細胞凝集体のジオメトリ制御 —三次元セルラー・インテグレーションのための トロイダル細胞凝集体の形成法—

Geometry Control of Cellular Aggregate

- The formation method of toroidal multicellular aggregates for Three-dimensional cellular integration -

○ 武井 菜月 (名古屋大) 正 益田 泰輔 (名古屋大)
正 中野 琢磨 (名古屋大) 正 新井 史人 (名古屋大, ソウル大)

Natsuki TAKEI, Nagoya University, t-natsuki@biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp

Taisuke MASUDA, Nagoya University

Takuma NAKANO, Nagoya University

Fumihito ARAI, Nagoya University, Seoul National University

We have developed a novel multicellular aggregate (spheroid) formation device that utilizes a maskless grey-scale photolithography. The device was capable of producing hundreds of aggregates rapidly at a time and regulating the diameter of aggregates with complex design. The cellular aggregates have a micro-pore to supply the growth factor and to expel the waste product. As a result, the cellular aggregates (toroidal) enable long-term culture. In addition we can use micro-pore as continuous channel and insert vascular system and nerve system into assembled tissue. These characteristics of the device suggest that it has the potential for use in a wide variety of applications, such as bio actuator, drug screening and tissue engineering.

Key Words: Cell manipulation, Tissue engineering, 3D culture, MEMS

1. 緒言

1.1 背景

次世代培養方法として注目される三次元培養は、これまでもコラーゲンゲル包埋培養[1]、遠心培養[2]、スフェロイド形成培養[3, 4]、三次元担体培養[5]など多数提案され、その必要性の高さがうかがわれる。しかし、様々な培養技術が提案されているなか[6-8]、血管網が豊富で複雑な構造の組織を構築する確固たる技術がないのが現状である。我々は、それら複雑な組織の再構築に必要な条件を①細胞への酸素・栄養分の効率的な供給、②細胞の高密度で均一な分布、③生理的な環境と類似する位置と配向、④自己組織化と生理機能の維持の4つであると考えている。本研究では、その1つである細胞への酸素・栄養分の効率的な供給および老廃物の除去に着目した。これまで報告されている細胞凝集体の多くは、直径200 μm を超えると培地の供給および老廃物の除去ができずにスフェロイド中心部において細胞が壊死することが知られている[3, 9]。そこで本研究では、スフェロイド中心部を培地の供給や老廃物の除去を行うために開放したトロイダル形状の細胞凝集体を作製することを目的とする。また、この細胞凝集体を三次元的にアセンブリし、電源装置が不要で生体適合性の良い自律駆動型バイオアクチュエータへの応用を検討する。

1.2 細胞凝集体の作製コンセプト

トロイダル形状細胞凝集体作製コンセプトを図1に示す。まず、微細加工技術により、U字底に1本のマイクロポストを有する形状を持つ細胞非接着性のトロイダル形状細胞凝集体形成ウェル(培養ウェル)を作製しアレイ化させる。培養細胞をウェル内に一定期間培養すると、培養ウェル表面が非接着性のU字底となっているため、細胞はマイクロポスト周辺に集積し、細胞凝集体が形成される。最後に、培養ウェルから細胞凝集体を形状を維持したまま回収する。以上の手順により、中心孔を有するトロイダル形状細胞凝集体が作製さ

れる。作製したトロイダル形状細胞凝集体は、中心孔の方向性を制御し三次元的にアセンブリすることで、血管系や神経系の導入を含めた機能性を有する移植組織の再構築を目指し、組織工学・再生医療などへの応用が期待できる。

Fig. 1 Design concepts of three-dimensional multicellular aggregates.

2. 材料および実験方法

2.1 トロイダル形状細胞凝集体形成培養デバイスの作製

培養ウェルの作製には、三次元微細加工技術を用いる必要がある。本研究では、グレイスケール露光[10-12]を行った。しかし、グレイスケールマスクは非常に高価であり作製パターンの設計変更が容易に行えない。そこで、マスクレス露光装置[13, 14]を併せて用いることにより、グレイスケールのラピッドプロトタイピングを可能にした。

