

微細形状による神経細胞突起の3次元培養方向制御

国立東京工業高等専門学校 機械工学科 ○小泉 理史 ◎角田 陽 首都大学東京大学院 青村 茂 中橋 浩康

要 旨

本研究の最終目的は、培養神経細胞を使用して耐衝撃試験を実施し、細胞1個単位での衝撃に対する損傷評価をおこない、頭部外傷のひとつである、びまん性軸索損傷の発生メカニズムの解明である。実際の細胞は成長に方向性をもつが、単純に培養した細胞はランダムに成長することが多い。そこで、まずは、実際の細胞状態に近づけるために、リソグラフィ技術を用いた微細形状により、神経細胞突起の3次元培養方向制御をめざす。

1. はじめに

1.1 研究背景および目的

日本国内における交通事故や転倒による死亡者は毎年約14,000人に及んでいる。その多くは、頭部への外傷による脳損傷で亡くなっている。しかし、脳損傷の発生メカニズムはまだまだ不明瞭な点が多く、メカニズムの解明が急がれている。特に脳損傷のひとつの病態である、びまん性軸索損傷(Diffuse Axonal Injury; DAI)は、病状の診断が困難でもあるが、効果的な治療方法が確立されていないため、発生メカニズムを解明し、発生を予測可能にすることが課題となっている。

本研究では、PC12細胞(ラット副腎褐色細胞腫)および神経幹細胞などを使用して耐衝撃試験を実施し、細胞1個単位での衝撃に対する損傷評価をおこない、DAIの発生メカニズムを解明することを最終目的とする。細胞に対する衝撃は、その負荷方向によっても影響が異なるとされ、細胞に対してさまざまな方向から衝撃試験をおこなう必要がある。そこで、細胞の培養方向を制御して衝撃試験をする必要があり、そのために、本研究では、細胞の3次元培養をめざす。具体的には、リソグラフィ技術を用いた微細形状による、神経細胞の3次元培養方向制御の技術の確立をめざす。

1.2 びまん性軸索損傷(Diffuse Axonal Injury; DAI)

1.2.1 概要

頭部へ衝撃が加わると、脳の組織に急激なゆがみが生じる。このゆがみにより、神経細胞の軸索が広範囲にわたって切断される脳損傷をびまん性軸索損傷という。なお、軸索とは神経細胞から伸びる1本の長い突起(神経線維)のことである。びまん性軸索損傷には、伸展、切断、圧迫などいくつかの種類があり、模式図をFig. 1に示す。

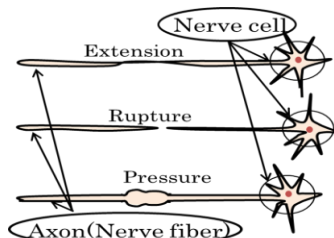


Fig. 1 Type of damage of nerve axons

1.2.2 問題点

びまん性軸索損傷では、明確な病理所見を示す診断方法の確立ができておらず、発生メカニズムも解明されていないことが課題である。また、現在びまん性軸索損傷の症状に対する効果的な治療法は確立されていない。そのため、呼吸・循環の安定化、高体温の防止、頭蓋内圧のコントロールなど全身管理をおこなうことで2次の脳損傷を予防し、脳の自発的回復を期待する程度のことしか対応策がないのが現状である。

1.3 先行研究

先行研究では、微細形状による2次元方向の培養方向制御を可能にしている¹⁾。これによれば、何もせずに培養すればランダムに伸長してしまう神経細胞の樹状突起を微細溝形状によって一定方向に制御して培養することができる。また、培養した細胞を使って耐衝撃試験を行い、衝撃に対する損傷評価がおこなわれている²⁾。しかし、実際の人の神経細胞は2次元のだけではなく、3次元的に配向性をもっているため、より実際の細胞に近い条件で耐衝撃試験をおこなうには3次元培養が必要不可欠であるといえる。

現在、細胞の3次元培養については、さまざまな方法で盛んに行われている。一般的な方法としては、寒天などを用いての培養が主流となっている。しかし、同培養手法では細胞はランダムに伸長してしまう。細胞の伸長方向を制御しつつ、3次元的に培養をおこなう方法はいろいろ

ろ試みられているが、主流になるような方法はまだ生み出されていないといえる。

そこで本研究では、より実際の細胞状態に近づけるために、リソグラフィ技術を用いた微細形状を使用することを試みる。すなわち、微細形状を利用して3次元培養方向制御をおこない、細胞を培養する技術の確立および実際に培養した細胞を使って耐衝撃試験をおこなうことをめざす。

2. 実験方法

2.1 微細形状の作製

本研究では、Fig. 2(a)のような溝形状と同(b)のような穴形状を組み合わせて同(c)のような3次元微細形状の作製をおこなう。作製した形状に細胞から伸長した樹状突起を沿わせることで培養方向制御をおこなう。

