



# Preparation of coculture system with three extracellular matrices using capillary force lithography and layer-by-layer deposition

表面張力リソグラフィ法による3種類の細胞外マトリックスを用いた細胞共培養

(JBB, Vol.108, No.6, 544-550, 2009)

高橋晋太郎<sup>1a</sup>・山添 泰宗<sup>2</sup>・佐々 文洋<sup>1</sup>・鈴木 博章<sup>1</sup>・福田 淳二<sup>1\*</sup>

生体内の細胞は、主に3つの細胞微小環境（液性因子、細胞-細胞間の相互作用、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用）により調節を受けている。従来の細胞培養法では、これらのうち、液性因子は培養培地中に添加することによって、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用については培養皿表面に細胞外マトリックスを塗布することによって、その役割や作用機序などが評価されてきた。一方、近年、フォトリソグラフィなどの半導体微細加工技術を用いることで、異なる種類の細胞をマイクロスケールで空間配置することが可能となり、細胞-細胞間相互作用を解析する技術が提案されている。すなわち、上記3つの細胞微小環境を評価する技術は存在するわけであるが、これまでは個々の作用はそれぞれ個別に評価されてきた。しかし、より生体に類似した環境下で解析を行うためには、これら3つを同時に制御する技術が必要である。ここでネックとなっていたのは、細胞パターンの作製に従来はポリエチレングリコールのような合成ポリマーが利用されていたことであった。本研究では、数種類の細胞外マトリックスの物理化学的な性質に着目して、合成試薬などを使用せず、細胞微小環境を制御する技術を開発した。

具体的な手法を図1に示した。まず、細胞外マトリックスの主要成分のひとつであるヒアルロン酸（HA）をガラスチップ上にスピコートする。そして、キャピラリーフォースリソグラフィと名づけた技術を用いてHAのマイクロパターンを形成した。この技術は、HA溶液、微細凹凸構造を有するポリジメチルシロキサン（PDMS）、そしてガラスチップのそれぞれの界面における自由エネルギー差を利用し、PDMSの凸部の下のみHAパターンを形成するものである（図1）。この現象は、分かりやすく言えばコップとテーブルの間に水滴が入り込むのと同じ原理である。次に、HAには細胞やタンパク質の付着を抑制する性質があるため、形成したHAパターンのガラス表面露出部位にのみフィブロネクチン（FN）を物理吸着させ、そこへ1種類目の細胞を部位特異的に接着させた。一方、HAはマイナスにチャージしているため、ポジティブチャージを持つポリマーと

は静電的に結合する。そこで、1種類目の細胞パターンを形成させた状態で、ポジティブチャージを持つコラーゲンをHAと結合させ、非細胞接着性であるHA表面を細胞接着性であるコラーゲン表面へとスイッチングした。本技術は細胞の種類に依存せず、マイクロパターン共培養が構築できる。また、この表面上で、異種細胞間にGAP junctionを介した直接的なシグナル伝達が生じていることを示した（図2）。また、ES細胞から神経細胞への分化誘導に本技術が有用であることを示した。今後は、ここで用いた細胞マトリックスに対する他のさまざまな細胞外マトリックスの生物学的な結合を利用して、さらに生体内に類似した機能性表面を提案していきたいと考えている。

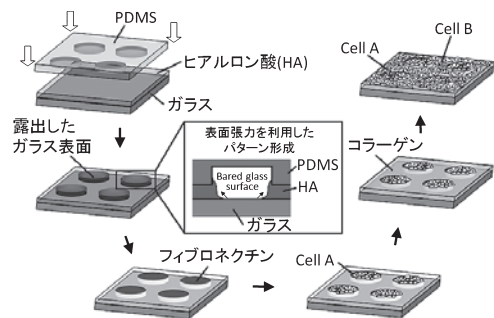


図1. マイクロパターン細胞共培養の作製法

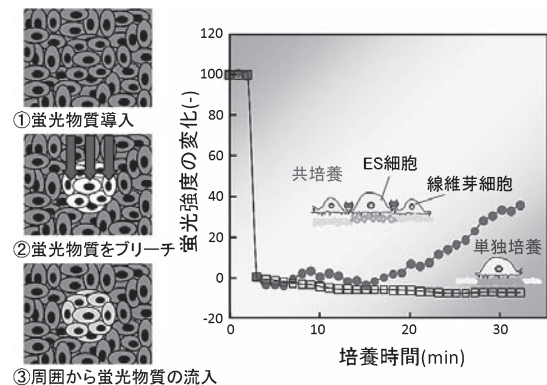


図2. 細胞接着分子（GAP junction）を介した細胞間のシグナル伝達

\*著者紹介 <sup>1</sup>筑波大学大学院数理物質科学研究科 物性・分子工学専攻（講師） E-mail: fukuda@ims.tsukuba.ac.jp  
<sup>2</sup>産業技術総合研究所, <sup>a</sup>現, オリンパス株式会社