また、露光データを作製するに当たり培養ウェルの大きさを決定する必要がある。今回作製するトロイダル形状細胞凝集体には血管などがいないため、酸素や栄養の供給は周囲の培地や組織からの拡散によって受けなければならない。そこで、細胞凝集体の大きさによる生存限界を考慮して培養ウェルの大きさを決定することとした。本研究では、Fick の方程式を用いた酸素の拡散を考えることにより、細胞の生存限界値を概算した[15, 16]。トロイダル形状の小円の半径を r_0 、トロイダル形状の中心から小円の中心までの距離を R とする。位置 r における拡散を考える。このトロイダル形状の表面積は $4\pi^2 rR$ なので、表面を通過して内側の組織に流れ込む酸素量は、Fick の第一法則より、

$$4\pi^2 rR J_r = -D \frac{\partial C}{\partial r} \quad (1)$$

この式で、 J_r は酸素の流束、 D は拡散係数、 C は位置 r における酸素濃度である。

位置 r にある単位面積を通過して、内側に流れ込む酸素量は $-J_r$ である。一方、単位体積中の細胞の酸素消費速度を m とすると、小円半径 r 、大円半径 R のトロイダル形状の体積は $2\pi^2 r^2 R$ と表わされるので、この凝集体による酸素消費量は、

$$(\text{酸素消費量}) = m2\pi^2 r^2 R \quad (2)$$

で与えられる。平衡状態では、この両者が等しいので

$$4\pi^2 rR D \frac{\partial C}{\partial r} = m2\pi^2 r^2 R \quad (3)$$

が得られる。細胞凝集体表面 $r=r_0$ の酸素濃度を P_e とし、この境界条件で式 (3) の微分方程式を解くと次式が得られる。

$$C - P_e = \frac{m}{4D} (r^2 - r_0^2) \quad (4)$$

細胞凝集体中の酸素濃度 C が負になることはない、すなわち凝集体中心 $r=0$ でも酸素濃度 $C_{r=0} > 0$ である。すなわち、

$$r_0 < \left(4P_e \frac{D}{m} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

が成り立つ。ここで

$$\begin{aligned} \text{周囲の組織の酸素濃度: } P_e &= 0.47 \times 10^{-4} \text{ mmol/cm}^3 \\ \text{細胞凝集体中の酸素の拡散係数: } D &= 1.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec} \\ \text{細胞凝集体の酸素消費速度: } m &= 1.2 \times 10^{-5} \text{ mmol/cm}^3 \cdot \text{sec} \end{aligned}$$

の値を式 (5) に代入し、細胞凝集体の小円の半径を評価すると、トロイダル形状断面の小円の半径が $r_0 < 148 \mu\text{m}$ 未満であれば、トロイダル形状全体の大きさに依存せず中心部の細胞まで細胞が行き渡るとわかった。このことより、今回作製する培養ウェルは U 字底一杯に細胞凝集体が形成されても生存限界値を超えないように、U 字底の幅を $300 \mu\text{m}$ とし、培養ウェルの深さについても同様に考え $300 \mu\text{m}$ と設計した。

ウェルモルドの作製において、フォトレジストはネガ型の SU-8 3050、G 線感光型（化薬マイクロケム）を使用した。また、用いる露光データは上述の設計値通りとなるようにグレイスケールキャリブレーションにより導き出された結果を用いて作成した（図 2）。

以下に今回作製した培養デバイスの作製プロセスを示す（図 3 左）。まず、ガラス基板上にフォトレジストを膜厚 $300 \mu\text{m}$ 程度で塗布し、基板裏面から最大露光量 700 mJ/cm^2 でマスクレス・グレイスケール露光を行った。次に、ホットプレートにより 95°C で 1 分間ポストエクスポージャーバイクし、PM シンナーを用いて 10 分間現像したのち、PDMS (poly (dimethylsiloxane)) に転写しアレイ化した培養ウェルを作製した。これをチャンバー底面にした培養デバイス（図 3 右）を作製し、三次元細胞凝集体の形成実験を行った。

2.2 トロイダル形状細胞凝集体の作製

PDMS 培養デバイスの表面は 3 % Pluronic (F-127) で 6 時間インキュベートし、細胞非接着処理を行った[17]。細胞試料は分化誘導することにより、自律拍動する心筋に分化するマウス胚性癌腫細胞株 P19CL6 を用いた[18-20]。細胞凝集体形成実験は、 37°C 、5 % CO_2 の環境下で行い、MEM α (10 % FBS, 1 % penicillin/streptomycin) に 5.0×10^4 , 1.0×10^5 , 5.0×10^5 , 1.0×10^6 cells/chamber の 4 種類の濃度で細胞を播種し、リアルタイム培養観察システム (CCM-MULTI, アステック) を用いて 6 時間の観察を行った。また、P19CL6 を自律拍動する心筋に分化させる分化誘導剤である DMSO の濃度を変えて 0.5, 1.0, 1.5 % の 3 つの条件で、細胞数を 5.0×10^5 cells/chamber で一定とし分化誘導実験を行った。3 日間培養後、細胞の生存率と細胞形態を確認するために Live/Dead 染色と DAPI 染色を施し、蛍光観察を行った。