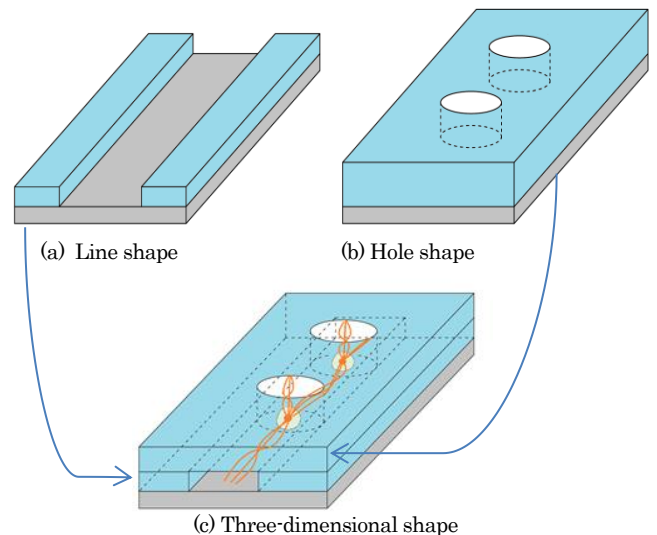


Fig. 2 Concept of fabrication of three-dimensional micro shape

2.2 リソグラフィ工程

ソグラフィ工程は以下のように行った。

A. 基板洗浄工程

基板には、リソグラフィで多用されている市販の単結晶Si基板を使用した。基板には以下の洗浄工程を実施した。

| | |
|------------------------|-------|
| 1. 純水洗浄 | 10min |
| 2. エタノール超音波洗浄 | 5min |
| 3. アセトン超音波洗浄 | 5min |
| 4. セミコクリーン(フルウチ製)超音波洗浄 | 10min |
| 5. 純水洗浄 | 3min |

B. 塗布工程

洗浄後のSi基板に対して、レジスト材として日本化薬株式会社製のSU8 3025を塗布した。塗布工程では、スピナーの回転数とレジスト材の塗布回数によって膜厚の調整をおこなった。3次元形状を実現するため、塗布厚さは100 μ m程度までをめざした。

Table 1 Thickness of resist (SU8 3025)

| | | Rotational speed of spinner | |
|-----------------------|-------|-----------------------------|---------------|
| | | 1500rpm | 2000rpm |
| The number of coating | 1st | 45~50 μ m | 35~40 μ m |
| | 2nd | 50~55 μ m | 40~45 μ m |
| | Total | 95~105 μ m | 75~85 μ m |

C. 露光工程

レジスト材に対する露光時間は、推奨露光量に対して、照度計で測定した実際の超高圧水銀灯の照度から決定した。レジスト材の厚さが厚くなるほど必要な露光量は多くなるので、レジスト材の厚さに比例して露光時間も長くなる。

2.3 培養細胞の概要

本研究で使用する細胞はPC12細胞(ラット副腎褐色細胞腫)およびラットの脳神経幹細胞である。

PC12細胞は、神経成長因子(Nerve Growth Factor; NGF)を作用させると、細胞のERK(アーク)というシグナル伝達分子が持続的に活性化され、神経細胞のように樹状突起を伸ばす。また、上皮増殖因子(Epidermal Growth Factor; EGF)を作用させるとERKは一過的に活性化され、増殖が進むことが知られている。

神経幹細胞は、増殖し継代を繰り返すことができる(自己複製能)と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞を作り出すことができる(多分化能)未分化細胞である。

3. 実験結果

一般的に、光リソグラフィ技術では、立体的なものを作製するのは難しいとされている。例えば、露光時に光が散乱するため、近接効果により、穴形状は、アスペクト比が高くなるほどすり鉢状の形状になりやすいなどの問題があるためである。そこで、本研究では、アスペクト比の高い深穴形状については、リソグラフィ技術によってレジスト材で円柱形状を作製し、その後、その円柱形状をPDMS材により反転転写することで深穴形状の作製をおこなった。深穴形状の作製手順の模式図をFig. 3に示す。

