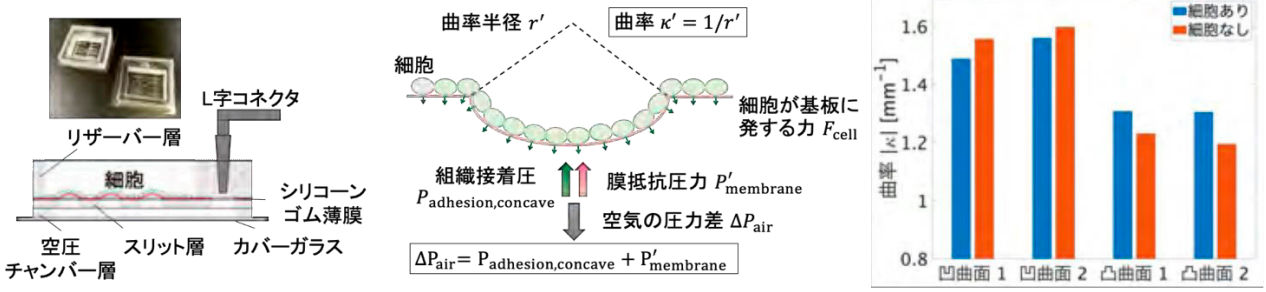
211　曲面上での組織張力アッセイ法の開発	山下　忠紘

【目的】体外での臓器構築の実現を目指す組織工学分野において、生体内で細胞が形成する精緻な立体構造やそれに由来する機能を再現するため、微細加工技術を用いたさまざまな形状の足場素材が製作され、細胞培養に用いられてきた。このような研究が進展するにつれ、これまで細胞の挙動に影響を与えることがないとみなされてきた曲率半径数百 μm の曲面構造が、組織の運動や形質の決定を誘導する物理的な入力であることが明らかになり，近年大きな注目を集めている。このような現象を説明するため、細胞には張力を用いて自らよりも巨大な構造の形状を認識する仕組みが備わっているものと予想されているが、立体面上で組織が発する力を定量的に評価する手法が存在せず、この予想は仮説の域を出ない。本研究は、細胞の形状認識機構を解明するための基盤技術として、凹凸曲面上で組織が発する力を評価する新規計測技術の開発を目的とする。

【方法】細胞が一様なシート上組織を形成して立体面上に存在するとき、組織はそれぞれの細胞接着部に対して力を及ぼす。その力の大きさを、組織の面積で除した量を組織接着圧 P と定義する。本研究は、曲率を操作可能な細胞培養環境を構築し、凹面上と凸面上で組織接着圧を評価可能な新しい計測系を構築した。まず、空気槽、シリコーンゴム薄膜、細胞培養槽からなるマイクロ細胞培養デバイスを製作した（図左）。このマイクロ細胞培養デバイスは、空気槽内の圧力を操作することで、細胞培養面の曲率を数 mm^{-1}の範囲で操作することが可能である。このマイクロ細胞培養デバイスの内部で、培養面を凹面もしくは凸面に保ちながらヒト大動脈血管平滑筋細胞（HASMC）をコンフルエント状態になるように培養し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて培養面の立体形状を観察した。次に、トリプシンを用いて HASMC を除去し、再び培養面の立体形状を観察した。最後に、細胞除去前後の培養面の曲率の僅かな変化から、HASMC が曲面状の培養面に及ぼしていた組織接着圧 P を評価した（図中央）。

【結果】マイクロ細胞培養デバイス内の空気槽内部の圧力を操作し、培養面の形状を凹面もしくは凸面に維持した状態で、HASMC はその上に一様なシート状構造を形成した。トリプシン処理により HASMC を除去した結果、凹面・凸面どちらの場合においても培養面の曲率が $0.1\,\mathrm{mm}^{-1}$前後変化した（図右）。細胞の有無に起因するこの曲率変化は、細胞が接着時に曲面に及ぼしていた力の大きさを反映しており、シリコーンゴム薄膜の特性から、その大きさは組織接着圧 P として凹面上で 19 hPa、凸面上で 34 hPa と算出された。培養面の曲率と細胞密度をもとに、この値を単一細胞あたりの張力に換算したところ、その値は凹面上で 3.1 μN、凸面上で 6.4 N であった。この値は、先行研究によって報告された、平面上で HASMC が発する張力の大きさ（4〜12 μN 程度）と比較しても妥当なスケールである。また、本研究では凸面上でより大きな組織接着圧が算出された。間葉系幹細胞（MSC）が凸面上で示す特異的な骨分化現象を報告した他グループによる先行研究では、凸面上で存在する MSC が核内に多くの中間径繊維 Lamin A を持ち、核により強い細胞張力が加わっていることが示唆されていたが、本研究の結果はこの既報とも符合する。今後、本手法を用いて、曲率を変えた様々な曲面上で組織が発する力の大きさを計測することで、細胞の曲面検知および応答において細胞張力が発する役割が明らかになると期待される。

