血管内皮細胞の初期伸展に及ぼす ハニカムフィルム細孔径の影響†

山本貞明^{*,***}・田中 賢^{**,***}・伊藤絵美子^{***}・森田有香^{*}

角南 寛^{*,***}・居城邦治^{**,***}・下村政嗣^{**,***}

^{*}北海道大学創成科学共同研究機構 ☎ 001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 10 丁目

^{**}北海道大学電子科学研究所附属ナノテクノロジー研究センター ☎ 001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 10 丁目

^{***}独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 ☎ 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

(2007 年 3 月 28 日受付 ; 2007 年 5 月 17 日掲載決定)

The Influence of Pore Size of a Honeycomb Film on Early Spreading Process of Endothelial Cells

Sadaaki YAMAMOTO^{*,***}, Masaru TANAKA^{**,***}, Emiko ITO^{***}, Yuka MORITA^{*},
Hiroshi SUNAMI^{*,***}, Kuniharu IJIO^{**,***} and Masatsugu SHIMOMURA^{**,***}

^{*}Creative Research Initiative “Sousei” Hokkaido University, N21W10 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021

^{**}Nanotechnology Research Center, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University,
N21W10 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021

^{***}Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST),
4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012

(Received March 28, 2007 ; Accepted May 17, 2007)

The mechanism that cells use to recognize micro-patterned topographies was clarified. First, 3D double-layer poly (ϵ -caprolactone) scaffolds equipped with honeycomb-patterned micro-pores (“honeycomb films”) were prepared. Then, porcine aortic endothelial cells (PAECs) were cultured on these scaffolds for 1-6 h in serum-free medium. Finally, their initial spreading process was investigated by using AFM and confocal laser scanning microscopy. The attachment and spreading of PAECs on honeycomb films having either 6- or 16- μ m pore diameters resulted in voids within the cell cytoplasm, which correspond with the size and location of the honeycomb micropores. The number of cells with this unique morphology decreased with increasing culture time. This dependence of morphology on film pore size and culture time suggests a spreading process of PAECs in which the cells spread trying to sense suitable sites to adhere. Using thick filopodia, the cells spread along the rim of the film and produced pores by close contact between two spreading filopodia. Evidently, these pores became filled in during culture, presumably as the cells began to reorganize their cytoplasm.

KEYWORDS : atomic force microscopy, cell adhesion, cell spreading, surface topography, endothelial cell, tissue engineering

1. は じ め に

ドナー不足と免疫拒絶の問題点を抱えた臓器移植に替

わる新しい治療法として、再生医療が注目されている。その実現を目指し、細胞の分化や増殖を制御して、生体組織を作る組織工学が活発に研究されている¹⁾。組織工学では、足場材料（細胞が接着して増殖、分化し組織を形成する細胞培養基材）が、用いる細胞と増殖や分化などを制御する液性因子と並んで重要な開発課題となって

† 第 26 回表面科学講演大会（2006 年 11 月 6 日～11 月 9 日）にて発表

E-mail : syama@cris.hokudai.ac.jp

ニカムフィルムは幹上) の任意に選んだ6か所での1 μm 角での測定値を平均することにより求めた。共焦点レーザー顕微鏡観察はOlympus社製FLUOVIEW FV300を用いて行った。SEM観察はHitachi S-3500N SEMを用い、加速電圧を15 kVで行った。

細胞培養、アクチンおよび細胞膜の蛍光染色

ブタ大動脈血管内皮細胞 (PAEC, CSC Certificate TM DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD., Japan) を100 unit/ml ペニシリン/100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (GIBCO) を含む無血清培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Munich) に分散させた。滅菌水

で洗浄したフィルムに継代6-8のPAECを播種密度 1.5×10^4 cells/ cm^2 で播種し37°C, 5% CO_2 雰囲気で培養した。培養1, 3, 6および72時間後、フィルムを室温で10%ホルマリン (Wako, Japan) に10分浸漬, 次いでPBS溶液で洗浄した後, アクチン (Alexa Fluor 488 phalloidin または Rhodamine phalloidin, Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) と核 (DAPI, DOJINDO Japan) を染色した。

細胞面積および周囲長, 接着数の測定

画像解析ソフトImage-Pro PLUS (Media Cybernetics, Inc. MD) を用いてアクチン染色像から, 細胞面積と周囲長を, また核染色像から細胞接着数を求めた。測定範

Fig. 2. SEM images of a honeycomb-patterned film. (a) top view, (b) tilted view, (c) side view, and (d) schematic of double-layered honeycomb film. Top layer with honeycomb-patterned pores is connected by pillars to bottom layer.

