

共培養系における心筋細胞の地形ガイドによる凝集誘導

Directed aggregation of cardiomyocytes by topographical guides in co-culture system

NTT 物性科学基礎研究所 °宮廻裕樹, 手島哲彦、上野祐子

NTT Basic Research Laboratories, °Hiroki Miyazako, Testuhiko Teshima, Yuko Ueno

E-mail: miyazako.hiroki@lab.ntt.co.jp

1. 緒言

培養細胞を用いた組織工学の分野において、多数の細胞を精度よく配置する技術が求められており、3D プリンティングや細胞外基質のパターニングによる配置技術が研究されている。組織工学においてパターニングする細胞には、株化細胞、幹細胞や初代培養細胞があり、初代培養細胞は動物から採取しているため、より生体に近い応答をすることが期待される。しかし、初代培養細胞の場合、複数種の細胞が混在しているため、それらの中から特定の細胞を所望の位置に配置するということは困難であった。我々は、初代ラット心筋細胞／繊維芽細胞の共培養系を三角形の閉領域中で培養することで、心筋細胞が中心に凝集する傾向があるという現象を発見したので、その実験結果について報告する。

2. 実験

フォトリソグラフィ技術によってタンパク質の吸着を抑制する MPC ポリマーをガラス基板上にパターニングした (MPC ポリマーの存在するところは細胞が吸着しない)。ラット(E18)初代心筋細胞、繊維芽細胞をパターン基板上に播種し、1 週間培養した。培養 7 日目に細胞固定化处理をし、心筋細胞のマーカーであるトロポニン I の免疫染色とファロイジンによるアクチン染色の 2 重染色を行い、蛍光観察を行った。また、培養 5 日目に Fluo-4 によりパターン基板上的心筋細胞のカルシウムイメージングを行った。

3. 結果・考察

MPC ポリマーのパターニングによって三角形の細胞接着領域を作成したときの典型的な結果を Fig. 1 に示す。位相差像(a)およびアクチン染色像(b)により三角形形状の細胞接着領域全体に細胞が存在していることが分かるが、心筋細胞のマーカーであるトロポニン I が染色された細胞は三角形の重心に局在した (Fig.1 (c))。また、Fluo-4 によりカルシウムイメージングをした結果、重心付近に凝集した細胞の蛍光強度が周期的に強くなっていることが分かった (Fig. 2)。したがって、三角形の細胞接着領域上に心筋細胞と繊維芽細胞を共培養させることで心筋細胞を三角形の重心付近に自律的に集合できたと考えられる。この原因として繊維芽細胞が増殖しパターンの境界に沿って配向するため、拍動する心筋細胞が一番応力のかかりにくいパターンの中心に存在しやすくなり、凝集するという仮説が考えられる。

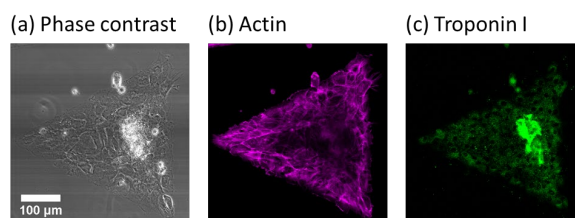


Fig.1: Microscope images of cardiomyocytes and fibroblasts

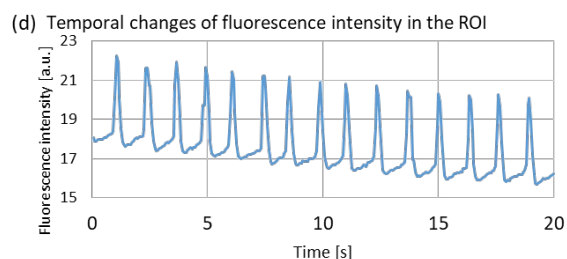
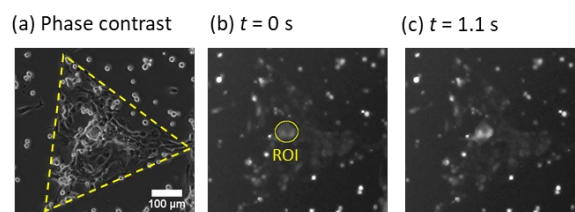


Fig.2: Calcium imaging of cardiomyocytes on the MPC polymer patterned substrate