

ナノプリント技術を応用したナノピラー細胞培養シート

Nanopillar Sheets for Cell Culture Fabricated by Nanoprinting

齊藤 拓 Taku Saito

高橋 亮介 Ryosuke Takahashi

桑原 孝介 Kosuke Kuwabara

根本 雅文 Masabumi Nemoto

小林 豊茂 Toyoshige Kobayashi

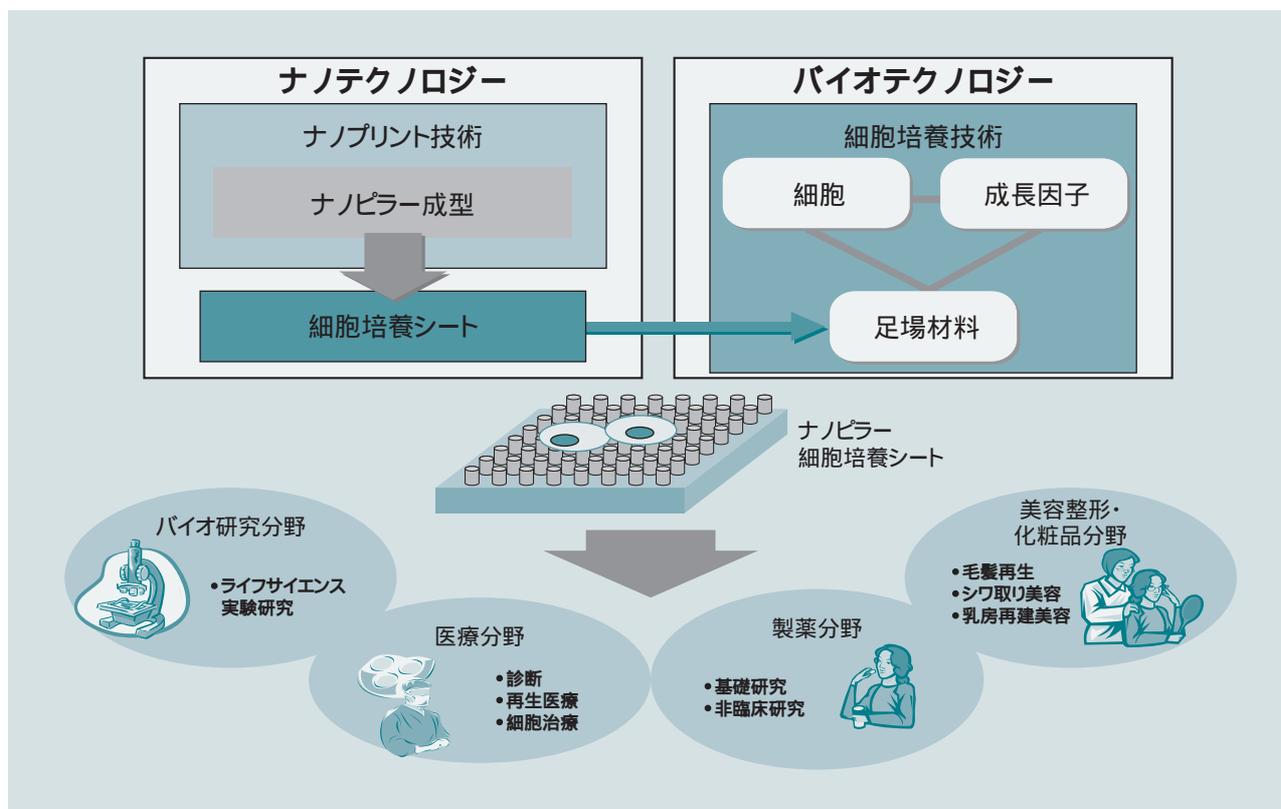


図1 ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合が切り開く未来

細胞培養に必要な足場材料にナノプリント技術を応用することで、生体内に近い環境を人工的に構築することができる。日立グループは、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合によって、細胞培養技術を革新し、人々の暮らしや健康を支えることを目指している。