Fig. 4. AFM images showing the morphology of PAECs cultured 1 h on a honeycomb and flat film. a) topographic image on a flat film, b) cross-sectional profile along the dotted line in a). c) topographic and d) phase images on a honeycomb film with a pore diameter of 6 μm . The images were obtained by using tapping mode in air.

囲は約 $160000 \mu\text{m}^2$ とした。

3. 結 果

ハニカムフィルムの構造

Fig. 2 は PCL ハニカムフィルムの構造を示す SEM 像である。フィルムを真上から観ると微細な孔が六方細密に規則的に配列していることがわかる (Fig. 2a)。断面観察図 (Fig. 2c) はハニカムフィルムが2枚の薄膜が六

Fig. 3. CLSM images of PAECs immunofluorescently stained for actin after 3 h culture on a) flat film, and honeycomb films with a pore diameter of b) 3, c) 6, and d) 16 μm , respectively. The images superimposed on the differential interference microscope images of honeycomb films show the dependence of spreading morphology on the pore size. Arrows in c) and d) indicate thin filopodia interacting with the surface of honeycomb rim. Arrow heads in c) and d) show thin filopodia interacting each other. ber : 10 μm .

角形の頂点にあるピラーでつながった二層構造をしていることを示す。このような規則的三次元構造を細胞がどのように認識するのかをみるために、次に細胞の伸展初期形態を調べた。

Fig. 5. CLSM depth image of a PAEC immunofluorescently stained for actin after 1 h culture. a) CLSM image superimposed on a differential interference microscope image of a honeycomb film, b) depth image across the dashed line of ① in a) that shows no fluorescence from actin at the honeycomb pore, demonstrating the voids within the cell cytoplasm, which correspond with the size and location of the honeycomb pore (indicated by * in a) and b)). c) depth image across the dashed line of ② in a). The depth images reveal that the cells migrated into the honeycomb pores along the honeycomb pillars (indicated by an arrow in b) and c). ber : 10 μm .

Fig. 6. CLSM images of PAECs immunofluorescently stained for actin (red) on honeycomb films with a pore diameter of 6 μm showing the dependence of the spreading morphology of PAECs on culture time. Culture time : a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h, and d) 72 h. e) close-up image of encircled region in b) f) close-up image of encircled region in c). Blue is nuclear. Bar : 20 μm .

細胞伸展形態

Fig. 3 は異なる細孔径を持つハニカムフィルム上で、3 時間培養を行った後、細胞骨格タンパク質であるアクチンを蛍光染色した PAEC の CLSM 像を示す。CLSM 像はハニカムフィルムの細孔位置と細胞の相対関係がわかるようにハニカムフィルムの微分干渉像を重ね合わせてある。**Fig. 3** は細胞の伸展形態がハニカムの細孔径によって大きく異なることを明瞭に示している。細孔径 3 μm のハニカム上の細胞の周囲には突起状の仮足が見られた (**Fig. 3b**)。それらの仮足は細孔を飛び越えて伸展していた。この形態は平膜上の形態 (**Fig. 3a**) と類似していた。一方、細孔径 6 および 16 μm のハニカムフィルム上では、ハニカムフィルム細孔の位置にその孔径と等しい孔を持った細胞が数多く観察された (**Fig. 3c, d**)。これらの形状は平膜および細孔径 3 μm のハニカムフィルム上の形態とは全く異なる形態であって、今回、初めて見出された形状である。幹上を伸展する太い仮足先端には、平膜あるいは細孔径 3 μm のハニカムフィルム上で見られた突起状の仮足が見られ (**Fig. 3c, d** 中、矢印で示した)、伸展先を探索している様子がうかがえる。細胞膜同士の接着の初期を示すと思われる隣接する突起同士が接触している瞬間もとらえられている (**Fig. 3c** 中三角印で示した)。**Fig. 4a** は平膜上の PAEC の AFM 像を示す。細胞の周囲には、CLSM で観察されたと同様の突起状の仮足が観察された。断面解析により細胞周囲の厚さは数十 nm と非常に薄いことがわかった (**Fig. 4b**)。ハニカムフィルム上の PAEC の AFM による形状観察では細胞全体の形態がわからないが (**Fig. 4c**)、位相像では、CLSM 像と類似の孔を持った形態が観察された (**Fig. 4d**)。AFM により求めた平膜およびハニカムフィルム幹の表面粗さ (Ra) はそれぞれ 12 および 42 nm であった。形状像でハニカムフィルム上の細胞の全体がみられないのは、ハニカムフィルムの幹表面の凹凸が大きく形状像では数十 nm の非常に薄い細胞の伸展部分は分解されにくいためと考えられる。**Fig. 5** は培養 1 時間後、アクチンを蛍光染色した PAEC の CLSM 断面観察像である。ハニカムフィルムのピラーに沿って細胞がフィルム内部に伸展していることを示している (**Fig. 5b** および **c** 中、矢印で示した)。また、フィルム細孔にあたる位置 (**Fig. 5a** および **b** の * 印で示す) では、フィルム top および bottom いずれの表面でも染色したアクチンからの蛍光は検出されなかった。このことはハニカム細孔位置で細胞に孔が開いていることを示している。

