲル」の開発とその特性を評価することを目的とした。

具体的に、3.2 節では NIR レーザーの仕様についてまとめ、NIR レーザーのスポット径の理論値を算出し、本研究で用いている NIR 照射システムについて述べた。3.3 節では、分子ヒーターとして CNT を複合した「CNT 複合アガロースゲル」の作製手法を確立し、複合ゲルの特性（細胞接着性、ゾル化温度、ゲル強度、NIR 応答性）についてアガロースゲルとの比較を行った。さらに、NIR 照射領域のみに細胞がトラップ出来、アレイ化技術として利用できるかどうか検討した。3.4 節では分子ヒーターとして金ナノロッドを複合した「金ナノロッド複合アガロースゲル」について同様の評価を行った。

3.2 NIR 照射システム

3.2.1 NIR 照射装置の概略

1.5 節で述べたように、光操作のメリットとして、光照射システムを既存の顕微鏡に組み込み、画像解析ソフト等で制御しやすい点がある。そこで本研究では、現有の倒立顕微鏡（Nikon ECLIPSE TE2000-U、ニコン）に NIR レーザー光源を組み込み、画像解析ソフト（Lumina Vision、三谷商事）で制御可能な NIR 照射システムを確立した（Fig.3.1）。このシステムでは、顕微鏡後方から入射した NIR が、対物レンズを介してサンプル底面から照射するようになっており、①「NIR の照射位置」を XY 電動ステージで、②「NIR の照射時間」を顕微鏡後方のシャッターで、および③「NIR の照射強度」を強度調節器によって自由に制御することが可能である。

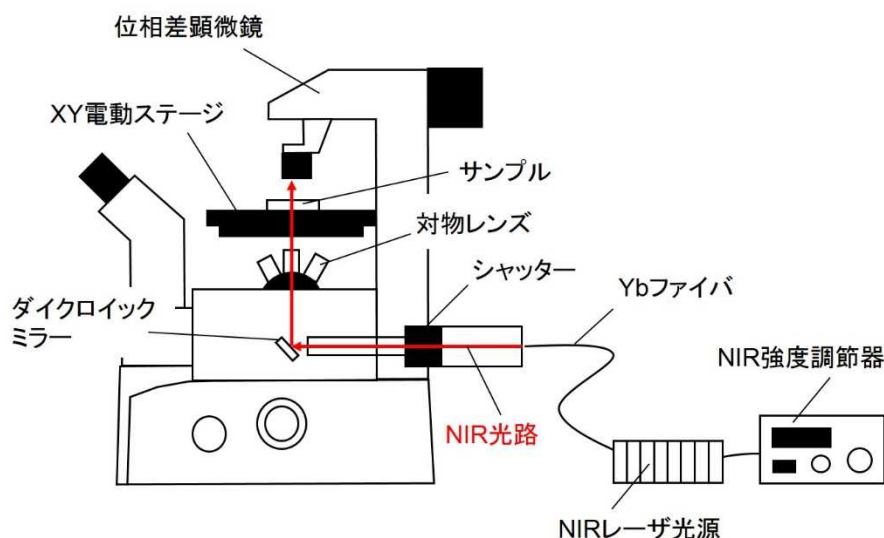


Fig.3.1 NIR 照射システムの概略

3.2.2 NIR 照射システム各部の詳細

以下、NIR 照射システムを構成する「NIR レーザー光源」、「XY 電動ステージ」、および「シャッター制御装置」について、詳細をまとめた。

(1) NIR レーザー光源

本研究では、ファイバレーザーを光源として利用している。ファイバレーザーは増幅媒質に、結晶ロッドではなく光ファイバを使用した固体レーザーの 1 種であり、①細いファイバ内に光を閉じこめるため、エネルギー変換効率が高い、②ファイバは細くて表面積が大きいため、冷却が容易で高出力化が可能、③ファイバと光部品を一体化できるため光軸ずれがなく安定・高信頼・保守が容易である（メンテナンスフリー）、および④ファイバ出力のためビーム品質に優れるといった特徴を有する^{1),2)}。

本研究で用いたファイバレーザー（型式：ASF1JE01、古河電工）の詳細を Table 3.1 に示す。 M^2 値（エムスクエア）とはレーザーの集光度合い（レーザーの品質）を表す数値で、理想的に集光されたレーザーでは $M^2=1$ となる。実際には、理想的なレーザーのスポット径の M^2 倍に広がる。今回用いたファイバレーザーは、光源となる装置にキズ・割れ目がなければ、理想的な光学系で $M^2 < 1.2$ が達成可能である。

Table 3.1 ファイバレーザーの仕様

発振条件	Continuous wave (CW)
波長	1064 nm
出力	0~2000 mW
M^2 値	<1.2

(2) XY 電動ステージ

NIR の照射位置を制御するため、XY 電動ステージ (ProScan/OptiScan Stages、日本ローパー) による位置制御を行った。このステージは画像解析ソフトの Luminavision で、位置を制御することが可能である。

Lumina Vision で操作する場合は、「スキャンパターン」画面にて、X、Y 方向の間隔を数値で入力し (0.01 mm 刻みで入力可能)、開始位置、および終了位置を X と Y 点の個数を確認しながら決定する (Fig.3.2)。なお、本システムでは、X、Y 方向への直線的な動きのみ制御可能であり、Z 軸方向、および電動ステージの速度は制御出来ない。

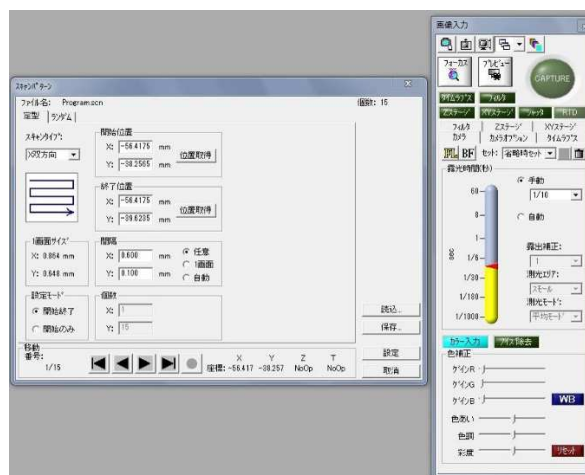


Fig.3.2 XY 電動ステージの制御画面 (Luminavision)

(3) シャッター制御装置

NIR の照射時間を制御するため、シャッターコントローラ (SSH-C4B、シグマ光機) によるシャッター制御を行った。「外部機器制御」の「シャッタータブ」画面で、「Open 後遅延」の欄に、シャッターを開けておく時間を入力する (単位: ms)。シャッターの開閉時間は約 1 秒刻みで制御が可能である (Fig.3.3)。



Fig.3.3 シャッターの制御画面 (Luminavision)

3.2.3 NIR レーザーのスポット径

NIR は目に見えず、物質透過性が高いため、レーザーのビームの形状やスポット径を測定することが難しい。そこで、本研究で用いた NIR レーザーをシングルモードの理想的な形状のレーザーと仮定し、集光部位におけるスポット径を以下の式で理論的に算出した^{1),2)}。まず、本研究で主に用いた対物レンズ（ニコン株式会社）の仕様を Table 3.2 に示す。NA 値とはレンズの分解能を表す数値であり、大きいほど高分解能を示す。瞳径とは、対物レンズ後方から入射可能な、軸上平行光束の最大径を指す。なお、焦点距離と瞳径は以下の式 (1)、(2) より算出した³⁾。

$$f [\text{mm}] = 200/M \quad \dots \dots (1)$$

M : 対物レンズの倍率

$$\text{瞳径} [\text{mm}] = 2 \times f \times \text{NA} \quad \dots \dots (2)$$

f : 対物レンズの焦点距離、NA : 対物レンズの開口数

Table 3.2 本研究で用いた対物レンズの仕様

Type	倍率	NA 値 (Numerical aperture)	焦点距離 [mm]	瞳径 [mm]
Plan fluor	X4	0.13	50	13
Plan fluor	X10	0.30	20	12
Plan fluor	X20	0.45	10	9
Plan fluor	X40	0.60	5	6

ここで、シングルモードのレーザーの理論的なスポット直径 (D) は、以下の式 (3) で求められる。

$$D [\text{mm}] = (4 \lambda / \pi) (f / D_0) M^2 \quad \dots \dots (3)$$

集光スポット径 : D [mm]、レーザー波長 : λ [mm]、集光レンズ焦点距離 : f [mm]、入射光の直径 : D_0 [mm]、 M^2 : エムスクエア値

今回の系では、入射光の直径を瞳径 (D_0)、 M^2 値と 1.2 と仮定して算出し、以下の Table 3.3 に示した。

Table 3.3 各レンズにおける NIR レーザーのスポット径

Type	倍率	スポット径 (直径) [μm]
Plan fluor	X4	6.3
Plan fluor	X10	2.7
Plan fluor	X20	1.8
Plan fluor	X40	1.4

なお、本研究を遂行するにあたり、基本的なシステムは同様であるが NIR 光源部分を一度変更した。上記で示しているレーザーの情報は最新のものである。以前利用していたレーザーの M^2 値は 2.5 であったため、スポット径の理論値を再計算し、以下の Table 3.4 に示した。本論文では、最新のレーザーを「新レーザー」、以前利用していたレーザーを「旧レーザー」と表記し、NIR 光源の違いを区別した。

Table 3.4 各レンズにおける NIR レーザーのスポット径

Type	倍率	スポット径(直径)[μm]
Plan fluor	X4	13
Plan fluor	X10	5.4
Plan fluor	X20	3.8
Plan fluor	X40	2.8

3.3 カーボンナノチューブ複合アガロースゲルの作製とその特性

3.3.1 本節の目的

2.2 節でも述べたように CNT は NIR 領域の光を吸収し、ほとんどは無輻射的な過程により失活し、熱運動に変換される。この高い発熱効率と、高い熱伝導度を活かし、本技術における分子ヒーターとして CNT を利用することとした。

本節では、NIR 照射による局所的なゾル化を実現するため、アガロースゲルに CNT を複合した「CNT 複合アガロースゲル」の作製方法を確立すること、および CNT を含まないアガロースゲルと、CNT 複合アガロースゲルの特性（細胞非接着性、ゾル化温度、ゲル強度、NIR 応答性）を比較することを目的とした。

3.3.2 実験方法

(1) CNT 複合アガロースゲル基板の作製方法

CNT 分散溶液（濃度：1 mg/mL、直径：1~2.5 nm、長さ：1~5 μm ）（SWNT FP-100、名城ナノカーボン社）を 1~2 時間超音波装置（45 Hz、アズワン）にかけて、大きな CNT の凝集塊を分散させた。試験管に低融点アガロース粉末（濃度：2 % w/v）（Agarose Super-LM、ナカライテスク）と CNT 分散液を混合し、サーマルサイクラー（Ultimate Dry Bath Incubator、major science 社）で 70 °C、30 分加熱した。アガロース粉末が溶けたらよく攪拌し、この溶液 250 μL を組織培養ディッシュ（FALCON3001、 ϕ 35 mm、Corning 社）上にスピコート（Opti coat MS-A100、ミカサ株式会社）を用いて薄膜を形成した（スピコート条件：2000 rpm、5 sec→4000 rpm、5 sec）。この基板を 4 °C の冷蔵庫にて一晩ゲル化させ、翌日、5 % CO_2 、95 % Air、37°C、飽和湿度のインキュベータにそのまま 1 日保存した。その後、ゲルの乾燥を防ぐため、滅菌水（または PBS）を入れて 5 % CO_2 、

95 % Air、37 °C、飽和湿度のインキュベータで保存した。

(2) CNT 複合アガロースゲルの細胞接着性

3.3.2 項 (1) の方法で作製した基板表面を滅菌水（または滅菌済みの PBS）で 2 回洗浄し、滅菌水で満たした状態で 1 時間クリーンベンチ (UV) 下に置いて滅菌を行った。その後、HepG2 細胞を WE+10 %FBS 培地（組成：Table 3.5）にて 1.5×10^5 cells/mL (3×10^4 cells/cm²) の密度に調製し、各基板に 2 mL 播種した。その後、5 % CO₂、95 % Air、37 °C、飽和湿度のインキュベータにて 24 時間培養した。その後、浮遊している細胞と接着している細胞をそれぞれ別のキャップ付きチューブに DNA 抽出液を用いて回収し、2.2.2 項 (6) に示した方法と同様に、細胞接着率を算出した。組織培養ディッシュ (TC：Tissue culture dish) をコントロールとし、アガロースゲルを蒸留水で調製したアガロースゲル (Agarose gel)、および CNT 複合アガロースゲル (CNT/Agarose gel) の 3 つの基板で評価した。

Table 3.5 WE 培地の組成

試薬	培地組成
WE 基本培地 (Sigma Cat. No. W4125)	13.5 g/L
NaHCO ₃	2.2 g/L
Penicillin	58.8 mg/L
Streptomycin	100 mg/L

(3) CNT 複合アガロースゲルのゾル化温度

ゾル化温度は、高感度 DSC を用いて測定を行った。1.5 mL チューブに 3.3.2 項 (1) の方法でゲルを作製した。このゲルサンプルから、アルミ製（容量：40 μL）のサンプルパンに入れた。窒素雰囲気下、10 °C/min の昇温条件下で、空のサンプルパンを Reference として測定した。測定したデータのピークトップの点をゾル化温度として評価した。アガロースを蒸留水で作製したアガロースゲル (Agarose gel) をコントロールとし、CNT 複合アガロースゲル (CNT/Agarose gel) と比較した。

(4) CNT 複合アガロースゲルのゲル強度

ゲルの強度はテクスチャーアナライザー（卓上小型テクスチャーアナライザーCT-3、ブルックフィールド社）によって測定した。50 mL のガラスバイアルに 3.3.2 項 (1) の方法で作製したゾルを約 40 mL 流し込み、ゲルを作製した。プローブ（プローブ径：12.7 mm）を、プローブ速度 0.5 mm/sec でサンプルに押し込み、応力-ひずみ曲線を専用のソフトウェアにて解析した。アガロースを蒸留水で作製したアガロースゲル (Agarose gel) をコントロールとし、CNT 複合アガロースゲル (CNT/Agarose gel) と比較した。

(5) CNT 複合アガロースゲルの NIR 応答性の評価

3.3.2 項 (1) の方法で作製したサンプルに NIR (旧レーザー) を照射し、NIR 照射時のゲル表面の温度をサーモグラフィ (TVS-8500、日本アビオニクス) にて測定した。アガロースを蒸留水で作製したアガロースゲル (Agarose gel) をコントロールとした。また、24×24 mm のガラス基板の上にゲルを作製し、NIR を照射した。この基板を、エタノール (脱水) (051-06135、和光純薬、大阪) および t-ブチルアルコール (028-03386、和光純薬) を用いて脱水処理し、上からイオンスパッタ (E-1030、日立ハイテク) で Pt を 10 sec 蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (SEM) (VE-8800、キーエンス) で基板表面を観察した。また、NIR 照射した別のサンプルを、窒素雰囲気下に 24 時間以上置いて乾燥させ、超高分解能非接触三次元表面形状計測システム (BW-A50X、ニコン) で表面の解析を行った。

(6) ゴル化範囲の測定、およびパターンへの細胞接着

3.3.2 項 (1) の方法で作製した基板に、Fig.3.1 に示した NIR 照射システム (旧レーザー) を用いて基板に NIR を照射し、円形のパターンを形成させた。このパターンの写真を Win Roof にて取得し、NIR 照射時間・CNT 濃度・対物レンズを変えた際の、ゴル化範囲の直径を Win Roof の「形状測定ツール」にて測定した。

また、この基板を滅菌後に HeLa 細胞を DMEM 培地+10 %FBS (組成 : Table 2.11 参照) にて 5×10^5 cells/mL (1×10^5 cells/cm²) の密度に調製し、基板に懸濁液を 2 mL 播種した。5 % CO₂、95 % Air、37 °C、飽和湿度のインキュベータにて約 4 時間静置した後、細胞が接着したことを確認し、パターンに接着していない細胞を PBS と培地にて洗浄し、パターンへの細胞の接着を確認した。

3.3.3 実験結果および考察

(1) CNT 複合アガロースゲルの特性評価

3.3.2 項で述べた手法で、アガロースゲル、および CNT 複合アガロースゲル基板を作製したところ、CNT を複合しても高い透明性を有する基板を作製することが出来た (Fig.3.4)。この基板上のゲル層の厚みは約 4 μm であった。

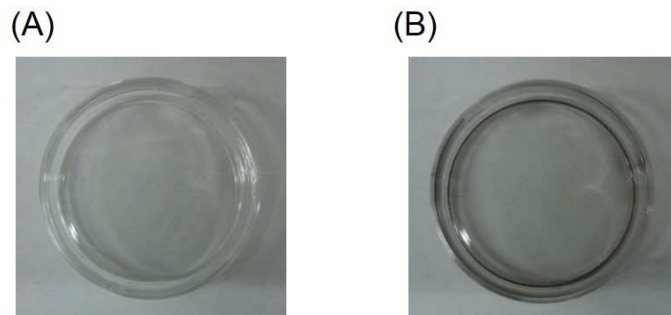


Fig.3.4 (A)アガロースゲル、および(B)CNT 複合アガロースゲルの外観

また、CNTの複合化によってアガロースゲルの細胞接着性へ影響しないか、HepG2細胞を播種して24時間後の細胞接着を評価した。組織培養ディッシュ（TC）は、基板上に細胞が接着、伸展していることに対し、アガロースゲル（Agarose gel）とCNT複合アガロースゲル（CNT/Agarose gel）ではほとんど細胞が接着していなかった（Fig.3.5）。

この結果を定量的に評価するため、接着している細胞と浮遊細胞をそれぞれ回収し、接着率を算出したところ、TCでは100%の接着率に対し、Agarose gel、およびCNT/Agarose gelではそれぞれ約1%、0.3%であった（Fig.3.6）。この結果から、アガロースゲルは高い細胞非接着性有するとともに、CNTの複合はアガロースゲルの細胞接着性へ影響しないことがわかった。

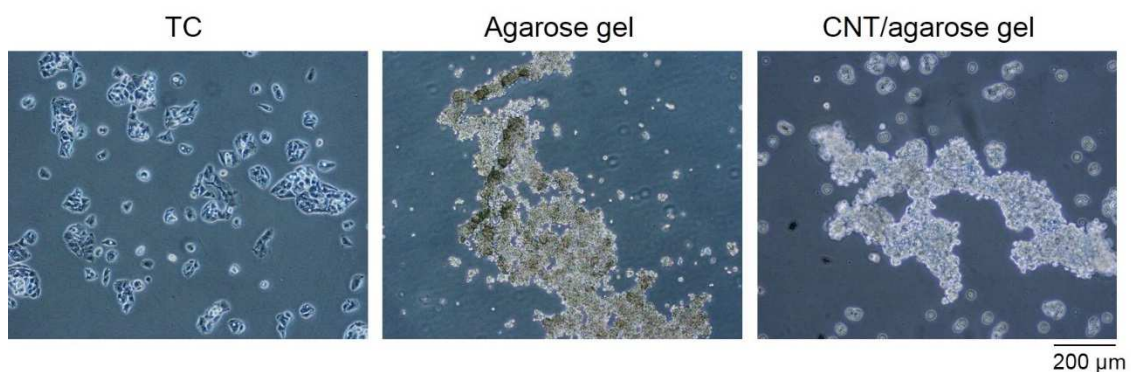


Fig.3.5 各基板上での培養24時間後のHepG2細胞の形態

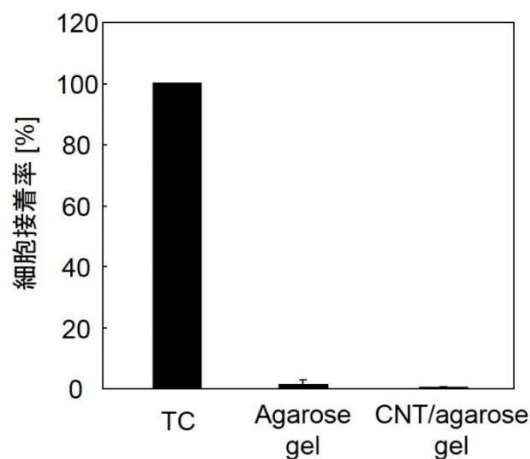


Fig.3.6 各基板上での培養24時間後のHepG2細胞の接着率

ゲルのゾル化温度（融点）の上昇は、NIR照射による効率的なゾル化誘導の妨げになり、細胞への熱のダメージも大きくなってしまいうため好ましくない。そこで、CNT複合化によるゲルのゾル化温度への影響について、高感度DSCを用いて評価した（Fig.3.7）。その結果、Agarose gelでは約59°C、CNT/Agarose gelは約56°Cであり、CNTの複合化はゾル化温度へ大きく影響しないことがわかった。

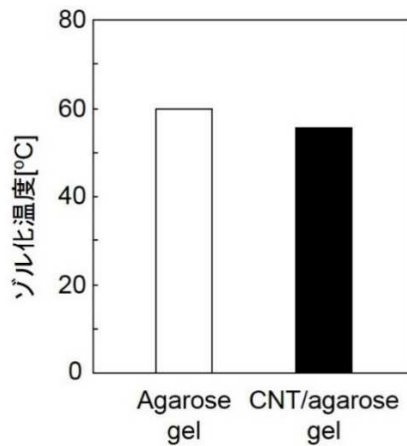


Fig.3.7 アガロースゲル、および CNT 複合アガロースゲルのゾル化温度

さらに複合ゲルの特性を評価するため、ゲル強度を測定した。Agarose と CNT/Agarose gel の応力—ひずみ曲線を Fig.3.8 に示す。最大応力を示した点がゲルの破断点であり、破断後、応力は緩やかに低下した。また、CNT の複合化によって最大応力の上昇、すなわちゲル強度の上昇がみられた。Yildirim らの研究から、CNT を複合させることによってアルギン酸ゲルの強度が上昇することが報告されており⁴⁾、CNT の高い機械的強度による影響だと考えられる。細胞培養では、ピペットによる培養操作や、また長期的な培養を行うことを考えると、この特性は好都合であると考えられる。

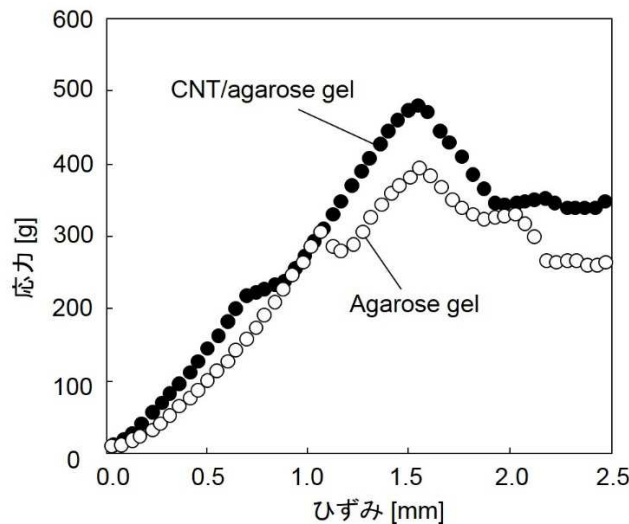


Fig.3.8 アガロースゲル、および CNT 複合アガロースゲルの応力—ひずみ曲線⁵⁾

(2) CNT 複合アガロースゲルの NIR 応答性評価

Fig.3.1 に示した NIR 照射システムを用いて、CNT 複合アガロースゲルの NIR 応答性を評価した。まず、NIR 照射時のゲル表面の温度をサーモグラフィーにて測定したところ、Agarose gel ではほとんど温度上昇が見られなかったことに対し、CNT/Agarose gel では、NIR 照射とともに、瞬間的な温度上昇が見られた (Fig.3.9)。

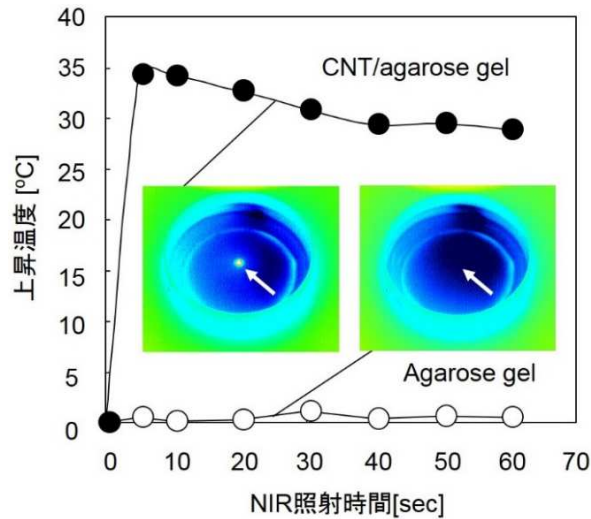


Fig.3.9 アガロースゲル、および CNT 複合アガロースゲルの NIR 照射時のゲルの温度上昇 (グラフ内はサーモグラフィーでの取得画像。矢印が NIR 照射部位を示す)⁵⁾

また、NIR 照射部分を位相差顕微鏡で観察すると、円形のゾル化パターンが形成された (Fig.3.10 (A))。この円形パターン部分がエッチングされているのか、より詳細な観察を行うため、表面形状解析を行ったところ、円形のパターン部分がゲルの表面 (点線で示した部分) より低くなっており、ゲルがエッチングされて取り除かれていることが明らかになった (Fig.3.10 (B)、(C))。