マイクロデバイスを用いる曲面上での細胞張力の測定



211. 曲面上での組織張力アッセイ法の開発

山下　忠紘

慶應義塾大学 理工学部 システムデザイン工学科 須藤研究室

Key words：曲率，張力，血管平滑筋細胞，マイクロデバイス

緒　言

体外での臓器構築の実現を目指す組織工学分野において、生体内で細胞が形成する精緻な立体構造やそれに由来する機能を再現するため、微細加工技術を用いたさまざまな形状の足場素材が製作され、細胞培養に用いられてきた。従来、足場素材が持つ数十μm 以上の構造、すなわち単一細胞よりも大きなスケールの表面形状は、細胞にとって平面と認識され、その形態や性質に大きな影響を与えることが無いと見做されてきた。しかしながら、2010 年代半ばから、これまで細胞の挙動に影響を与えることがないと考えられてきた曲率半径数百μm のわずかな曲面状構造が、細胞や組織の運動［1］、変形［2］、成長［3］、表現型［4］といった様々な挙動や性質に決定的な影響を与えることが報告されてきた。このような報告は、細胞よりもはるかに大きなスケールの曲面が持つわずかな曲率が、細胞の運命を決定し得る物理的な入力であることを示しており，近年大きな注目を集めている。

曲率に依存した様々な細胞の挙動を説明するため、細胞には張力を用いて接着面のわずかな曲率を認識する仕組みが備わっているものと予想されているが、現時点でこの考えは仮説の域を出ない。この仮説を検証するためには、曲面上で組織が発する力を定量的に評価し、細胞が曲面状で示す挙動との相関を精査する必要がある。細胞や組織が発する張力を定量的に評価するため、Traction Force Microscopy［5］や、Muscular Thin Film 法［6］といった実験手法が開発されてきたが、これらの計測原理は曲面上に存在する細胞に適用する際に様々な技術的困難を伴うため、これまで曲面上に存在する細胞の張力を計測することはできなかった。本研究は、細胞が持つ形状認識機構を解明するための基盤技術として、凹凸曲面上で組織が発する力を評価する新規計測技術を開発することを目的とする。

方　法

1. 曲面上での組織張力計測の原理

曲面上で細胞が示す特異な変形挙動［2］を解析するため、我々の研究グループはこれまで、空気圧を用いて培養面の曲率を操作可能なマイクロ細胞培養デバイスを開発した［7］。本研究は、マイクロ細胞培養デバイスに改良を施すことで、培養面のわずかな曲率の変化から、曲面上に存在する細胞が発する力の大きさを計測する新しい計測原理を着想した。本研究で用いるマイクロ細胞培養デバイスは、上部の細胞培養槽（リザーバー）と下部の空気槽（空圧制御チャンバー）が、シリコーンゴム薄膜で隔てられた構造を持つ（図 1a）。シリコーンゴム薄膜上で細胞を培養し、同時に空気槽の圧力を制御することで、曲率半径数 mm^{-1}の範囲で培養面の曲率を操作することが可能である。

