誘電泳動を応用した細胞集積化技術の確立と再生軟骨への応用*

竹内 嘉隆^{*1}, 宮田 昌悟^{*2}Micro Cell Patterning Technology by Dielectrophoresis and
Application to Regenerated CartilageYoshitaka TAKEUCHI and Shogo MIYATA^{*3}^{*3} Graduate School of Science and Technology, Keio University,
3-14-1 Hiyoshi, Kouhoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa, 223-8522 Japan

Recently, microfabrication tools have been utilized to quantify the role of the cellular microenvironment on cell activity and function. Improving tissue regeneration by cell culture on scaffold material will also require tools to control cellular organization in 3-dimensional (3-D) condition. Our objective was to improve cartilage tissue engineering using 3-D cell organization technology. In this study, we developed an anisotropic cartilaginous tissue by cell patterning within hydrogel slabs using dielectrophoretic (DEP) forces. Our data indicate that the embedded chondrocytes remained viable and reconstructed cartilaginous tissue along the patterned cell array. In conclusion, DEP cell patterning may become a useful approach for reconstructing anisotropic structure in cartilage regeneration.

Key Words: Biomaterial, Biomechanics, Anisotropy, Dielectrophoresis, Regenerated Cartilage, Tissue Engineering

1. 緒 言

近年, 損傷した生体組織から細胞を取り出し, 生体内あるいは生体外で培養し, 再生された組織を体内に帰納させるという考えを根幹に持つ再生医療工学に注目が集まっている。細胞は生体外で二次元的に培養するだけでは機能を失う(脱分化する)可能性が高いことから, 三次元的に培養する必要がある。細胞を三次元培養する際には足場となる担体を必要とし, コラーゲンゲル, アガロースゲルに代表されるような天然高分子材料^{(1)~(4)}, ポリ乳酸, ポリグリコール酸などの合成高分子⁽⁵⁾を用いた多孔質構造の培養基材に関する研究が報告されている。しかしながら, 現在までのところ, 細胞を三次元培養するだけでは組織再生には充分とは言えず, より生体に近い組織を再生するためには対象とする生体組織に特有の高次機能を発現させる必要がある。

生体組織の機能は, 組織中の細胞-細胞間, 細胞-細

胞外基質間の相互作用に由来していることが多く, 骨・軟骨, 血管, 神経組織などは細胞の配列が組織の機能と密接に関係している。本研究では生体内での修復能に乏しいことから, 近年, 生体外での組織再生に関する研究が広く進められている関節軟骨に注目した。

関節軟骨は関節表面を覆う結合組織であり, 衝撃の緩衝や低摩擦・低摩耗の潤滑能を持つ。関節軟骨組織の大部分は軟骨細胞が産生したコラーゲンとプロテオグリカンからなる軟骨基質と 70~80%の水分から構成されている。また, 軟骨の組織は関節の摺動面に対して深さ方向に不均一な構造を持ち, 一般に摺動面から軟骨下骨に向かって表層, 中層, 下層と区分されている。軟骨組織中のコラーゲン線維は各層ごとに構造が変化しており, 表層では摺動面に平行, 中層ではランダムな網目構造, 下層では垂直方向に配向されており, 組織に加わる生理的な変形に応じて複雑な異方性の材料特性を持つ組織である⁽⁶⁾。

このような異方性組織の再生は, ゲルや多孔質体などの培養担体に均一に細胞を分散する既存の手法では困難であり, 細胞の配列が制御された形で細胞の播種が行われることが重要である。このような背景から細胞配置のコントロールができる微粒子の集積化技術や

* 原稿受付 2010年1月27日。

^{*1} 慶應義塾大学大学院総合デザイン工学専攻(☎ 223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1)。^{*2} 正員, 慶應義塾大学理工学部機械工学科。