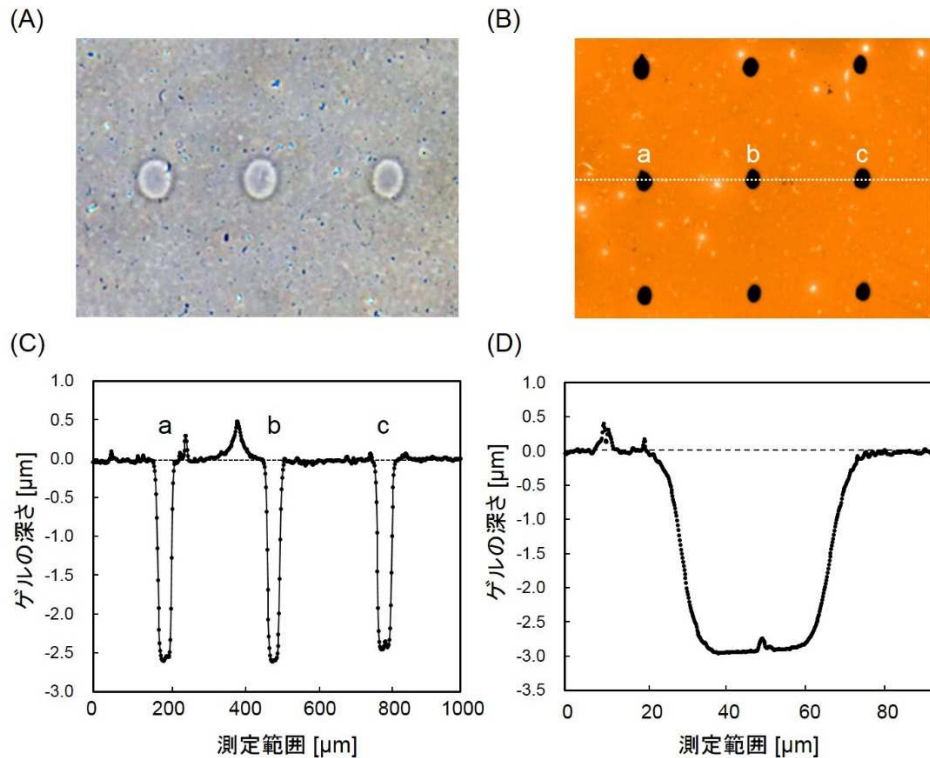


Fig.3.10 (A)CNT 複合アガロースゲルの NIR 照射時の位相差像、(B)表面形状解析画像、(C)(B)の a、b、c 点における、10 倍レンズ、および(D)20 倍レンズでの表面形状プロファイル⁵⁾

さらに高倍率で解析してみると、上面が広く、底面が狭い円錐状になっていることが明らかとなった (Fig.3.10 (D))。なお、Fig.3.10 (C) と (D) の結果については、乾燥状態で観察を行ったため、膨潤率でゲルの深さを補正した。

このようにゾル化部分が円錐になる現象について、以下のように考察した。シングルモードのレーザーは、一様な光強度の平行波ではなく、その強度分布はガウス分布に従っている (Fig.3.11 (A))。つまり、レーザーの当たっている中心部が一番温度が高く、周囲に向かって温度は低くなっていると考えられる (Fig.3.11 (B))。

CNT 複合アガロースゲルの厚み $3\ \mu\text{m}$ の範囲において、レーザーのスポット径は深さ方向ではほぼ同じと考えられ、均一にゾル化が起こっていると考えられる。しかし、アガロース分子の拡散は水と接している部分から優先的に起こるため、その間に下の面が水と接して冷やされていく。その結果、温度の低い端ではゾル化が起きにくくなる、または再ゲル化し、円錐状になったと考えられる。

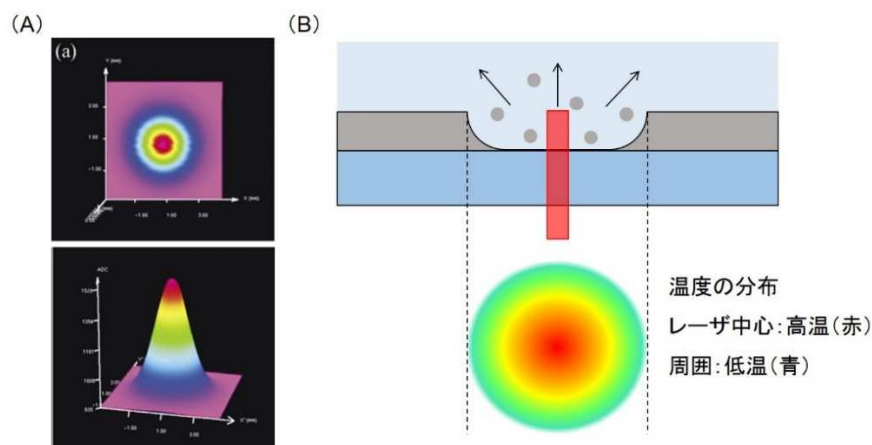


Fig.3.11 (A)レーザーの強度分布¹⁾、および(B)NIR 照射時の温度分布の予想図

(3) ゾル化範囲の測定、およびゾル化部位への細胞接着

アレイ化技術へ応用する際には、目的に応じてパターンサイズを制御出来ることが好ましい。本技術では熱の発生によるゲルゾル転移を誘導しているため、ゾル化範囲（すなわち、細胞接着面となるパターンサイズ）は NIR の集光状態とゲル内の熱伝導性（熱拡散）に影響を受けると考えられる。そこで、NIR 照射時間、NIR 強度、CNT 濃度、対物レンズといったパラメータが、パターンサイズに与える影響を評価した。

NIR 照射時間の違いによるパターンサイズへの影響を見てみたところ (Fig.3.12 (A))、NIR 照射と同時に円形のパターンが形成された。また、形成されるパターンサイズの大きさは、1 秒後以降変化せず、ほぼ一定であったことから、アガロースゲルの瞬間的かつ選択的なゾル化を制御できることが示された。この結果から、以降の NIR 照射時間は 5 秒に一定とした。

NIR 強度、および対物レンズの違いによるパターンサイズへの影響を見てみたところ (Fig.3.12 (B))、NIR 強度が大きくなるにつれて、パターンサイズが大きくなった。NIR

強度が高い程 CNT との光熱交換効率が上がり、熱が多く発生するため、パターンサイズが広がっていると考えられる。また、対物レンズは倍率が大きいほど、パターンサイズが小さくなった。Table 3.4 に示しているように、レーザーのスポット径そのものは対物レンズが大きくなるほど小さくなるためであると考えられる。

CNT 濃度の違いによるパターンサイズへの影響を見てみたところ (Fig.3.12 (C))、CNT 濃度が高い程パターンサイズが大きくなった。濃度が高い程 NIR 照射領域における CNT 量が増加し、熱が多く発生するため、パターンが広がっていると考えられる。

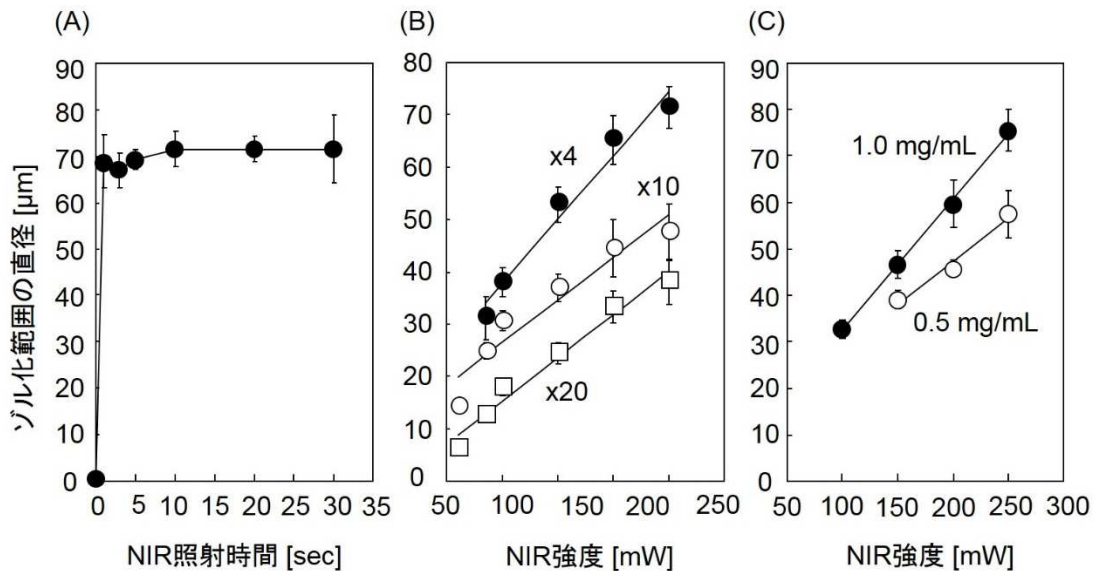


Fig.3.12 (A)NIR 照射時間、(B)NIR 強度と対物レンズ、および(C)NIR 強度と CNT 濃度がゾル化範囲に及ぼす影響⁵⁾

このとき、CNT 濃度 1.0 mg/mL、NIR 強度 250 mW、4 倍対物レンズの条件下で、最大 80 μm 程度のパターンを形成している。ディッシュに当たった NIR が散乱しないと仮定すると、ゾル化範囲はレーザーのスポット径の約 6 倍に広がっている (Table 3.13 参照)。CNT は高い熱伝導性 (水 : 0.6 W/mK に対し CNT : 20 W/mK) を有するため、熱が周囲に拡散しやすく、スポット径よりも広範囲にゾル化したと考えられる。

さらに、この表面を SEM で詳しく観察すると、下の基板表面が露出している様子が確認された (Fig.3.13)。

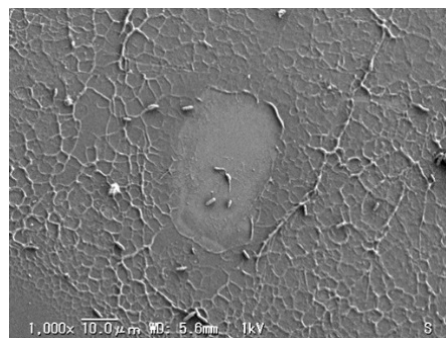


Fig.3.13 NIR 照射部位の SEM 画像⁵⁾

ここに HeLa 細胞を播種してみると、パターンサイズに応じて単一細胞～複数細胞が接着することを確認した (Fig.3.14)。つまり、瞬時的かつ完全なゾル化を誘導し、細胞が完全に接着可能な面を形成出来ていることがわかった。

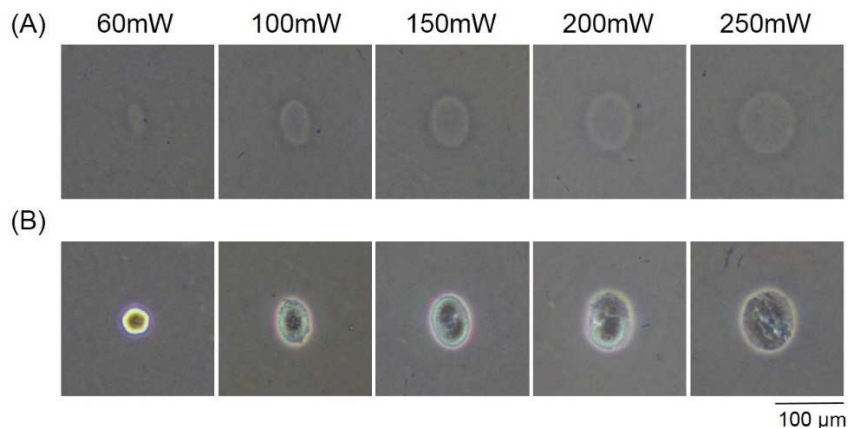


Fig.3.14 (A)各 NIR 強度におけるゾル化範囲(パターン)の形成、および(B)HeLa 細胞が接着したパターン⁵⁾

NIR 照射時には、必ず蒸留水 (または PBS) などの溶液で満たされているため、ゾル化したアガロース分子や CNT が溶液中に拡散し、再ゾル化を防いでいると考えられる。またこれらの結果は、細胞を培養している途中、すなわち培地が入っている状態でも、効率的にゾル化を誘導出来ることを示している。ここには結果を示していないが、蒸留水を満たした状態で 2 週間、インキュベータにゲル基板を静置して NIR を照射したところ、2 週間後でも NIR 応答性を有していることを確認している。CNT の堅牢性、化学的安定性により、少なくとも 2 週間は安定的に光応答性を有していることを示した。

3.3.4 本節のまとめ

これらの結果から、以下の結果を得た。

- (1) CNT の複合化は、細胞接着性、ゾル化温度には全く影響を与えない。
- (2) CNT の複合化によって、アガロースゲルよりもゲル強度が上昇することがわかった。
- (3) 各種表面解析によって、CNT 複合アガロースゲルの NIR 照射部位のみ、ゾル化が誘導されていることがわかった。
- (4) 形成されたゾル化部位のみに、HeLa 細胞が接着した。

以上の結果から、CNT とアガロースゲルを組み合わせることにより、NIR 照射によって効率的にゾル化する光応答性ハイドロゲルを開発することが出来た。

3.4 金ナノロッド複合アガロースゲルの作製とその特性

3.4.1 本節の目的

金ナノロッドを含む金ナノ粒子の伝導電子は可視光と強く相互作用し、共鳴波長で強い吸収および散乱を示すことは古くから知られている。しかし、CNT 同様に金ナノ粒子の発光量子収率は著しく低い。このため、吸収した光エネルギーは効率よく熱に変換される（光熱変換）^{6,7)}。2.3 節で、細胞親和性を高めるための金ナノロッドへの PEG 修飾法を確立した。そこで本節では、アガロースゲルに PEG 修飾金ナノロッドを複合した「金ナノロッド複合アガロースゲル」の作製方法を確立し、ゲルの特性を評価することを目的とした。

3.4.2 実験方法

(1) 金ナノロッド溶液の温度特性評価

96well プレート (FALCON1172, Corning 社) に蒸留水、CTAB-GNR (濃度: 0.04 mg/mL)、および PEG-GNR (濃度: 0.04 mg/mL) をそれぞれ 100 μ L/well 分注し、ウェルに温度センサー (DIGITAL THERMOMETER CT1200D、カスタム社) を垂直に挿した (装置の図は Fig.3.15 (A) に示す)。NIR (強度: 600 mW) を照射しながら、5 秒毎の温度を 1 分間計測した。なお、ウェルに溶液を入れる際は、他のウェルに熱の影響が出ないようにするため、1 ウェルずつあけて分注した。

(2) 金ナノロッド複合アガロースゲルの作製とゾル化温度の評価

試験管に低融点アガロース粉末 (濃度: 2% w/v) と PEG-GNR 溶液 (濃度: 0.02 mg/mL) を混合し、サーマルサイクラーで 70 $^{\circ}$ C、30 分加熱した。アガロース粉末が溶けたらよく攪拌し、このゾルをポリジメチルシロキサン (poly-dimethylsiloxane; PDMS) (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning 社) で作製した鋳型 (サイズ: 約 1 mm \times 1 mm \times 1 mm) に流し込み、24 時間、4 $^{\circ}$ C でゲル化させた。蒸留水でアガロースゲルを調製したものをコントロールとした。融点測定装置 (RFS-10, j-science 社) に作製したゲルを設置して温度を上昇させ、ゾル化が起こる温度を目視で確認した。

(3) 金ナノロッド複合アガロースゲルの NIR 応答性評価

ガラスベースディッシュ (ϕ 35 mm、ガラス面直径: 12 mm、IWAKI) 上に複合ゲルを作製したものに NIR (強度: 600 mW) を照射し、照射時間ごとのゾル化範囲を画像解析ソフト (LuminaVision、三谷商事) で測定した。

(4) 細胞接着性の評価

PEG-GNR 複合アガロースゾルをガラスベースディッシュ (ガラス面直径: 12 mm) 上にキャストし、24 時間、4 $^{\circ}$ C でゲル化させた。NIR 照射システム (強度: 600 mW)

を用いて、PEG-GNR 複合アガロースゲル基板に NIR を照射してパターンを形成した後、滅菌水（または滅菌済みの PBS）で表面を洗浄、クリーンベンチ内の UV ランプ下において滅菌を行った。ここに NIH 3T3 細胞を DMEM+10 %FBS（組成は Table 2.11 参照）にて 2.5×10^5 cells/mL の密度に調製し、基板に 2 mL の懸濁液を播種した。パターンに細胞が接着したことを確認した後、パターン以外の細胞を PBS で洗浄し、照射部位への細胞の接着を評価した。

3.4.3 実験結果および考察

PEG 修飾による金ナノロッドの温度応答性への影響を評価するため、Fig.3.15 (A) に示す温度測定システムを構築し、NIR 照射時の溶液の温度を測定した。蒸留水ではほとんど温度上昇しないことに対し、CTAB-GNR と PEG-GNR では時間経過と共に溶液の温度が上昇した (Fig.3.15 (B))。このとき、CTAB-GNR と PEG-GNR では上昇温度に差がなく、PEG 修飾は光熱交換性に影響を与えないことがわかった。

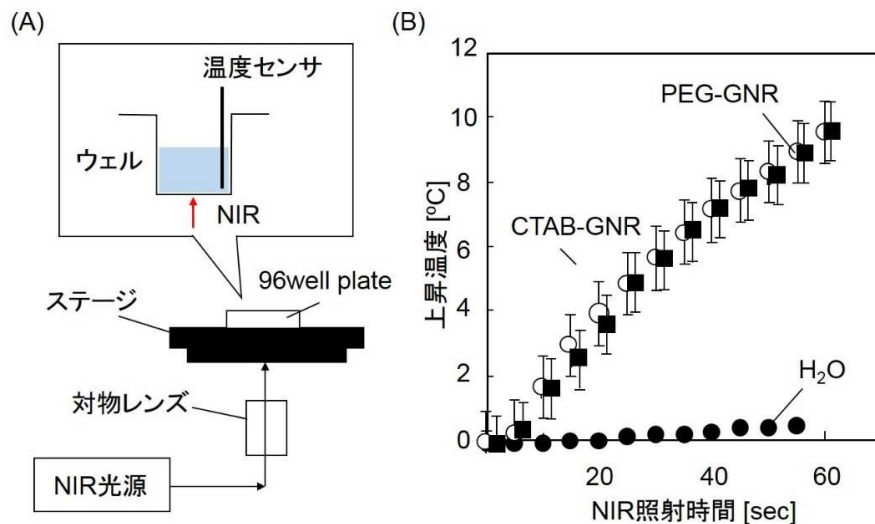


Fig.3.15 (A)温度測定システムの概略、および(B)金ナノロッド溶液の NIR 照射による各溶液の温度測定結果

金ナノロッドへの PEG 修飾は温度特性に影響を与えず、良好な光熱交換性を維持できることがわかったので、PEG-GNR とアガロースを複合した「金ナノロッド複合アガロースゲル」を作製した。その特性を評価するため、複合ゲルのゾル化温度（融点）を確認したところ、コントロール、複合ゲルともに 55 °C 前後であり、違いは見られなかった。また、作製した金ナノロッド複合アガロースゲル基板（ゲルの厚み：約 300 μm）に NIR（600 mW）を照射すると、均一なサイズの円形のゾル化部位が形成された (Fig.3.16)。また、形成されるゾル化範囲は、照射時間に依存せず、ほぼ一定であったことから、CNT 同様に、アガロースゲルの瞬間的かつ選択的なゾル化を制御できることが示された。このとき、アガロースゲルのみではゾル化が起こらず、金ナノロッド複合によりゾル化が促進したことを示した。

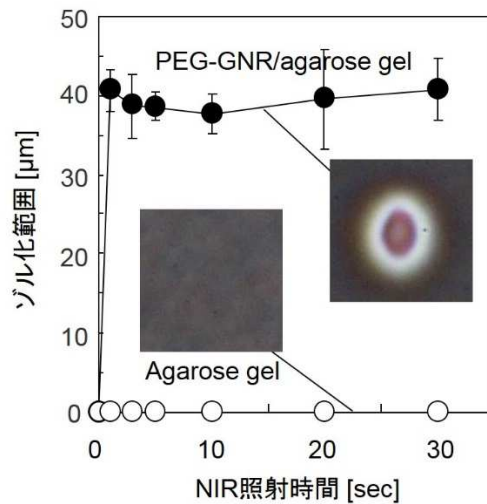


Fig.3.16 金ナノロッド複合アガロースゲルの NIR 照射によるゾル化範囲の変化⁸⁾

複合ゲルが細胞アレイ化技術へ応用できるか評価するため、NIR 照射部位への細胞接着性を評価した。まず、PEG-GNR 複合アガロースゲル基板 (Fig.3.17 (A)) に蒸留水を張った状態で NIR を照射し、ドット状の接着パターンを形成させた (Fig.3.17 (B))。その後、蒸留水で基板を洗浄し、NIH 3T3 細胞を播種すると、ゾル化領域のみに細胞が接着した (Fig.3.17 (C))。これらの結果より、PEG-GNR 複合アガロースゲルが良好な細胞非接着性を示すとともに、NIR 照射によるゾル化が、基板上的のアガロース分子を完全にに取り除き、細胞接着面を露出できることを示した。

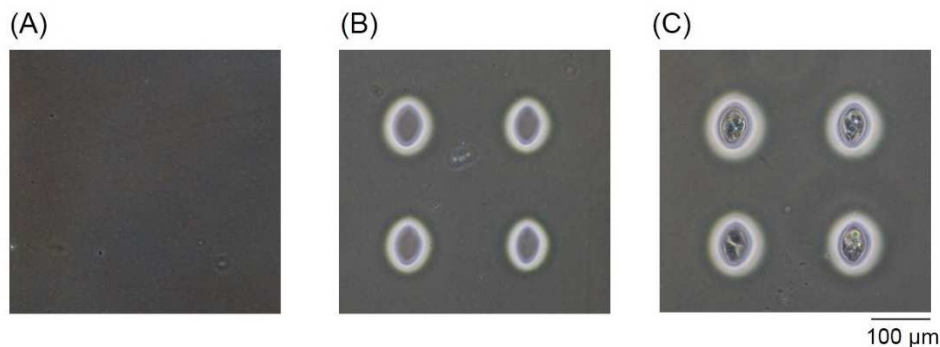


Fig.3.17 (A)照射前の金ナノロッド複合アガロースゲル表面、(B)NIR 照射による円形のパターンの形成、および(C)NIH 3T3 細胞のパターン形成⁸⁾

金ナノロッドの NIR のモル吸光係数は CNT の約 200 倍であることが報告されており (金ナノロッド: $1.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、CNT: $6.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁹⁾、金ナノロッドは分子ヒーターとしての機能が強く、CNT よりも少量での効率的なゾル化の誘導が期待出来る。また、NIR 照射による均一なゾル化を誘導するためには、分子ヒーターの良好な分散性を維持することが重要であるが、金ナノロッド表面には様々な分子修飾が容易であるため、CNT よりも、良好な分散性を維持できる可能性がある。

3.4.4 本節のまとめ

本節より、以下の結果を得た。

- (1) 金ナノロッドに PEG を修飾しても、ゲルの特性や NIR に対する温度応答性は変わらず、良好な光熱交換性を示した。
- (2) PEG 修飾金ナノロッドをアガロースゲルに複合した「金ナノロッド複合アガロースゲル」は NIR 照射に応答してゾル化することを確認した。
- (3) 金ナノロッド複合アガロースゲルに NIR を照射して形成したパターンに、細胞が接着した。

本節で開発した PEG 修飾金ナノロッド複合アガロースゲルは、CNT 複合アガロースゲル同様に良好な NIR 応答性を示し、光応答性ハイドロゲルを開発することが出来た。

3.5 本章のまとめ

本章の結果より、「CNT 複合アガロースゲル」の細胞接着性とゾル化温度は、アガロースゲルそのものの特性を維持していたが、ゲル強度は CNT を複合することで上昇していた。NIR 照射とともに瞬間的にゾル化が誘導され、ゾル化部位に細胞が接着し、アレイ化に応用できる可能性を示した。さらに、CNT 同様光熱交換性を有する金ナノロッドでも、同様の操作が可能であった。

そこで次章では、NIR 応答性アガロースゲルを用いた段階的細胞アレイ化への応用を試みた。

参考文献

- 1) 茅原崇, 酒井俊明, 八木三郎, 藤崎晃, シングルモードファイバレーザの特徴とその応用, スマートプロセス学会誌, **1**, 244-248 (2012)
- 2) 丸嶋一夫, 名畑太, 高ピークパワー・小集光スポットのファイバレーザマーカ, パナソニック電工技報, **58**, 55-59 (2010)
- 3) 株式会社ニコン, <http://www.nikon-instruments.jp/jpn/support/faq/FaqAns.aspx?param=51> (2015.01.06 アクセス)
- 4) E. D. Yildirim, X. Yin, K.i Nair, W. Sun, Fabrication, Characterization, and Biocompatibility of Single-Walled Carbon Nanotube-Reinforced Alginate Composite Scaffolds Manufactured Using Freeform Fabrication Technique, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Applied Biomaterials*, **87B**, **2**, 406-414 (2008)
- 5) H. Koga, T. Sada, T. Fujigaya, N. Nakashima, K. Nakazawa., Tailor-made cell patterning using a near-infrared-responsive composite gel composed of agarose and carbon nanotubes, *Biofabrication*, **5**, Article No. 015010 (2013)
- 6) 橋本修一, 瀬戸浦健仁, 単一金ナノ粒子を用いた光熱効果, *ケミカルエンジニアリング*, **5**, 1-7 (2014)
- 7) 橋本修一, 瀬戸浦健仁, 金ナノ粒子とレーザーの相互作用による光熱効果, *光化学*, **45**, 1-8 (2014)
- 8) 古賀晴香, 新二日市沙織, 中澤浩二, NIR 応答性金ナノロッド複合アガロースゲルを利用した細胞パターンニング技術, *高分子論文集*, **71**, 479-481 (2014)
- 9) J. W. Kim, E. I. Galanzha, E. V. Shashkov, H. M. Moon and V. P. Zharov, Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents, *Nature Nanotechnology*, **4**, 688-694 (2009)

第4章

NIR 応答性アガロースゲルによる段階的細胞アレイ化技術

4.1 本節の目的

第3章では、1.6節で述べたコンセプトを基に、NIR 領域に高い光熱交換性を有するCNT (または金ナノロッド) と、熱によってゾル化するアガロースゲルを複合した「NIR 応答性 CNT 複合アガロースゲル」を開発することが出来た。また、NIR 照射部位に細胞が接着することが確認され、細胞アレイ化技術へ応用できる可能性を示した。

本章では、この NIR 応答性アガロースゲルを用いた段階的細胞アレイ化技術の確立、およびその有効性を評価することを目的とした。本技術を用いた段階的細胞アレイ化の概念を、以下の Fig.4.1 に示しておく。NIR 照射によって局所的なゲルゾル転移を誘導し、下の細胞接着面（組織培養ディッシュやガラス）の底面を露出させる、という発想に基づき、レーザーを再び照射すれば、段階的に細胞の接着面（=パターン）を追加することが可能になると考えた。

