

細胞の配向性および組織化



Effects of surface microgeometry on fibroblast shape and cytoskeleton.

繊維芽細胞の形状と細胞骨格に対する表面微小形状の効果

JC Grew, JL Ricci, AH Teitelbaum, JL Charvet.

Presented at the 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials.
April 30-May 4, 1997. New Orleans, LA.

要約

緒言：表面微小形状は組織-インプラント相互作用に影響を与えるが、その作用は殆ど明らかとなっていない。細胞のコンタクトガイダンス、つまり表面微小形状に対する組織反応は、細胞の増殖およびその他の行動に大きく影響する。例えば、溝を付与した表面においては、溝の深さおよび幅の最低限度は細胞の形状と配向性ならびに増殖方向に影響を与える範囲でなければならない。細胞の付着、形状および配向性が細胞骨格形成に影響しているが、このような細胞骨格形成は微小形状効果によるものと考えられる。我々は、様々な表面微小構造をもった模擬生体材料上で培養した線維芽細胞の特性を調べた。ヒト線維組織の細胞はインプラントに接触する最初の細胞になることを踏まえ、実験ではラット腱線維芽細胞 (RTF) を用いておこなった。インプラントの線維性被包化は表面粗さ及び微小形状によって起こる。粗面化により被膜は薄く成長するため、骨細胞・骨組織とインプラントとの接触がより緊密になり、インプラントの結合が改善される。

方法：後足の伸筋腱から得られた保存培養の RTF を、平滑 (コントロール)、 $2\mu\text{m}$ または $12\mu\text{m}$ の平行直線の溝、あるいは $3 \times 3\mu\text{m}$ の溝で分断された 8×50 もしくは $80 \times 50\mu\text{m}$ のダイヤモンド形状の表面を持つポリスチレン基板上で培養した。基板はシリコンの鋳型で溶媒キャストし、酸化チタンでコーティングしたものを用い、この 15mm のそれぞれの円形抜き型の基板を 24 個のウェルプレートに入れ、20,000 個の RTF を播種した。培養 4 日および 8 日で細胞を固定した。ローダミン-ファロイジン、ならびに抗ピンキュリンの後にフルオレセイン合成二次抗体にて細胞を染色し、細胞形態を走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察・記録した。

結果：平滑基板ならびに微小形状基板で増殖した RTF の配向および形状は常に異なっていた。培養細胞の増殖方向は、平滑基板ではランダムになる傾向があったが、微小形状基板では総じて直線の溝ならびにダイヤモンドの長い辺の方向と一致していた。 $2\mu\text{m}$ の溝ならびにダイヤモンドパターンの基板上で増殖した RTF はパターンの盛り上がった部分に多く、直溝をまたいで付着していた。 $12\mu\text{m}$ の溝で培養した RTF は溝内およびダイヤモンドパターンの両方で増殖しており、溝をまたいでいるものはほとんどなかった。大きいダイヤモンドパターンの表面で培養した RTF は盛り上がった部分での増殖が多かった。平滑基板で培養した RTF は概ね円形で左右対称になっており、中央の細胞集団から全方向に短突起を伸ばしていた。直線溝の基板上で培養した RTF はほとんどが紡錘状になり、狭い溝 (2 または $3\mu\text{m}$) をまたいでいる時、もしくは溝の壁 ($12\mu\text{m}$ の溝) と側面接触をする時のみ、溝に対して直角に突起を伸ばした。基板の微小形状はマイクロフィラメントの束 (ストレス線維) の形成にも影響を与えた。ストレス線維は微小形状基板上の培養 RTF における配向の主な方向と一致していた。平滑基板の培養 RTF では、様々な角度で細胞質いっばいに広がるマイクロフィラメント束がみられた。免疫蛍光顕微鏡観察で明らかに、全ての細胞内においてマイクロフィラメント束の末端にピンキュリンが存在した。これは、細胞-基板付着の位置が焦点付着と一致することを示唆している。

結論：本研究では直線およびダイヤモンドのパターンにおける線維芽細胞の配向性と細胞骨格形成への影響が示され、これまでに観察されてきた細胞形状変化や方向性の増殖という、基板の微小形状によるコンタクトガイダンス効果が表された。 $3 \sim 10\mu\text{m}$ 幅の RTF は、 2 および $3\mu\text{m}$ の溝をまたいでいることが多かったことから、細胞成長の最適化には、表面の特徴をさらに絞り込む必要性を示唆している。今回の結果は、コラーゲンゲル中に細胞を懸濁させて作製した「ドット」培養に関する今までの報告とは異なっており、培養細胞の微小形状効果はドット培養より播種培養の方が小さいと思われる。増殖するドット培養細胞は基板表面でかなりの距離を移動している可能性が高い。このように溝は、定着する播種培養細胞より、移動するドット培養細胞に対して重要なガイドの役割をしている可能性がある。特に基板への細胞付着モデルを用いた比較実験の継続によって、パターン化された基板上の細胞挙動の知識が深まるであろう。例えば、組織-インプラント界面における線維組織増殖の割合および方向をコントロールすることが可能となれば、インプラントの安定性が最適化されるであろう。

謝辞：本研究は NFS SBIR フェーズ I の助成金 #9160684 によっておこなわれた。微小形状の鋳型は Cornell Nanofabrication Facility にて製作した。