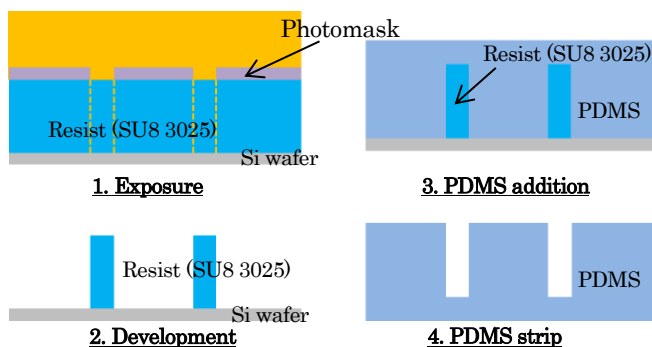


Fig. 3 Concept of fabrication of high aspect ratio hole shape

3.1 レジスト材による形状作製結果

作製した穴形状と溝形状の仕様は、神経細胞のサイズに合わせ、前者は、径(7 μ m, 9 μ m, 11 μ m, 15 μ m, 25 μ m, 30 μ m)、高さ(40 μ m, 50 μ m, 80 μ m, 100 μ m)で、後者は、溝幅(7 μ m~20 μ m)では1 μ m間隔、25 μ m, 30 μ m)、高さ(40 μ m, 50 μ m, 80 μ m, 100 μ m)とした。実際に作製したレジスト材による円柱形状を、走査型電子顕微鏡で円柱の側面および正面から観察をおこなった一例として、径15 μ m、高さが約80 μ mの円柱の側面図をFig. 4、正面図をFig. 5に示す。

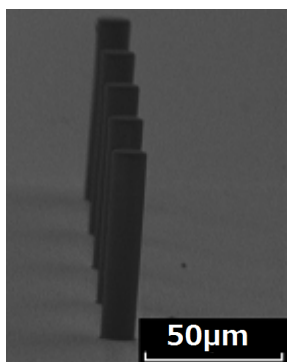


Fig. 4 ϕ 15 μ m Cylinder (side view)

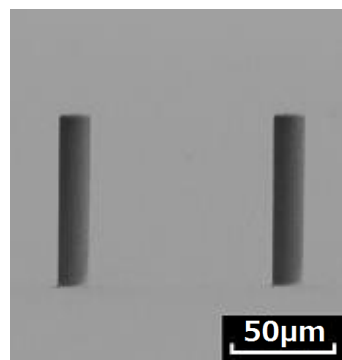


Fig. 5 ϕ 15 μ m Cylinder (front view)

3.2 PDMSによる反転形状作製結果

レジスト材で作製した微細穴形状とPDMSでの反転パターンで作製した穴形状をFig. 6およびFig. 7に示す。円穴形状は、直接レジスト材で形状を作製するのに比べてストレートな解像度の高い円穴形状が作製できている。



Fig. 6 ϕ 15 μ m circular hole [Resist (SU8 3025)]



Fig. 7 ϕ 15 μ m cylinder inverted hole [PDMS]

同様にレジスト材で形状を作製した後、PDMSで反転をおこなって作製した溝形状の一例をFig. 8に示す。

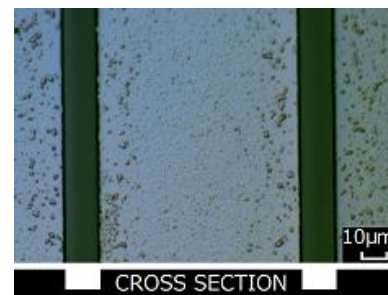


Fig. 8 Groove width 15 μ m line shape [PDMS]

3.3 細胞培養結果

実際に、溝幅40 μ mの微細溝に2000cell/cm²の播種数で神経幹細胞の播種をおこなって培養したものをFig. 9、 ϕ 30 μ mの穴形状に10000cell/cm²の播種数で細胞を播種したものをFig. 10に示す。いずれも溝や穴に沿って培養が進み始めていることが確認できる。

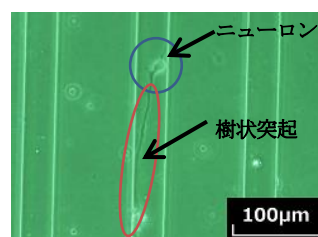


Fig. 9 Cell direction control (Groove width 40 μ m)

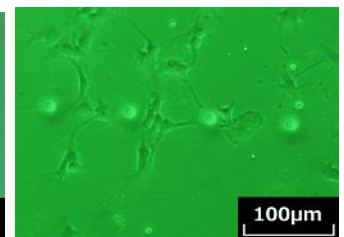


Fig. 10 Circular hole cell seeding (ϕ 30 μ m circular hole)

4. まとめ

微細溝や穴を組み合わせることで3次元的な微細形状をリソグラフィ技術などによって作製し、細胞培養の培養方向制御をおこなうことを提案し、実際の微細形状の作製および培養実験により培養方向制御を確認している。

参考文献

- 1) 舟木勇矢ら：微細溝による培養神経細胞の樹状突起の伸長方向制御，精密工学会春季学術講演会講演論文集，(2012) 83-84.
- 2) 古瀬清人ら：衝撃負荷に対する神経細胞PC12の観察と評価，バイオフロンティア講演会講演論文集，(2008) 11-12.