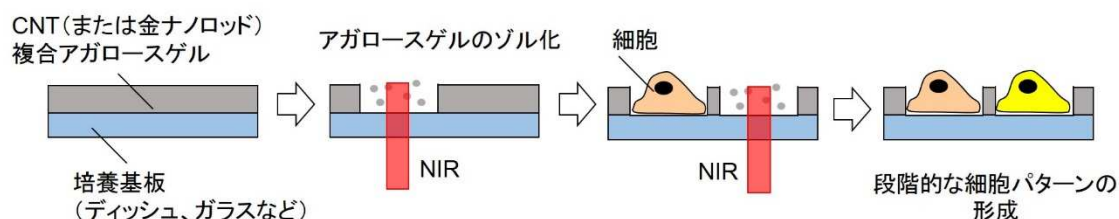


Fig.4.1 NIR 応答性アガロースゲルを用いた段階的細胞アレイ化技術の概念図

本章では、金ナノロッドと比較して、実験に十分利用可能な量（15～20 mL 程度）の分散溶液が容易、かつ、より安価（CNT：濃度 1.0 mg/mL の溶液が約 60,000 円/100 mL に対し、金ナノロッド：濃度 0.04 mg/mL の溶液が約 45000 円/25 mL）に入手可能である CNT 分散液を用い、CNT 複合アガロースゲルによる検討を行った。

具体的に 4.2 節では、段階的に NIR が形成可能な利点を活かし、異種の細胞を配置した共培養細胞アレイ化技術、および単一細胞遊走技術へ応用した。

4.3 節では、さらにこの技術の有効性を評価するため、肝細胞と線維芽細胞の共培養による生体類似構造の構築、およびその機能活性に影響する因子を検討した。

4.2 CNT 複合アガロースゲルを用いた段階的細胞アレイ化技術

4.2.1 本節の目的

本節では、NIR 応答性ハイドロゲルが、本研究で目指している段階的細胞アレイ化技術へ応用出来るのか、2つのデモンストレーションを行った。ひとつは、「異種細胞のアレイ化技術」として、HeLa 細胞と 3T3 細胞を用い、異種細胞が任意の位置に配列可能かどうか検討した。次に、段階的に細胞接着面を形成出来る点を活かし、細胞の遊走方向を制御可能な「単一細胞遊走技術」への応用を試みた。

4.2.2 実験方法

(1) 共培養アレイ化技術への応用

3.3.2 項 (1) の方法で CNT 濃度を 1.0 mg/mL としてゲル基板を作製した。Fig.3.1 に示した NIR 照射システム (旧レーザー) を用いて、基板に NIR を照射し (250 mW、4 倍対物レンズ) 円形のパターンを形成させた。この基板を滅菌後に HeLa 細胞を DMEM 培地+10 %FBS (組成は Table 2.11 参照) にて 5×10^5 cells/mL の密度に調製し、基板に 2 mL 播種した。5 % CO₂、95 % Air、37 °C、飽和湿度のインキュベータにて約 4 時間静置後、パターンに細胞が接着したことを確認して、浮遊細胞を PBS と培地にて洗浄した。培養 24 時間後、円形パターン間にライン状のパターンを形成させ、NIH 3T3 細胞を 1×10^6 cells/dish の密度で、DMEM 培地+10 %FBS を用いて播種した。数時間後、細胞が接着したことを確認し、浮遊細胞を PBS にて洗浄した。このとき、2 種類の細胞を区別するため、Cell tracker (HeLa 細胞 : Red、NIH 3T3 細胞 : Green) (Invitrogen) でそれぞれの細胞を蛍光染色して播種した。無血清培地で各試薬を 10 μM の濃度に調製し、トリプシン処理して得られた細胞懸濁液に 1 mL の染色液を入れて 15 分インキュベートした。遠心処理して染色液を抜いた後、無血清の培地で 30 分インキュベートした。その後、遠心処理して PBS で洗浄し、DMEM+10 %FBS で通常通り基板に播種した。

(2) 細胞の生死染色

PBS 1 mL に対して、Calcein-AM/DMSO 溶液を 2 μL、PI 水溶液を 6 μL (Double stainig kit、同仁化学) 加えてよく攪拌し、これを染色液とした。浮遊している細胞を取り除くため、ディッシュの古い培地を取り除き、暖めた 500 μL の PBS で一回洗浄した。レーザー照射直後のディッシュに染色液を 500 μL 入れて 37 °C で 15 分ほど加温した。その後染色液を取り除いて PBS を 500 μL 入れた。蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000™、キーエンス) で観察を行った。

(3) 単一細胞遊走技術への応用

3.3.2 項 (1) の方法で CNT 濃度を 1.0 mg/mL としてゲル基板を作製した。Fig.3.1 に示した NIR 照射システム (旧レーザー) を用いて、NIR を照射し (85 mW、10 倍対物

レンズ) 円形のパターンを形成させた。この基板を滅菌後に NIH 3T3 細胞 1×10^6 cells/dish の密度で、DMEM 培地+10%FBS を用いて 2 mL 播種した。5% CO₂、95% Air、37 °C、飽和湿度のインキュベータにて約 4 時間静置後、パターンに細胞が接着したことを確認して、パターンに接着していない細胞を PBS と培地で洗浄した。洗浄してその日のうちに、細胞の接着しているパターン近傍からライン状のパターンを追加し、1 時間ごとに細胞の挙動を位相差顕微鏡にて観察した。

4.2.3 実験結果および考察

(1) 異種細胞アレイ化技術への応用

第 1 章でも示したように、主なアレイ化技術では、1 種類の細胞のみをパターンニング可能な技術が中心であった。序論でも述べたように、生体内では異種の細胞間で様々な相互作用が行われて生命活動が維持されているため、*in vitro* で異種の細胞を同一空間で培養する「共培養」が盛んに試みられている (Table 4.1)。

Table 4.1 様々な細胞種の組合せによる共培養の試み(文献 1 と 2 から抜粋)

ターゲット	組合せ	研究グループ
肝細胞	初代肝細胞 + 線維芽細胞 (NIH 3T3 J2)	Bhatia et al. 他
	初代肝細胞 + ヒト大動脈内皮細胞	Ito et al.
神経細胞	神経前駆細胞 + 不死化微小血管内皮細胞	Q. Shen et al.
	アストロサイト + ニューロン	H. Takano et al.
幹細胞	間葉系幹細胞 (MSC) + 骨芽細胞	B. R. Chitteti et al. 他
	間葉系幹細胞 (MSC) + マクロファージ	D. A. Cantu et al. 他
心筋	心筋細胞 + 線維芽細胞	V. L. MJA et al. 他
	ヒト血管平滑筋細胞 (VSMCs) + 血管内皮細胞 (HUVEC)	S. L. Rose et al. 他
皮膚	線維芽細胞 + ケラチノサイト	R. Fleischmajer et al. 他
	線維芽細胞 + 血管内皮細胞 (HUVEC)	A. N. Smith et al. 他
その他	ヒト由来子宮がん細胞 (HeLa) + 血管内皮細胞 (HUVEC)	H. Kaji et al. 他

光を用いて段階的に細胞のパターンを形成し、異種細胞を配列可能な技術もあるが、そのほとんどは UV 応答性材料によるものである³⁾⁻⁵⁾。そこで、NIR を用いた本技術が、より自由度の高い細胞パターンニング技術に応用できるか評価するため、HeLa 細胞と NIH 3T3 細胞を用いた異種細胞のアレイ化を試みた。まず、円形のパターンに HeLa 細胞 (蛍光: 赤) を播種し、接着を確認した後 (Fig.4.2 (A))、円形パターンの間にライン状のパターンを形成した (Fig.4.2 (B))。その後、NIH 3T3 細胞 (蛍光: 緑) を播種すると、ライン状のパターンのみに接着し、同一基板上に異種の細胞をパターンニングすることができた (Fig.4.2 (C)、(D))。この結果から、このゲルゾル化反応は培地存在下でも問題なく行うことが可能であり、段階的に細胞接着面を形成出来ることを示した⁹⁾。

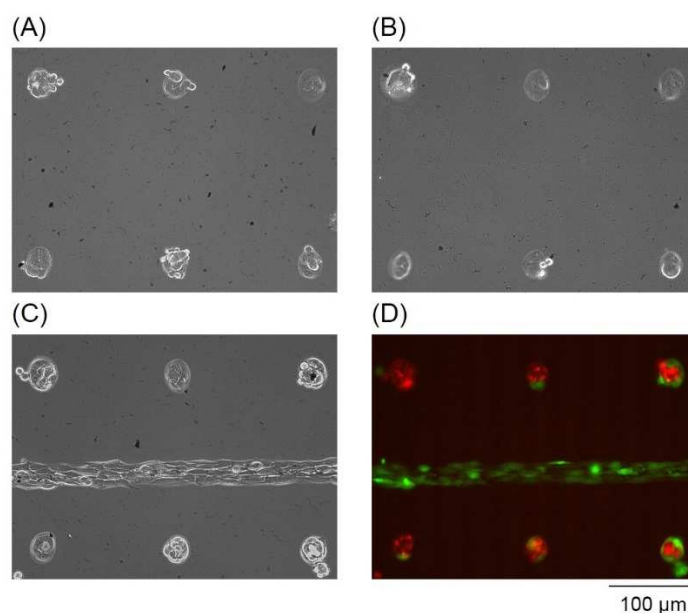


Fig.4.2 (A) HeLa 細胞の円形パターン(位相差顕微鏡)、(B)ライン状パターンの追加、(C)NIH 3T3 細胞のパターン形成、および(D)HeLa 細胞(赤)と NIH 3T3 細胞(緑)の Cell tracker による蛍光染色画像⁶⁾

また、レーザー照射によって発生する熱が、細胞にダメージを与えないか検討するため、照射直後に生死染色を行った (Fig.4.3)。その結果、レーザー照射部位近傍の細胞は生存しており (緑色)、熱の影響はほとんどみられなかった。

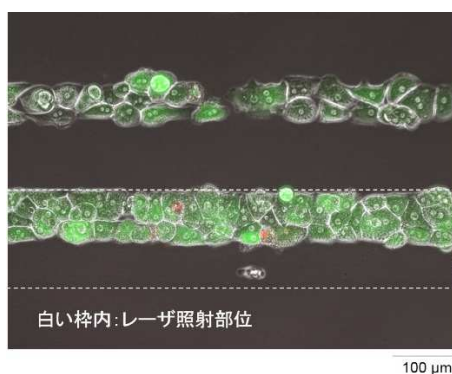


Fig.4.3 レーザー照射後の生死染色(生細胞:緑、死細胞:赤)

(2) 単一細胞遊走技術への応用

細胞はずっと同じ場所に止まっているわけではなく、自身で移動する現象が見られる。これを細胞の「遊走」と呼ぶ。遊走は、細胞の前方からアクチンに富んだ構造を伸ばす「突出」、アクチンの細胞骨格が細胞膜を超えて基質と結合する「付着」、細胞質の塊が前方に引っ張られる「牽引」という複雑な過程を経て行われる。細胞遊走は様々な生命現象に関わっている。例えば、胚発生時における形態形成は、個々の細胞の移動と、上皮層全体の協調的な移動により行われている。また、多細胞生物の成体において、組織

の創傷部位には線維芽細胞が遊走して傷の修復をサポートする。ガン細胞は栄養を獲得するため、集団であったガンの原発巣から血管まで移動する。この現象はガンの転移・湿潤と呼ばれ、秩序ある細胞社会を崩壊させ、個体に悪影響を与える。また、その他にも、血管新生や組織の形成において、細胞遊走が深く関わっている^{7),8)}。

このような細胞の遊走挙動を解析し、細胞特性を評価する試みが盛んに行われている。最も汎用的な遊走アッセイ技術として、コンフルエントになった細胞表面を引っかけて遊走面を形成する「スクラッチアッセイ」があるが、①遊走方向・面積の制御、②遊走境界面の制御、③アッセイの自動化の面では、本技術のように光を用いた手法が優れている⁹⁾。そこで、本技術を用いて単一細胞の遊走方向を制御し、遊走の観察を試みた。

NIR を照射して、約 20 μm の直径の円形パターンを形成させた。ここに NIH 3T3 細胞を播種すると、単一の細胞がパターンに接着した (Fig.4.4 (A))。再び NIR を照射してライン状のパターンを形成すると (Fig.4.4 (B))、時間と共に細胞が形状を変え、遊走する様子が確認された (Fig.4.4 (C)、(D))。また、24 時間以降には細胞の分裂が確認された (Fig.4.4 (E)、(F)) この結果から、細胞遊走技術としても利用できることを示した。

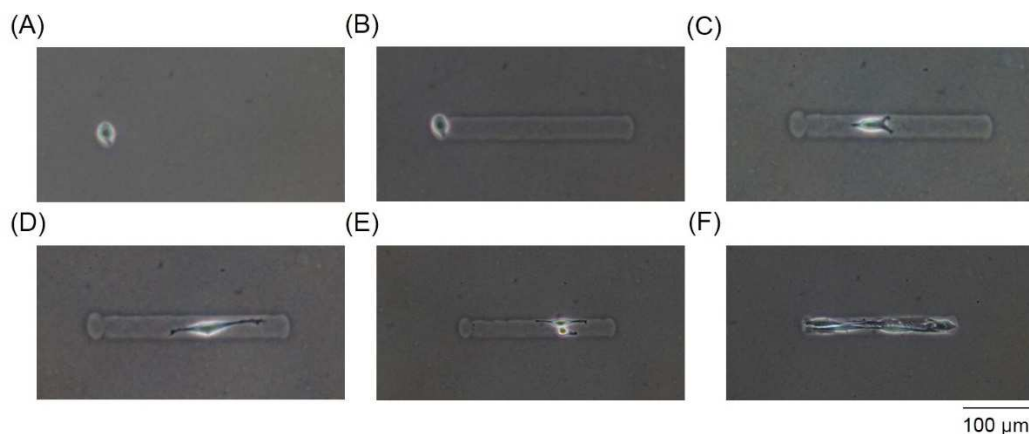


Fig.4.4 (A)単一の 3T3 細胞、(B)ライン状パターンの追加直後、(C)パターン追加 5 時間後、(D)8 時間後、(E)24 時間後、および(F)48 時間後^{6), 10)}

4.2.4 本節のまとめ

本節より、以下の結果を得た。

- (1) 段階的なレーザー照射が可能な点を活かし、異種の細胞を段階的にアレイ化することが出来た。
- (2) レーザー照射部位で発生する熱による細胞へのダメージはほとんどなかった。
- (3) 段階的にレーザーを照射し新たな接着面を形成し、細胞の遊走を観察することが出来た。

次節ではこの段階的な細胞アレイ化技術を活かし、精密共培養による生体類似構造の構築技術へと展開した。

4.3 肝細胞と線維芽細胞の共培養による生体類似構造の構築

4.3.1 本節の目的

初代肝細胞は、*in vitro* においてその機能発現が速やかに消失してしまうことが知られている。初代肝細胞の機能活性には、形態が大きく影響している。一般的に用いられている単層培養法では、肝細胞は基板に過度に接着・伸展してしまい、立体構造を維持出来ず、その機能を数日で失ってしまう。これは *in vivo* において、肝細胞は伸展せずに立体的 (Cuboidal) な構造を保っていることに起因しているものと考えられている¹¹⁾。

肝細胞の機能活性を維持するため、線維芽細胞や血管内皮細胞との共培養は機能活性維持に有効な手法のひとつである。共培養の効果については、細胞間接着タンパク質、TGF- β 1 といったサイトカイン、プロテオグリカンの一種である decorin といった分子の発現が上昇することが知られ、主に「異種細胞間」の相互作用が共培養時の肝細胞の機能活性維持に関与していることが指摘されている (Table 4.2)。

Table 4.2 肝細胞と異種細胞の共培養の試み

細胞種の組合せ	機能活性の要因	文献
初代ラット肝細胞+3T3-J2、MEF、 または NIH 3T3	Decorin の発現が機能発現に正に働き、N-cadherin の発現が負に働く。 また、3T3-J2>NIH 3T3>MEF の順で肝細胞の機能活性が高くなる。	12
初代ラット肝細胞+NIH 3T3	TGF β 1 の活性化に伴い、肝細胞の機能活性が上昇する。	13
初代ラット肝細胞+CHO 細胞	T-cadherin を強制発現させた CHO 細胞との共培養によって、機能活性が上昇する。	14
初代ラット肝細胞+3T3-J2、MEF、 NIH 3T3、LSEC、または MVEC	肝細胞のコロニーサイズの増大(肝細胞の増殖性が高い)とともに機能活性が上昇する。3T3-J2 との共培養で最も活性が高くなる。	15
初代ラット肝細胞+3T3-J2	線維芽細胞の割合が多いほど(肝細胞の密度が低いほど)、単一細胞あたりの肝細胞の酸素消費が高く、機能活性も高くなる。	16
初代ラット肝細胞 + 3T3-J2	肝細胞と線維芽細胞の接触部位での E-cadherin(Cadherin-1)の高発現によって、機能活性が上昇する	17

(Table 4.2 の略語一覧)MEF: Mouse Embryonic Fibroblast(マウス胚線維芽細胞)、CHO: Chinese Hamster Ovary cell(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、LSEC: Liver Sinusoidal Endothelial cell(肝類洞内皮細胞)、MVEC: Micro-Vascular Endothelial cell(微小血管内皮細胞)

これまで用いられてきたランダム共培養では、それぞれの細胞の分布が不均一であるため、細胞の形態を評価することが難しく、共培養時の肝細胞の形態に着目した研究は少ない。そこで本節では、NIR 応答性アガロースゲルが段階的に細胞をアレイ化可能な利点を活かし、肝細胞と線維芽細胞をストライプ状に規則的に配列した生体類似構造を構築した。共培養時の「肝細胞の形態」に着目した解析を行い、機能活性への影響を検討することを試みた。

4.3.2 実験方法

(1) CNT 複合アガロースゲル基板の作製

コラーゲン溶液 (Type I-C、新田ゼラチン) を、クリーンベンチ内で PBS を用いて 10 倍希釈し、0.3 mg/mL コラーゲン溶液を調製した。このコラーゲン溶液を 1 mL、組織培養ディッシュ (FALCON3001、φ35 mm) に入れて、ディッシュ全面に塗布する作業を 2 回繰り返した。その後、クリーンベンチに入れて UV 下で 1 時間静置した。1 時間後、析出した PBS の成分を滅菌水にて 2 回洗浄して取り除き、窒素下において十分乾燥させた。このコラーゲンコート基板上に、3.2.1 項 (1) と同様の方法で CNT 複合アガロースゲル (CNT 濃度 : 1.0 mg/mL) を形成させた。

(2) ラット初代肝細胞の培養

Wister ラット (雄、7 週齢、約 200 g) の肝臓から、2.2.2 項 (2) の手法と同様に、コラゲナーゼ灌流法を利用して初代肝細胞を調製した。

(3) 細胞接着率の算出

細胞接着率を比較する条件として、①無処理の組織培養ディッシュ (TC)、②組織培養ディッシュにコラーゲンコートを施したもの (Col)、③TC に CNT 複合アガロースゲルを作製したもの (TC/CNT)、および④Col に CNT 複合アガロースゲルを作製したもの (Col/CNT) の 4 つの基板を (1) の手法で作製した。

細胞接着率は、培養 24 時間後に浮遊細胞と接着細胞をそれぞれ回収し、2.2.2 項 (6) で示した手法と同様に算出した。

(4) 細胞のアレイ化と細胞培養

Fig.3.1 に示した NIR 照射システム (新レーザー) を用いて基板に NIR を照射し (800 mW、4 倍対物レンズ)、幅 100 μm、長さ 2.5 mm のライン状の接着パターンを形成させた (Fig.4.5 (A)、(B))。ラット初代肝細胞を HDM 培地にて約 1×10^6 cells/dish の密度で播種し、数時間後、パターンに細胞が接着したことを確認して、パターンに接着していない細胞を PBS と HDM 培地で洗浄した。培養 2 日目に、パターン上に肝細胞が隙間なく伸展・接着していることを確認し、①そのまま何もせず、肝細胞のみで培養するもの (Mono culture=MC)、および②肝細胞パターン間に NIR を照射し、NIH 3T3 細胞を播種したもの (Co culture=CC) の 2 条件の基板を作製した (Fig.4.5 (C))。

CC の条件では、肝細胞パターン間に NIR を照射し (NIR 強度 800 mW)、NIH 3T3 細胞を 1×10^6 cells/dish の密度で、HDM 培地+10 %FBS 培地にて 2 mL 播種した。数時間後、細胞が接着したことを確認して、パターンに接着していない細胞を PBS にて洗浄した。この洗浄のタイミングで、MC も含めて全て培地交換 (HDM+10 %FBS 培地) を行った。2 日に一回、所定の時間に培地交換、兼培地のサンプリングを HDM+10 %FBS 培地にて行った。共培養後は、全て HDM+10 %FBS 培地に切り替えた。

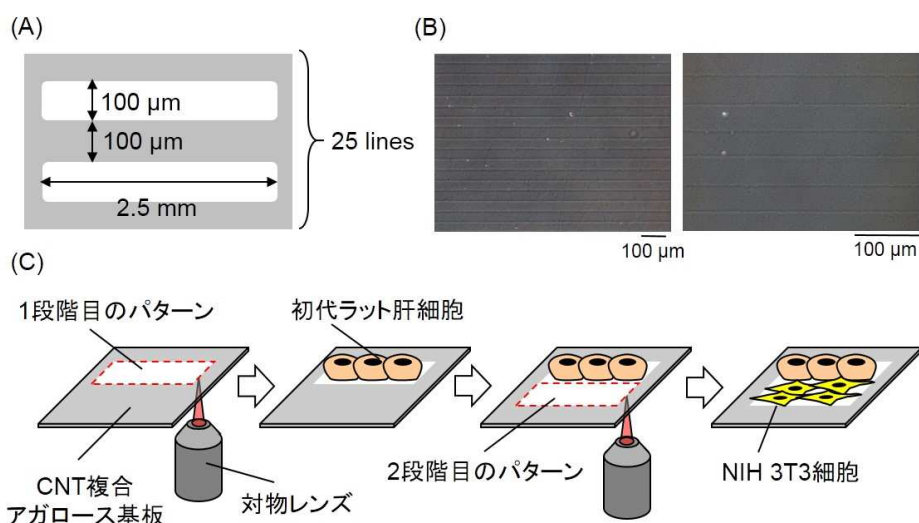


Fig.4.5 (A)細胞パターン設計、(B)パターンの位相差顕微鏡写真(左:倍率4倍、右:倍率10倍)、および(C)肝細胞と線維芽細胞のアレイ化の過程

(5) アルブミン分泌活性測定

培養2、4、6、8、10、12日目の培地をサンプリングし、新鮮培地に交換してから48時間で培地中に分泌したアルブミン濃度をELISA法により求め、アルブミン分泌量を算出した。異種細胞それぞれの細胞数の測定が困難であるため、バルクあたりの機能活性を算出した。それぞれの培養日数でANOVAによる有意差検定を行い、MCと比較して有意差 $p < 0.05$ を示した。

(6) 形態の評価

培養2、4、6、8、10、12日目の位相差顕微鏡写真からそれぞれの条件において、10倍対物レンズで撮影した写真を8個、無作為に抽出し、画像解析ソフト(WinROOF Ver.5.02、三谷商事)で肝細胞パターンの幅を測定した。それぞれの培養日数でANOVAによる有意差検定を行い、MCと比較して有意差 $p < 0.05$ を示した。

(7) 免疫抗体染色

培地を抜いて、暖めたPBSで二回洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液を1 mL ディッシュに加え、15分間処理した(細胞の固定化)。その後、PBSで洗浄し、0.2% Triton-X100を1 mL入れて15分間処理した(透徹)。蒸留水にて4倍希釈したBlocking One(ナカライテスク)1 mLで20分間ブロッキングした。その後、100倍希釈したAlbuminの1次抗体(Albumin P-20、Santa Cruz Biotechnology社)で1時間反応させた。PBSで洗浄後、250倍希釈した2次抗体(donkey anti-goat IgG-FITC: sc-2024、Santa Cruz Biotechnology社)で1時間反応させ、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(8) 遺伝子発現解析

RNA 抽出用のスピカラム (NucleoSpin® RNA II、ニッポンジーン) を使用して、2.2.2 項 (7) と同様の手法で total RNA の抽出、および PCR を実施した。以下の Table 4.3 に解析した遺伝子を示す。遺伝子発現レベルは、比較 Ct 法 (comparative cycle-time method) によって定量した。このとき、GAPDH をハウスキーピング遺伝子として標準化し、肝細胞の懸濁液を基準として発現レベルを比較した。

Table 4.3 本検討で解析した遺伝子

分類	遺伝子名	TaqMan Assay no.
ハウスキーピング	GAPDH	Rn01775763_g1
ギャップ結合	Connexin 32	Rn01641031_s1

4.3.3 実験結果および考察

(1) コラーゲンコートでの細胞接着性への影響

本検討では、初代肝細胞の接着、伸展を促進するため、あらかじめコラーゲンを培養ディッシュに塗布した。70℃程度に加熱した CNT 複合ゲルのゾルをディッシュにコートするため、熱の影響によるコラーゲンの溶出が懸念されたが、培養 24 時間目の細胞の形態、および細胞接着率を算出したところ、Col/CNT は TC/CNT と同様の細胞非接着性を示し、コラーゲンの溶出は認められなかった (Fig.4.6 (A)、(B))。従って、コラーゲンコートディッシュ上に CNT 複合アガロースゲルをスピコートしても、良好な非接着面を形成可能であることがわかった。

