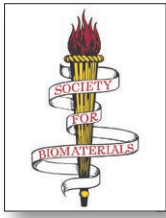


方向性をもつ組織反応



Cytological characteristics of 3T3 fibroblasts cultured on micropatterned substrates.

微小パターンをもつ基板上で培養した 3T3 線維芽細胞の細胞学的特徴

JC Grew, SR Frenkel, E Goldwyn, T Herman, JL Ricci.

Presented at the 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials.

April 22-26, 1998. San Diego, CA.

要約

緒言: 組織-インプラント相互作用は完全には解明されていないが、インプラントの表面形状および微小形状は細胞反応に影響する。合成基質の物理的・化学的特性は様々なタイプの培養細胞における形態、生理および行動に影響する。これらの詳細が *in vitro* においてようやくわかりはじめた。平滑な基板上で培養した細胞と、ミクロン単位の表面規則性をもつ基板上で培養した細胞間では、形態、付着、遊走、方向および細胞骨格構成が異なる。我々はマウス線維芽細胞の形状、方向、ならびにマイクロフィラメントと接着斑の分布 — 基板の微小形状に影響するコンタクトガイダンスおよびその他の因子の関連パラメータについて研究をおこなった。マイクロフィラメントの構造は細胞形状および配向性を反映するのみならず、細胞付着、有糸分裂、遊走およびアポトーシスをつかさどる信号変換体系にも重要である。マイクロフィラメント束はアクチン関連タンパク質、接着タンパク質、信号変換機能をもつプロテインキナーゼの集合体で一単位となる。我々は、(1) マイクロフィラメント/張線維、(2) 接着斑分子、(3) 細胞付着に関連する主要キナーゼ生成物のホスホチロシンなどの分布に関して分析をおこなった。

方法: 1cm² のマイクロテクスチャー加工インサートの入ったマルチウェルプレート内で、冷凍保存株の 3T3 線維芽細胞(メリーランド州ロックヴィル、ATCC 社) を 10%FBS 含有 DMEM で培養した。インサートはシリコン型で溶媒キャストされたポリスチレンで構成され、酸化チタンコーティングされている。表面は、8μm の平行の溝、12μm の平行の溝、3μm² の柱(3μm の溝が直角に交わることで作られた突起)、あるいは特徴無し(コントロール群)とした。インサートを入れたウェルに 4,000 の細胞を播種し、4 日または 8 日間の培養をおこなった。細胞は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察をした。また、(1) ローダミン - ファロイジン、(2) マウス抗タリン / マウス抗ピンキュリンと抗マウス - ローダミン抗体、(3) 抗ホスホチロシン - フルオレセイン抗体のいずれかを用いて細胞染色をおこなった。

結果: 3T3 細胞は培養 4 日までに全基板上に付着し、8 日までにはかなり増殖した。ところどころ重なり合う細胞もみられた。コントロール群の表面上で培養した細胞には顕著な配向性や形状の特性はなかった。その細胞質にはローダミン染色の拡散がみられ、明らかなストレス線維はなかった。接着斑およびホスホチロシンは拡散分布していた。8μm あるいは 12μm の溝がある基板で増殖した細胞は溝に沿ってほぼ均一な配向がみられた。8μm 溝では培養細胞はほとんどが溝の頂部で増殖しており、溝を超えてまたがっているものも多かった。12μm 溝の培養細胞は主に溝の頂部もしくは溝内で増殖しており、隣の溝の頂部にまたがって増殖しているものは少なかった。どちらの溝でも 8 日間培養した細胞の中には、ストレス線維の限局した痕跡を示すものもあった。接着斑とホスホチロシンは細胞と基板の接触面部位に限定されており、溝から溝にまたがる細胞の一部分は接着斑とホスホチロシンが欠如していた。柱様表面の培養細胞では、柱の間を交差する溝に沿うようにマイクロフィラメントの直交配列がみられたものの、ストレス線維は観察されなかった。これらの細胞は柱の頂上に留まるか表面に定着し、基底面に限ってマイクロフィラメント束の分布がみられた。SEM からは、基底細胞膜表面の柱の貫通と、柱周囲への細胞含有物の定着が明らかであった。接着斑とホスホチロシンも同様に分布していた。

考察: 本実験では、平行あるいは直行の溝が 3T3 線維芽細胞の接着斑の形状、方向、細胞骨格形成および分布に影響を与えることが確認されたが、ラット腱線維芽細胞への効果に関する我々のこれまでのデータを発展させる結果となった。これらのプロセスを誘導する細胞外基質の役割は、明らかにはなっていないものの、考察の必要がある。基質の物理特性によってキナーゼ活性が制限される発見は新規であり、基質に対する反応は、細胞の種類によって異なるメカニズムであることが明らかになった。我々は、インプラントの結合の促進と機能の延命に関わるそれぞれの細胞特性のうちの表現型について、それらの相違を発見することを目標としたい。

謝辞: 本研究は、全米科学財団 SBIR フェーズ I 助成金 #9160684 およびジャージー市州立大学 SBR 助成金 #220251 を受けている。微細構造の鋳型は Cornell Nanofabrication Facility にて製作した。