1.はじめに

近年、半導体デバイス産業をはじめ、光学部品やストレージデバイスなどの分野で、より微細な加工技術への要求が高まっている。その要求に応える技術の一つに、簡便・低コストでさまざまな材料に超微細加工を施すことが可能なナノプリント技術がある¹⁾。最近では、この技術をバイオテクノロジーの分野にも応用する例が報告されており、その一つが、細胞を培養する際の足場材料への適用である。

一般的に細胞を培養するためには、細胞、成長因子、足場材料の三つが必要と言われており、特に足場材料は生体内に存在する血液細胞以外のほとんどの細胞(接着細胞)にとって、増殖や分化に欠かせないものである。

従来から、細胞培養の分野では、欲しい細胞を必要な数だけ、理想的な形状で、機能・活性を維持したまま作り出すことを目標としてきた。この目標達成に向け、次に示す技術開発に取り組んでいる。

- (1) ターゲットとなる細胞だけを分離する技術
- (2) 細胞を増殖させる技術
- (3) 細胞が増殖する過程の形状制御技術
- (4) 培養した接着細胞の剥(はく)離技術

これらのうち、(3)と(4)については、足場材料による技術革新の可能性があり、これまで足場材料として利用されてきた平面培養皿に代わる新しい部材が求められてきた。

日立グループは、ナノプリント技術で成型した超微細の柱

生体内に存在する多くの細胞は、細胞外マトリックスと呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在しており、この足場材料なくしては、細胞増殖や本来の機能発現をしないのが一般的である。そのため、生体外の細胞培養においても細胞外マトリックスに代わる足場材料が大きな役割を担うことになる。そこで、日立グループが有する超微細加工技術のナノプリント技術を応用することにより、これまででない培養特性を示す足場材料を開発した。将来的には、この足場材料の物理的パラメータを変更することで、ターゲットとなる細胞の培養特性をコントロールすることができれば、細胞治療をはじめとする先端医療分野や、製薬分野における非臨床検査などに大きな恩恵をもたらす可能性がある。日立グループは、2005年6月に、この足場材料であるナノピラー細胞培養シートの販売を開始するとともに、さまざまな研究機関や企業と連携しながら研究を進めている。

状構造(ナノピラー)を足場材料として使用した場合の、(3)および(4)に対する有効性を検証した。

ここでは、ナノピラー細胞培養シート、および基礎実験の結果について述べる(図1参照)。

2. ナノピラー細胞培養シート

ナノピラー細胞培養シート(以下、細胞培養シートと言う。)は、一般的な平面培養皿の材料として使用されるポリスチレン樹脂上に微細構造を成型したものである。微細構造の成型には、熱式ナノプリント技術を利用しており、概略工程は図2に示すように、加熱したポリスチレン樹脂上にナノ金型を押し当て、加圧し、冷却後にナノ金型を剥離するという手順で構成される。

細胞培養シート上に形成したナノピラーの直径は240 nm ~ 2 μm、高さは1.0 μmである。細胞の培養特性の解析を効率よく進められるよう、複数の大きさのナノピラーをさまざまなパターンで配置した「標準マルチパターン型」と、同じ大きさのナノピラーを均一に配置した「モノパターン型」の2種類の細胞培養シートを用意した。細胞培養シートの評価を実施する場合、最初に「標準マルチパターン型」で細胞の大まかな培養特性を観察し、その後、適当と思われるナノピラー直径のモノパターン型で詳細な評価をすることにより、作業を効率よく進められる。

数百nm ~ 数μmという大きさは、図3に示すように、一般的な細胞の大きさと同程度もしくは以下であるため、ナノピラーを細胞と直接相互作用する構造体として活用することが期待できる。さらに、モノパターン型のシートは、ナノピラーの大きさや配置パターンを変えることができるため、これらのパラメータが細胞培養の足場材料として培養特性に与える影響を評価することが可能である(図4参照)。