細胞伸展形態の培養時間依存性

本研究で初めて見出された血管内皮細胞の伸展形態の

Fig. 7. The culture time dependence of a) cell area, b) cell perimeter, and c) cell number on culture time. The honeycomb micropore diameter is 6 μm .

形成プロセスを明らかにするために、伸展形態の培養時間依存性を調べた。**Fig. 6** は培養 1 時間から 72 時間までの間に観察された典型的な血管内皮細胞の伸展形態を示す。培養初期 1 時間では、孔の開いた細胞が多く観察された (**Fig. 6a**)。培養 3 時間および 6 時間と培養時間が長くなるに従って、孔の開いた細胞数が減って、孔のまったくない細胞数が増加した (**Fig. 6b, c** 中波線丸で囲った細胞)。孔のない細胞を拡大して観察すると、数多くの線状のアクチン繊維が細胞内に走っていることがわかった (**Fig. 6d, e**)。さらに 72 時間の培養では、孔の開いた細胞はなく、線状にアクチン繊維が発達した細胞のみが観察された (**Fig. 6f**)。

伸展細胞の面積、周囲長および接着率の培養時間依存性

Fig. 7a, b は各培養時間における伸展速度の指標となる全細胞の伸展面積と周囲長を示す。伸展面積と周囲長のいずれも播種後 1 時間で増加し、その後、3 時間から 6 時間では大きな増加は示さず、ほぼ一定となることが

わかった。細胞の接着率は培養1時間から6時間の間でほぼ一定であることがわかった (Fig. 7c)。したがって、観察された面積と周囲長は、はじめに播種された全細胞の培養1, 3 および 6 時間での伸展面積を表していると考えられる。

4. 考 察

Fig. 3 のアクチンを蛍光染色した細胞の CLSM 像と Fig. 4d の AFM 位相像は細胞に孔が開いていることを示している。Fig. 2 の SEM 像が示すように、フィルムは3次元構造を持つので、フィルム細孔の位置で、細胞が内部に入り込み bottom 層を伸展しているために top 層の CLSM 観察では蛍光が検出できず、また AFM 探針が細孔下層を検知できないために孔が開いているように見えている可能性が考えられる。しかしながら Fig. 5 に示すように CLSM による断面観察によっても、細孔の bottom 層位置で蛍光が観察されないの、ハニカムフィルムの細孔位置に一致するところには細胞質がなく、実際に細胞には孔があいているといえる。ナノメートルサイズの表面形状をもつポリマー表面での血管内皮細胞の伸展形態が調べられていて、その形態は $3\mu\text{m}$ の細孔径を持つハニカムフィルム上と類似している⁵⁾。このような孔の開いた血管内皮細胞の形態は本研究で初めて見出されたものである。細孔径3ミクロンのハニカムフィルム上の細胞形態は平膜上と同じく (Fig. 3a, b), 細孔径が6および $16\mu\text{m}$ のハニカムフィルム上の細胞形態は平膜上とは全く異なっている (Fig. 3c, d) ということは、細胞が $3\mu\text{m}$ と $6\mu\text{m}$ 以上の細孔の大きさを感知・識別していることを示している。

培養時間が長くなるにつれて孔の開いた細胞の割合は減少し、変わって、孔を持たず線状のアクチン繊維が発達した細胞が見られるようになる (Fig. 6e, f)。孔が培養時間とともに、どのようなものかを見るために、極