E-mail: miyata@mech.keio.ac.jp

マニピュレーション技術に注目が集まっている。集積化技術には様々な手法があり、電圧勾配の傾きを利用する誘電泳動(Dielectrophoresis: DEP)⁽⁷⁾や Ink Jet Printing 法⁽⁸⁾などがある。特に、近年では細胞の集積化やマニピュレーションに誘電泳動を用いた研究が広く進められている。これは誘電泳動が細胞に直接触れることなく、迅速に集積化が行えるからである。細胞を対象とした研究には単一細胞のパターニングやマニピュレーションに関する研究^{(9)~(13)}、2種類の細胞を交互に線状に集積化する研究⁽¹⁴⁾、クラスタ状に細胞を集積化し、細胞機能の活性を評価する研究⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾などの報告がある。

しかしながら、誘電泳動を用いた細胞の集積化技術を軟骨の再生に応用し、組織に異方性を実現する研究は現在まで行われていない。また、誘電泳動が組織再生に与える影響も十分に検討されているとは言えない。そこで本研究では、誘電泳動を用いたハイドロゲル基材中での細胞集積化技術を確立し、その集積化技術を用いてハイドロゲル内で軟骨細胞の集積化を行い、培養担体内で細胞配列に異方性を有する再生軟骨組織を作製した。また、誘電泳動による細胞集積化が細胞外基質の産生に及ぼす影響について検討したので報告する。

2. 試料及び実験方法

2・1 誘電泳動用チャンバの作製と泳動原理 誘電泳動実験用チャンバは導電性を有するITO(Indium Tin Oxide)膜付きスライドガラス(25×75×1.1 mm³)2枚とシリコンガセット(厚み: 500 μm)1枚を組み合わせて構築した。ITO膜の膜厚は1200~1600 Åである。下部のITO膜付きスライドガラスのITO膜上に厚膜フォトリソ剤であるSU-8(SU-8, 10, MicroChem Corp., USA)を塗布し、不均一な電場を生む、スリット形状にITO膜が露出する電極構造を作製した [図1(a)]。スリット形状の電極はスライドガラス上の10 mm×10 mmの領域に構築し、露出されるスリット形状のITO膜電極は幅20 μm、長さ15 mm、電極間距離は100 μmとした。これにより上部スライドガラスのITO膜と下部スライドガラスのスリット形状の電極間に交流電場を印加することで不均一な電界強度分布が生じ、細胞の誘電泳動が実現される。本研究では電界強度の極小部へ細胞が集積される負の誘電泳動(negative-dielectrophoresis: n-DEP)を用いた。誘電泳動実験中の細胞の挙動を図1(b)に示す。

2・2 仔ウシ軟骨細胞の単離と三次元培養 軟骨

細胞は仔ウシ関節軟骨由来の細胞を用いた。生後2-3ヵ月の仔ウシの肩関節部より軟骨組織片を採取し、コラゲナーゼ溶液内で攪拌することで酵素的に軟骨細胞を単離した。単離された軟骨細胞は細胞密度 2.0×10^7 cells/mlになるように低導電性の細胞等張液に懸濁した。その後、同体積の3.0%低融点アガロース溶液(A2576, Type IX-A, SIGMA, USA)と混合して細胞密度 1.0×10^7 cells/mlの軟骨細胞を含む1.5%のアガロース溶液として調製し、誘電泳動用チャンバへ注入した。チャンバに交流電場を印加することで誘電泳動現象を生じ、細胞を集積した。交流電場の印加後に冷却、ゲル化して培養体とした。

誘電泳動ではファンクションジェネレータ、電力増幅器を用いて安定した交流電場をチャンバに印加した。チャンバに印加される電圧はオシロスコープによりモニタリングした。電圧は10, 20 V_{p-p}、周波数は10 kHzとした。印加時間は20 minとし、誘電泳動後にゲル化するための冷却時間は4°C下で40 minとした。

ゲル化した培養試料は細胞培養ディッシュに移動し、37°C、5%CO₂環境下で培養した。なお、コントロール試料群として同条件下で電場の印加を行わずに均

Fig. 1 (a) DEP chamber and (b) schematic of chondrocyte patterning in the chamber

一に細胞を分散した試料(0 V_{p-p})を作製して比較対象とした。培養液には DMEM/F-12+20%FBS+50 µg/ml L-ascorbic acid を用いた。培養期間は 7 日間とした。