3. 細胞培養シートの評価

細胞培養シートの評価は、過去に多くの培養実績があり、比較実験に適しているという観点から、HeLa細胞¹⁾、マウスの神経細胞、および繊維芽細胞の三つを使用した。以下に

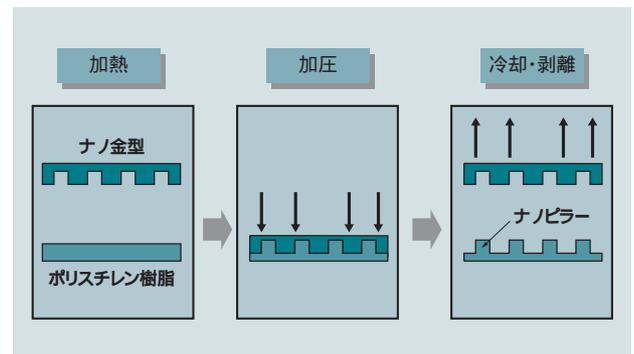
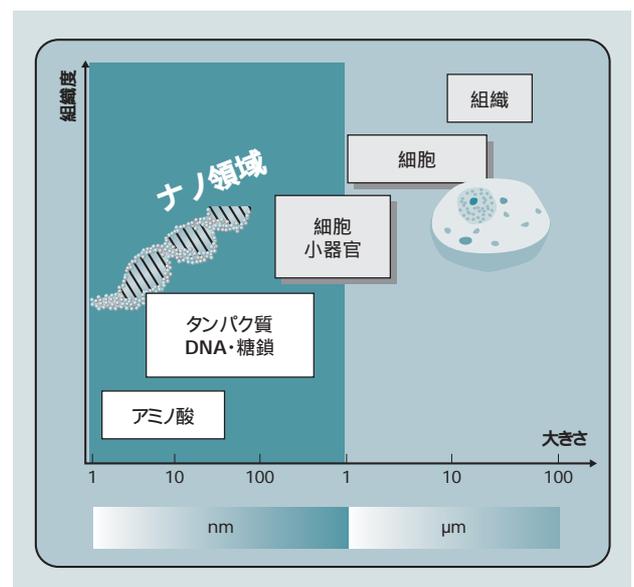


図2 細胞培養シート作製工程
熱式ナノプリント技術を用いて微細構造を成型する。



注:略語説明 DNA(Deoxyribonucleic Acid)