端に培養時間を長くすると (培養72時間)、孔の開いた細胞は見られず、孔を持たず線状のアクチン繊維が発達した細胞のみが観察される (Fig. 6d)。孔を持った細胞の割合が低くなるのは、孔の開いた細胞が選択的にアポトーシス等の理由によって基板から外れてしまった可能性が考えられるが、培養1時間から6時間にわたってハニカムフィルム上の細胞数が一定であるということから (Fig. 7c), この可能性は否定され、細胞は培養経過にともなって、孔を埋めているといえる。さらに、伸展する細胞の面積と周囲長が培養1時間までは増加し、それ以降、6時間では大きな増加が見られないことから (Fig. 7a, b), 培養1時間以降では、細胞は伸展を止め、孔の修復とアクチン骨格の形成を開始しているものと考えられる。現在のところ、細胞が孔をどのようにして埋めて行くのかは不明であるが、一つの細胞が持つ孔のサイズはその過程を考える手がかりを提示している。各々の孔が、ランダムに埋められていくものであるとすれば、各培養時間で細胞形態を観察すると、一個の細胞には径の異なった孔が観察されるべきである。しかしながら Fig. 3 や Fig. 6 に示すように、培養3, 6時間での複数の孔が開いた細胞の孔径は均一であって、ハニカムフィルムの細孔径に等しい。また、孔のない細胞では、孔が見られない (Fig. 6)。このことから、各孔はランダムに埋められていくのではなく、短い時間 (今回の実験では培養1時間と3時間の間、つまり最大で2時間。実際はそれよりも早いことが考えられる) の間にそろって (協奏的に) 埋められていると考えられる。細胞内に孔を埋める作業開始の何らかのシグナルが生じ、細胞質の細胞内移動が生じて、そろって孔が埋められているのではないかと考えられる。細胞が何をもって伸展を止め、孔の修復とアクチン繊維の形成を開始するかは非常に興味ある問題であるが、その解明は今後の課題である。

伸展形態の細孔径依存性と培養時間依存性から、ハニ

Fig. 8. (color online). Schematic presentation of proposed spreading process of PAECs in which the cells spread, trying to sense suitable sites on which to adhere. Using thick filopodia, the cells spread along the rim of the film and produced pores by close contact between two spreading filopodia. Evidently, these pores became filled in during culture, presumably as the cells began to reorganize their cytoplasm.

カムフィルム上の血管内皮細胞の伸展プロセスは次のように考えられる (Fig. 8) : 細胞は $3\mu\text{m}$ と $6\mu\text{m}$ のサイズの大きさの違いを識別し, $6\mu\text{m}$ 以上では細孔を越えることなく, 細胞は幹に沿って仮足を伸ばす。伸展途中に細孔を隔てて幹上を伸展してきた2つの仮足が会合することで孔形状を形成し, さらに伸展を続ける。ある程度伸展した, 培養開始後3~6時間で伸展がとまり, 細胞質の移動によって孔が埋められる。

5. ま と め

固体表面形状が細胞挙動に及ぼす影響の解明は培養基材の開発にとって重要な課題である。本研究では, その解明を目的として, 血管内皮細胞がハニカムフィルムの規則的三次元構造をどのように認識するかを調べた。その結果, 細胞はハニカムフィルムの細孔の大きさを識別した特異的な進展を行っていることがはじめて明らかになった。 $3\mu\text{m}$ の細孔径を持つハニカムフィルム上では, 平膜上と同様の伸展形態を示すのに対し, 6 および $16\mu\text{m}$ の細孔径を持つハニカムフィルム上では, ハニカムフィルムの細孔位置に細孔サイズと等しい大きさの孔が開いた細胞形態が観察された。さらに, その形態は培養時間が長くなるに従って消失することが明らかになった。この特異的な形態の形成に関連して, どのようにして細胞が $3\mu\text{m}$ と $6\mu\text{m}$ の孔を識別して伸展方法を決めているのか? 会合した位置で細胞膜は単に接触しているのか? あるいは, それより強い膜間の相互作用が引き起こされているのか? など興味ある課題が明らかになった。また, 孔の消失は協奏的に起きていることが考えられ, 細胞のより深い理解への手がかりを提示している。今回明らかになった現象には基板の表面形状と構造が大きく関わっていることが予想され, 今後, 表面科学的手法によるアプローチにより, 更なる解明にせまる予定である。本研究結果は, 細胞培養基材の開発にとって表面科学が果たす役割の大きさを示している。