なお、ゲル培養体は 1 組の仔ウシ肩関節から抽出された軟骨細胞を用いて作製し、誘電泳動での印加電圧条件 0, 10, 20 V_{p-p} において、それぞれ $n=3-4$ となる試料群を構成して実験を行った。また、実験は 3 組の個体の異なる仔ウシ肩関節を用いて、同様の実験を 3 回行い再現性を確認した。実験結果は、仔ウシの個体差による各回の間の測定値のばらつきが大きいこと、また、3 回の実験が定性的にはすべて同様の傾向を示したことを考慮して、3 回行った実験の結果から代表例として 1 回分の結果を示した。

2.3 組織学的評価および生化学的評価 組織学的評価として培養 0, 7 日において試料の細胞外基質を染色するサフラニン O 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

生化学評価は培養 7 日の試料を対象として、軟骨の細胞外基質の主要成分の一つである硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)と細胞数の定量を行った。sGAG 含有量の定量には DMMB assay⁽¹⁷⁾ を用いた。標準液には shark chondroitin sulfate(C4384, SIGMA,

USA)を用いて、波長 540 nm における吸光度測定を行った。組織内の細胞数測定には Hoechst fluorometric DNA assay⁽¹⁸⁾ を用いて、総 DNA 含有量を定量した。標準液には calf thymus DNA を用い、蛍光度測定は Ex 365 nm/Em 468 nm の条件で行った。細胞 1 個当たりの DNA 含有量を 7.7 pg として上記で定量した総 DNA 含有量から試料中の総細胞数を算出した⁽²¹⁾。

測定された 1 試料あたりの sGAG 含有量、総細胞数、1 軟骨細胞あたりの sGAG 産生量は統計学的に有意差を評価した。統計学的な比較には t 検定を用いて、有意水準は 5%とした。

3. 結 果

誘電泳動により軟骨細胞はハイドロゲル中の ITO スリット電極間に配列が制御された形で凝集塊が形成された。また、組織学的評価としては、培養 0, 7 日の試料の染色像を比較すると、培養によって染色範囲の増加が観察され、細胞外基質の産生が確認された(図 2)。また、集積化を行うことで細胞外基質の産生領域を図 2 a-2 に示す均一なものから図 2 b-2 のようなスリット形状に制御することができ、組織再生領域に異方性を示す培養軟骨を作製することができた。

Fig. 2 (a) Chondrocyte-seeded agarose and (b) chondrocyte clusters in agarose gel cultured for 0 day (left) and 7 days (right)

生化学的評価では、異なる個体由来の肩関節を用いて行った3回の実験のすべてにおいて、同様の傾向を示す結果が得られた。しかしながら、仔ウシの個体差に由来する各回の測定値の差が大きいため、ここでは

Fig. 3 Sulfated-GAG content of specimens cultured for 7 days. * indicates a significant difference from 0 V groups ($p < 0.05$)

Fig. 4 Cell number in specimens cultured for 7 days. Dashed line indicates the cell number of specimens at day 0

Fig. 5 Sulfated-GAG content synthesized by one cell in cultured specimens

代表例として1回分の実験結果を示す。7日間培養された試料内の総 sGAG 含有量では、細胞が均一に分散された培養体と比較して、細胞が集積化された培養体では減少する傾向がみられた。印加電圧 10 V_{p-p} と 20 V_{p-p} の試料を比較すると 20 V_{p-p} において減少傾向が強まった(図3)。一方で、試料内の細胞数では、すべての試料において初期細胞数からの増殖が見られた。また、細胞が均一に分散された培養体と比較して、細胞の集積化を行った培養体では総細胞数が低くなる傾向がみられた(図4)。また、細胞1個当たりの sGAG 含有量では、図3と同様に集積化を行った培養体において細胞が均一に分散された培養体より減少する傾向がみられた(図5)。