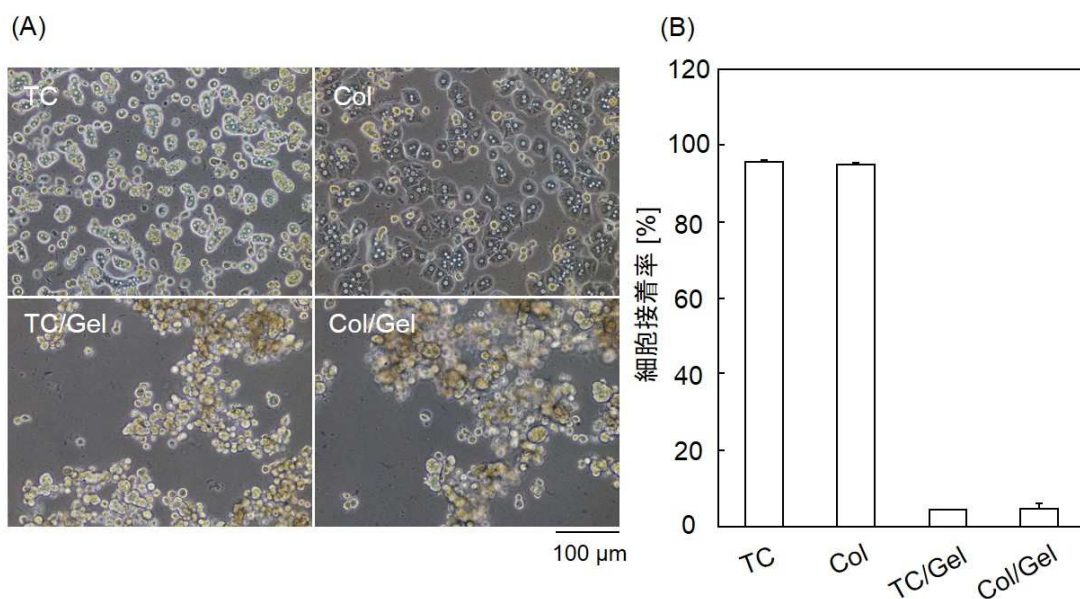


Fig.4.6 (A) 培養 24 時間における初代ラット肝細胞の形態、および(B) 24 時間後の細胞接着率

(2) 細胞の形態

Fig.4.7 にパターンの形態を示す。MC ではパターン上に肝細胞が接着・伸展している状態がしばらく保持されていたが、培養 5 日目あたりからパターン外への細胞の伸展が顕著に起こり始め、細胞がパターンから剥離している部分も観察された。CC では、肝細胞の伸展はほとんど見られず、パターンを長期間維持し、肝細胞の剥離はほとんど見られなかった。一方、CC での 3T3 細胞は、培養初期には細長い形状を示していたが、培養日数が経つにつれ、小さく密になり、肝細胞と接触している様子が観察された。この結果から、CC において NIR 照射によるエッチングにより完全にゲルは取り除かれ、肝細胞と線維芽細胞間は直接的に接触していることが示唆された。

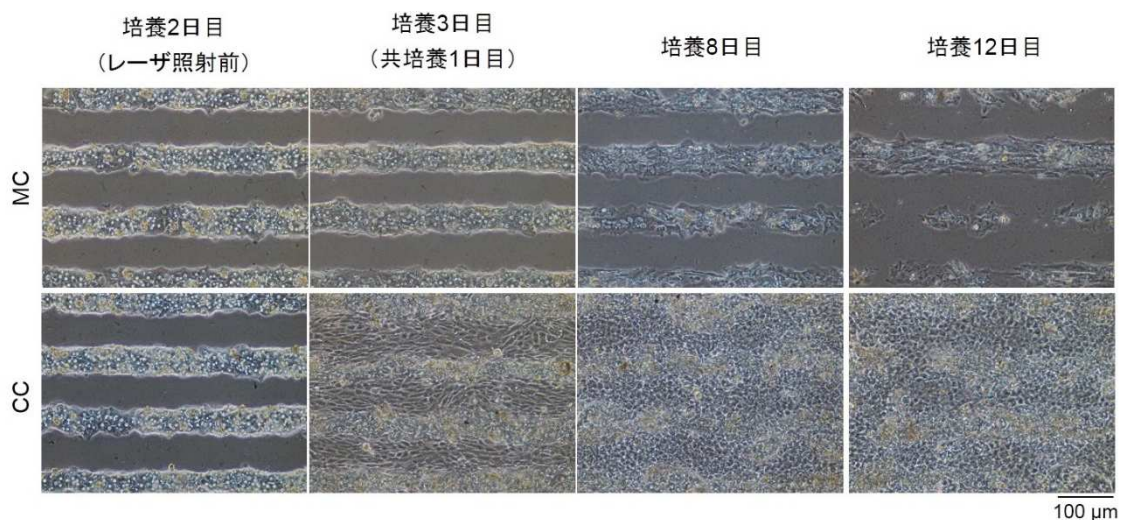


Fig.4.7 各パターンの形態変化

培養日数に伴い、肝細胞と線維芽細胞がストライプ状の構造を維持出来ているのか位相差顕微鏡での判断が困難であるため、アルブミン抗体による MC と CC の抗体染色を行った (Fig.4.8)。培養 8 日目に染色を行ったところ、MC では、パターンを超えて細胞が大きく伸展してしまい、パターンの形状を維持できていなかった。また、強い蛍光は部分的にしか観察されなかった。一方、CC では、アルブミン染色によって肝細胞がストライプの構造を維持できていることがはっきりと確認された。また、ひとつひとつの肝細胞が丸い形状を有し、肝細胞同士が密に隣り合っている様子が観察された。

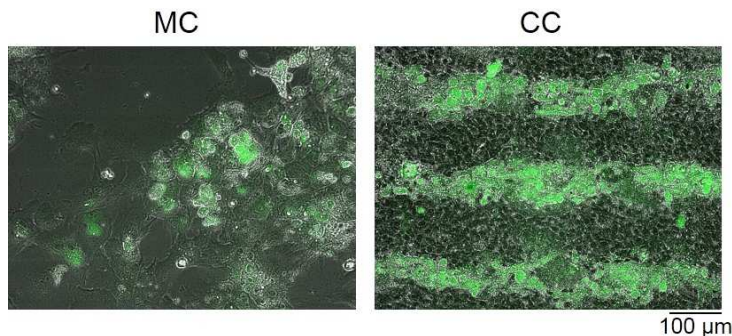


Fig.4.8 各パターンの上アルブミン染色

(3) 細胞の機能活性

MC と CC のアルブミン分泌活性を測定したところ (Fig.4.9)、MC では培養 4 日目までその活性を維持していたが、8 日目以降、活性が著しく低下した。CC では、NIR 照射後にすぐに活性は上がらなかったが (培養 4 日目、NIR 照射 2 日目)、培養 8 日目に大幅に上昇し、12 日目には MC と 6 倍以上の差があった。初代ラット肝細胞と線維芽細胞の共培養において、肝細胞と線維芽細胞の直接的な接触が、機能の維持に必要であることが知られており、本実験でも同様の結果を得た。

従って、本技術を用いて異種の細胞で生体類似構造を構築させることにより、肝細胞の機能活性を大幅に向上することが可能であった。

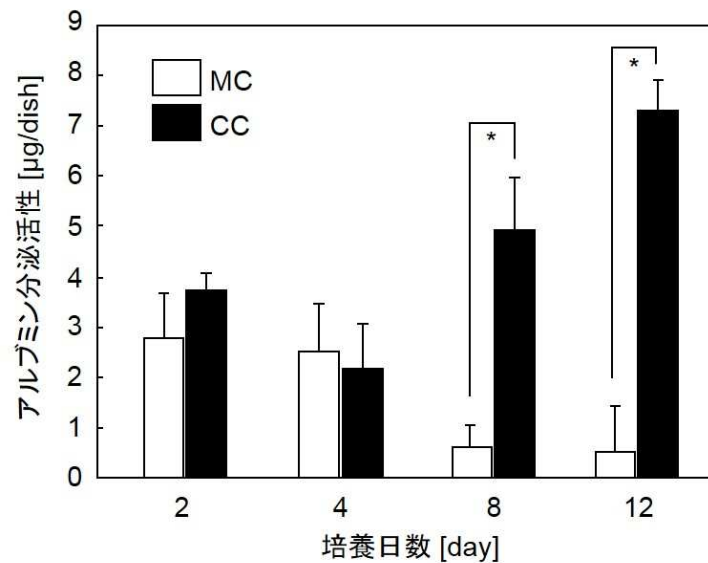


Fig.4.9 各パターンでのアルブミン分泌活性

(3) 肝細胞の形態の評価

MC と CC のアルブミン分泌活性の差について、肝細胞のラインパターンの形状の変化に着目し、肝細胞パターンの幅の変化を画像処理ソフトで算出した (Fig.4.10)。このとき、MC では培養日数に伴う、パターンの幅の大きな変化はあまり見られなかったが、培養 12 日目にはパターンの幅が広がる傾向があった。

一方、CC では NIR 照射と 3T3 細胞の播種を播種した後、培養 3 日目 (NIR 照射翌日) に肝細胞のパターンの幅は縮小し、培養 6 日目以降はほぼ一定となった。

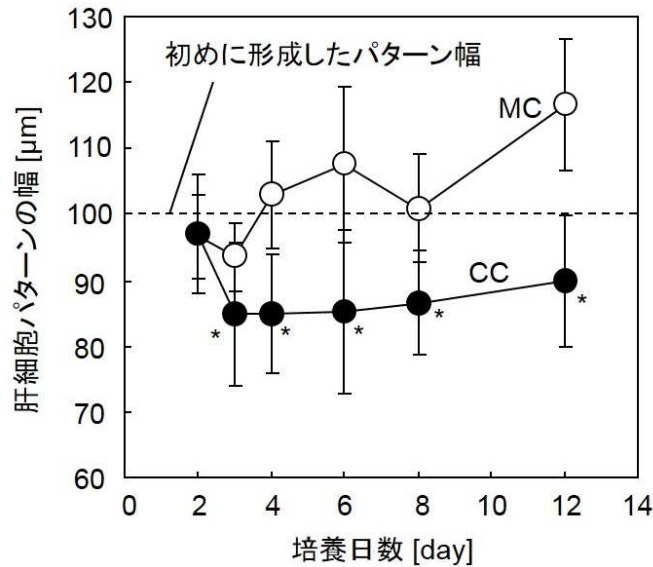


Fig.4.10 肝細胞のパターン幅の経時変化

CC では、肝細胞パターンの幅が小さくなっていることから、肝細胞はほとんど伸展せず、3T3 細胞が優先的に増殖・伸展し、肝細胞の伸展を抑制していることが示唆される。これは、共培養時の培地に FBS を添加しているため、3T3 細胞の増殖・伸展が促進されたためであると考えられる。その結果、3T3 細胞が物理的な「壁」の役割を果たし、肝細胞は伸展せずに立体的な構造を保つため、幅の縮小が見られたと考えられる (Fig.4.11)。

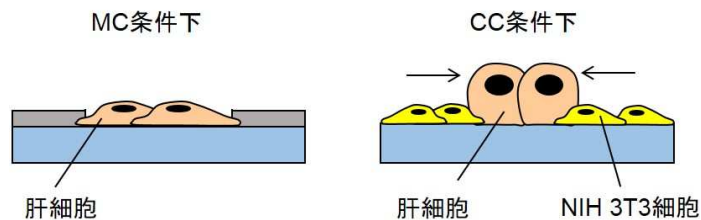


Fig.4.11 各パターン上での肝細胞の挙動の考察

(3) 肝細胞の遺伝子発現

アルブミン分泌活性を含む肝細胞の特異的な機能発現は、ギャップ結合が重要な役割を担っている。肝細胞のギャップ結合は Connexin 32 というタンパク質から構成されているが、過度に基板上に伸展した肝細胞 (単層培養) では、この発現がほとんど見られないことが知られている。一方、コラーゲンゲルで包埋した肝細胞や肝細胞が密に隣り合った細胞シートにおいて、ギャップ結合の存在が確認されている^{11), 18)}。さらに、本論文 2.2 節の結果では、CNT コート基板上でのラット初代肝細胞はスフェロイドを形成し、Connexin 32 の遺伝子発現が上昇していた。つまり、肝細胞が密に、かつ球状になって存在している場合、ギャップ結合の形成が促進していることが示唆され、肝細胞の形態と Connexin 32 の遺伝子発現には相関があると考えられる。

そこで、共培養時の Connexin 32 の遺伝子発現を見てみると、培養 4 日目（NIR 照射 2 日目）には MC の方が高い発現レベルを示していたが、培養 12 日目にはこの発現レベルは完全に逆転し、CC が高い発現を示していた（Fig.4.12）。つまり、CC では 3T3 細胞の作用によって、肝細胞が球状の状態が維持され、肝細胞間の物質のやり取りが活発に行われていることが示唆された。

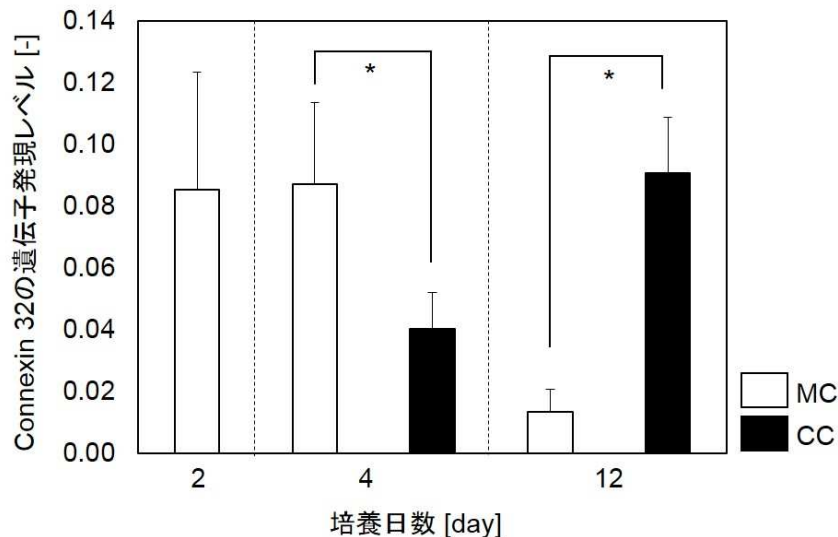


Fig.4.12 培養 2、4、12 日目における Connexin-32 の遺伝子発現レベル

肝細胞と線維芽細胞との共培養においては、Bhatia や Yarmush らのグループが精力的に研究を行っており、「異種細胞との接触」が機能活性の向上に重要であると述べている^{19),20)}。もちろん、その結果を裏付ける様々な因子が同定されており、機能活性に寄与していることは間違いない（Table 4.2）。

しかし、本研究の結果より、このような異種細胞間の直接的な相互作用（液性因子のやりとり、細胞間接着タンパク質）のみならず、線維芽細胞は肝細胞の伸展を抑制する「壁」となり、肝細胞同士のコミュニケーションの発達をサポートする役割を担い、機能活性の向上に働いていることが新たに示唆された。

4.3.4 本節のまとめ

本節から、以下の結果を得た。

- (1) コラーゲンコートをした培養ディッシュ（支持体）上でも CNT 複合アガロースゲルによるアレイ化が達成出来た。
- (2) 肝細胞と線維芽細胞をストライプ状に配列させることが出来た。
- (3) 共培養時の機能活性の向上には、ギャップ結合の形成が大変重要であり、肝細胞自身の形態が重要な役割を果たしていることが示唆された。

これらの結果より、本技術が段階的細胞アレイ化技術として利用できることを示した。

4.4 節 本章のまとめ

本章では、NIR 応答性アガロースゲルを用いることにより、段階的細胞アレイ化技術、および細胞の遊走アッセイに応用できることを示した。

また、この技術を用いて肝細胞と線維芽細胞の生体類似構造の構築を試み、(1) 本手法を使った共培養でも、肝細胞の機能活性が向上すること、(2) 共培養時の肝細胞の形態が、肝細胞の機能活性に大きく影響することを明らかにした。これらの結果より、本技術が生体類似構造の構築技術、および生命現象の解明ツールとして有望な手法であることを示した。

ここまでの検討では、二次元的に細胞をアレイ化するための技術についての応用を示してきた。次章では、さらなる NIR 応答性アガロースゲルの応用として、三次元的なマイクロ細胞組織体（スフェロイド）の形成へと展開した。

参考文献

- 1) H. Kaji, G. C. Unal, R. Langer and Ali Khademhosseini, Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions, *Biochim Biophys Acta.*, **1810**, 239–250 (2011)
- 2) K. G. Battiston, J. W. C. Cheung, D. Jain and J. Paul Santerre, Biomaterials in co-culture systems: Towards optimizing tissue integration and cell signaling within scaffolds, *Biomaterials*, **35**, 4465–4476 (2014)
- 3) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, H. Nakayama, K. Yamaguchi and Mizuo Maeda, Photoactivation of a Substrate for Cell Adhesion under Standard Fluorescence Microscopes, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16314–16315 (2004)
- 4) K. Kikuchi, K. Sumaru, J. Edahiro, Y. Ohshima, S. Sugiura, T. Takagi and T. Kanamori, Stepwise Assembly of Micropatterned Co-cultures Using Photoresponsive Culture surface and Its Application to Hepatic Tissue Arrays, *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 552–561 (2009)
- 5) C. G. Rolli, H. Nakayama, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, R. Kemkemer and J. Nakanishi, Switchable adhesive substrates: Revealing geometry dependence in collective cell behavior, *Biomaterials*, **33**, 2409–2418 (2012)
- 6) H. Koga, T. Sada, T. Fujigaya, N. Nakashima and K. Nakazawa., Tailor-made cell patterning using a near-infrared-responsive composite gel composed of agarose and carbon nanotubes, *Biofabrication*, **5**, Article No. 015010 (2013)
- 7) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, 細胞の分子生物学 第4版, ニュートンプレス, p.972 (2004)
- 8) A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. Thomas Parsons and A. R. Horwitz, Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back, *Science*, **302**, 1704–1709 (2003)
- 9) R. Riahi, Y. Yang, D. D. Zhang and P. K. Wong, Advances in Wound-Healing Assays for Probing Collective Cell Migration, *J. Lab. Autom.*, **17**, 59–65 (2012)
- 10) 古賀晴香, 中澤浩二, 第4章 第10節 光応答性ゲルを利用した細胞パターンニング技術, *ゲルテクノロジーハンドブック*, 株式会社エヌティーエス, pp.708-713 (2014)
- 11) F. Berthiaume, P. V. Moghe, M. Toner and M. L. Yarmush, Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration, *The FASEB Journal*, **10**, 1471–1484 (1996)
- 12) S. R. Khetani, G. Szulgit, J. A. Del Rio, C. Barlow and S. N. Bhatia, Exploring Interactions Between Rat Hepatocytes and Nonparenchymal Cells Using Gene Expression Profiling, *HEPATOLOGY*, **40**, 545–554 (2004)
- 13) S. M. Chia, P. C. Lin and H. Yu, TGF- β 1 Regulation in Hepatocyte-NIH3T3 Co-Culture Is Important for the Enhanced Hepatocyte Function in 3D Microenvironment, *Biotechnol. Bioeng.*, **89**, 565–573 (2005)
- 14) S. R. Khetani, A. A. Chen, B. Ranscht, and S. N. Bhatia, T-cadherin modulates hepatocyte functions in vitro, *The FASEB Journal*, **22**, 3768–3775 (2008)
- 15) C. H. Cho, F. Berthiaume, A. W. Tilles and M. L. Yarmush, A New Technique for Primary Hepatocyte Expansion In Vitro, *Biotechnol. Bioeng.*, **101**, 345–356 (2008)
- 16) C. H. Cho, J. Park, D. Nagrath, A. W. Tilles, F. Berthiaume, M. Toner and M. L. Yarmush, Oxygen Uptake Rates

- and Liver-Specific Functions of Hepatocyte and 3T3 Fibroblast Co-Cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 188-199 (2007)
- 17) C. H. Cho, J. Park, A. W. Tilles, F. Berthiaume, M. Toner, and M. L. Yarmush, Layered patterning of hepatocytes in co-culture systems using microfabricated stencils, *Biotechniques*, **48**, 47–52 (2010)
 - 18) Y. Sakai, M. Koike, H. Hasegawa, K. Yamanouchi, A. Soyama, M. Takatsuki, T. Kuroki, K. Ohashi, T. Okano and S. Eguchi, Rapid Fabricating Technique for Multi-Layered Human Hepatic Cell Sheets by Forceful Contraction of the Fibroblast Monolayer, *PLoS ONE*, **8**, (2013)
 - 19) E. E. Hui and S. N. Bhatia, Micromechanical control of cell–cell interactions, *PNAS*, **104**, 5722–5726 (2007)
 - 20) S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, and M. Toner, Microfabrication of Hepatocyte/Fibroblast Co-cultures: Role of Homotypic Cell Interactions, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 378-387 (1998)

第5章

NIR 応答性アガロースゲルによるマイクロ細胞組織体形成

5.1 本章の目的

分散状態の細胞を集合・凝集化させて三次元的な構造を有する「マイクロ細胞組織体」(スフェロイドや細胞シートなど)が様々な分野で注目されている。例えば、肝細胞などの機能性細胞は、細胞凝集体(スフェロイド)を形成させると、高機能化や組織類似構造の構築が可能であることが知られ、人工肝臓や創薬スクリーニングへの応用が試みられている¹⁾。近年では、このマイクロ細胞組織体を移植用の組織や臓器の構築に利用する試みも注目され、「ボトムアップ型」と呼ばれる手法は、スフェロイドや細胞シートなどをレゴブロックのように積み上げることにより、より大型の組織や臓器の構築を目指している²⁾。また、ES細胞やiPS細胞などの幹細胞の分化誘導過程においては、スフェロイドの形成が各種機能性細胞への分化のトリガーとなる。

このようなマイクロ細胞組織体は、3次元的な細胞外マトリクスとの相互作用・細胞間の相互作用・3次元構造に起因する力学的な作用などの影響を受け、単層状態よりも *in vivo* に近い環境を模倣することが可能であり³⁾、生体類似構造の構築における、要素技術のひとつとなっている。

マイクロ細胞組織体を形成する手法のひとつに、マイクロモールドを利用する方法がある。基材表面に微細なウェルや溝を設け、そこに細胞をトラップすることにより、マイクロ細胞組織体を形成するという発想である(Fig.5.1)。微細な形状を形成することにより、マイクロ細胞組織体のサイズ・形状制御、大量形成が達成出来るため、大変有用なアプローチだといえる。

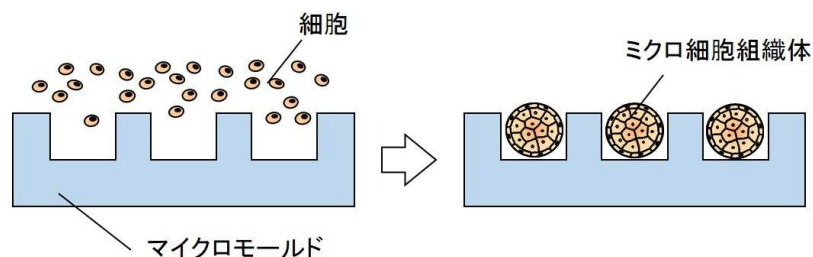


Fig.5.1 マイクロモールドを用いたマイクロ細胞組織体形成の発想

マイクロモールドを作製する手法として、石英で出来た鋳型を、加熱した熱可塑性樹脂(ポリメタクリル酸メチル(PMMA)など)に押し付けて、樹脂に形状を転写する技

術であるナノインプリント技術 (Fig.5.2 (A))⁴⁾や、マイクロメートルオーダーの微細ドリルを利用した切削法 (Fig.5.2 (B))^{5),6)}などがある。しかし、これらの手法では鋳型やドリルを接触させるため、二次的な加工は困難であり、鋳型に依存した形状の微細構造しか形成出来ない。

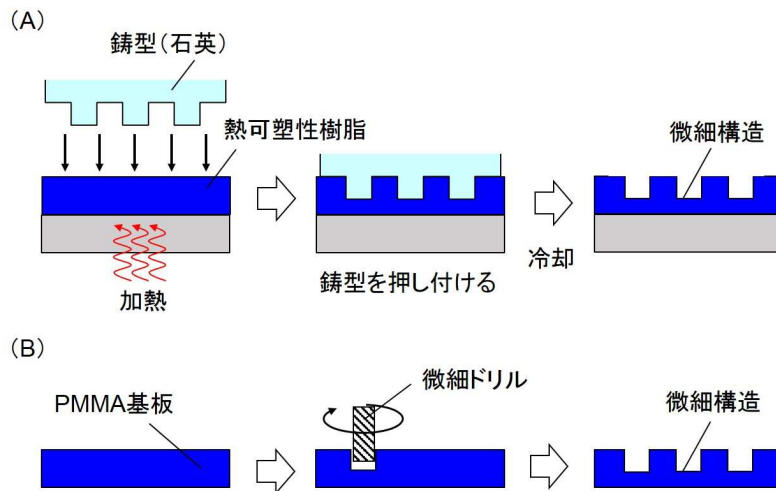


Fig.5.2 (A)ナノインプリント、および(B)切削法を用いたマイクロモールド形成技術

第3章、4章では、薄膜のゲルを用いた二次元的な細胞のアレイ化を達成することが出来た。ここで1.6節でも述べたように、アガロースゲルは熱によってゲル-ゾル転移するため、ゾル状態で鋳型に流し込めば目的の形状や厚みを再現可能であるという利点がある。

そこで本章では、数百 μm 以上の厚みを有する CNT 複合アガロースゲル基板を利用し、NIR 照射によって微細なウェル構造 (マイクロウェル) を形成すること、およびその原理を利用し段階的にスフェロイドを形成する技術の確立を目的とした。

まず5.2節と5.3節では、NIR 応答性材料のベースとなるアガロースゲルそのものが、マイクロ細胞組織体 (スフェロイド) に与える影響を評価することを目的とした。初代ラット肝細胞と株細胞である HepG2 細胞を用い、アガロースゲル上でのスフェロイド形成過程、その機能活性や特性が、他の材料上で形成されたスフェロイドと差があるのかについて検討した。

5.4節では、CNT 複合アガロースゲルを利用して、マイクロ細胞組織体の形成を試みた。NIR 照射によって形成されるマイクロウェルの形状の評価、および実際に細胞を用いてマイクロ細胞組織体の形成を試み、その形状や特性を評価した。

5.2 初代ラット肝細胞スフェロイド形成における

アガロースゲルの効果

5.2.1 本節の目的

初代肝細胞スフェロイドは、肝特異的機能（アルブミン分泌活性、尿素合成活性、薬物代謝活性など）の高発現・長期維持が可能であることが知られている。そのため、人工肝臓や創薬スクリーニング分野での応用が期待されている。

培養基板の材料に着目すると、「完全な細胞非接着表面」、または「細胞弱接着表面」上でスフェロイドの形成が確認されている⁷⁾。例えば、アガロースゲルや寒天、poly-HEMA や PEG を修飾した基板は「完全な細胞非接着面」の例であり、これらの基板の上では肝細胞の接着は抑制され、肝細胞同士はすみやかに集合してスフェロイドを形成する。また、プライマリアディッシュや、ペトリディッシュは「細胞弱接着面」の例であり、これらの基板の上では、肝細胞は一度基板の上に接着した後に、剥離・遊走し、スフェロイドを形成する⁸⁾。