3. 実験結果および考察

グレイスケールキャリブレーション結果をもとに、最適なマイクロポスト形状を得るための露光データを作成し、液晶露光装置を用いて三次元微細加工を行った。図 4 に PDMS 転写前の培養ウェルのフォトレジストパターンとその表面形状を段差計で計測した結果を示す。図 4 に示されるように $300 \mu\text{m}$ 厚のレジスト膜にグレイスケールパターンを得ることができた。また、段差計による表面形状測定においても、マイクロポストが十分な高さを有すること、そして、U 字底の幅や深さがほぼ設計値通りであったことが確認された。同様の結果は、PDMS に転写させた培養チャンバー断面の SEM 像からも確認され（図 5）、培養デバイスとして目的の形状を十分に達成できた。

Fig. 2 Calibration result and maskless photolithography pattern.

1) Coating

SU-8(GLine) 600rpm
Glass substrate

2) Exposure from backside
Exposure light (Max:700mJ/cm²)

3) Development

4) Transcribing onto PDMS

PDMS
(polydimethylsiloxane)

three-dimensional multicellular
aggregate formation device

Fig. 3 Formation process for three-dimensional multicellular aggregate formation device.

Fig. 4 Photo image and shape measurement of resist pattern made with maskless grey-scale photolithography.

Fig. 5 SEM cross-sectional image of three-dimensional multicellular aggregate formation device.

作製した培養デバイスを用いて P19CL6 細胞を 6 時間培養した結果、 5.0×10^5 cells/chamber 以上の濃度で細胞凝集体の形成が確認され、細胞はマイクロポスト周囲に巻きつくように集積し自己で凝集体を形成していく様子が観察された (図 6)。一方、 1.0×10^5 cells/chamber 以下の細胞数では、近くの細胞同士で凝集しあい小さなスフェロイドが形成されることがわかった。形成までにかかった時間は平均 3 時間 10 分であった (図 7)。また、細胞凝集体形成までの時間は播種した細胞の数によらず、ある細胞数以上であればほぼ一定であることがわかった。これは、培養ウェルにおけるトロイダル形状細胞

Fig. 6 Effect of the formation process of toroidal cell aggregates by cell number.

胞凝集体の形成が細胞数の支配する程度に起因し、その形成までにかかる時間は細胞間の相互作用、例えば、細胞外基質の合成および分泌に依存することが示唆される。

染色結果より作製した細胞凝集体では 95 % 以上の細胞が生存しており、効率的な酸素・栄養分の供給、老廃物の除去により従来のスフェロイド培養の細胞壊死を回避できていることが確認でき、トロイダル形状細胞凝集体の有用性を確認することができた (図 8-A, B)。また、この細胞凝集体の回収を行った。今回作製した培養デバイスには非接着処理が施されており、かつマイクロポストにテーパーがかかっているため、培養デバイスを天地反転することで容易に培養デバイスから取り出せた。その結果、回収した細胞凝集体は崩壊することなくトロイダル形状を維持することが確認された (図 8-C)。

本研究では自律駆動型細胞凝集体の作製を視野に心筋の分化誘導実験を検討したが、本実験結果から分化誘導または自律拍動は確認できなかった。また、市販されている三次元スフェロイド培養容器は、スフェロイドが底部に固着せず不安定な浮遊した状態で凝集するため、培地交換が困難であった [3]。それに対して今回提案するトロイダル細胞凝集体形成デバイスは、マイクロポストに凝集体が引っ掛かり安定した状態でチャンパー内に保持できるため、培地の交換および試薬投与などの操作性が格段に改善することができた。

Fig. 7 Effect of the formation time of toroidal cell aggregates by cell number. [N = 3]

Fig.8 A) Fluorescent microscope image of "Toroidal" cell aggregates with Live/Dead, B) with DAPI, C) phase-microscopic image of "Toroidal" cell aggregates recovered from the culture device.

4. 結言

トロイダル形状の細胞凝集体形成技術を提案し、細胞の生存限界を考慮した大きさの細胞凝集体培養ウェルを作製した。培養ウェルは、マスクレス露光装置を用いることにより高価なグレイスケールマスクを用いることなく作製でき、トロイダル形状細胞凝集体を形成するにあたり十分な三次元微細形状を得ることができた。そして、培養デバイスをを用いて細胞を培養し、トロイダル形状細胞凝集体を作製した。現行の三次元スフェロイド培養の問題点である酸素または栄養分の供給不足・老廃物の排出不全が改善されたこと、作製した細胞凝集体を細胞非接着処理を施した培養ウェルから非侵襲的かつ容易に回収できることを確認し、細胞凝集体の有用性を示した。今後は、電源装置が不要で生体適合性の良い自律駆動型バイオアクチュエータへの応用を検討するために、ポンプ型の細胞凝集体やその力学刺激デバイスなどの作製を行っていく。