4. 考 察

本研究で用いた軟骨細胞のアガロースゲル培養法は Benya らによって提案され、軟骨細胞の分化状態を維持して軟骨基質の産生が促進されることが報告されている⁽¹⁹⁾。本研究においても、アガロースゲル内で軟骨細胞を培養することで、サフラニン O による染色範囲の増加が観察され、ゲル内に軟骨組織が再構築されることが確認された。これは誘電泳動によって集積化された後にも、細胞が生存しており、かつ、組織の再構築が進んだこと、細胞外基質同士が組織の再構築に伴って、結合した結果であると考えられる。細胞が均一に分散された試料、細胞の集積化を行った試料共に、培養0日の培養体に比べ、培養7日の試料では細胞が球形状を維持していることがわかる。このことから細胞が脱分化することなく、細胞の分化状態が維持されること、細胞の生存性が確認された。

生化学特性では、印加電圧の増加に伴って試料中の培養後の総細胞数が小さくなる傾向がみられた(図4)。すべての試料において初期細胞数からの増加が見られたことから、交流電場の印加条件に関わらず細胞の生存性は保たれて細胞増殖が生じたが、集積化することで細胞1個当たりの増殖空間が減少した結果、細胞が集積化した試料では培養後に総細胞数が低い値を示す傾向にあったと考えられる。

図3における試料中の総 sGAG 含有量、図5における細胞1個当たりの sGAG 産生量の結果より、集積化を行うことで sGAG 産生量が減少する傾向にあることがわかった。Albrecht ら⁽¹⁶⁾ は誘電泳動を用いて PEG ゲル中に細胞をクラスタ状に集積化することで細胞の活性が減少傾向にあることを報告しており、本研究の結果とも一致する。上述の結果には二つの要因が推測される。

一点目には、軟骨の再構築領域の差異が推測される(図2中のa-2, b-2)。細胞の集積化による異方性組織の再生では再構築される組織の領域を限定するために、アガロースゲル内部に再生される軟骨組織の総体積が小さくなり、それに伴ってsGAG含有量が低下したと考えられる。組織染色画像において染色された画像領域の評価を行ったところ、図2a-2の染色範囲を1とした場合に図2b-2の染色範囲は約0.7であった。二次元の画像を元にした面積比による検討ではあるが、図3に示した20 V_{p-p}の試料の0 V_{p-p}の試料に対するsGAG産生量の低下率が約0.7であることから再構築された体積の低下率とほぼ等しいと考えられる。すなわち、組織中のsGAG含有量の減少は、アガロースゲル内に再生される組織の体積減少によるものであり、再生組織そのもののsGAG濃度が低下したことによるものではないと推測される。しかしながら、ハイドロゲル中の再生組織の総体積の検討には、本研究で用いた2次元の組織染色画像では不十分であり、今後は培養体中の細胞の形状・サイズの計測や培養体中の総タンパク含有量の測定を行い詳細な評価を行う必要がある。

二点目には、高電圧の印加による細胞活性の低下が考えられる。与えられる電圧が大きくなるに従って、sGAG産生量が減少する傾向が見られることから、交流電圧の印加によって細胞活性が低下した可能性が示唆された。軟骨細胞は誘電泳動によって細胞膜で分極構造を取ると推測される。誘電泳動を用いた細胞集積化では、分極構造による細胞へのダメージの有無、細胞機能への影響などを明らかにする必要があると考えられる。

本研究では、誘電泳動を用いたハイドロゲル内部での細胞配列の制御技術を確認した。また、スリット形状の細胞凝集塊をハイドロゲル内部に作製し、培養することで再生領域に異方性のある再生軟骨組織を作製することができた。今後は、印加電圧や誘電泳動中の細胞表面における分極構造の変化を計測、評価することで誘電泳動による集積化が細胞機能に与える影響を検討する予定である。

5. 結 論

誘電泳動を用いたハイドロゲル内への軟骨細胞の集積化技術を確認した。さらに、その細胞集積化技術を用いて、アガロースゲル中で軟骨細胞をスリット形状に集積化した後に培養することで、再生領域に異方性を持つ再生軟骨を作製することができた。