培養組織が存在しない状態でシリコーンゴム薄膜内外の圧力差をΔP_{air}一定に保つと、シリコーンゴム薄膜の形状は以下の釣り合いの式が成り立つように維持される。ここで、P_{membrane}は変形したシリコーンゴム薄膜が元の形状に戻ろうとするために発生する復元圧力である。

$$\Delta P_{\mathrm{air}} = P_{\mathrm{membrane}} \tag{1}$$

一方で、内外の圧力差がΔP_{air}に保たれた曲面状のシリコーンゴム曲面の上に培養組織が安定的に存在しているとき、細胞が培養面に及ぼす圧力 P_{adhesion} とシリコーンゴム薄膜内外の圧力差ΔP_{air}、シリコーンゴム薄膜が発する復元圧力P'_{membrane}の間には、以下の釣り合いの式が成り立つ（図 1b）。

$$\Delta P_{air} = P_{adhesion} + P'_{membrane} \quad (2)$$

すなわち、培養組織が存在する状態と存在しない状態で、シリコーンゴムが発する復元圧力を測定し、その差分を評価することで、曲面上で培養組織が培養面に及ぼす力（圧力）の大きさを計測することが可能になる。以上の計測原理を実現するために、シリコーンゴム薄膜を持つマイクロ細胞培養デバイスと、デバイス内部の空気槽と外気圧の差圧を数日間にわたって制御・維持することが可能な空圧制御装置の製作に取り組んだ。

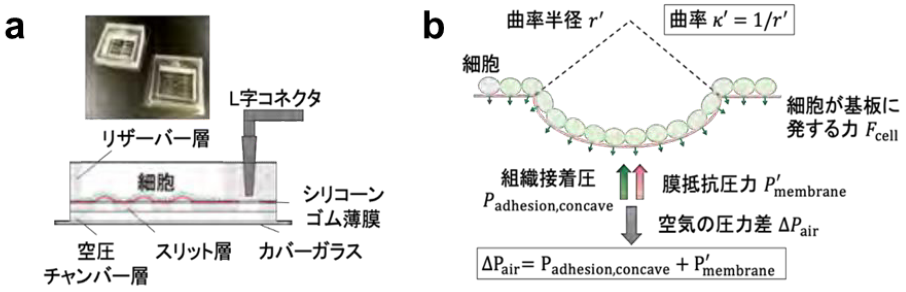


図 1. 曲面上に存在する組織の張力評価の原理

a) シリコーンゴム薄膜を含むマイクロ細胞培養デバイスの構造。

b) マイクロ曲面を構成するシリコーンゴム薄膜内外での圧力の釣り合い。

2. 実験装置の製作

フォトリソグラフィを用いてスリット、空気槽（空圧制御チャンバー）の鋳型を製作し、そのポリジメチルシロキサンを流し込んで固化させることで、それぞれの層を構成する部品（図 2a）を製作した。次に、これらの部品とシリコーンゴム薄膜、カバーガラスを、プラズマ処理を施した後に接合することで、マイクロ細胞培養デバイスを製作した。シリコーンゴム薄膜は、この後の蛍光観察のためにスルホローダミン水溶液で染色した。

次に、マイクロ細胞培養デバイス内部の空気槽の圧力を制御する空圧制御装置を製作した（図 2b）。本空圧制御装置は、コンプレッサと真空ポンプを圧力源とし、それぞれが発生する正圧と負圧をデバイス内部へ導く。圧力源は電空レギュレータを介してデバイスに接続されており、電空レギュレータは信号制御部からの入力信号に応じて、デバイス内部の空気槽の圧力を適切な値に調節する。信号制御部は Arduino と DA コンバータからなり、Arduino のプログラム上で設定した電圧信号を電空レギュレータに送る。

以上の装置を組み合わせることで、長期間にわたって細胞培養面の曲率を一定に維持することができる実験系を製作した。組織接着圧を評価するに先立ち、製作したデバイス内部へ印加する空気圧を変えながら、変形したシリコーンゴム薄膜の形状を共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、培養面の変形特性を評価した。