図3 細胞の大きさ
ナノピラーの大きさは一般的な細胞の大きさと同程度もしくは以下である。

その詳細について述べる。

3.1 HeLa細胞による評価

ヒト子宮頸(けい)がん由来樹立細胞株のHeLa細胞を、

1) HeLa細胞:ヒトの子宮頸がん細胞。最も古いヒト由来培養細胞であり、多くの研究で使われている。

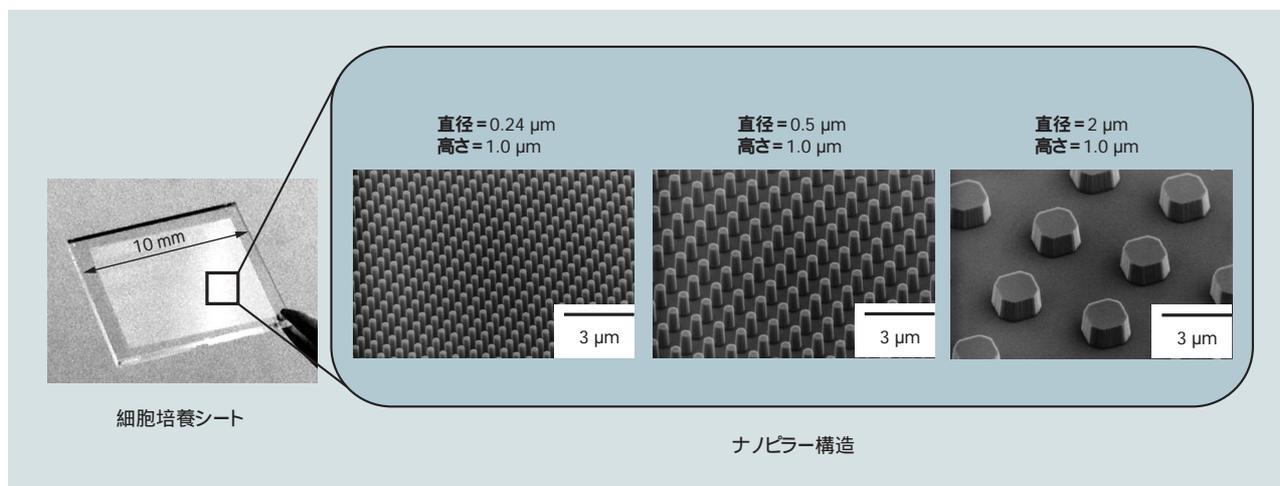


図4 細胞培養シート外観(モノパターン型の例)
モノパターン型はナノピラーの大きさや配置パターンを変えることができる。

1.0×10^4 cells/cm²の密度で細胞培養シート上に播(は)種し、10%FBS²⁾を含むDMEM³⁾中で培養(5% CO₂雰囲気、37℃)した。

平面培養皿と細胞培養シートで3日間培養したHeLa細胞の顕微鏡写真を図5に示す。平面培養皿上では、細胞は扁(へん)平に広がった形状で増殖していくが、細胞培養シート上では球状形状を保ったまま増殖している。また、培養したHeLa細胞の剥離性に関しては、シート上にピペットによる水流を起こすこと(ピペッティング)だけで、細胞培養シート上の細胞のほとんどを回収できるという結果を得た。一般的な平面培養皿上で培養した場合、細胞は接着タンパクを介して足場に接着しながら、増殖していく。そのため、細胞を回収するためには、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を使い、細胞の接着にかかわるタンパク質を分解する必要がある。しかし、トリプシンを使用すると、細胞表面のタンパク質などがダメージを

受けるため、再生医療などに応用するには好ましくない。今回、細胞培養シートを使用することにより、培養した細胞の機能・活性を維持したまま回収することができる可能性を見いだせたことで、さまざまな分野への応用が可能と考える。

3.2 マウスの神経細胞による評価

細胞培養シート上に、細胞接着を促すpoly-L-lysine⁴⁾を被覆した後、Opti-MEM⁵⁾に10%のFBS、55mM 2-metcap-toethanolを加えた培地を配した。培養に使用した細胞は、受胎後14日のICRマウス(実験用マウス)胎仔(じ)大脳皮質組織から調整したもので、細胞密度が 2.0×10^4 cells/cm²となるよう播種し、7日間の培養(5% CO₂雰囲気、37℃)を行った。

細胞培養シート上で培養したマウス神経細胞の状態を図6に示す。神経細胞はナノピラーの大きさによって異なる培養特性を示すことがわかる。ナノピラー直径が0.5 μmのシート上では、神経突起が太く、分岐数が多くなった。ナノピラー直径1.0 μmのシート上では、神経突起がナノピラーの間を直線状に長く伸展し、分岐はあまり起こっていない。ナノピラー直径5.0 μmのシート上では細胞体が球状に収縮し、神経突起は大幅に短くなった。