文 献

- (1) Wakitani, S., Kimura, T., Hirooka, A., Ochi, T., Yoneda, M., Yasui, N., Owaki, H. and One, K., Repair of Rabbit Articular Surfaces with Allograft Chondrocytes Embedded in Collagen Gel, *Journal of Bone and Joint Surgery*, Vol. 71, No. 1 (1989), pp. 74-80.
- (2) Ochi, M., Uchio, Y., Tobita, M. and Kuriwaka, M., Current Concepts in Tissue Engineering Technique for Repair of Cartilage Defect, *Artificial Organs*, Vol. 25, No. 3 (2001), pp. 172-179.
- (3) Buschmann, M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J., Kimura, J. H. and Hunziker, E. B., Chondrocytes in Agarose Culture Synthesize a Mechanically Functional Extracellular Matrix, *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 10, No. 6 (1992), pp. 745-758.
- (4) Underhill, G. H., Chen, A. A., Albrecht, D. R. and Bhatia, S. N., *Biomaterials*, Vol. 28, No. 2 (2007), pp. 256-270.
- (5) Stttinger, M., Reitzel, D., Dauner, M., Hierlemann, H., Hammer, C., Kastenbauer, E., Planck, H., Burmester, G. R. and Bujia, J., Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structure to chondrocyte, *Journal of Biomedical Material Research*, Vol. 33, No. 2 (1996), pp. 57-63.
- (6) Guilak, F., Butler, D. L., Goldstein, S. A. and Mooney, D. J., eds., *Functional Tissue Engineering*, (2003), pp. 227-229, Springer-Verlag.
- (7) Jones, T. B., *Electromechanics of Particles*, (1995), pp. 34-62, Cambridge University Press.
- (8) Ringeisen, B. R., Othon, C. M., Barron, J. A., Young, D. and Spargo, B. J., Jet-based methods to print living cells, *Biotechnology Journal*, Vol. 1, No. 9 (2006), pp. 930-948.
- (9) Schnelle, T., Hagedorn, R., Fuhr, G., Fiedler, S. and Müller, T., Three-dimensional electric field traps for cells-calculation and experimental verification, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1157, No. 2 (1993), pp. 127-140.
- (10) Fuhr, G., Glasser, H., Müller, T. and Schnelle, T., Cell manipulation and cultivation under a.c. electro field influence in highly conductive culture media, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1201, No. 3 (1994), pp. 353-360.
- (11) Voldman, J., Gray, M. L., Toner, M. and Schmidt, M. A., A microfabrication-based dynamic array cytometer, *Analytical Chemistry*, Vol. 74, No. 16 (2002), pp. 3984-3990.
- (12) Rosenthal, A. and Voldman, J., Dielectrophoretic traps for single-particle patterning, *Biophysical Journal*, Vol. 88, No. 3 (2005), pp. 2193-2205.
- (13) Mittal, N., Rosenthal, A. and Voldman, J., *Lab on a Chip*, Vol. 7, No. 9 (2007), pp. 1146-1153.
- (14) Suzuki, M., Yasukawa, T., Shiku, H. and Matsue, T., Negative dielectrophoretic patterning with different cell types, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 24, No. 4 (2008), pp. 1043-1047.
- (15) Albrecht, D. R., Underhill, G. H., Wassermann, B. T., Sah, R. L. and Bhatia, S. N., Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments, *Nature Methods*, Vol. 3, No. 5 (2006), pp. 369-375.
- (16) Albrecht, D. R., Underhill, G. H., Mendelson, A. and Bhatia, S. N., Multiphase electropatterning of cells and

- biomaterials, *Lab on a Chip*, Vol. 7, No. 6 (2007), pp. 702-709.
 - (17) Farndale, R. W., Buttle, D. J. and Barrett, A. J., Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 883, No. 2 (1986), pp. 173-177.
 - (18) Kim, Y. J., Sah, R. L., Doong, J. Y. and Grodzinsky, A. J., Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258, *Analytical Biochemistry*, Vol. 174, No. 1 (1988), pp. 168-176.
 - (19) Benay, P. D., Shaffer, J. D., Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels, *Cell*, Vol. 30, No. 1 (1982), pp. 215-224.
-