

切り紙構造を足場とする骨格筋細胞の自立細胞シートの形成

Fabrication of free-standing sheet of skeletal muscle cells using kirigami structure as a scaffold

名大院工¹, 弘前大院理工² ○(D)秋田谷 美乃¹, 丸山 央峰¹, 森脇 健司², 星野 隆行¹

Nagoya Univ.¹, Hirosaki Univ.² ○Mino Akitaya¹, Hisataka Maruyama¹, Takeshi Moriwaki², Takayuki Hoshino¹

E-mail: akitaya.mino.b5@s.mail.nagoya-u.ac.jp

1. 序論

生体組織の機能において細胞を一軸方向に配向させるということは重要な意味を持つ。例えば筋繊維が同じ方向に配向していなければ筋力が発揮できない。これまで培養細胞に配向を持たせる方法はマイクロ溝の配列のようないずれもシャーレの底面に工夫を凝らすものであった。

培養液中でシャーレの底から自立した状態で細胞を配列させる方法としては、メッシュ形状の足場を用いる方法が報告されており、マウス由来の骨格筋細胞 C2C12 がメッシュ足場上で膜を形成し、一軸方向に配向することが確認されている¹⁾。ただし、C2C12 は、伸展させながら分化させることで筋管細胞の成熟が促進されることが報告されている²⁾が、この方法ではメッシュを伸展させることは不可能であった。我々はメッシュ状足場を伸展可能な構造にすれば、細胞の配向と筋管細胞の成熟の両方が得られると考えた。

そこで、本研究では、自立しなおかつ伸展可能な切り紙構造のメッシュ足場を開発した。この方法は細胞が他の細胞を足場として増殖し膜を形成するため足場の面積を所望の面積の半分以下に留められる。またスリットが開くことに加え、材料を PDMS とすることで伸縮可能であり、細胞シートを貼り付けたい形状に沿わせられる等の利点がある。足場を生分解性素材に置き換え、場合によって積層させることで組織再生や培養肉の分野への応用も期待できる。また、細胞がメッシュ状構造のスリット部をブリッジして覆う現象は、自己修復が可能な材料としての可能性も持っている。

2. 実験方法・条件

伸展可能なメッシュ状足場は、切り紙構造とし、ソフトリソグラフィとスクロスを犠牲層としたリフトオフ工程により作製した。

切り紙構造は、厚さ 45 μm の PDMS シートに 600 μm 長の貫通スリットが互い違いに配置されたものである。切り紙構造を広げる治具は、ポリ乳酸 (PLA) 樹脂材料を用い 3D プリンタで作製した。この治具でスリットを広げた切り紙構造に、フィブロネクチンをコートしたうえで、C2C12 細胞懸濁液を播種した。10% FBS, 1% P-S を含む DMEM 増殖培地にて 7 日間培養した後、2% HS, 1% P-S を含む DMEM 分化培地に切り替えて、さらに 7 日間培養を続けた。

3. 結果・考察

播種 3 日目に細胞は増殖し、切り紙構造全体に

接着しており、5 日目には広がったスリットの縁から徐々に細胞の膜が形成され、7 日目には観察可能なスリットの半数以上が完全に細胞で覆われた。分化培地への切り替え後、筋管細胞が形成され、スリットの長軸方向に配向が見られた。配向の方向に収縮させる力が働き、スリット長軸方向に平均 5.0% 短縮するひずみが観察された (Fig.1)。

貫通スリット端部の凹曲面では、平面より接着機会が多いと推測され、細胞がスリット内に移動していき易く、そこに小さく細胞の膜が張る。さらにその端部の細胞を足場として別の細胞が接着することで徐々に開口部を覆っていく。これがスリット開口部での膜形成のメカニズムと考えられる。

4. 結論

切り紙構造から成る伸展可能なメッシュ足場上で培養された細胞は、中空のスリットを覆い、分化の過程ではメッシュの長軸方向に配向し、同方向での収縮が起きたと考えられる。

5. 謝辞

本研究は、2024 年度名古屋大学大学院工学研究科博士後期課程女性フェロウシップ制度の支援により行われた。

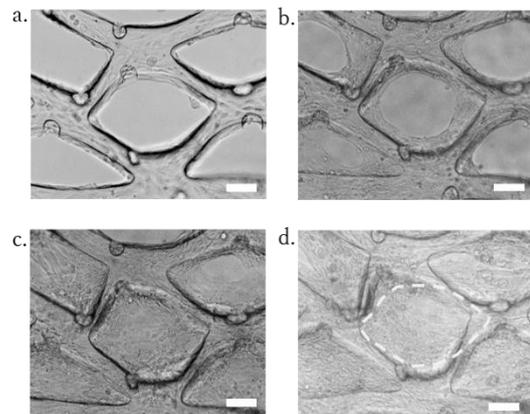


Fig.1 バタン上で培養されている細胞の様子
培養開始後 a.3 日後, b.5 日後, c.7 日後の様子。7 日後に写真中央のスリットが細胞でふさがった。d.分化培地に切り替えてから 7 日後の様子。スリットの横幅が狭まっている。白の点線は培養 3 日目の同じスリットの形状を示す。スケールバーの長さは 100 μm 。

1) K. O. Okeyo, Y. Kibe and T. Adachi, Mater. Today Adv. **12**, 100194 (2021).

2) X. Chen, W. Du, Z. Cai, S. Ji, M. Dwivedi, J. Chen, G. Zhao and J. Chu, ACS Appl. Mater. Interfaces **12** [2], 2162 (2020).