これらの結果から、神経細胞の細胞体や神経突起の形状は、ナノピラーの直径と間隔に依存することがわかった。

これらの結果から、神経細胞の細胞体や神経突起の形状は、ナノピラーの直径と間隔に依存することがわかった。

3.3 繊維芽細胞による評価

生体内の組織は細胞だけでなくECM

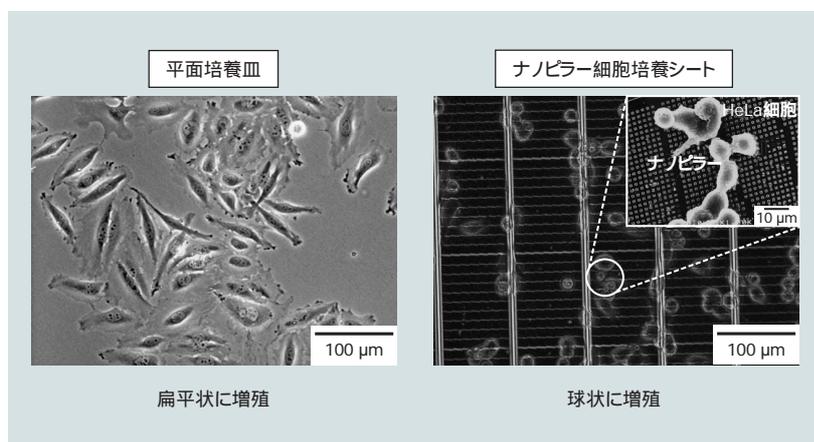


図5 培養したHeLa細胞
平面培養皿と細胞培養シートで3日間培養したHeLa細胞の顕微鏡写真をそれぞれ示す。

2) FBS(Fetal Bovine Serum):ウシ胎児血清
3) DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium):基本的な細胞培養用培地の一つ

4) poly-L-lysine:神経細胞などの接着を促す表面コーティング
5) Opti-MEM:MEM(Minimum Essential Medium)から血清成分を除いた無血清培地

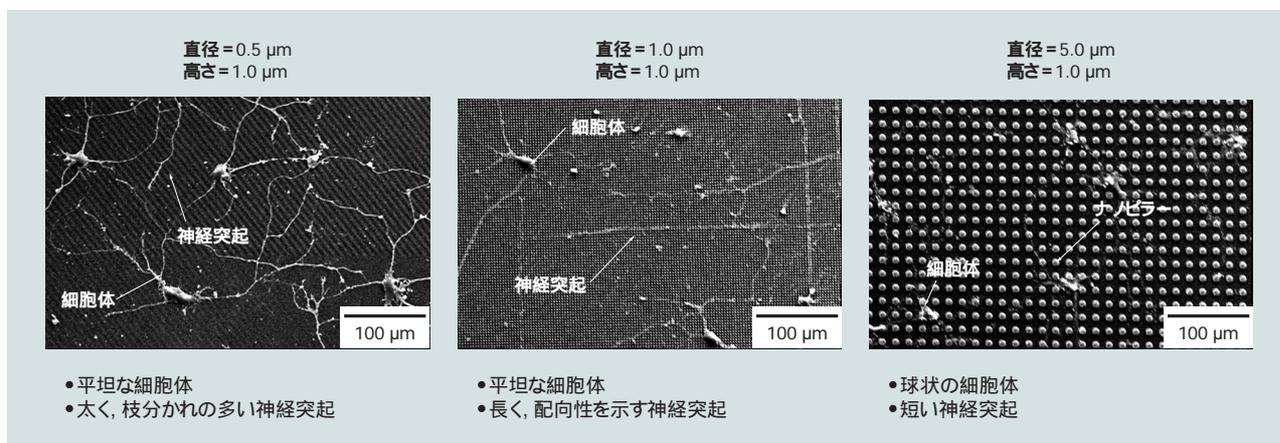


図6 培養したマウスの神経細胞
細胞培養シート上で培養したマウスの神経細胞の状態を示す。

(Extracellular Matrix:細胞外マトリックス) とよばれる三次元的な巨大分子の複雑な網目構造で満たされ、接触している細胞の生存、発生、接着、移動、増殖などを調節する役割を果たしている²⁾。このECMを構成する巨大分子を分泌するのが繊維芽細胞であり、細胞生物学や組織工学などの研究分野で頻繁に使用される実験材料となっているが、従来の平面培養皿での培養は、三次元構造を持つ生体内での環境を反映したものとはなっていない。