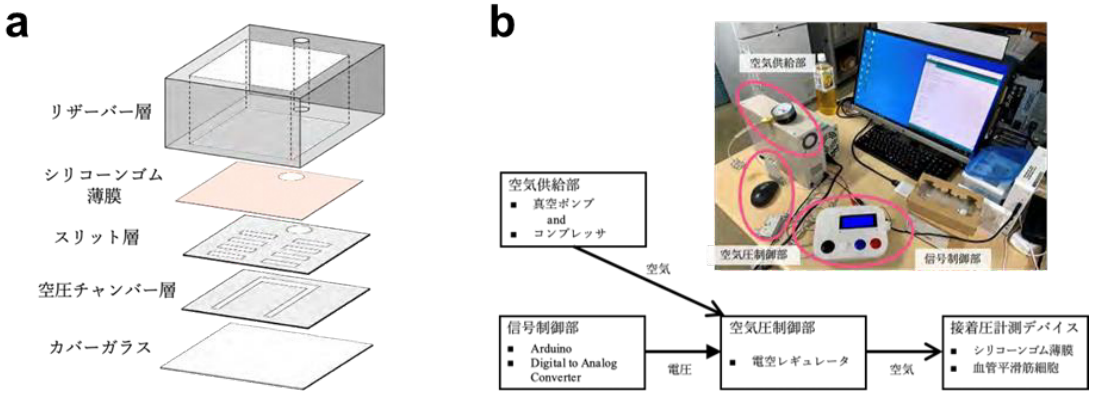


図 2. 曲面上に存在する組織の張力評価の原理

a) マイクロ細胞培養デバイスを構成する各部品の構造。

b) デバイス内外の圧力を制御するための空圧制御装置の構成。

3. 組織接着圧の計測

組織接着圧を計測するにあたり、細胞培養面にフィブロネクチンをコートした二つのマイクロ細胞培養デバイスを準備し、空圧制御装置に接続した。空圧制御装置は、接続された二つのデバイスに対し、同時に同量の空気圧を印加する。接続した一方のデバイスのリザーバー部へ、モデル細胞であるヒト大動脈血管平滑筋細胞（HASMC）を 7.5×10^4 cells/cm^{2}の密度で播種した。次に、二つのデバイス内部の空気槽内の空気圧を、外気圧に対して正もしくは負に調節することで、培養面を 1.3〜1.4 mm^{-1}程度の曲率を持つ凸面もしくは凹面に変形し、24 時間培養を継続した。HASMC は、観察のために Cell Tracker Green™ を用いて蛍光染色した。この間、細胞を播種していないデバイスには培地のみを入れ、その他の条件は細胞を培養したデバイスと同様に維持した。培養時間が経過した後、二つのデバイスの培養面の断面形状を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、その曲率を評価した。培養面の曲率から、薄膜の変形特性を参照することで、それぞれのデバイスの培養面が発している復元圧力を求め、その差分から、組織が曲面状の培養面に及ぼす圧力の大きさを評価した。

結　果

1. シリコーンゴム薄膜の変形特性の評価

製作したマイクロ細胞培養デバイスの空気槽に、空圧制御装置を用いて正負に渡る空気圧を印加し、変形したシリコーンゴム薄膜の曲率を評価した。シリコーンゴム薄膜の変形特性は、同様の拘束条件下における弾性膜の理想的な変形特性［8］をもとに、以下の式をフィッティングした。

$$\Delta P = A\kappa^3 + B\kappa \qquad (3)$$

負圧を導入したデバイスの培養面の変形特性は - 1 mm^{-1}以下の曲率において、正圧を導入したデバイスの変形特性は 0.5 mm^{-1}以上の曲率において、理論式との良好な一致を示した（図 3a、b）。曲率の絶対値が 1 mm^{-1}よりも小さい範囲では、変形した薄膜の曲率を顕微鏡画像から正確に読み取ることができなかったため、理論式とのずれが生じたものと考えられる。この結果から、本実験系は、凹面において−1〜−1.6 mm^{-1}、凸面において 0.5〜1.4 mm^{-1}の範囲で、空気圧操作によって正確に曲率を制御できることを確認した。