今回作製したトロイダル形状細胞凝集体は、中心孔を利用した三次元的な組織のアセンブリなどが考えられる。また、中心孔の方向性を制御し三次元的にアセンブリすることで、血管系や神経系の導入を含めた機能性をもった組織の再構築が可能になると考えられる。このように、トロイダル形状細胞凝集体は、機能性を有する三次元組織構造体の再構築に応用できるので、バイオアクチュエータ、再生医療、ドラッグデリバリーなどの多岐にわたる展開が期待される。

文 献

- [1] Wakitani, S., Kimura, T., Hirooka A., Ochi, T., Yoneda, M., Yasui, N., Owaki, H. and Ono, K. "Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 71-1, pp. 74-80, 1989.
- [2] Yamada, K., Kamiyama, M., Hamamoto, R. and Iijima, S. "Efficient induction of hepatocyte spheroids in a suspension culture using a water-soluble synthetic polymer as an artificial matrix," *J. Biochem.*, vol.123-6, pp. 1017-1023, 1998.
- [3] Anada, T., Masuda, T., Honda, Y., Fukuda, J., Arai, F., Fukuda, T. and Suzuki, O. "Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.147-1, pp. 376-379, 2010.
- [4] Ota, H., Yamamoto, R., Deguchi, K., Tanaka, Y., Kazoe, Y., Sato, Y. and Miki, N. "Three-dimensional spheroid-forming lab-on-a-chip using micro-rotational flow," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.147-1, pp. 359-365, 2010.
- [5] Masuda, T., Kawai, T., Anada, T., Kamakura, S., and Suzuki, O. "Quality of regenerated bone enhanced by implantation of octacalcium phosphate-collagen composite," *Tissue Eng Part C Methods*, vol.16-3, pp. 471-478, 2010.
- [6] Bartosh, T.J., Ylostalo, J.H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R.H., Choi, H., and Prockop, D.J. "Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties," *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 2010.
- [7] Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S. and Mori, H. "Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction," *Nat Med*, vol.12-4, pp. 459-65, 2006.
- [8] Lee, J., Cuddihy, M.J., Kotov, N.A. "Three-dimensional cell culture materials: state of the art," *Tissue Eng Part B Rev.*, vol.14-1, pp.61-86, 2008.
- [9] Tong, J.Z., Lagaussie, P. De, Furlan, V., Cresteil, T., Bernard, O. and Alvarez, F. "Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids," *Exp Cell Res*, vol.200-2, pp. 326-32, 1992.
- [10] Duffy, D.C., McDonald, J.C., Schueller, O.J.A., Whitesides, G.M. "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol.70-23, pp.4974-4984, 1998.
- [11] O' Shea, D.C., Rockward, W.S. "Gray-scale masks for diffractive-optics fabrication: II. Spatially filtered halftone screens," *Appl. Opt.*, vol.34-32, pp.7518-7526, 1995.
- [12] Suleski, T.J., O' Shea D.C. "Gray-scale masks for diffractive-optics fabrication: I. Commercial slide imagers," *Appl. Opt.*, vol. 34-32, pp. 7507-7517, 1995.
- [13] Itoga, K., Kobayashi, J., Tsuda, Y., Yamato, M., Okano, T. "Second-generation maskless photolithography device for surface micropatterning and microfluidic channel fabrication," *Anal Chem*, vol.80-4, pp.1323-1327, 2008.
- [14] Totsu, K., Esashi, M. "Gray-scale photolithography using maskless exposure system," *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, vol.23-4, pp.1487-1490, 2005.
- [15] 岩田博夫 "生体組織工学," 産業図書株式会社, pp.213-215, 1995.
- [16] Haward C.Berg "Random Walks in Biology," 法政大学出版局, pp. 15-22, 1988.
- [17] Neff, J.A., Caldwell, K.D., Tresco, P.A. "A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 40-4, pp.511-519, 1998.
- [18] Hosoda T, Monzen K, Hiroi Y, Oka T, Takimoto E, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. "A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes," *Biological Chemistry*, Vol. 276-38, pp. 35978-35989, 2001.
- [19] Habara-Ohkubo, A. "Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells," *Cell Struct. Funct.* vol. 21-2, pp. 101-110, 1996.
- [20] Monzen K., Shiojima I., Hiroi Y., Kudoh S., Oka T., Takimoto E., Hayashi D., Hosoda T., Habara-Ohkubo A., Nakaoka T., Fujita T., Yazaki Y., Komuro I. "Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4," *Mol. Cell. Biol.*, vol.19-10, pp.7096-7105, 1999.