そこで、三次元構造を持つ細胞培養シートを用いて培養したときの繊維芽細胞の増殖能および接着性の検討を行った。培養にはマウス胎仔から樹立された繊維芽細胞を使用した。10% FBS, 抗生物質添加した培地を用いて、 2.0×10^4 cells/cm²の密度で細胞を播種し、48時間培養後に観察した。

その結果、従来の培養実験に用いられてきた平面培養皿では細胞 - 培養皿間、あるいは細胞 - 細胞間で接着を保ちながらシート状に増殖するのに対して(図7参照)、ナノピラー直径10 μm のシートで培養した場合には、細胞の培養皿への接着能が解除され剥離し、塊状になることがわかった(図8参照)。ナノピラー直径を変えて評価をしたところ、数 μm から数十 μm

と言われる細胞サイズのオーダーとほぼ一致する、ナノピラー直径が1.0 ~ 20 μm のシートで培養した場合において、このような傾向にあることがわかった。

また、ナノピラー直径が1.0 μm より小さな径を持つシートで培養した場合には、平面培養皿ほどではないにせよ、接着傾向にあるとみられる(図9参照)。ただし、シート状に増殖して

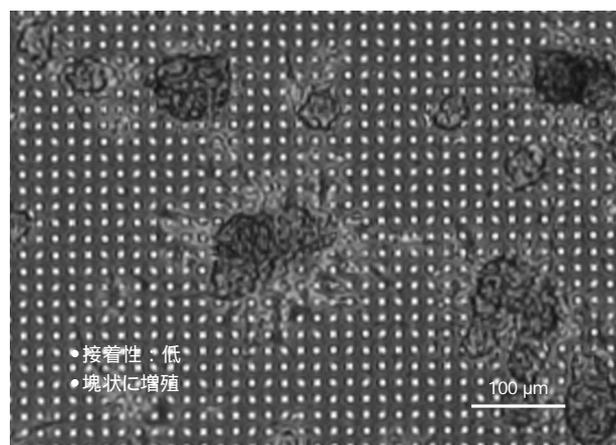


図8 細胞培養シート上での培養(ナノピラー直径10 μm)
細胞の接着能が解除されて塊状になる。

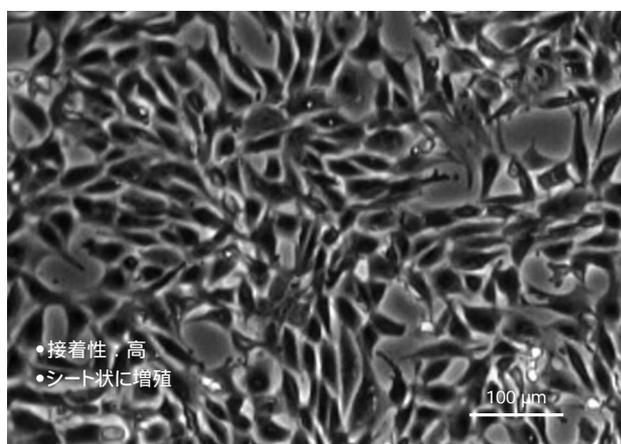


図7 平面培養皿上での培養
細胞は接着を保ちながらシート状に増殖する。

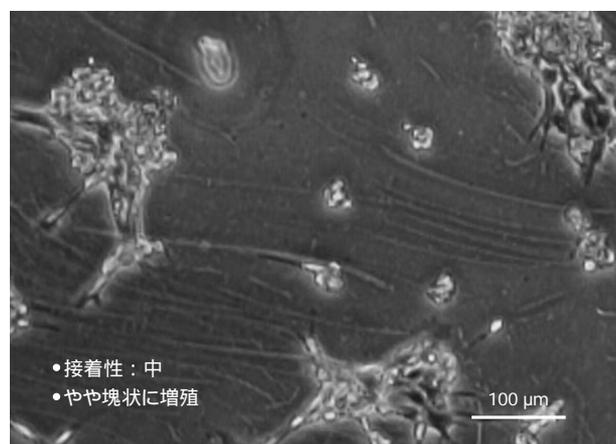


図9 細胞培養シート上での培養(ナノピラー直径0.25 μm)
細胞は接着傾向にあるが、シート状には増殖しない。

いくことはなかった。

これらの結果は、細胞表面に存在している接着タンパクが最適な足場を見失い、それらを介した情報伝達が細胞内に伝達されず、結果として通常の接着や増殖を行うことができなかったためと考えられる。

以上の結果から、繊維芽細胞を細胞培養シート上で培養した場合、ナノピラーパターンによって、その接着性や増殖能が異なる傾向にあることがわかった。

4. おわりに

ここでは、ナノピラー細胞培養シート、および基礎実験の結果について述べた。

基礎実験の結果から、ナノピラーの形状(大きさや配置パターン)と、培養した細胞の接着性、形状、増殖能などの間に、ある程度の関係があるという知見を得た。つまり、ナノピラーの大きさや配置パターンを適切に選択することにより、細胞の形状や剥離性をコントロールできる可能性がある。ナノプリント技術を利用することのメリットは、足場材料としての物理的環境を定量的に制御できる点にあるため、ナノピラー形状を変更することで細胞の培養特性を意のままにコントロールすることが可能になれば、その恩恵は計り知れないであろう。