このように、肝細胞スフェロイドの形成は培養基板材料の影響を大きく受け、その形態や機能を変化させる。そこで本節では、CNT 複合アガロースゲルでマイクロ細胞組織体の形成を試みる前に、培養基板としてのアガロースゲルが、スフェロイド特性に及ぼす影響を検証することを目的とした。本検討では Fig.5.3 に示すように、規則的なマイクロウェルを基板の上に多数有した「マイクロウェルチップ」を利用することにした^{5),6)}。本チップを用いることで、スフェロイド同士の融合を防ぎ、均一なサイズのスフェロイドを多数形成することが可能であるため、アガロースゲルがスフェロイド特性に与える影響を評価するための系として適切だと考えた。

具体的には、微細加工技術を用い、PMMA で作製した PMMA チップ、PMMA チップ表面を PEG で修飾した PMMA/PEG チップ、及びアガロースゲルで成型した Agarose チップの 3 種類を作製し、ラット初代肝細胞スフェロイドの形成プロセスや細胞間結合、肝特異機能（アルブミン分泌とアンモニア代謝）、ウェル内の培養環境の比較を行った。

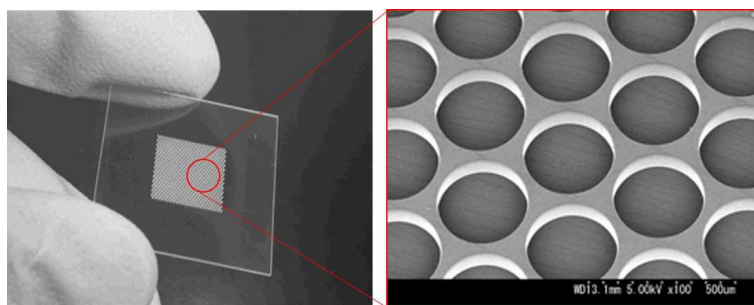


Fig. 5.3 マイクロウェルチップの外観とマイクロウェル構造

5.2.2 実験方法

(1) マイクロウェルチップの作製^{5),6)}

<PMMA チップ、PMMA/PEG チップ>

24×24 mm、厚さ 0.4 mm のアクリル (PMMA) 板を、土台となる 30×100 mm、厚さ 1.0 mm の PMMA 板にパラフィン (Histparaffin、和光純薬) で固定した。卓上型 NC 微細加工機 (Micro MC-2、PMT) を利用し、直径 400 μm のエンドミルドリル (NACHI MINI-SQUARE、不二越) を用い、直径 400 μm、ピッチ 500 μm の円柱状の貫通ウェルを三角配置で 460 個、PMMA 基板上に作製した (Fig.5.4 (A))。加工後の基板を界面活性剤で洗浄後、未加工の PMMA 板とガラス板で挟んでクリップで固定し、乾燥機 (ADVANTEC DRE320DA、東洋製作所) で 106 °C、2 時間、溶着した (PMMA チップ、Fig.5.4 (B))。

完成したチップ基板に、ポリジメチルシロキサン (PDMS) (Sylgard 184 silicone elastomer kit、Dow Corning 社) で作製した枠を取り付けた (詳細は 5.2.2 項 (2) で説明する)。6 Pa、15 mA、60 sec の条件下で Pt 蒸着 (E-1010 Ion Sputter、日立ハイテック) を施し、チオール基を有する PEG-SH 溶液 (分子量 30000) (SUNBLIGHT ME-050-SH、日油) を 50 %エタノールで 5 mM に調製し、チップに塗布して窒素雰囲気下で乾燥させた。ウェル内を脱気し、50 %エタノール、滅菌水で二回洗浄して未反応の過剰な PEG を除去した (PMMA/PEG チップ、Fig.5.4 (C))。

これらのチップは、滅菌後、HDM 培地を入れてインキュベーターにて保存した。作製したチップの外観を Fig.5.5 (A) に示す。

<Agarose チップ>

先程の PMMA チップに PDMS を流して油圧ポンプで脱気し、約 48 時間静置して硬化させた。PDMS を 24×24 mm のサイズに切り出し、100 mm のディッシュに 4 つ配置して張り付けた。この PDMS 鋳型に Pt 蒸着して、PEG-SH (分子量 5000~30000、親水面を形成すればどの分子量、濃度でも良い) を修飾、洗浄して乾燥させた。アガロース粉末 (AgaroseNA、フナコシ) を蒸留水で加熱して 2 %w/v となるように溶かし、先程の PDMS 鋳型の上から 17.5 mL 流し込んだ。このゲルを 4 °C の冷蔵庫でゲル化させ、PDMS 鋳型からピンセットでゲルを剥離し、ペトリディッシュ (φ35 mm、Falcon1008) 上に置いた。クリーンベンチ内で滅菌水にて洗浄し、滅菌水を入れたまま、UV 下で滅菌した (Agarose チップ、Fig.5.4 (D))。作製したチップの外観を Fig.5.5 (B) に示す。

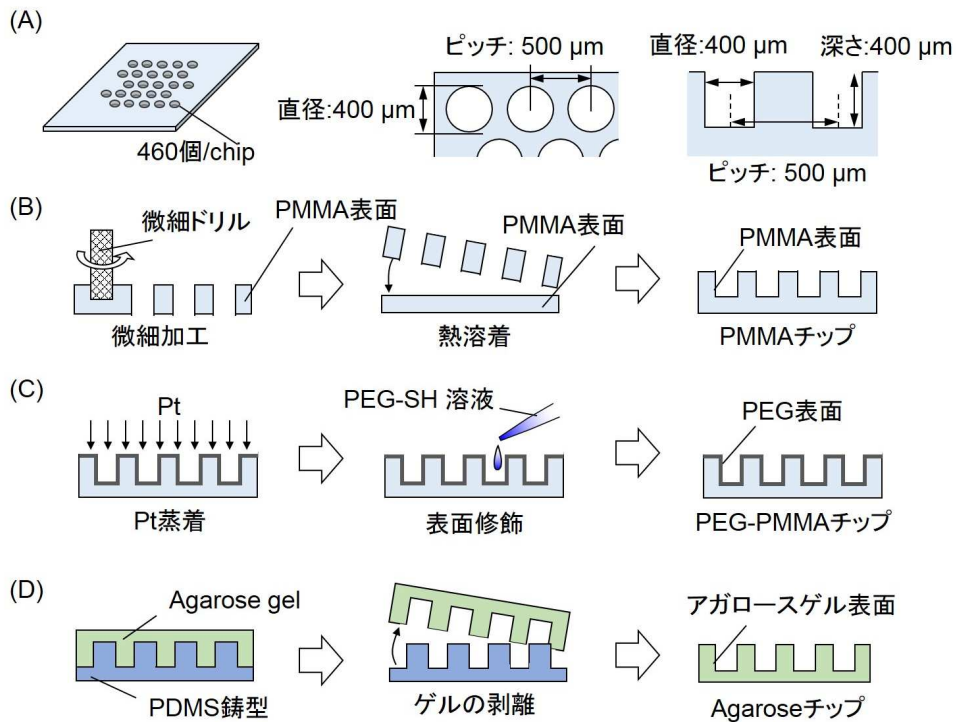


Fig. 5.4 (A) マイクロウェルチップの条件、(B)PMMA チップ、(C)PMMA/PEG チップ、および(D)Agarose チップの作製方法

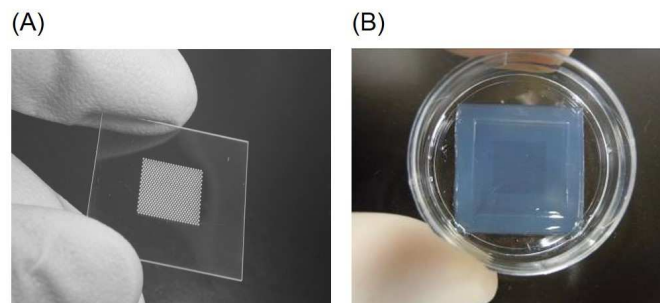


Fig.5.5 (A)PMMA、および PMMA/PEG チップ、(B) Agarose チップの外観 (PDMS 製の枠の無い状態)

(2) ラット初代肝細胞の調製と播種

Wister ラット (雄、7 週齢、約 200 g) の肝臓から、コラゲナーゼ灌流法を利用して、2.2.2 項 (2) で示した手法と同様に、初代ラット肝実質細胞を調製した。

各チップには、細胞の懸濁液をトラップするための PDMS 製の枠 (内径: 1 cm × 1 cm、厚さ: 約 0.25 mm) を取り付けた。Agarose チップは PDMS 枠が密着しないため、上からおもりでおさえて固定した。このチップの枠内に、細胞密度 1.5×10^5 cells/chip の細胞懸濁液を 250 μ L 播種し、細胞がウェル内に沈降した後、チップの枠を取り外した。その後、2 日に一回培地交換を行った (Fig.5.6)。

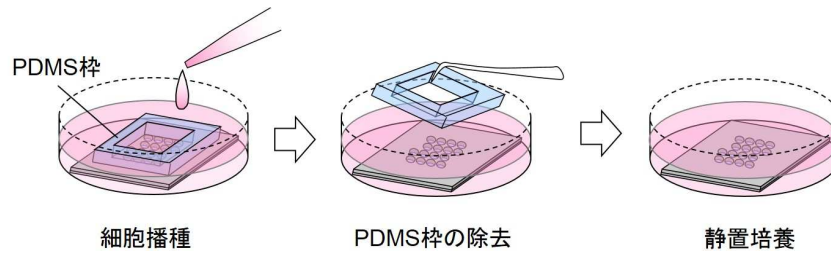


Fig.5.6 マイクロウェルチップの播種、培養手順

(3) 細胞形態観察・画像解析

培養 1、3、5、7 日目の位相差顕微鏡の写真から、それぞれの条件において 80 個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト (WinROOF Ver 5.02、三谷商事) でスフェロイドの粒径を評価した。培養日数ごとに ANOVA を行い、Agarose チップとの有意差を $*P<0.05$ で示した。

(4) 細胞数の測定

培養 1、3、5、7 日目に、2.2.2 項 (6) と同様の手法で細胞から DNA を抽出し、細胞数を算出した。培養日数ごとに ANOVA を行い、Agarose チップとの有意差を $*P<0.05$ で示した。

(5) 肝特異機能評価

培養 1、3、5、7 日目のアンモニア代謝能とアルブミン分泌能について、2.2.2 項 (8) と同様の手法で評価した。細胞数で標準化し、細胞数あたりの機能活性を算出した。培養日数ごとに ANOVA を行い、Agarose チップとの有意差を $*P<0.05$ で示した。

(6) 遺伝子発現解析

2.2.2 項 (7) と同様の手法で、RNA 抽出用のスピнкаラム (NucleoSpin® RNA II、ニッポンジーン) を使用して、肝組織、培養 0.25、0.5、1、2、3、5、7 日目の培養肝細胞から total RNA を抽出し、PCR (StepOne™ real-time PCR system、Applied Biosystems) を実施した。以下の Table 5.1 に、解析した遺伝子を示す。遺伝子発現は GAPDH をハウスキーピングとして標準化し、肝組織を基準としての発現レベルを比較した。Agarose チップとの有意差を $*P<0.05$ で示した。

Table 5.1 本検討で解析した遺伝子

分類	遺伝子名	TaqMan Assay no.
ハウスキーピング	GAPDH	Rn01775763_g1
組織型プラスミノゲンアクティベーター	tPA	Rn00565767_m1
ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーター	uPA	Rn00565261_m1
細胞間接着結合	E-Cadherin	Rn00580109_m1
グルコーストランスポーター(低酸素マーカー)	Glut1	Rn01417099_m1
ヘムオキシゲナーゼ(低酸素マーカー)	HO-1	Rn01536933_m1

5.2.3 実験結果および考察

(1) スフェロイドの形成

PMMA チップは、培養初期に肝細胞は基板に接着していたが、その後遊走・剥離が起こり、自発的に凝集して培養7日目には1つのウェル内でいくつかのヘミスフェロイド(半接着スフェロイド)を形成した。一方、PMMA/PEG チップと Agarose チップでは細胞の接着は起こらず、培養1日目に細胞同士が凝集し、一つのウェルに一つの浮遊したスフェロイドを形成した(Fig.5.7)。つまり、完全な非接着面であるPEGとAgaroseチップは直接細胞同士が集まってスフェロイド形成が見られるが、PMMAチップでは基板への接着を介したスフェロイド形成が進行することがわかった。

このような違いが見られた要因として、アガロースのようなハイドロゲルやPEG表面は、高い親水性や排除体積効果により表面へのタンパク質の吸着・細胞の接着が起こらないため、直接的肝細胞同士が集まり、スフェロイドを形成したと考えられる。一方、PMMAチップでは、肝細胞は一度基板上に接着してからスフェロイドを形成した。PMMA表面は強い疎水性を有しているためタンパク質が吸着しやすく、デバイス内のタンパク質によるファウリング(汚染)がしばしば問題となっている^{9)~11)}。本研究では、マイクロウェルチップ材料の違いが及ぼす影響を見るために、培地に血清を加えていないので、肝細胞から分泌されたタンパク質(ビトロネクチン、フィブロネクチンなど)がPMMA表面に吸着し、培養初期に肝細胞の接着が見られたと考えられる。

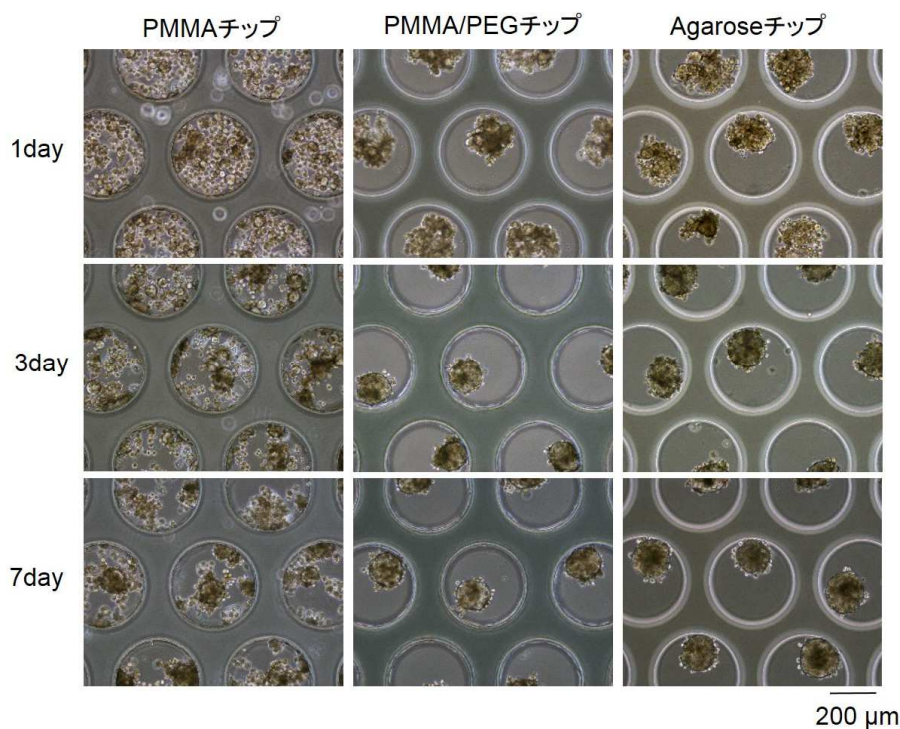


Fig.5.7 PMMA、PMMA/PEG、および Agarose チップ上でのラット肝細胞スフェロイドの形成過程

(2) プラスミノゲン活性化因子と細胞間結合の遺伝子発現

プラスミノゲン活性化因子 (PA) は、プラスミノゲンを限定分解し、プラスミンへと変換する酵素である。プラスミンは、凝固により生じた不溶性のフィブリンを分解する反応を司る分子で、組織傷害時に生じた血栓が組織修復に伴い不要になった際に、これを溶解・除去する重要な役割を持つ¹²⁾。PA はこのようなフィブリンの分解機構だけでなく、組織修復の過程における細胞外マトリクス (ECM) や細胞の破片の分解、ECM の再構築にも大きく関与している。その中で、スフェロイドの形成過程に、PA が大きく関与していることが指摘されている^{13), 14)}。そこで、本検討でのスフェロイド形成過程の指標とし、材料によるスフェロイド形成プロセスの違いを詳細に評価するため、PA の発現を評価した (Fig.5.8 (A)、(B))。

PA の発現を見てみると、PMMA チップでは培養 2 日目から tPA、uPA の発現が上昇し、培養経過に伴うにつれて上昇した。このとき、uPA は一旦発現が下がり、2 日目から再び上昇していた。一方、PMMA/PEG と Agarose チップでは培養中常に低く、発現の変化はほとんどなかった。

また、スフェロイド形成に伴う細胞間結合の変化を確認するため、代表的な細胞間結合である E-Cadherin の遺伝子発現を評価したところ、どちらの発現も 1~2 日目に一旦下がるが、スフェロイドの形成に伴い 2~3 日目に再び上昇していた (Fig.5.8 (C))。しかし、チップ材料の違いによる発現の差は見られなかった。

この結果から、接着を介したスフェロイド形成が行われる PMMA チップでは、スフェロイドの形成に PA が大きく関わっていることがわかった。一方、直接的なスフェロイド形成が見られる PMMA/PEG チップと Agarose チップではほとんど発現が見られず、PA はスフェロイド形成に関与していないことがわかった。以前の報告により、肝細胞は、プライマリアディッシュ上に一度接着してスフェロイドを形成し、スフェロイドの形成とともに uPA、tPA の発現が上昇する。一方、細胞が接着しないアガロースゲルをコートしたディッシュ上では、スフェロイド形成を行うが、PA をほとんど発現しないことが明らかになっている¹⁴⁾。マイクロウェルチップでも同様の傾向が見られ、肝細胞が接着しやすい PMMA 表面では PA による ECM の分解・再構築が行われ、肝細胞の接着・遊走を介してスフェロイド形成が進行する。肝細胞が接着しにくい PEG、アガロース表面では、どちらもスフェロイド形成に PA は関与しないことがわかった。

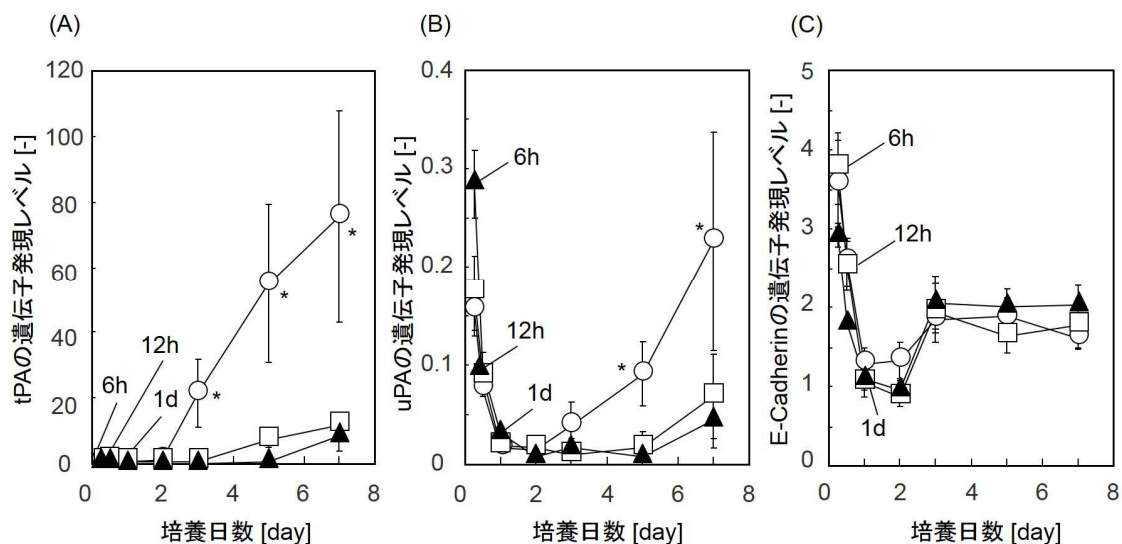


Fig.5.8 PMMA、PEG/PMMA、および Agarose チップ上での (A) tPA、(B) uPA、および (C) E-Cadherin の遺伝子発現レベル (PMMA チップ(○)、PMMA/PEG チップ(□)、Agarose チップ(▲))

しかし、一度 PMMA 上に接着した肝細胞が基板上に伸展せず、なぜ Plasmin/PA system が活性化されてスフェロイドを形成するのかについては不明である。Plasmin/PA system は肝再生における ECM の分解、傷害を受けた細胞のクリアランス、肝細胞の増殖に関わっていることが知られており^{15), 16)}、スフェロイドの構築プロセスは肝再生プロセスと同様の現象が起こっているのかもしれない。コラーゲンコートディッシュ上では肝細胞は接着・伸展するため、コラーゲンコートディッシュ上での PA の発現を比較するなど、この点について詳細な分子メカニズムの検討が必要であると考えている。

(3) 細胞数、スフェロイド径の評価と肝機能発現

細胞数を比較すると、どのチップ条件も1~3日にかけて細胞数の減少が見られた。その後、PMMAとPMMA/PEGチップは3~5日目にも細胞数の減少が見られたが、Agaroseチップは3日目以降、細胞数を維持している傾向があった (Fig.5.9 (A))。また、完全なスフェロイド形成が見られたPMMA/PEGチップとAgaroseチップのスフェロイドのサイズを比較したところ、両者とも1~3日にかけてスフェロイドのサイズの縮小が見られた。さらに5日目以降、Agaroseチップのスフェロイドの方がPMMA/PEGチップよりもサイズを維持している傾向があり (Fig.5.9 (B))、Agaroseチップは細胞数の維持に関与していることが明らかとなった。

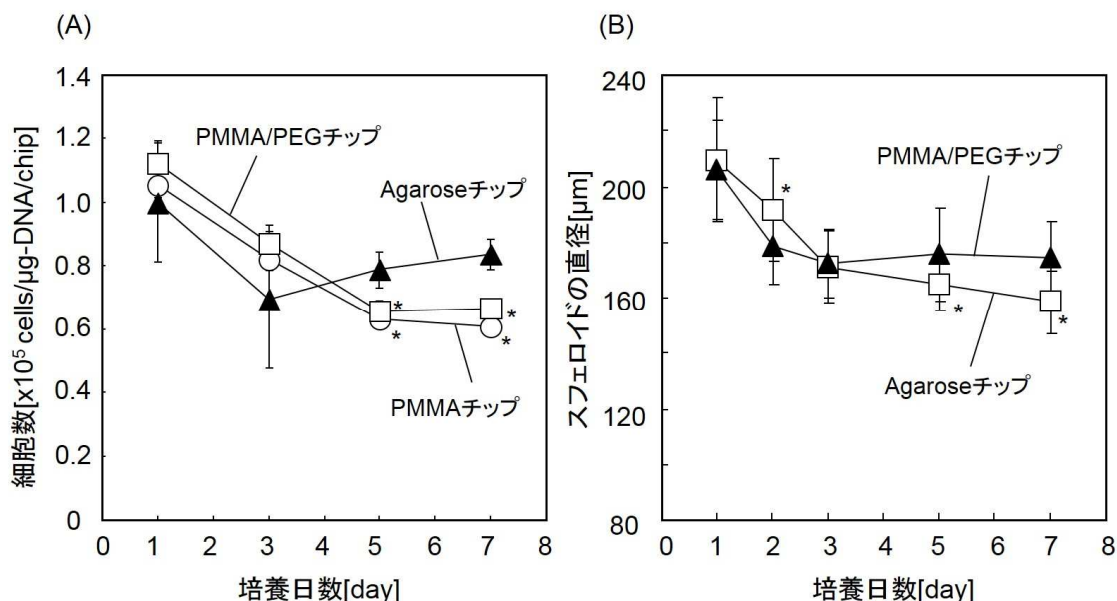


Fig.5.9 (A)PMMA、PEG/PMMA、および Agarose チップ上でのスフェロイドの細胞数、および(B) PEG/PMMA、および Agarose チップ上でのスフェロイド直径の変化 (PMMA チップ(○)、PMMA/PEG チップ(□)、Agarose チップ(▲))

さらに、代表的な肝特異機能である、アルブミン分泌活性とアンモニア代謝活性を評価したところ (Fig.5.10 (A)、(B))、どの条件もスフェロイドの形成に伴って機能が上昇し、5日目あたりで一定になった。しかし、Agaroseチップでは他の2つのチップ条件より高く、特に5日目には約1.5倍の差があった。このことから、Agaroseチップでは肝特異機能の維持に効果があることが示唆された。

細胞数、肝特異的機能活性の結果より、Agaroseチップでは肝細胞の培養環境を改善する効果があると考え、以下の項でウェル内の酸素環境に着目した解析を行った。

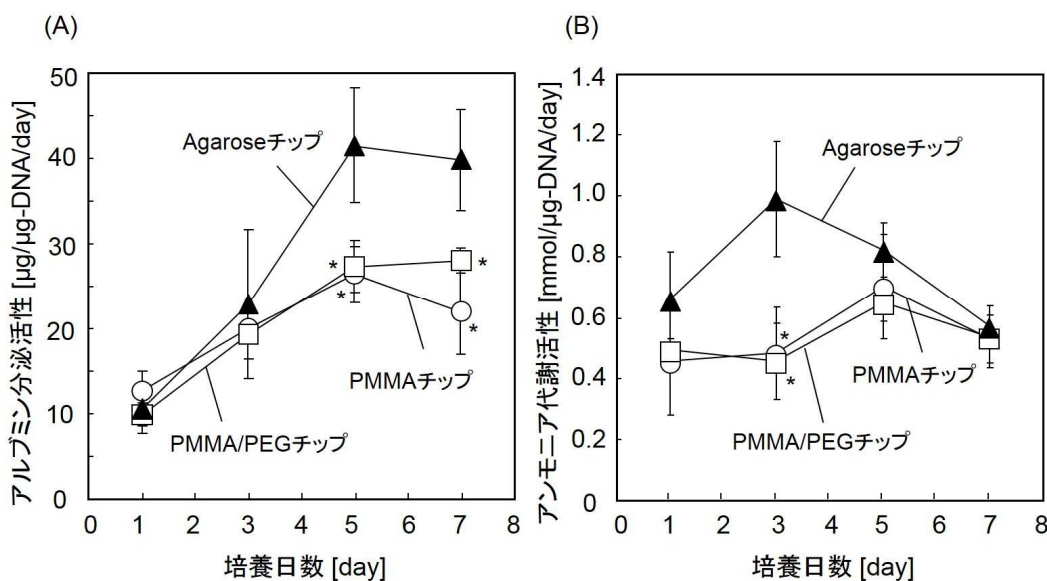


Fig.5.10 (A)PMMA、PMMA/PEG、および Agarose チップ上でのスフェロイドのアルブミン分泌活性、および(B)アンモニア代謝活性 (PMMA チップ(○)、PMMA/PEG チップ(□)、Agarose チップ(▲))