謝 辞

本研究は, 文部科学省科学技術振興調整費戦略的研究拠点育成プログラム「北大 R & BP 構想」と JST 戦略的創造研究推進事業医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製領域「高分子の階層的自己組織化による再生医療用ナノ構造材料の創製」の支援を受け, 創成科学共同研究機構において実施された。

文 献

1) R. Langer and J.P. Vacanti : *Science* **260**, 920 (1993).

- 2) A. Carrel and M. Burrows : *J. Exp. Med.* **13**, 571 (1911).
- 3) E.T. den Braber, J.E. de Ruijter, L.A. Grinsel, A.F. von Recum and J.A. Jansen : *J.A. j. Biomed Mater. Res.* **40**, 291 (1998).
- 4) R.G. Flemming, C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Goodman and P.F. Nealey : *Biomaterials* **20**, 573 (1999).
- 5) M.J. Dalby, M.O. Riehle, H. Johnstone, S. Affrossman and A.S.G. Curtis : *Biomaterials* **23**, 2945 (2002).
- 6) A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.L. Murphy and P.F. Nealey : *J. Cell Sci.* **116**, 1881 (2003).
- 7) D. Motlagh, T.J. Hartman, T.A. Desai and B. Russell : *J. Biomed. Mater. Res.* **67A**, 148 (2003).
- 8) M.J. Dalby, S. Childs, M.O. Riehle, H.J.H. Johnstone, S. Affrossman and A.S.G. Curtis : *Biomaterials* **24**, 927 (2003).
- 9) M. Arnold, A.E. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler and J.P. Spatz : *ChemPhysChem* **5**, 383 (2004).
- 10) C.C. Berry, M.J. Dalby, D. McCloy and S. Affrossman : *Biomaterials* **26**, 4985 (2005).
- 11) M.J. Dalby, M.J. P. Biggs, N. Gadegaard, G. Kalna, C.D.W. Wilkinson and A.S.G. Curtis : *J. Cl. Biochem.* **100**, 326 (2007).
- 12) N. Maruyama, T. Koito, J. Nishida, T. Sawadaishi, X. Gieren, K. Ijio, O. Karthaus and M. Shimomura : *Thin Solid Film* **854**, 327 (1998).
- 13) M. Tanaka, M. Takebayashi, M. Miyama, J. Nishida and M. Shimomura : *Bio-Med. Mater. Eng.* **14**, 439 (2004).
- 14) T. Nishikawa, M. Nonomura, K. Arai, J. Hayashi, T. Sawadaishi, Y. Nishiura, M. Hara and M. Shimomura : *Langmuir* **19**, 6193 (2003).
- 15) K. Sato, K. Hasebe, M. Tanaka, M. Takebayashi, M. Nishikawa, M. Shimomura, T. Kawai, M. Matsushita and S. Todo : *Int. J. Nanosci.* **1**, 689 (2002).
- 16) M. Tanaka, K. Nishikawa, H. Okubo, H. Kamachi, T. Kawai, M. Matsushita, S. Todo and M. Shimomura : *M. Colloids Surf. A.* **464**, 284 (2006).
- 17) A. Tsuruma, M. Tanaka, N. Fukushima and M. Shimomura : *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **3**, 159 (2005).
- 18) M. Tanaka, A. Takayama, E. Iti, H. Sunami, S. Yamamoto and M. Shimomura : *J. Nanosci. Nanotech.* **7**, 763 (2007).
- 19) R.O. Hynes : "Fibronectin" (Springer, New York, 1990) p. 546.
- 20) 藤本大三郎編 : "細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー" (アイシーピー) p. 111.
- 21) S. Yamamoto, M. Tanaka, H. Sunami, K. Arai, A. Takayama, S. Yamashita and M. Shimomura : *J. Surf. Sci. Soc. Jp.* **27**, 502 (2006).
- 22) S. Yamamoto, M. Tanaka, H. Sunami, K. Arai, A. Takayama, S. Yamashita, Y. Morita and M. Shimomura : *Surf. Sci.* **600**, 3785 (2006).
- 23) S. Nishimura and K. Yamada : *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10555 (1997).