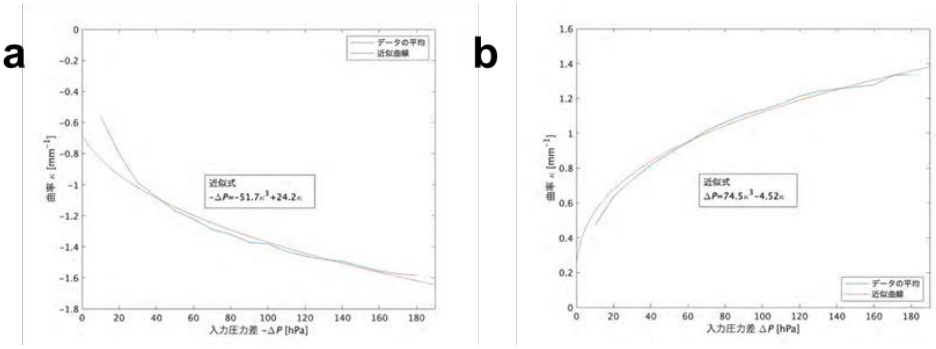


図 3.　シリコーンゴム薄膜の変形特性

a）負圧を導入した際の印加圧力-曲率応答特性　（N=2、n=16）。

b）正圧を導入した際の印加圧力-曲率応答特性　（N=3、n=24）。

2. 組織接着圧の計測

マイクロ細胞培養デバイスの内部で HASMC を培養したところ、HASMC は凹面、凸面どちらの上でもシリコーンゴム薄膜表面に良好に接着し、シート状の組織を形成した（図 4 a、b）。それぞれのデバイスが持つ 8 箇所の培養用曲面の曲率を評価し、その中央値をまとめたものが図 4c である。組織の存在によって、凹面では培養面の曲率が低下し、凸面では培養面の曲率が増加していることが確認された。これらの曲率から、シリコーンゴム薄膜の変形特性（図 3）

をもとに、組織が曲面に及ぼす圧力の大きさを、凹面では 19 hPa、凸面上で 34 hPa と算出することができた。単一細胞が曲面に沿って発する力の大きさ γ を、ヤングーラプラスの式

$$\gamma = \Delta P / \kappa \qquad (4)$$

を用いて概算したところ、その大きさを凹面上で 3.1 μN、凸面上で 6.4 μN と求めることができた。この値は、先行研究によって報告された、平面上で単一の HASMC が発する張力の大きさ（4〜12 μN 程度）［9］と比較しても妥当なスケールの数値である。

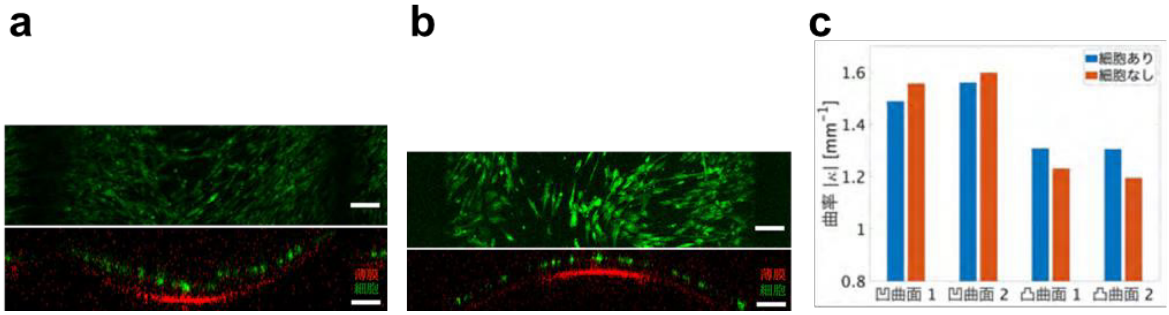


図 4. 曲面上で培養された組織と培養面の曲率

a) マイクロ細胞培養デバイスの凹面上で培養された HASMC とシリコーンゴム薄膜の様子（上段：平面図、下段：断面図；スケールバー：100 μm）。

b) マイクロ細胞培養デバイスの凸面上で培養された HASMC とシリコーンゴム薄膜の様子（上段：平面図、下段：断面図；スケールバー：100 μm）。

c) 培養面の曲率。

考　察

本実験を通じて算出された、曲面上で発する細胞張力の大きさは、先行研究と比較しても妥当なスケールであることから、本計測手法は培養組織が曲面上で発する張力の大きさを評価することができたと考えられる。従来の細胞張力計測手法［5, 6］は、技術的な制約から、平面上に存在する細胞のみに適用可能なものであったが、本研究は空気圧操作を用いる新しい原理を通じて、曲面上に存在する細胞が発する力の大きさを初めて計測することができた。今後、シリコーンゴム薄膜の厚みを細かく調節し、空圧制御装置の対応圧力を広げることで、幅広い範囲の曲率を持つ曲面上で、細胞が発する力の大きさを評価することが可能になると期待される。