(4) ウェル内の酸素環境評価

完全なスフェロイド形成が見られた PEG チップと Agarose チップについて、機能に大きく差が生じた培養 5 日目でのスフェロイド内の好嫌気状態を染色、および遺伝子発現により比較した。生死染色の結果、Agarose チップの方が緑に染まっている (生細胞) エリアが広いが、PMMA/PEG チップでは、死細胞を示す赤い蛍光のエリアが広がった (Fig.5.11 (A))。また、低酸素状態で赤い蛍光を示す Lox-1 染色では、PMMA/PEG チップのほうが全体的に強く染まっていた (Fig.5.11 (B))。

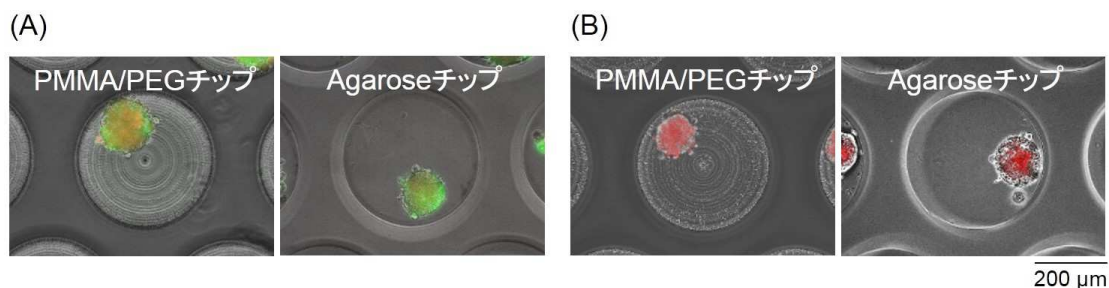


Fig.5.11 (A)PMMA/PEG と Agarose チップ上でのスフェロイドの Live/Dead 染色 (緑:生細胞、赤:死細胞)、および(B)Lox-1 染色 (低酸素:赤)

低酸素環境下での細胞は、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) やグルコーストランスポーター (Glut1) といった遺伝子の発現が強く誘導され、低酸素ストレスに対応することが知られている¹⁷⁾⁻²⁰⁾。HO-1 が細胞内で誘導されると、ヘムタンパク質の補欠分子であるヘムが分解され、ヘム分解産物 (ビリルビンなど) が低酸素などの外的ストレスからの細

胞保護に重要な役割を担っていると考えられている。また、低酸素状態での細胞はエネルギーを獲得するため、グルコーストランスポーター (Glut1) を介して、グルコースの取り込みを積極的に行おうとする。従って、これらの遺伝子発現が高いということは、細胞周囲環境が低酸素であることを示唆している。そこで、HO-1 と Glut1 の遺伝子発現を比較してみたところ、Agarose チップよりも PMMA/PEG チップの発現レベルが高く、PMMA/PEG チップ内は低酸素環境であることが示唆された (Fig.5.12 (A)、(B))。

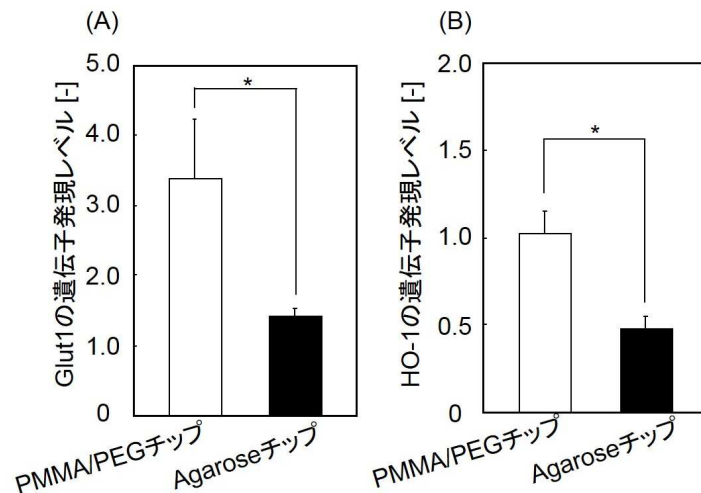


Fig.5.12 (A)PMMA/PEGとAgarose チップ上でのスフェロイドの Glut1、および(B)HO-1 の遺伝子発現レベル

Agarose チップは、PMMA チップや PMMA/PEG チップと比較して、細胞数の維持や、肝特異機能の発現が高い傾向があった。PMMA チップと PMMA/PEG チップは同じ PMMA を基板で作製し、Agarose チップはゲルで作製している点に大きな差がある。この結果から、肝特異機能を制御する一番重要な因子は、マイクロウェルチップを構成する材質の物質透過性であると考えられる。この要因についての詳しい考察は、次の 5.3 節で詳しく述べる。

5.2.4 本節のまとめ

本節より、以下の結果を得た。

- (1) アガロースゲル上では、肝細胞は PEG 表面と同じく PA を介したスフェロイド形成を行う。
- (2) E-Cadherin の遺伝子発現の結果から、細胞間の結合状態はどのチップ条件でも変化がなかった。
- (3) 細胞数・スフェロイド径・肝特異的機能活性は、Agarose チップで良好に維持しており、アガロースゲルの物質透過性の高さに起因しているものと考えられた。

以上の結果から、アガロースゲルはスフェロイド形成において優位な材料であると考えられる。

5.3 株細胞スフェロイド形成におけるアガロースゲルの効果

5.3.1 本節の目的

5.2.1 項で述べたように、初代肝細胞スフェロイドの形成は肝機能活性の維持に大変有用なアプローチである。その一方で、初代肝細胞は調製が煩雑であるため、継代培養の可能な「株細胞」は重要な細胞ソースとして汎用されている。

そこで本節では、汎用性の高い肝細胞株である HepG2 細胞を用いて、前節と同様に HepG2 細胞のスフェロイドを形成させ、細胞の増殖性・機能活性・遺伝子発現を評価し、アガロースゲルの効果を検討することを目的とした。

5.3.2 実験方法

(1) マイクロウェルチップの作製

<PMMA/PEG チップ>

5.2.2 項 (1) の手法と同様に作製した。マイクロウェルチップのウェル径、ウェル深さ、ウェル数などの条件は Fig.5.13 に示す。

<Agarose チップ>

5.2.2 項 (1) の手法と同様に作製した。マイクロウェルチップのウェル径、ウェル深さ、ウェル数などの条件は Fig.5.13 に示す。

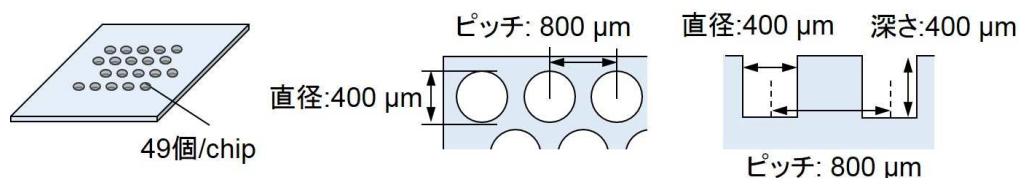


Fig.5.13 マイクロウェルチップの設計条件

(2) HepG2 細胞の調製と播種

コンフルエントになった HepG2 細胞を、0.05 %トリプシン/ EDTA 溶液 (Invitrogen) にて酵素処理して細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を、液量 250 μL、細胞密度 1.5×10^5 cells/chip、WE+10 %FBS 培地 (組成: Table 3.5 参照) にて各チップの枠内に播種した (播種の手順は前節 Fig.5.6 と同様)。細胞がウェル内に沈降した後、ウェルに入らなかった細胞を、培地交換をして取り除き、チップ全体を 3 mL の培地で満たした。その後は 2 日に一回培地交換を行った。

(3) 細胞形態観察

培養 1、3、5、7 日目の位相差顕微鏡の写真から、それぞれの条件において 80 個のスフェロイドを無作為に抽出し、画像解析ソフト (Win ROOF Ver 5.02、三谷商事) でスフェロイドの粒径を評価した。

(4) 細胞数の測定

培養 10 日目に、2.2.2 項 (6) と同様の手法で細胞から DNA を抽出し、細胞数を算出した。

(5) 肝特異機能評価

培養 10 日目のアンモニア代謝能とアルブミン分泌能について、2.2.2 項 (8) と同様の手法で評価した。細胞数で標準化し、細胞数あたりの機能活性を算出した。

(6) 遺伝子発現解析

2.2.2 項 (7) と同様の手法で、RNA 抽出用のスピнкаラム (NucleoSpin® RNA II、ニッポンジーン) を使用して、播種時の細胞懸濁液、培養 10 日目の培養細胞から total RNA を抽出し、PCR (StepOne™ real-time PCR system、Applied Biosystems) を実施した。以下の Table 5.2 に、解析した遺伝子を示す。遺伝子発現は GAPDH をハウスキーピングとして標準化し、細胞懸濁液を基準としての発現レベルを比較した。Agarose チップとの有意差を * $P < 0.05$ で示した。

Table 5.2 本検討で解析した遺伝子

分類	遺伝子名	TaqMan Assay no.
ハウスキーピング	GAPDH	Hs02758991_g1
グルコーストランスポーター	Glut1	Hs00892681_m1
乳酸脱水素酵素	LDH1	Hs00855332_g1

5.3.3 実験結果および考察

(1) スフェロイドのサイズ変化

Agarose チップ、PMMA/PEG チップどちらも各ウェルにスフェロイドを形成し、培養経過とともにスフェロイドのサイズは増大した (Fig.5.14 (A))。

特に、培養 7 日目あたりから Agarose チップのスフェロイドのサイズが顕著に大きくなり、ウェル一杯に増殖していた。このことから、Agarose チップはスフェロイドのサイズ維持に効果があることが示唆された (Fig.5.14 (B))。

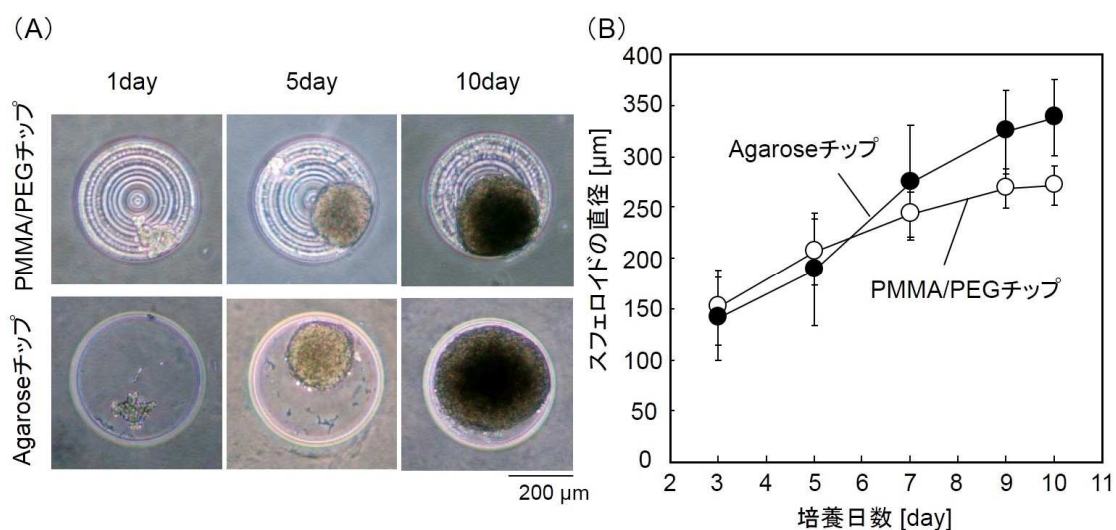


Fig.5.14 (A)各チップの形態変化、および(B)粒径変化
(Agarose チップ(●)、PMMA/PEG チップ(○))

(2) スフェロイドの細胞数・機能活性

スフェロイドのサイズに違いが生じた培養 10 日目の細胞数、およびアルブミン分泌活性を比較した (Fig.5.15 (A)、(B))。その結果、Agarose チップの細胞数、アルブミン分泌活性ともに PMMA/PEG チップの約 2 倍の数値を示した。このことから、Agarose チップはスフェロイドの細胞数維持、および高機能の発現に効果があることが示唆された。

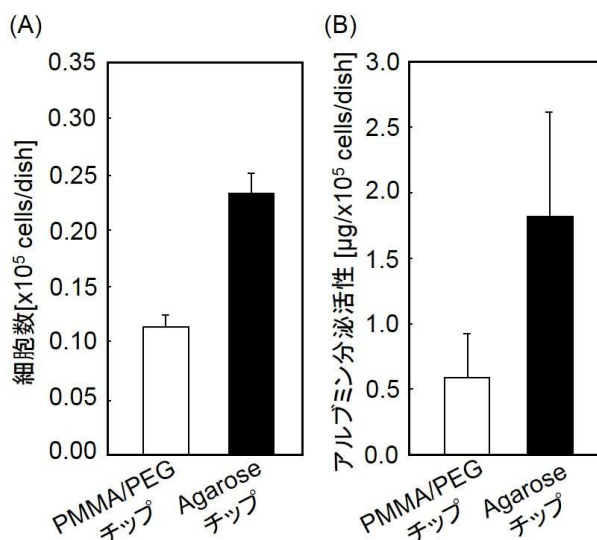


Fig.5.15 (A)各チップの細胞数変化、および(B)アルブミン分泌活性(培養 10 日目)

(3) スフェロイドの好嫌気状態の評価

前節と同様に、スフェロイドの好嫌気状態を評価するため、代表的な低酸素マーカーである Glut1 と LDH1 の遺伝子発現レベルを比較した (Fig.5.16 (A)、(B))。前節でも

述べたように、低酸素下の細胞は、グルコーストランスポーター（Glut1）を介してグルコースの取り込みを積極的に行う。また、低酸素条件下では、解糖系だけでなく、乳酸の生成を行い、乳酸脱水素酵素（LDH1）によって ATP の合成を行っているため、これらの遺伝子発現レベルは低酸素状態を評価する指標となる。

これらの遺伝子発現レベルを比較すると、どちらも PMMA/PEG チップでの発現が高く、嫌気的環境におかれていることが示唆された。

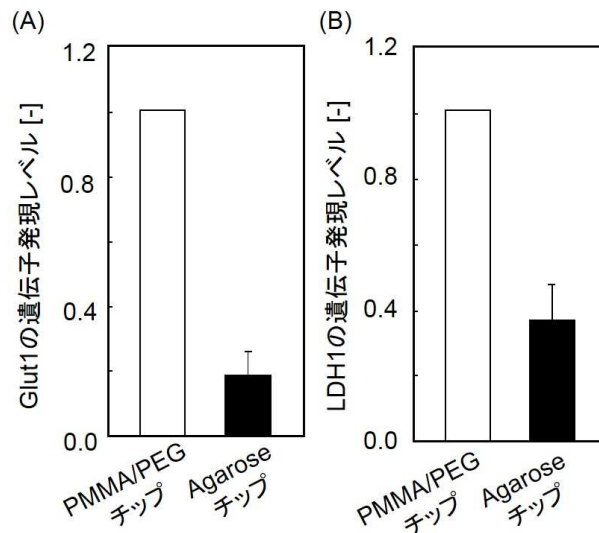


Fig.5.16 (A) Glut1 の遺伝子発現レベル、(B) LDH1 の遺伝子発現レベル(培養 10 日目)

これらの結果から、前節と同様に、Agarose チップは HepG2 スフェロイドの細胞数（増殖性）、機能活性の向上に効果があることが認められた。特に、低酸素マーカーの遺伝子発現から、Agarose チップの物質透過性の高さに起因しているものと考えられる。

肝細胞は酸素要求性が高く、培養系内への酸素供給を改善することにより、肝細胞の高機能発現につながるということが知られている²¹⁾。例えば、Anada らは酸素透過性の高い PDMS を用いたマイクロウェルチップで HepG2 細胞を培養することで、高い生存率・機能活性を維持することを見出している²²⁾。本研究で用いた PMMA は酸素や物質の透過性が低いことが知られている一方で、アガロースゲルのようなハイドロゲルは、その三次元的な網目構造により、酸素、栄養素や老廃物の透過性が高い特徴を有している。

そこで、今回用いたアガロースゲル内の酸素拡散性について、Ogston モデルを用いて理論的に解析を行い、ウェル内の酸素環境について考察した。

常温におけるアガロースゲル内と水中の酸素の拡散係数の比は Ogston モデルを用いて、以下の式 (1)、(2) と Table 5.3 の値から理論的に計算できる^{23), 24)}。

$$D/D_0 = \exp(-\phi^{1/2}) (r_s / r_f) \cdots \cdots (1)$$

D : アガロースゲル内での酸素の拡散係数、D₀ : 水中での酸素の拡散係数、φ : ゲルの体積分率、r_s : 拡散する分子の半径 [nm]、r_f : ゲルの繊維半径 [nm]

$$\phi = c / (\rho\omega) \cdot \cdot \cdot \cdot (2)$$

c : アガロースゲルの濃度 [%w/v]、 ρ : ゲルの密度 [g/mL]、 ω : ゲルの重量分率

Table 5.3 酸素拡散係数の計算に用いた値(文献値を参考)

対応する文字	数値 ^{23), 24)}
r_s	0.5 nm
r_f	1.9 nm
c	2 %w/v
ρ	1.64 g/mL
ω	0.625

この式より D/D_0 を計算すると約 0.96 となり、アガロースゲル内の酸素の拡散係数は水中と同等であるとみなすことができる。

一般的なマイクロウェルチップは、酸素透過性の低い材料を用いた手法が主流であり、ウェルの上部のみから培地や酸素の供給が行われるため、ウェルの中は低酸素状態となりやすい。その結果、細胞の生存率や機能活性も低い傾向にあることが指摘されている²⁵⁾。一方、Agarose チップは先ほどの計算より、ゲル内部においても培地中と同程度に酸素が拡散しており、ウェル上部からだけでなく壁面・底面からも、ウェル内部に十分に酸素が供給されると考えられる (Fig.5.17)。つまり、ウェル内の環境が他の2つのチップに比べて好氣的なため、肝細胞の生存率や機能維持の向上につながったと考えられ、アガロースゲルの物質透過性の高さでウェルという微小培養環境が生み出した効果であると言える。

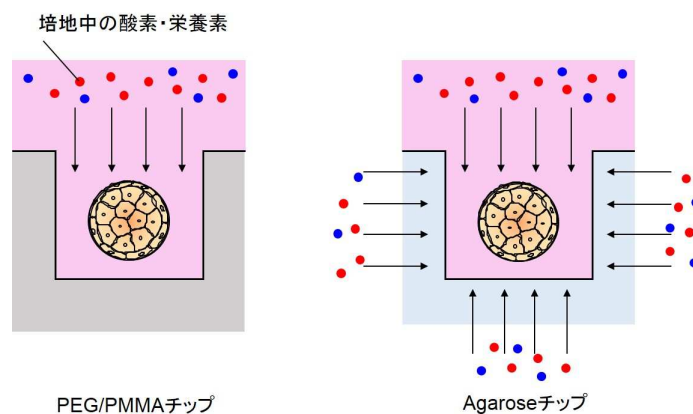


Fig.5.17 各チップ内への物質透過性の模式図

5.3.4 本節のまとめ

本節より、以下の結果を得た。

- (1) HepG2 スフェロイドのサイズ・細胞数・肝特異的機能活性は、Agarose チップで良好に維持していた。
- (2) 遺伝子発現解析と、Ogston モデルによる解析により、Agarose チップ内の HepG2 スフェロイドは好気的環境が維持されており、これが肝細胞の培養環境の改善に寄与していることが明らかになった。

前節の結果とあわせて、アガロースゲルはスフェロイド形成において優位な材料であることが明らかになった。次節では NIR 応答性ハイドロゲルを利用したマイクロ細胞組織体形成を試みた。

5.4 NIR 応答性アガロースゲルによるマイクロ細胞組織体形成

5.4.1 本節の目的

5.2、5.3 節より、アガロースゲルがマイクロ細胞組織体形成において有利な材料であることが明らかとなった。

そこで本節では、NIR 応答性アガロースゲルを利用して、段階的にマイクロ細胞組織体の配列や形状を自由に制御可能な、マイクロ細胞組織体手法を構築出来ないかと考えた。

細胞が集合・凝集した細胞組織体の形成は細胞非接着面で促進するため、効率的に細胞組織体を形成するには、細胞の接する面が細胞非接着面であることが望ましい。しかし、これまでのように培養ディッシュの底面を露出させてしまうと、細胞はズル化部位で接着・伸展してしまい、組織体を形成することが出来ない。そこで本節では、Fig.5.18 に示す 2 層構造のアガロースゲル基板を発想した。

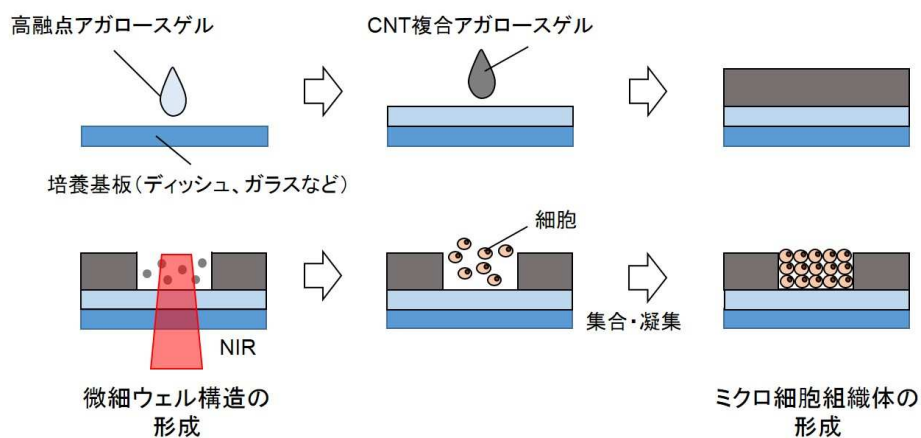


Fig.5.18 CNT 複合アガロースゲルを利用したマイクロ組織体形成基板の発想

具体的に、まず下の層に CNT を含まないアガロースゲル、その上層に CNT 複合アガロースゲルを積層させる。NIR を照射すると、上層の CNT 複合アガロースゲルのみが NIR による光熱交換反応によりゾル化し、細胞をトラップするマイクロウェル構造を形成出来るという発想である。本節では、この NIR 応答性 2 層構造アガロースゲル基板を用いた、マイクロ細胞組織体形成技術の開発を目的とし、NIR 照射によるマイクロウェル構造の形成、及びマイクロ細胞組織体の形成を試みた。

5.4.2 実験方法

(1) 2 層構造アガロース基板の形成

高融点アガロースゲル粉末（融点：約 90 °C、濃度：2 %w/v、Agarose 36NA、フナコシ）を蒸留水に加え、電子レンジで加熱して完全に溶解した。ゲルの厚みを制御するため、Fig.5.19 のように PMMA 板をカッターとアクリル用接着剤（アズワン）で加工し鑄型を作製した。この鑄型の足の部分（カットした PMMA 板部分）の厚みによってゲルの高さをコントロールし、内側を PEG 修飾することで隙間にゾルを流し込みやすくした。この鑄型を Fig.5.20 のようにペトリディッシュ（φ35 mm、FALCON1008）にセットし、アガロースゲルを厚さが 400 μm になるように流し込み、4 °C でゲル化させた。これを下層のゲル層とした。次に、CNT 分散液（SWNT Ink、名城ナノカーボン）に低融点アガロース（濃度：2 %w/v）の粉末を加え、サーマルサイクラーを用いて 70 °C で加熱してゲル粉末を溶解した。溶けたらこのゾルをよく攪拌し、先程のゲル化したアガロースゲル層の上から、Fig.5.20 のように「400 μm（下層）+目的の厚さ」の高さを有する鑄型を用いて流し込み、4 °C でゲル化させた。これを上層の CNT 複合アガロースゲル層（CNT ゲル層）とした。その後、2 層構造アガロースゲル基板が浮かないように、周辺に高融点アガロースゲルを流し込んで固定した。

CNT 濃度を 0.025、0.05、0.1 mg/mL、また、CNT ゲル層の厚みを 200、400、1000 μm のゲル基板を作製し、微細ウェルの形状と CNT の濃度や CNT ゲル層の厚みの関係性を評価した。

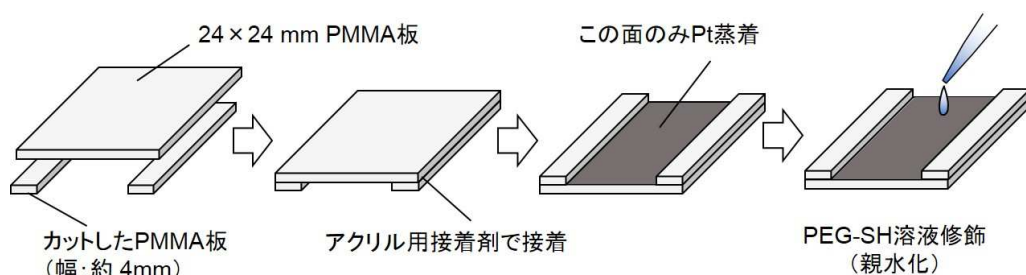


Fig.5.19 ゲル作製用 PMMA 製鑄型の作製方法

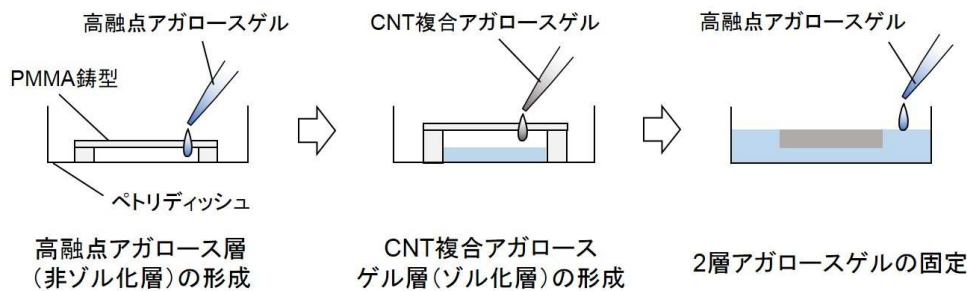


Fig.5.20 2層構造アガロースゲル基板の作製方法

(2) 2層アガロースゲル断面の形状評価

2層アガロースゲル基板に水を入れた状態で NIR 照射システム（新レーザー、4×対物レンズ）を利用して NIR（強度：800 mW）を照射し、マイクロウェルを形成した。その後、2層アガロースゲル基板をカッターでスライスして切片を作製後、ガラス板の上に置き、乾燥しないように切片を水滴で覆った。位相差顕微鏡を用いて写真を撮影し（4×対物レンズ）、その画像を元に Lumina Vision でウェルの長さや深さを測定した。

