

方向性を持つ組織反応



Cytoskeletal organization in three fibroblast variants cultured on micropatterned surfaces.

微小形状パターンのある表面で培養した3つの線維芽細胞変異株における細胞骨格形成

JC Grew, JL Ricci.

Presented at the Sixth World Biomaterials Congress, Kamuela, HI.

May 15-20, 2000.

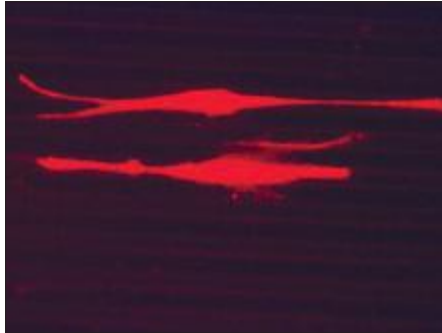


図1: 12μmのグループで培養した3T3-L1線維芽細胞。伸長した細胞の均一な配向性に注目

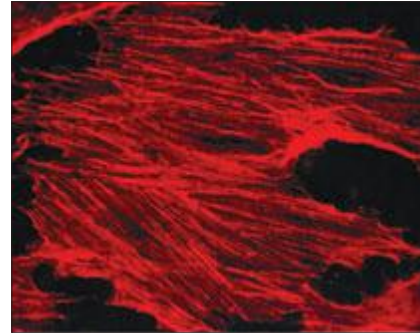


図2: 平滑面で培養したMC-3T3線維芽細胞

要約

緒言: インプラント表面形状および微小形状はインプラントに対する組織反応に影響を与える。合成基質の物理的・化学的特性は、培養された様々なタイプの細胞の形態、生理、行動に影響する。これまで、組織-インプラント相互作用の研究では、細胞付着、シグナル伝達およびその他の細胞反応メカニズムが重視されてきた。ミクロン単位の基質特性によって影響を受けた細胞特性には、細胞の形状、付着、移動、配向性および細胞骨格構築などが含まれる。我々はマウス線維芽細胞株の3つの表現型の変異株を用いて、細胞の形状、配向性およびマイクロフィラメント分布に与える基質の微小構造の影響について研究をおこなった。マイクロフィラメント組織は、細胞付着、有糸分裂、移動およびアポトーシスを制御する細胞シグナル伝達に付随して、細胞の形状および配向性を反映している。マイクロフィラメントの束(ストレス線維)は、培養基質に対し *in vitro* 細胞反応の一因となるアクチン関連タンパク、接着分子およびタンパクキナーゼのクラスターで終わっている。

方法: TiO₂ コーティングのマイクロテクスチャーを施したポリスチレンのインサートを入れた24穴のウェルプレートに、10%のNCS、1%の抗生物質を加えたDMEM培養地で、NIH-3T3線維芽細胞、3T3-Li線維芽細胞(ATCC、ヴァージニア州マナッサス)およびMC-3T3線維芽細胞(JP O'Connor氏による寄贈)を培養した。培養基質には8μmもしくは12μmの平行な溝、3μmの直角方向の溝によって分離されている3×3μm²の正方形の柱、あるいは特徴無し(コントロール)のものを使用した。10,000個の細胞を、インサートを入れているウェルの中に播種し、1日後、走査電子顕微鏡(SEM)用の標本作製とローダミン-ファロイジン染色をおこなった。

結果: 3T3線維芽細胞の3つの変異株全てが1日以内に全ての基質に付着した。コントロールの表面の培養細胞に顕著な配向性もしくは形状はなく、いくつかの細胞質には、明らかに焦点性癒着で終結するストレス線維のランダム配列がみられた。8μmあるいは12μmの溝をつけた基板上で培養した全細胞株のほぼ全ての細胞が、溝の頂上もしくは底で溝に並行に増殖、伸長し、配向していた(図1)。8μmの溝で培養した細胞は12μmの溝のものより頻りに溝を乗り越えて増殖していた。溝のある表面で1日培養した細胞でストレス線維形成を示すものは、どの細胞株にもほとんどみられなかった。溝を格子状につけた基質上で培養した細胞の多くには、柱の上で終結するストレス線維がみられた。この線維は中央の細胞質塊から直角に伸張し、突起した柱の頂上で終結する過程で構築された星状構造を持つと推察される(図1)。本所見は、我々が過去におこなった柱様基板上の培養NIH-3T3細胞の所見と同様であった。SEMでは3T3変異株に対する基質の細胞形状効果と細胞配向効果を確認した。

考察: 平行溝ならびに交差溝が、3T3線維芽細胞の3つの表現型分散株の細胞の形、配向性、細胞骨格構造を決定づけることが、本実験から明らかとなった。NIH-3T3変異株は線維形成株であるが、3T3-L1変異株は脂質合成をしており、またMC-3T3変異株は骨原性である。こうした細胞の表現型の分析を、アルカリ性ホスファターゼ分析(MC-3T3細胞はアルカリ性ホスファターゼ陽性)およびSudan Black B染色(3T3-Li細胞の脂質封入に対する染色)によっておこなった。上記のコンタクトガイダンスにおける細胞外基質および細胞接着分子の役割特性は明らかにならなかったが、今後のテーマではある。我々は以前、インテグリン分散およびチロシンキナーゼ活性がマイクロメトリック基質の特性による物理的に抑制されていることを明らかにした。同様の抑制が本稿で述べた細胞の中でも起こっていると仮定される。インプラントに対する組織応答を指示する細胞株における表現型の相違の解明が、インプラントの結合改善と延命に有益となるかもしれない。

謝辞: 本論文はNSFの助成金SBIR-9160684およびDUE-9750533、ならびにNJCU・SBRの助成金220253を受けた。微小形状の鑄型はCornell Nanofabrication Facilityにて製作した。

方向性を持つ組織反応



Cytological characteristics of 3T3 fibroblasts cultured on micropatterned substrates.