また、本研究では、凸面上で凹面上よりも大きな組織接着圧が算出された。間葉系幹細胞（MSC）が凸面上で示す特異的な骨分化現象を報告した他グループによる先行研究では、凸面上で存在する MSC が核内に多くの中間径繊維 Lamin A を持つことが報告されている［4］。この結果は、凸面上に存在する細胞が、凹面上に存在する細胞よりも、細胞核に対して細胞張力に由来するより強い圧縮力を加えていることを示唆している。凸面上で凹面上よりも大きな細胞張力が認められた本研究の計測結果は、この既報と符合するものである。曲率に依存して細胞が張力を変化させる仕組みは未だに明らかになっていないが、今後本手法を用いて曲率を変えた様々な曲面上で組織が発する力の大きさを計測し、細胞の張力発生に関わるシグナル経路の活性化レベルとの相関を精査することで、細胞の曲面検知および応答において細胞張力が発する役割が明らかになると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科の須藤亮教授、竹内翠氏、高橋昴希氏と共同で遂行したものである。また、空圧制御装置を設計するにあたり、理化学研究所生命機能科学研究センターの田中信行上級研究員に多くの貴重なアドバイスを頂いたことに、感謝を申し上げる。

文　献

1) Pieuchot L, Marteau J, Guignandon A, Santos TD, Brigaud I, Chauvy PF, Cloatre T, Ponche A, Petithory T. Rougerie P, Vassaux M, Milan JL, Wakhloo NT, Spangenberg A, Bigerelle M, Anselme K. Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes. Nat Commun. 2018 Sep 28;9(1):3995. PMID: 30266986 DOI: 10.1038/s41467-018-06494-6.

2) Yamashita T, Kollmannsberger P, Mawatari K, Kitamori T, Vogel V. Cell sheet mechanics: How geometrical constraints induce the detachment of cell sheets from concave surfaces. Acta Biomater. 2016 Nov;45:85–97. PMID: 27562610 Epub 2016 Aug 22. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.08.044

3) Bidan CM, Kommareddy KP, Rumpler M, Kollmannsberger P, Bréchet YJM, Fratzl P, Dunlop JWC. How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. PLoS ONE. 2012;7(5):e36336. PMID: 22606256 Epub 2012 May 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0036336

4) Werner M, Blanquer SBG, Haimi SP, Korus G, Dunlop JWC, Duda GN, Grijpma DW, Petersen A. Surface Curvature Differentially Regulates Stem Cell Migration and Differentiation via Altered Attachment Morphology and Nuclear Deformation. Adv Sci. 2016 Nov 1;4(2):1600347. PMID: 28251054 PMCID: PMC5323878 eCollection 2017 Feb. DOI: 10.1002/advs.201600347

5) Polacheck WJ, Chen CS. Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools. Nat Meth. 2016 May;13(5):415–23. PMID: 27123817 PMCID: DOI: 10.1038/nmeth.3834

6) Nesmith AP, Agarwal A, McCain ML, Parker KK. Human airway musculature on a chip: an in vitro model of allergic asthmatic bronchoconstriction and bronchodilation. Lab Chip. 2014 Oct 21;14(20):3925-36. PMID: 25093641 DOI: 10.1039/c4lc00688g

7) Yamashita T, Nishina T, Matsushita I, Sudo R. Air-pressure-driven Separable Microdevice to Control the Anisotropic Curvature of Cell Culture Surface. Anal Sci. 2020;36(8):1015–9. PMID: 32201406 Epub 2020 Mar 20. DOI: 10.2116/analsci.20A001

8) Allen MG, Mehregany M, Howe RT, Senturia SD. Microfabricated structures for the i n s i t u measurement of residual stress, Young's modulus, and ultimate strain of thin films. Appl. Phys. Lett. 1987;51:241-3. DOI: 10.1063/1.98460.

9) Petit C, Guignandon A, Avril S. Traction Force Measurements of Human Aortic Smooth Muscle Cells Reveal a Motor-Clutch Behavior. Mol Cell Biomech. 2020;16(2):87-108. DOI: 10.32604/mcb.2019.06415