日立グループは、2005年6月に細胞培養シートを発売して以来、さまざまな研究機関や企業の協力の下、基礎実験を重ねてきた。現在も、細胞の成長形状制御や剥離性向上などの観点から細胞培養シートの評価を行うとともに、組織培養なども見据えて知見を積み重ねている。また、細胞培養シート以外にも、バイオ分野におけるナノプリント技術の適用先として、タンパク質などの抗原を検出する免疫分析チップの高感度化などを検証した³⁾。ナノテクノロジーもバイオテクノロジーも、今後さらなる発展が期待される技術であり、これらの技術を生かすことで、医療、製薬、美容整形などの分野に貢献していきたいと考える。

なお、本稿で紹介した基礎実験のうち、HeLa細胞の培養に関しては、独立行政法人産業技術総合研究所との共同研究、マウス神経細胞の培養に関しては、北海道大学との包括連携に基づく共同研究による成果である。関係各位に深く感謝する次第である。

参考文献

- 1) S.Y.Chou, et al.: Appl. Phys. Lett., 67, 3114(1996)
- 2) B.Greiger, et al.: Nat Rev Mol Cell Biol. 2:793-805(2001)
- 3) K.Kuwabara, et al.: Proc. To 8th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(μTAS2004) 297(2004)

執筆者紹介



齊藤 拓
1999年日立製作所入社、トータルソリューション事業部プロジェクト統括本部 ナノプリントソリューションセンター所属
現在、ナノプリント技術の事業企画・エンジニアリングに従事



小林 豊茂
2003年日立製作所入社、基礎研究所 健康システムラボ所属
現在、細胞プロセッシング技術の研究開発に従事
日本炎症・再生医学会会員、日本組織工学会会員



根本 雅文
1992年日立製作所入社、トータルソリューション事業部プロジェクト統括本部 ナノプリントソリューションセンター所属
現在、ナノプリント技術の事業化取りまとめに従事



桑原 孝介
2002年日立製作所入社、日立研究所 材料研究所 電子材料研究部 所属
現在、ナノプリント技術の研究開発に従事
応用物理学会会員



高橋 亮介
2001年日立製作所入社、基礎研究所 健康システムラボ所属
現在、細胞プロセッシング技術の研究開発に従事
日本分子生物学会会員、日本組織培養学会会員