(3) スフェロイドの形成とその形状評価

CNT 濃度 0.05 mg/mL、CNT ゲル層の厚み約 300 μm 、下層の厚み約 400 μm のゲル基板を作製した。ゲル基板に NIR 照射システム（新レーザー、4倍対物レンズ）を利用して NIR（NIR 強度：800 mW）を照射し、マイクロウェルを形成させた。滅菌水（または滅菌済みの PBS）でゲルの表面を二回洗浄し、水を入れた状態で UV ランプ下にて約 1 時間滅菌した。HepG2 細胞を WE+10 %FBS 培地（組成：Table 3.11）で約 5×10^5 cells/mL に調製し、2mL の懸濁液を基板に播種した。数時間後、マイクロウェル内に細胞が沈降したのち、ウェルに入らなかった細胞を PBS と培地で洗浄して取り除いた。2 日に一回、WE+10 % FBS 培地で培地交換を行い、培養 5 日目にマイクロピペットでスフェロイドを回収後、Lumina Vision で組織の短軸・長軸方向の長さを測定した。

(4) スフェロイドの融合とその形状評価、および生死染色

CNT 濃度 0.05 mg/mL、CNT ゲル層の厚み約 200 μm 、下層の厚み約 400 μm のゲル基板を作製した。ゲル基板に NIR 照射システム（新レーザー、4×対物レンズ）を利用して NIR（NIR 強度：800 mW）を照射し、マイクロウェルを形成させた。滅菌水（または滅菌済みの PBS）でゲルの表面を二回洗浄し、水を入れた状態で UV ランプ下にて約 1 時間滅菌した。HepG2 細胞を WE+10 %FBS 培地（組成：Table 3.11）にて約 5×10^5 cells/mL に調製し、2mL の懸濁液を基板に播種した。数時間後、マイクロウェル内に細胞が沈降したのち、ウェルに入らなかった細胞を PBS と培地で洗浄して取り除いた。

2 日毎に、WE+10 %FBS 培地で培地交換を行い、HepG2 細胞培養 3 日目に、スフェロイド間に NIR（650 mW）を照射した。培養 7 日目と 9 日目に、形成した組織をマイク

ロピペットで回収、形状の評価を行った。

また、レーザー照射前後に生死染色を行った。培養3日目に、レーザーを照射したサンプル、していないサンプルを用意し、温めた PBS で洗浄した。Calcein-AM と PI (Cellstain®- Double Staining Kit、同仁化学研究所) を 1 mL の PBS にそれぞれ 2 μ L、および 3 μ L 加えて染色液を調製した。この染色液を 1 mL/dish 入れ、インキュベーター内に 15 分静置した。染色後、PBS で洗浄を行い、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U、ニコン) で観察した。

(5) 共培養マイクロ細胞組織体の形成

CNT 濃度 0.1 mg/mL、CNT ゲル層の厚み約 200 μ m、下層 (高融点アガロースゲル) の厚み約 400 μ m のゲル基板を作製した。ゲル基板に NIR 照射システム (新レーザー、4 \times 対物レンズ) を利用して NIR (NIR 強度: 500 mW) を照射し、マイクロウェルを形成させた。NIH 3T3 細胞を DMEM+10 %FBS 培地 (組成: Table 2.11 参照) で約 1×10^6 cells/dish (液量: 2 mL/dish) に調製し、基板に播種した。数時間後、マイクロウェル内に細胞が沈降したのち、ウェルに入らなかった細胞を PBS と培地で洗浄して取り除いた。3T3 細胞はスフェロイド化すると増殖しなかったため、二回上から播種しなおした。

培養7日目に、NIH 3T3 細胞のスフェロイド間に、NIR (500mW) を照射して、2段階目のウェル構造を形成した。このとき、HepG2 細胞と NIH 3T3 細胞を区別するため、NIH 3T3 細胞を Cell tracker Green (Invitrogen)、HepG2 細胞を Cell tracker Red (Invitrogen) で染色して播種した。NIH 3T3 スフェロイド、または 100 mm dish 上でコンフルエントになった HepG2 細胞に、2 mL の各染色液 (濃度: 10 μ M、無血清培地で調製) を入れて 15 分インキュベートし、染色液を抜いた後、無血清培地でさらに 30 分インキュベートした。その後、HepG2 細胞は PBS で洗浄してトリプシン処理を行い、分散した細胞懸濁液を調製した。この染色した HepG2 細胞を、NIH 3T3 スフェロイド形成基板に播種した。培養7日目以降は、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U、ニコン) を用いて観察を行った。

5.4.3 実験結果および考察

(1) マイクロウェル構造の形成と形状の評価

まず、CNT の濃度と CNT 複合ゲル層の厚みがマイクロウェルの形状に与える影響を評価するため、基板に NIR を照射した後のゲル断面の画像解析を行った。

CNT 濃度依存的なマイクロウェルの形状変化を見るため、CNT ゲル層の厚みを 200 μ m、下層のアガロースゲル層の厚みを 400 μ m、CNT 濃度を、0.025、0.05、及び 0.1 mg/mL にして基板を作製し、800 mW の NIR を照射してマイクロウェルを形成した。Fig.5.21 を見ると、上層の CNT ゲルのみがゾル化し、マイクロウェルを形成していることがわかった。CNT の熱の影響を考慮し、下層を高融点アガロースゲルで作製した効果であるといえる。また、CNT の濃度が高くなるほど、ウェルの幅が大きくなっていた。

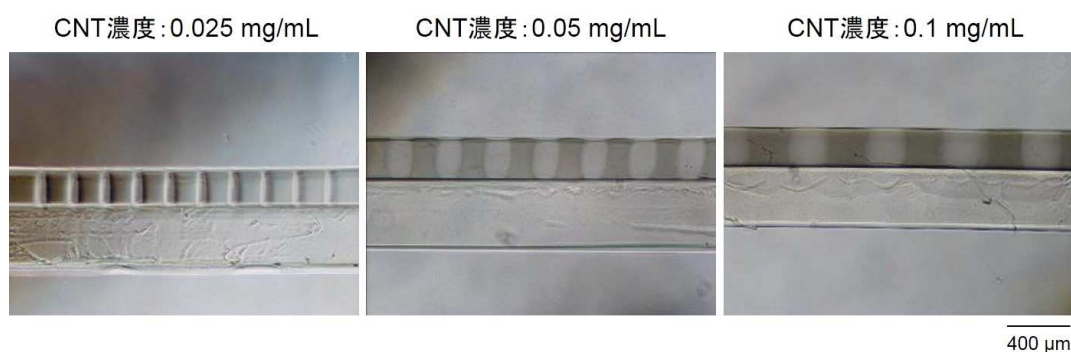


Fig.5.21 CNT 濃度依存的なマイクロウェル形状の変化

このときの形状を定量的に評価するため、ウェルの深さ 50 μm ごとに、ウェルの幅を測定した断面プロファイルの結果を Fig.5.22 に示す。この図から、ウェルの大きさは、CNT 濃度に依存していること、また、ウェルの形状は中心部が大きな「たる型」を形成していることが明らかになった。

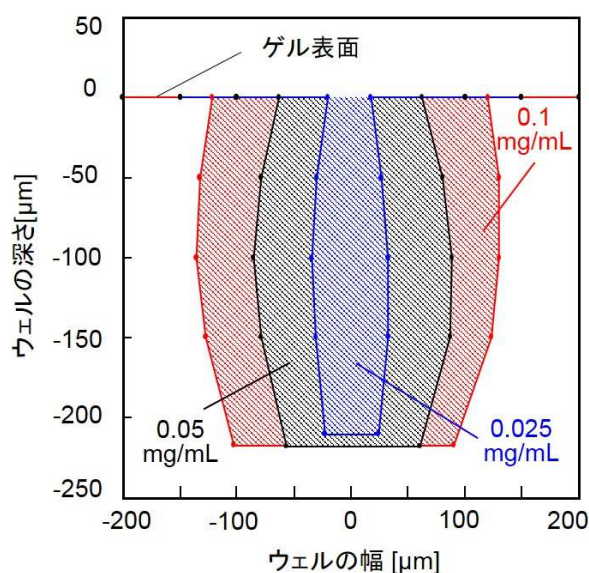


Fig.5.22 CNT 濃度依存的なマイクロウェル形状の断面プロファイル
(青: CNT 濃度 0.025 mg/mL、黒: 0.05 mg/mL、および赤: 0.1 mg/mL)²⁶⁾

この形状の特徴を詳細に解析するため、ウェルの最上部の幅を a 、中心部の幅を b 、最下部の幅を c として b/a 値を算出すると、濃度が低いほど b/a 値は大きくなった (Table 5.4)。この現象についてはまだ明らかでないが、以下のように考察した。CNT 濃度が高い場合は、ゲル全体にゾル化に必要な熱が十分発生する。一方、CNT 濃度が低い場合は全体として熱の発生が不十分であり、特に CNT と NIR レーザーの接触面積が大きく、かつ熱の拡散が起こりくい中心部でゾル化が促進してしまうため、たる型の形状が顕著に表れたと考えられる。

Table 5.4 CNT 濃度依存性におけるマイクロウェルの幅の変化

CNT 濃度	0.025 mg/mL	0.05 mg/mL	0.1 mg/mL
上面の幅 [μm](a)	34	124	240
中心部の幅 [μm](b)	64	176	260
下面の幅 [μm](c)	40	126	242
b/a 値	1.9	1.4	1.1

同様に、CNT 複合アガロースゲル層の厚み依存的なマイクロウェルの形状変化を見るため、CNT の濃度を 0.05 mg/mL、下層のアガロースゲル層の厚みを 400 μm 、および CNT 複合アガロースゲル層の厚みを、200、400、及び 1000 μm にして基板を作製し、800 mW の NIR を照射してマイクロウェルを形成した。Fig.5.23 を見ると、CNT 複合アガロースゲル層の厚みが大きいほど、形成されるウェルは大きくなっていった。

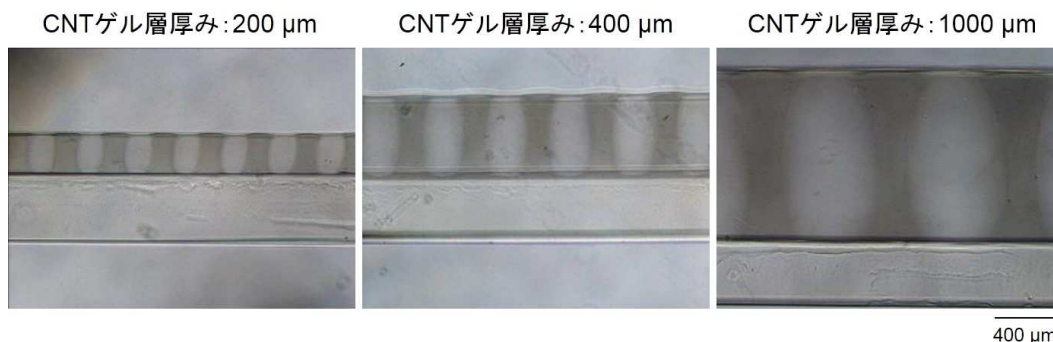


Fig.5.23 CNT 複合アガロースゲル層の厚み依存的なマイクロウェル形状の変化

また、先程と同様にウェルの深さ 50 μm ごとにウェルの幅を測定した結果、厚みに依存してウェルの幅が大きくなっていった。CNT 複合アガロースゲル層の厚みを大きくすれば、NIR 照射領域における CNT 量が多くなるので、大きなウェルが形成されたと考えられる。また、このときもたる型の形状になっていることがわかった (Fig.5.24)。

先程と同様に、ウェルの最上部の幅を a、中心部の幅を b、最下部の幅を c として b/a 値を算出すると、厚みが大きいほど b/a 値は大きくなった (Table 5.5)。ゲルが薄い場合はゲル全体に熱が均一に伝わるが、ゲルが厚い場合は中心部でのゾル化が促進し、たる型の形状が顕著に現れると考えた。

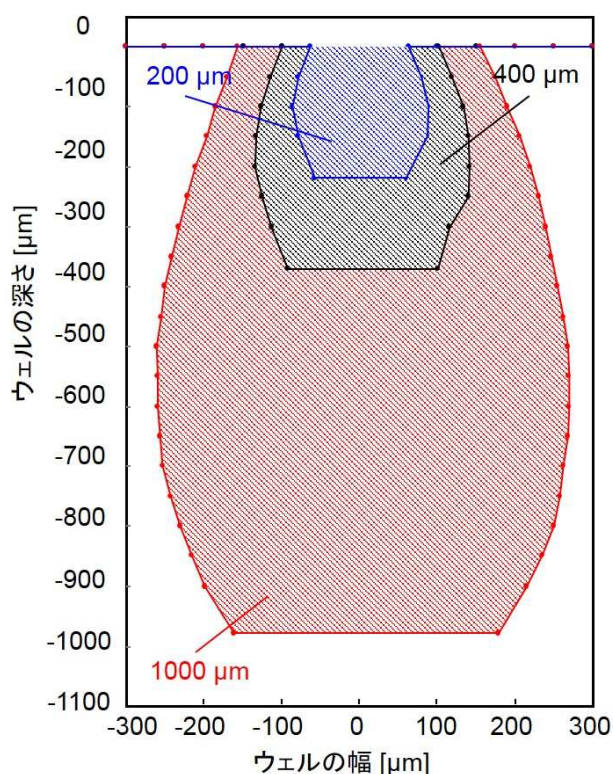


Fig.5.24 CNT 複合アガロースゲル層の厚み依存的なマイクロウェル形状断面プロファイル
(青: CNT ゲル層厚み 200 μm 、黒: 400 μm 、および赤: 1000 μm)

Table 5.5 CNT 複合アガロースゲル層厚みにおけるマイクロウェルの幅の変化

CNT ゲル層の厚み	200 μm	400 μm	1000 μm
上面の幅 [μm](a)	124	204	310
中心部の幅 [μm](b)	176	282	536
下面の幅 [μm](c)	126	198	312
b/a 値	1.4	1.4	1.7

以上の結果から、CNT 濃度と CNT 複合アガロースゲル層の厚みによって、ウェルのサイズ、形状の制御が可能であることを示した。

(2) ミクロ細胞組織体の形成

2 層アガロースゲル基板に NIR を照射するとマイクロウェルを形成出来ることがわかったので、HepG2 細胞によるスフェロイドの形成を試みた。HepG2 細胞は形成されたウェルにトラップされ、培養経過と共にウェル内で増殖していた。また、このスフェロイドは、マイクロピペットで優しく吸い上げることにより、容易に回収することが出来た (Fig.5.25 (A) ~ (D))。

ハイドロゲルのカプセルやブロックに細胞を包埋し、積み上げて組織を形成する手法

が数多く報告されているが^{27), 28)}、これらの手法ではハイドロゲルやカプセルが細胞と一緒に残ってしまうか、酵素による分解処理が必要である。本技術は、低侵襲な方法で組織体を回収できるため、細胞のみからなるスフェロイドを得ることが可能である。

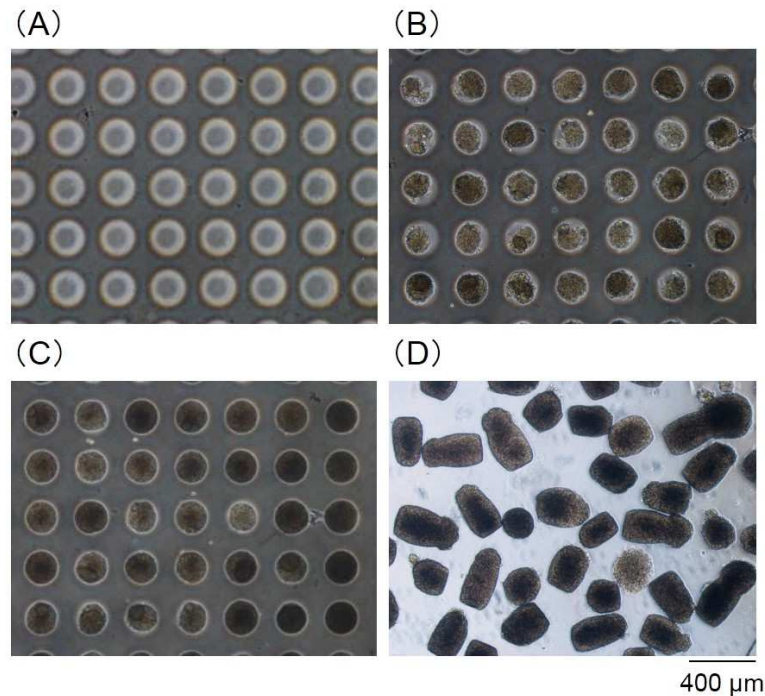


Fig.5.25 CNT 複合アガロースゲルを利用したマイクロ細胞組織体形成の過程(A)NIR 照射によって形成したマイクロウェル、(B)HepG2 細胞培養 3 日後、(C)培養 5 日後、および(D)培養 5 日目に回収した HepG2 細胞組織体

このときのスフェロイドの形状を評価するため、スフェロイドの長軸方向、及び短軸方向の長さを画像解析ソフトで測定した (Fig.5.26 (A)、(B))。同様に、細胞の入っていないウェルの幅・高さも画像解析ソフトで測定した。その結果、スフェロイドの短軸方向の長さはウェルの幅と、長軸方向の長さはウェルの深さとほぼ一致し、ゲル基板で形成されたスフェロイドは、ウェルいっぱいには増殖し、ウェルと全く同じ形状を形成していることがわかった。

これは、5.2 節、および 5.3 節で述べたように、アガロースゲルの高い物質交換性に起因しているものと考えられる。

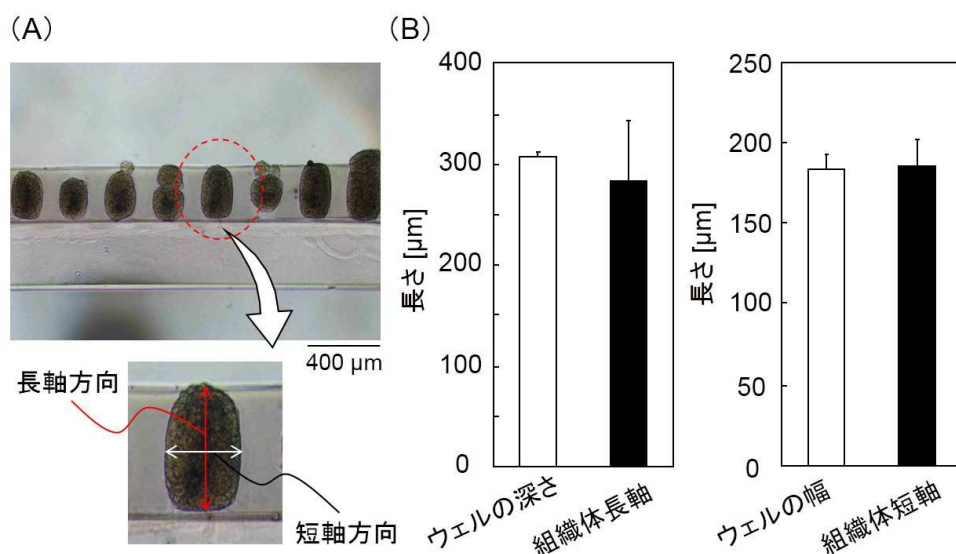


Fig.5.26 スフェロイドのサイズ評価(HepG2 細胞、培養 5 日目)(A)マイクロウェルに入った状態の HepG2 細胞組織体の断面写真、および(B)スフェロイドのサイズ評価²⁶⁾

(3) 様々なマイクロ細胞組織体の形成

本研究で用いている NIR 照射システムでは電動ステージの位置を制御出来るため、NIR の照射位置を任意に設定することが出来る。その点を活かして、ウェル形状以外の細胞組織体の形成を試みた。

まず、四角で囲むようにレーザーを照射した後、HepG2 細胞を播種すると、枠内で部分的にスフェロイドが形成された。その後、それぞれのスフェロイドが活発に増殖、融合して、培養 14 日目には四角のマイクロ細胞組織体を形成した。この組織体はマイクロピペット操作で簡便に回収することが可能であった (Fig.5.27)。

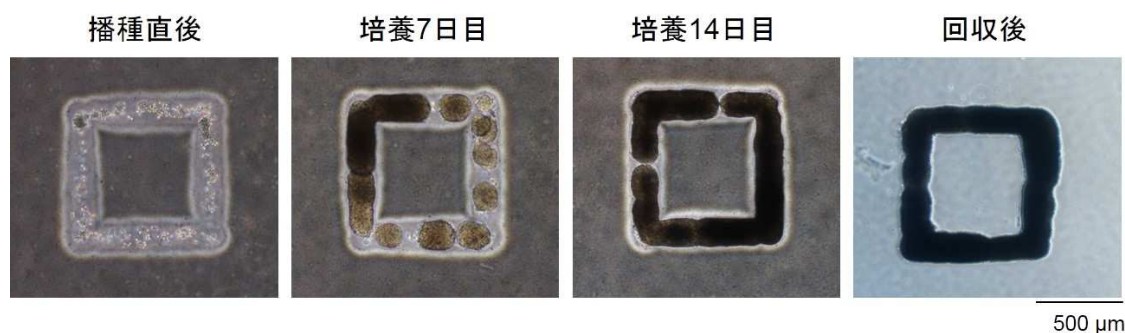


Fig.5.27 四角のマイクロ細胞組織体の形成²⁹⁾

さらに、段階的にレーザーを照射可能な利点を活かして、隣接するマイクロ細胞組織体の融合を試みた。まず、先程と同様に HepG2 細胞のマイクロ細胞組織体を形成させた後、培養 3 日目に、隣接する細胞組織体の間にレーザーを照射した (2 段階目のウェル)。このとき、レーザー照射前後で、カルセイン・PI による生死染色を行った結果 (Fig.5.28)、

レーザー照射部位に死細胞が観察された。レーザー照射によって発生した熱による影響を受けているものと考えられる。

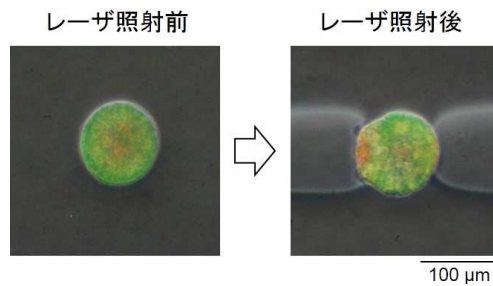


Fig.5.28 レーザー照射前後の生死染色(緑:生細胞、赤:死細胞)

しかし、HepG2 細胞組織体は徐々に 2 段階目のウェルに活発に増殖し、培養 9 日目には組織体同士がつながって棒状の組織体を形成した。培養 7 日目の組織体の断面を見ると、ひとつひとつの組織体が大きくなっていくと共に、徐々に下面から融合している様子が観察された。そして培養 9 日目にはくし型の組織体を形成した (Fig.5.29)。くしの歯の部分、CNT ゲル層の厚み (200 μm) より大きかったため、ウェルを超えて、細胞が活発に増殖していることがわかった。この結果から、独立したスフェロイドを形成出来るだけでなく、培養途中でマイクロ細胞組織体の形状を変更することが可能であることを示した。

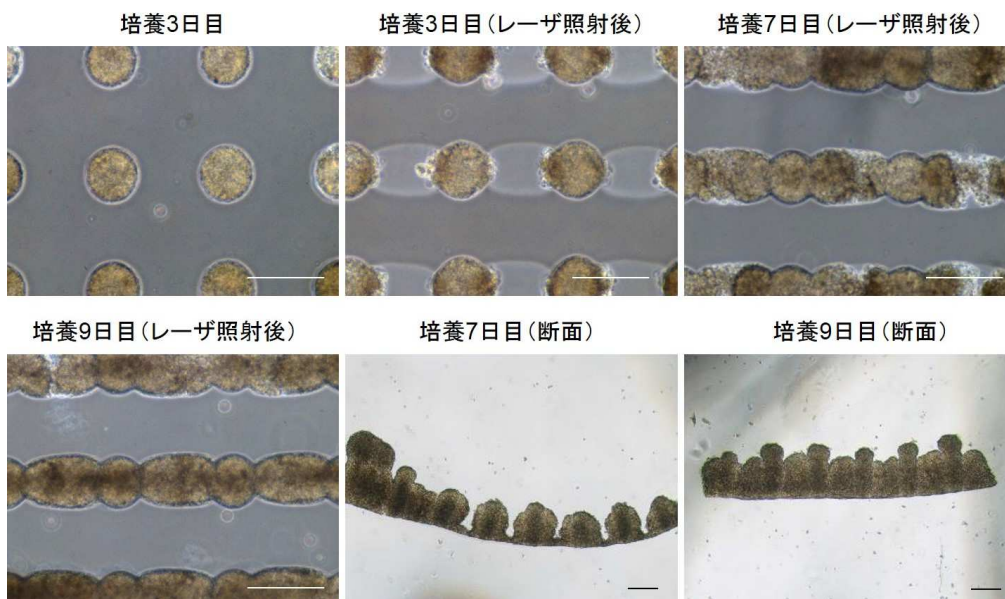


Fig.5.29 CNT 複合アガロースゲルを利用したマイクロ組織体融合(スケールバーは 200 μm)