微小パターンを持つ基板上で培養した 3T3 線維芽細胞の細胞学的特徴

JC Grew, SR Frenkel, E Goldwyn, T Herman, JL Ricci.

Presented at the 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials.

April 22-26, 1998. San Diego, CA.

要約

緒言: 組織-インプラント相互作用は完全には解明されていないが、インプラントの表面形状および微小形状は細胞反応に影響する。合成基質の物理的・化学的特性は様々なタイプの培養細胞における形態、生理および行動に影響する。これらの詳細が *in vitro* においてようやくわかりはじめた。平滑な基板上で培養した細胞と、ミクロン単位の表面規則性を持つ基板上で培養した細胞間では、形態、付着、遊走、方向および細胞骨格構成が異なる。我々はマウス線維芽細胞の形状、方向、ならびにマイクロフィラメントと接着斑の分布 — 基板の微小形状に影響するコンタクトガイダンスおよびその他の因子の関連パラメータについて研究をおこなった。マイクロフィラメントの構造は細胞形状および配向性を反映するのみならず、細胞付着、有糸分裂、遊走およびアポトーシスをつかさどる信号変換体系にも重要である。マイクロフィラメント束はアクチン関連タンパク質、接着タンパク質、信号変換機能を持つプロテインキナーゼの集合体で一単位となる。我々は、(1) マイクロフィラメント/張線維、(2) 接着斑分子、(3) 細胞付着に関連する主要キナーゼ生成物のホスホチロシンなどの分布に関して分析をおこなった。

方法: 1cm^2 のマイクロテクスチャー加工インサートの入ったマルチウェルプレート内で、冷凍保存株の 3T3 線維芽細胞(メリーランド州ロックヴィル、ATCC 社) を 10%FBS 含有 DMEM で培養した。インサートはシリコン型で溶媒キャストされたポリスチレンで構成され、酸化チタンコーティングされている。表面は、 $8\mu\text{m}$ の平行の溝、 $12\mu\text{m}$ の平行の溝、 $3\mu\text{m}^2$ の柱 ($3\mu\text{m}$ の溝が直角に交わることで作られた突起)、あるいは特徴無し(コントロール群)とした。インサートを入れたウェルに 4,000 の細胞を播種し、4 日または 8 日間の培養をおこなった。細胞は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察をした。また、(1) ローダミン-ファロイジン、(2) マウス抗タリン/マウス抗ピンキュリンと抗マウス-ローダミン抗体、(3) 抗ホスホチロシン-フルオレセイン抗体のいずれかを用いて細胞染色をおこなった。

結果: 3T3 細胞は培養 4 日までに全基板上に付着し、8 日までにはかなり増殖した。ところどころ重なり合う細胞もみられた。コントロール群の表面上で培養した細胞には顕著な配向性や形状の特性はなかった。その細胞質にはローダミン染色の拡散がみられ、明らかなストレス線維はなかった。接着斑およびホスホチロシンは拡散分布していた。 $8\mu\text{m}$ あるいは $12\mu\text{m}$ の溝がある基板で増殖した細胞は溝に沿ってほぼ均一な配向がみられた。 $8\mu\text{m}$ 溝では培養細胞はほとんどが溝の頂部で増殖しており、溝を超えてまたがっているものも多かった。 $12\mu\text{m}$ 溝の培養細胞は主に溝の頂部もしくは溝内で増殖しており、隣の溝の頂部にまたがって増殖しているものは少なかった。どちらの溝でも 8 日間培養した細胞の中には、ストレス線維の限局した痕跡を示すものもあった。接着斑とホスホチロシンは細胞と基板の接触面部位に限定されており、溝から溝にまたがる細胞の一部分は接着斑とホスホチロシンが欠如していた。柱様表面の培養細胞では、柱の間を交差する溝に沿うようにマイクロフィラメントの直交配列がみられたものの、ストレス線維は観察されなかった。これらの細胞は柱の頂上に留まるか表面に定着し、基底面に限ってマイクロフィラメント束の分布がみられた。SEM からは、基底細胞膜表面の柱の貫通と、柱周囲への細胞含有物の定着が明らかであった。接着斑とホスホチロシンも同様に分布していた。

考察: 本実験では、平行あるいは直行の溝が 3T3 線維芽細胞の接着斑の形状、方向、細胞骨格形成および分布に影響を与えることが確認されたが、ラット腱線維芽細胞への効果に関する我々のこれまでのデータを発展させる結果となった。これらのプロセスを誘導する細胞外基質の役割は、明らかにはなっていないものの、考察の必要がある。基質の物理特性によってキナーゼ活性が制限される発見は新規であり、基質に対する反応は、細胞の種類によって異なるメカニズムであることが明らかになった。我々は、インプラントの結合の促進と機能の延命に関わるそれぞれの細胞特性のうちの表現型について、それらの相違を発見することを目標としたい。

謝辞: 本研究は、全米科学財団 SBIR フェーズ I 助成金 #9160684 およびジャージー市州立大学 SBR 助成金 #220251 を受けている。微細構造の鋳型は Cornell Nanofabrication Facility にて製作した。