

方向性をもつ組織反応



Cytoskeletal organization in three fibroblast variants cultured on micropatterned surfaces.

微小形状パターンのある表面で培養した3つの線維芽細胞変異株における細胞骨格形成

JC Grew, JL Ricci.

Presented at the Sixth World Biomaterials Congress. Kamuela, HI.

May 15-20, 2000.

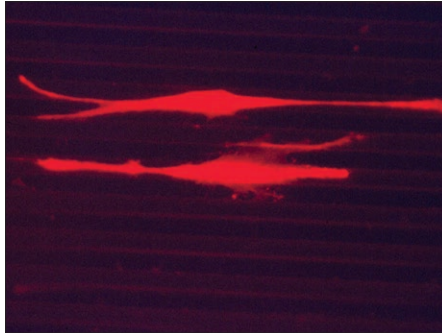


図1: 12μmのグループで培養した3T3-L1線維芽細胞。伸長した細胞の均一な配向性に注目

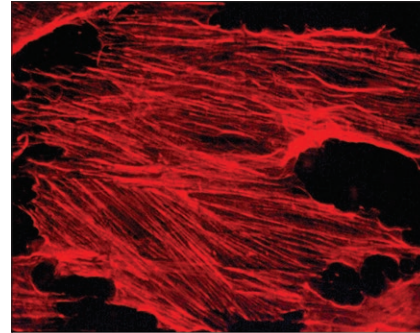


図2: 平滑面で培養したMC-3T3線維芽細胞

要約

**緒言:** インプラント表面形状および微小形状はインプラントに対する組織反応に影響を与える。合成基質の物理的・化学的特性は、培養された様々なタイプの細胞の形態、生理、行動に影響する。これまで、組織-インプラント相互作用の研究では、細胞付着、シグナル伝達およびその他の細胞反応メカニズムが重視されてきた。ミクロン単位の基質特性によって影響を受けた細胞特性には、細胞の形状、付着、移動、配向性および細胞骨格構築などが含まれる。我々はマウス線維芽細胞株の3つの表現型の変異株を用いて、細胞の形状、配向性およびマイクロフィラメント分布に与える基質の微小構造の影響について研究をおこなった。マイクロフィラメント組織は、細胞付着、有糸分裂、移動およびアポトーシスを制御する細胞シグナル伝達に付随して、細胞の形状および配向性を反映している。マイクロフィラメントの束(ストレス線維)は、培養基質に対し *in vitro* 細胞反応の一因となるアクチン関連タンパク、接着分子およびタンパクキナーゼのクラスターで終わっている。

**方法:** TiO<sub>2</sub> コーティングのマイクロテクスチャーを施したポリスチレンのインサートを入れた24穴のウェルプレートに、10%のNCS、1%の抗生物質を加えたDMEM培養地で、NIH-3T3線維芽細胞、3T3-Li線維芽細胞(ATCC、ヴァージニア州マナッサス)およびMC-3T3線維芽細胞(JP O'Connor氏による寄贈)を培養した。培養基質には8μmもしくは12μmの平行な溝、3μmの直角方向の溝によって分離されている3×3μm<sup>2</sup>の正方形の柱、あるいは特徴無し(コントロール)のものを使用した。10,000個の細胞を、インサートを入れているウェルの中に播種し、1日後、走査電子顕微鏡(SEM)用の標本作製とローダミン-ファロイジン染色をおこなった。

**結果:** 3T3線維芽細胞の3つの変異株全てが1日以内に全ての基質に付着した。コントロールの表面の培養細胞に顕著な配向性もしくは形状はなく、いくつかの細胞質には、明らかに焦点性癒着で終結するストレス線維のランダム配列がみられた。8μmあるいは12μmの溝をつけた基板上で培養した全細胞株のほぼ全ての細胞が、溝の頂上もしくは底で溝に並行に増殖、伸長し、配向していた(図1)。8μmの溝で培養した細胞は12μmの溝のものより頻りに溝を乗り越えて増殖していた。溝のある表面で1日培養した細胞でストレス線維形成を示すものは、どの細胞株にもほとんどみられなかった。溝を格子状につけた基質上で培養した細胞の多くには、柱の上で終結するストレス線維がみられた。この線維は中央の細胞質塊から直角に伸張し、突起した柱の頂上で終結する過程で構築された星状構造をもつと推察される(図1)。本所見は、我々が過去におこなった柱様基板上の培養NIH-3T3細胞の所見と同様であった。SEMでは3T3変異株に対する基質の細胞形状効果と細胞配向効果を確認した。

**考察:** 平行溝ならびに交差溝が、3T3線維芽細胞の3つの表現型分散株の細胞の形、配向性、細胞骨格構造を決定づけることが、本実験から明らかとなった。NIH-3T3変異株は線維形成株であるが、3T3-L1変異株は脂質合成をしており、またMC-3T3変異株は骨原性である。こうした細胞の表現型の分析を、アルカリ性ホスファターゼ分析(MC-3T3細胞はアルカリ性ホスファターゼ陽性)およびSudan Black B染色(3T3-Li細胞の脂質封入に対する染色)によっておこなった。上記のコンタクトガイダンスにおける細胞外基質および細胞接着分子の役割特性は明らかにならなかったが、今後のテーマではある。我々は以前、インテグリン分散およびチロシンキナーゼ活性がマイクロメトリック基質の特性による物理的に抑制されていることを明らかにした。同様の抑制が本稿で述べた細胞の中でも起こっていると仮定される。インプラントに対する組織応答を指示する細胞株における表現型の相違の解明が、インプラントの結合改善と延命に有益となるかもしれない。

謝辞: 本論文はNSFの助成金SBIR-9160684およびDUE-9750533、ならびにNJCU・SBRの助成金220253を受けた。微小形状の鑄型はCornell Nanofabrication Facilityにて製作した。