(4) 共培養組織体の形成

さらに、2 段階目のウェルに異種細胞を播種することで、共培養組織体の形成を試みた (Fig.5.30)。まず、一段階目のウェルに NIH 3T3 細胞を播種し、NIH 3T3 細胞スフェロイドを形成させた。培養 7 日目に 2 段階目のウェルを形成して HepG2 細胞を播種し

たところ、播種直後ではお互いの細胞がそれぞれのウェルに分離出来ていた。培養を続けると NIH 3T3 細胞スフェロイドは初めの位置から動かず、かつ増殖も見られなかったが、HepG2 細胞が優先的に増殖して、マイクロ組織体を形成していた。この組織体は回収することが可能であった。

NIH 3T3 細胞は細胞密度が高くなると、増殖を停止することが古くから知られている（接触阻害）。Wada らはこの点に着目し、NIH 3T3 細胞を 20~120 μm 四方の細胞パターン上に播種し、単一細胞の形状を変化させた。このとき、細胞の形が丸くなることによって接触阻害のシグナル（Hippo signal）が活性化することを明らかにしている³⁰⁾。つまり、スフェロイド化して 3T3 細胞が密で丸い形状になって接触阻害と同様の現象が起これ、HepG2 細胞が優先的に増殖しマイクロ細胞組織体を形成していると考えられる。

以上の結果から、段階的にレーザーを照射することにより、異種細胞スフェロイドからなる共培養組織体を形成することが可能であった。本法は、生体類似構造の構築技術としてだけでなく、スフェロイド融合過程や三次元的なガン組織の浸潤機構の解明などへも展開できると期待できる。

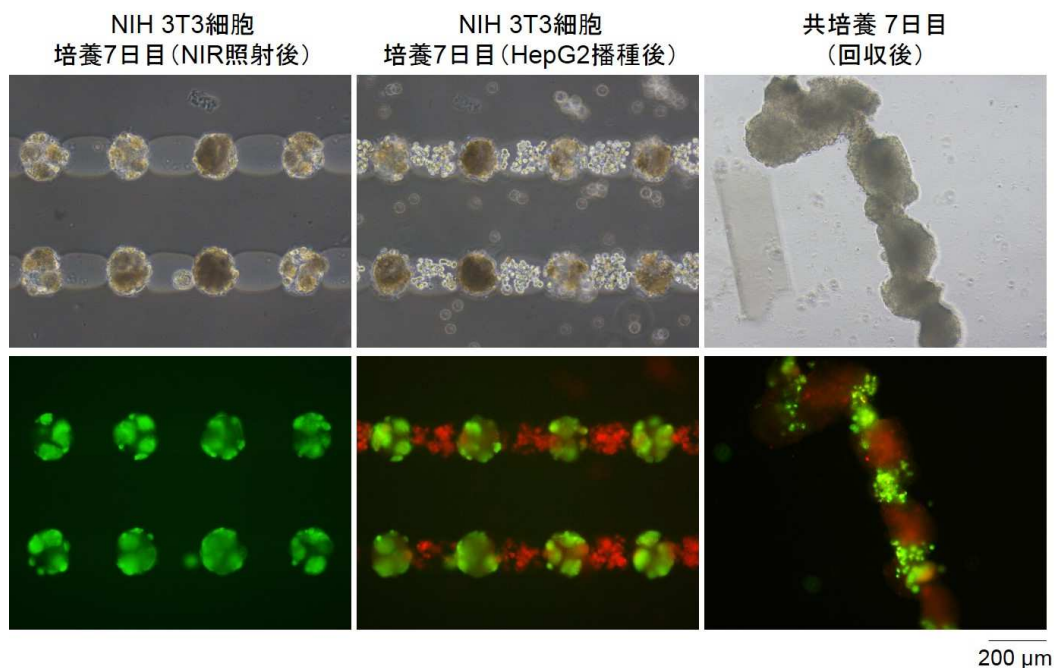


Fig.5.30 CNT 複合アガロースゲルを利用した共培養組織体形成過程

しかし今回は、HepG2 細胞のように増殖性の高い細胞種で主に検討を行っており、初期にウェルに入る細胞数が少なくても、スフェロイドやマイクロ組織体を形成した。

増殖性の劣る初代細胞を用いて生体類似構造を構築する際には、①播種エリアに細胞をトラップ出来る枠を設ける、および②マイクロ流路などを使って、ウェルひとつひとつに細胞を導入するなどの技術的な工夫や、①共培養、および②液性因子（ECM や増殖因子）の添加、といった生物学的な工夫を行うことによって、より効率的に組織の構築を実現できると考えている。

5.4.4 本節のまとめ

本節から、以下の結果を得た。

- (1) CNT 複合アガロースゲルと、CNT を含まないアガロースゲルの 2 層構造にすることにより、マイクロウェル構造を形成することが出来た。
- (2) マイクロウェルのサイズや形状を CNT の濃度や CNT 層の厚みで制御出来ることを示した。
- (3) このゲル基板に播種された細胞は活発に増殖してマイクロ組織体を形成した。
- (4) 段階的な NIR 照射を行うことで、組織同士の融合や異種細胞からなる共培養組織体の形成も可能であった。

本技術を用いることで、スフェロイドが形成出来るだけでなく、様々な形状の細胞組織体の形成、およびスフェロイド同士の融合が可能であり、生体類似構造の構築や、組織の融合過程などのメカニズムを知るためのツールとして期待できると考えられる。

5.5 本章のまとめ

以上の結果から、アガロースゲルが有する 3 次元的な網目構造により、酸素の透過性が良いため、マイクロウェル内の好気的な環境を維持していた。その結果、ラット初代肝細胞の高機能発現、および株細胞の活発な増殖を促していた。また、CNT 複合アガロースゲルとアガロースゲルの 2 層構造にすることにより、NIR 照射でマイクロウェルを形成することが出来た。厚みのある NIR 応答性ゲルを用いることにより、基板上に 3 次元的な構造を形成可能であることを示した。

参考文献

- 1) R. Z. Lin and H. Y. Chang, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, *Biotechnol. J.*, **3**, 1172–1184 (2008)
- 2) D. L. Elbert, Bottom-up tissue engineering, *Curr Opin Biotechnol.*, **22**, 674–680 (2011)
- 3) 日本再生医療学会監修, 組織工学, 朝倉書店, pp.148-177 (2013)
- 4) S. Y. Chou, P. R. Krauss and P. J. Renstrom, Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers, *Appl. Phys. Lett.* **67**, 3114-3116 (1995)
- 5) J. Fukuda, Y. Sakai and K. Nakazawa, Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing, *Biomaterials*, **27**, 1061-1070 (2006)
- 6) Y. Sakai and K Nakazawa, Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips, *Acta Biomaterialia*, **3**, 1033–1040 (2007)
- 7) T. Takezawa, M. Yamazaki, Y. Mori, T. Yonaha and K. Yoshizato, Morphological and immunocytochemical characterization of a heterospheroid composed of fibroblasts and hepatocytes, *J. Cell Science*, **101**, 495-501 (1992)
- 8) N. Koide, K. Sakaguchi, Y. Koide, K. Asano, M Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, T. Shinji, M. Mori and T. Tsuji, Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments, *Experimental Cell Research*, **186**, 227-235 (1990)
- 9) T. Yasui, M. R. Mohamadi, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi and Y. Baba, Characterization of low viscosity polymer solutions for microchip electrophoresis of non-denatured proteins on plastic chips, *Biomicrofluidics*, **5**, Article No. 044114 (2011)
- 10) J. Liu, T. Pan, A. T. Woolley and M. L. Lee, Surface-Modified Poly(methyl methacrylate) Capillary Electrophoresis Microchips for Protein and Peptide Analysis, *Anal. Chem.*, **76**, 6948-6955 (2004)
- 11) H. Bi, S. Meng, Y. Li, K. Guo, Y. Chen, J. Kong, P. Yang, W. Zhong and B. Liu, Deposition of PEG onto PMMA microchannel surface to minimize nonspecific adsorption, *Lab Chip*, **6**, 769–775 (2006)
- 12) 浦野哲盟, 線溶機序, *The journal of Japanese college of angiology*, **51**, 293-299 (2011)
- 13) Y. Hasebe, M. Akao, N. Okumura, T. Izumi, T. Koh, T. Seki and T. Ariga, Plasminogen activator/plasmin system regulates formation of the hepatocyte spheroids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 852-857 (2003)
- 14) Y. Hasebe, N. Okumura, T. Koh, H. Kazama, G. Watanabe, T. Seki and T. Ariga, Formation of rat hepatocyte spheroids on agarose, *Hepatology Research*, **32**, 89-95 (2005)
- 15) M. Akao, Y. Hasebe, N. Okumura, H. Hagiwara, T. Seki and T. Ariga, Plasminogen activator-plasmin system potentiates the proliferation of hepatocytes in primary culture, *Thrombosis Research*, **107**, 169-174 (2002)
- 16) T. H. Kim, W. M. Mars, D. B. Stolz, B. E. Petersen and G. K. Michalopoulos, Extracellular Matrix Remodeling at the Early Stages of Liver Regeneration in the Rat, *HEPATOLOGY*, **26**, 896-904 (1997)
- 17) G. L. Semenza, Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level, *PHYSIOLOGY*, **19**, pp.176–182 (2004)
- 18) R. Foresti, H. Goatly, C. J. Green and R. Motterlini, Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**, 1976-1984

- (2001)
- 19) P. J. Lee, B. H. Jiang, B. Y. Chin, N. V. Iyer, J. Alami, G. L. Semenza and A. M. K. Choi., Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia, *J. biological chem.*, **272**, 5375–5381 (1997)
 - 20) C. Chen, N. Pore, A. Behrooz, F. I. Beigi and A. Maity, Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1, *J. Biol.Chem.*, **276**, 9519–9525 (2001)
 - 21) F. Evenou, T. Fujii and Y. Sakai, Spontaneous formation of stably-attached and 3D-organized hepatocyte aggregates on oxygen-permeable polydimethylsiloxane membranes having 3D microstructures, *Biomed. Microdevices*, **12**, 465–475 (2010)
 - 22) T. Anada, J. Fukuda, Y. Sai and O. Suzuki, An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids, *Biomaterials*, **33**, 8430-8441 (2012)
 - 23) A. Pluen, P. A. Netti, R. K. Jain and D. A. Berk, Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels: Comparison of Linear and Globular Configurations, *Biophysical Journal*, **77**, 542–552 (1999)
 - 24) A. Guaccio, C. Borselli, O. Oliviero and P. A. Netti., Oxygen consumption of chondrocytes in agarose and collagen gels: A comparative analysis, *Biomaterials*, **29**, 484-1493 (2008)
 - 25) C. L. Randall, Y. V. Kalinin, M. Jamal, T. Manohara and D. H. Gracias, Three-dimensional microwell arrays for cell culture, *Lab Chip*, **11**, 127–131 (2011)
 - 26) 古賀晴香, 中澤浩二, 第1編 第3章 近赤外光を用いた細胞操作, *三次元ティッシュエンジニアリング最前線*, 株式会社エヌ・ティー・エス (in press)
 - 27) B. G. Chung, K. H. Lee, A. Khademhosseini and S. H. Lee, Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering, *Lab Chip*, **12**, 45–59 (2012)
 - 28) G. Eng, B. W. Lee, H. Pars, C. D. Chin, J. Schneider, G. Linkov, S. K. Sia and G. V. Novakovic, Assembly of complex cell microenvironments using geometrically docked hydrogel shapes, *PNAS*, **110**, 4551–4556 (2013)
 - 29) 古賀晴香, 中澤浩二, 第4章 第10節 光応答性ゲルを利用した細胞パターンニング技術, *ゲルテクノロジーハンドブック*, 株式会社エヌ・ティー・エス, pp.708-713 (2014)
 - 30) K. Wada, K. Itoga, T. Okano, S. Yonemura and H. Sasaki, Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers, *Development*, **138**, 3907-3914 (2011)

第6章

結論

6.1 本論文のまとめ

本研究で開発した「NIR 応答性アガロースゲル」は、NIR 照射という低侵襲な手法で、細胞を培養基板上で培養したまま基板の細胞接着／非接着性を変えることが可能な画期的な手法である。

光照射により細胞接着性をスイッチングする培養基板は様々あるが、主たる光源はUV または可視光であった。そこで本研究では、細胞への低刺激性、および基板の安定化を図るべく、NIR 応答性ハイドロゲルの開発、およびそれを用いた培養基板加工技術へ展開することを目的とした。NIR 領域に光熱交換性を示す CNT、または金ナノロッドをアガロースゲルに複合し、高い NIR 応答性を有するゲルを開発するとともに、段階的な細胞アレイ化技術、およびスフェロイド形成技術へと展開した。

第1章では、「生体類似構造を構築する」という本研究の大きな構想、既存の細胞アレイ化技術の課題を示すとともに、本研究の目的と NIR 応答性ハイドロゲルのコンセプトを示した。

第2章では、アガロースゲルに高い NIR 応答性を持たせるための分子ヒーターである CNT、および金ナノロッドの細胞への影響を検討した。CNT そのものを培養基板上に固定化しても細胞の増殖・活性には悪影響を及ぼさないことが明らかになった。また、金ナノロッド表面に PEG 修飾を施すことで、高い分散性・細胞親和性を示すことを明らかにした。

第3章では、本研究で使用した NIR 照射システムの詳細について延べ、第1章で示したコンセプトに基づき、分子ヒーターとアガロースゲルを複合した「NIR 応答性アガロースゲル」の開発を試みた。CNT、および金ナノロッド複合アガロースゲルの作製方法を確立し、そのゲル特性について評価した。複合ゲルは、アガロースゲルの細胞非接着性、ゾル化温度を維持し、かつ良好な NIR 応答性を示すことがわかった。また、CNT 複合アガロースゲル、または金ナノロッド複合アガロースゲルに NIR を照射したところ、照射部位のみゾル化し、ゾル化部位への細胞の接着を確認した。

第4章では、NIR 応答性アガロースゲルを用いた段階的細胞アレイ化技術の確立を目指した。段階的なアレイ化技術、および単一細胞の遊走現象の観察を行うことが出来た。さらに本技術の有効性を実証するため、初代肝細胞と線維芽細胞による共培養を行ったところ、それぞれの細胞をストライプ状に配置することが出来、共培養を行うことによって肝細胞の機能活性が向上・維持することを示した。

第5章では、NIR 応答性アガロースゲルを、今までの2次元的な細胞のアレイ化のみならず、マイクロ細胞組織体形成技術へと展開した。

アガロースゲルのマイクロ細胞組織体形成への影響を評価したところ、ゲルの高い物質透過性が、マイクロウェル内の酸素環境の改善に大きく寄与することが示唆された。また、CNT 複合アガロースゲルと、CNT を含まないアガロースゲルの2層構造にすることで、NIR 照射でマイクロウェルを形成することが出来た。この基板を用いて段階的にNIR を照射し、マイクロ細胞組織体の形状や配列を自由に制御出来ることを示した。

本研究で開発した NIR 応答性アガロースゲルは、CNT や金ナノロッドといった分子ヒーターをアガロースゲルと混合するのみで、高い NIR 応答性を付与することが出来る画期的な材料である。

また、二次元的(細胞レベル)な基板のみならず、三次元的(マイクロ細胞組織レベル)な構造を形成出来るため、単一細胞だけでなく、マイクロ組織体の自由な配置も可能であった。この技術を応用することによって、複雑な生命現象を、細胞レベルで読み解くための基盤技術、また、その知見を活かし、より三次元的な生体類似構造を模倣するための基盤技術として幅広い細胞操作へ発展出来る可能性を秘めている (Fig.6.1)。

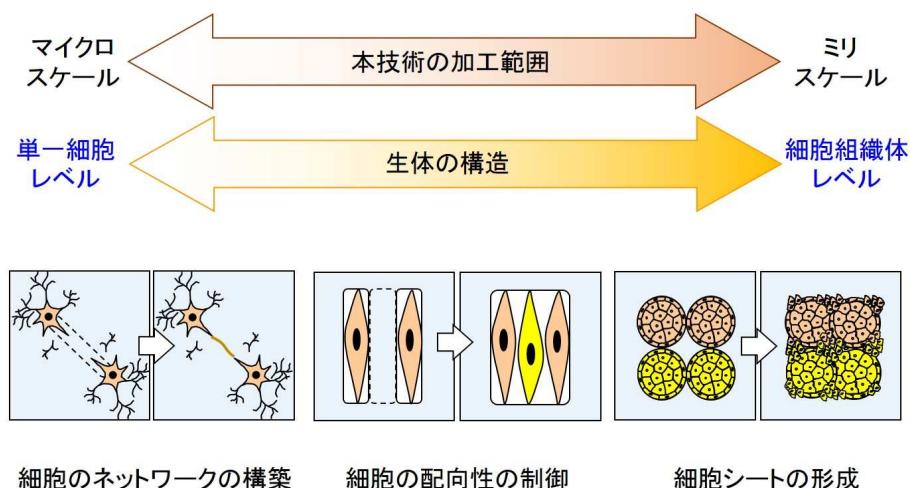


Fig.6.1 本研究のまとめ

6.2 今後の展開

本技術の改良すべき点として、材料の観点から見ると、分子ヒーターの分散状態でゾル化部位の分解能が左右されるため、化学修飾フラーレン、カーボンナノチューブ、グラフェンなどの機能性を有するカーボン材料や、その他の金属ナノ粒子を用いることで、ゲルの改良を試みる必要があると考えている。

また、操作方法の観点から見ると、マスクや鋳型を用いた手法に比べて時間がかかってしまうという点がある。もちろん、オーダーメイドにアレイ化出来ることが本技術の大きな特徴ではあるが、ある程度決まった形状は鋳型やマスクを使って大量に形成し、必要な部分は NIR 照射によって加工を施す「セミオーダーメイド」な手法を用いることにより、より高速化も期待できると考えている。

また、NIR 応答性アガロースゲルの具体的な応用展開として、細胞レベルのアレイ化技術、およびマイクロ細胞組織体レベルのアレイ化技術について、具体的に2つの技術への応用を提案する。

(1) 細胞レベルのアレイ化技術：選択的細胞剥離技術への応用

本技術では、ベースとなる水ゲルに細胞非接着性を示すアガロースゲルを用いた。しかし、先にも述べた通り、熱によってゲル→ゾル転移する水ゲルは多種多様であり、例えば細胞接着性水ゲルを利用すれば、接着している細胞を剥離させ、アレイ化することが可能になる (Fig.6.2)。このように、選択的に細胞を基板から回収できれば、必要な細胞のみを回収する、または基板上に残すことが出来る画期的な技術となりうる。

これまでに、コラーゲンゲルに CNT を複合した「CNT 複合コラーゲンゲル」の作製を試みているが、コラーゲンゲルのゾル化温度が安定していないため、45~50 °C 付近で容易にゾル化する水ゲルの探索を行う必要があると考えている。

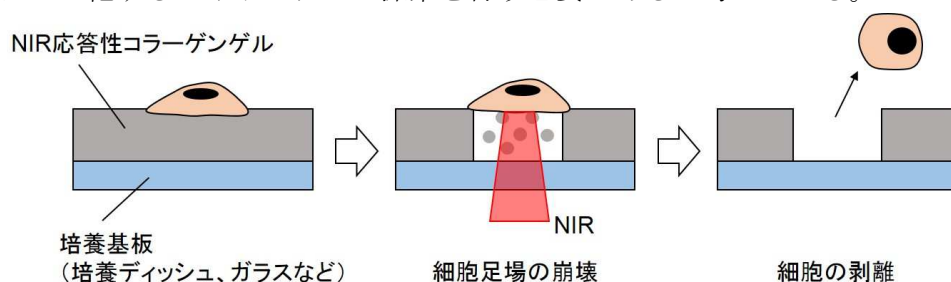


Fig.6.2 選択的細胞剥離技術への応用

(2) ミクロ細胞組織体レベルのアレイ化技術：複波長応答性ハイドロゲル基板

例えば、金ナノロッドは、そのロッドのアスペクト比で吸収波長が変わるため、吸収波長の異なるゲルを重ねることにより、階層的にゲルの構造を変化させることが出来ると考えた。この原理が達成できれば、自由な形状のスフェロイド形成、およびその回収をひとつの基板で行うことが出来ると考えた (Fig.6.3)。また、異なる波長に反応するゲルを重ねることによって、内部に空間があるような、より複雑な構造を模倣可能であることが期待できる。

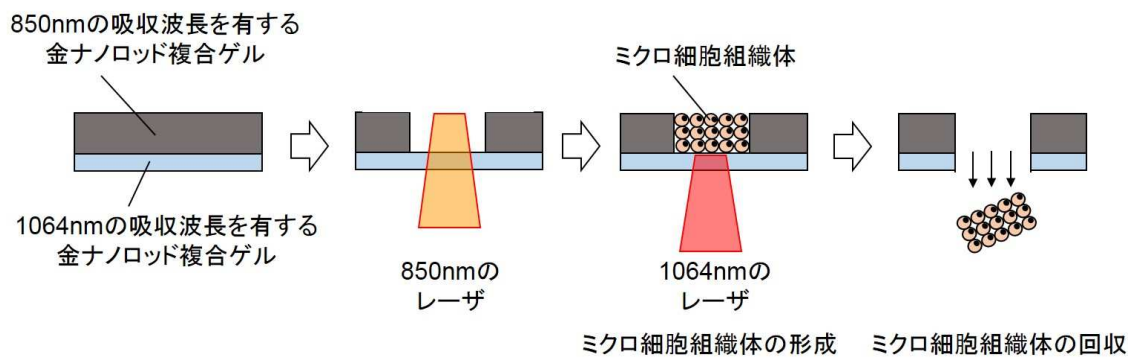


Fig.6.3 複波長応答性ハイドロゲル基板の、スフェロイド形成・回収一体化基板への応用

業績リスト

本研究は、以下の学術論文等に掲載された。

【主要論文】

- 1) Haruka Koga, Tsuyohiko Fujigaya, Naotoshi Nakashima, Kohji Nakazawa., Morphological and functional behaviors of rat hepatocytes cultured on single-walled carbon nanotubes, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **22**, 2071–2078 (2011) (査読有)
- 2) Haruka Koga, Takao Sada, Tsuyohiko Fujigaya, Naotoshi Nakashima, Kohji Nakazawa., Tailor-made cell patterning using a near-infrared-responsive composite gel composed of agarose and carbon nanotubes, *Biofabrication*, **5**, Article No. 015010 (2013) (査読有)
- 3) 古賀晴香, 新二日市沙織, 中澤浩二, NIR 応答性金ナノロッド複合アガロースゲルを利用した細胞パターンニング技術, *高分子論文集*, **71**, 479-481 (2014) (査読有)

【参考論文・解説等】

- 1) 古賀 晴香, 中澤 浩二, 幹細胞胚様体のパターンニング培養, *細胞*, **44**, 370-373 (2012)
- 2) Kohji Nakazawa, Yukiko Yoshiura, Haruka Koga, Yusuke Sakai., Characterization of mouse embryoid bodies cultured on microwell chips with different well sizes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **116**, 628-633 (2013) (査読有)
- 3) 古賀晴香, 中澤浩二, 光応答性ゲルを利用した細胞パターンニング技術, *ゲルテクノロジーハンドブック*, (株)エヌ・ティー・エス, pp.708-713 (2014)
- 4) 古賀晴香, 中澤浩二, 近赤外線を用いた細胞操作, *三次元ティッシュエンジニアリング技術最前線*, (株)エヌ・ティー・エス (印刷中)

謝辞

本研究の遂行のみならず、5年間の研究室生活において適切なご鞭撻を賜りました、北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科 中澤浩二 教授に深く感謝の意を表します。マイペースな自分に対しご苦勞も耐えなかったことと思いますが、温かく、時には厳しくご指導頂けたこと、これからの教育・研究者生活を歩んでいく励みになりました。

本論文の審査にあたり、副査をして頂きました、北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科 櫻井和朗 教授、同 エネルギー循環化学科 吉塚和治 教授、同 情報メディア工学科 高島康裕 准教授に心から感謝致します。厳しくも的確なご指摘を受けたことで、自身の考えの甘さを認識すると共に、研究をより深めることが出来ました。また、自身の研究分野ばかりを見ては気づかない新たな発見が多くあり、自身の視野が広がりました。

本研究を行うにあたり、CNT に関して様々なご協力を頂いた九州大学大学院工学研究院 中嶋直敏 教授、同 藤ヶ谷剛彦 准教授、同 佐田貴生さんに心から感謝致します。

また、お忙しい中公聴会にご出席頂いた、北九州市立大学国際環境工学部エネルギー循環化学科 秋葉勇 教授、同 今井裕之 講師、同 環境生命工学科 木原隆典 准教授に心から感謝致します。こんなに多くの先生方にご出席頂けると思っておりませんでした。厳しくも的確な質問を頂き、活発な公聴会となり、本論文を練り上げることが出来ました。

この大学生活の中で、北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科 森田洋 教授、同 エネルギー循環化学科 西浜章平 准教授をはじめとする本学の先生方、そして多くの学外の先生方との出会いや支えでここまでやってこれました。本当に感謝の気持ちで一杯です。

また、大学院における研究生生活においては、先生方のみならず、様々な方のご協力を頂きました。学部から修士までの6年間、研究への協力だけでなく、卒業後も精神面で多大なサポートをして頂いた飯野智絵さん、博士後期課程での生活面、精神面のみならず、時には研究のサポートをして頂いた本田隆志さんに心より感謝致します。

研究室に配属され、多くのことを先輩方から教わりました。堺裕輔さん、吉浦由貴子さん、吉田詩朗さん、浅田次郎さんに心から感謝致します。

また、研究室生活で多くの仲間に出会い、大きく支えて頂きました。同期であるコウキョウさん、田山慎二さん、浅岡聖美さん、頼りない先輩について来てくれた、堀之内裕太さん、原拓也さん、吉野陽文さん、エンイチタンさん、後藤優希さん、佐藤涼平さん、白木原愛さん、百武愛さん、谷口舞さん、吐合千秋さん、宮本大輔さん、森京貴志さん、林寛大さん、大野恭平さん、白水聡之さん、新二日市沙織さん、新口加奈子さん、高橋克洋さん、山内美紀さん、山口健太さん、横山英雄さんに深く感謝致します。

最後に、博士後期課程へ進学し、充実した研究生生活を送ることが出来たのは、家族の支えなしには不可能でした。生活面および精神面において全力を挙げて支えてくれた、私の家族に深く感謝します。

2015年3月 古賀晴香

