

光応答基板上で形状を制御した細胞集団の粒子画像流速解析

(日大生産工) ○深山達也, (千葉院工) 菰田貴文, 菅原路子

(物材機構) 中西淳, (日大生産工) 野々村真規子

1 まえがき

一般に上皮細胞は、細胞間の接着を維持した状態で集団として動くが、時としてその集団性が積極的に変化することが知られている。この集団性の変化は、我々の体のかたちづくりやがん細胞の転移とも密接に関係しているため、それがどのような因子によって調節されているかを知ることは生物学および医学的にも重要である。本研究では、細胞集団の幾何学形状が細胞の集団移動性に与える影響を調べている。ここでは、光照射に応じて表面の細胞付着性が変化する光応答性基板(図1)¹⁾を用いた細胞集団形状の制御と、粒子画像流速(PIV)解析²⁾による細胞の動きの定量化の検討について述べる。

2 実験方法

エタノール洗浄および UV-O₃ 処理によって表面清浄化した金基板に対して、細胞接着性(cRGD)、非接着性(EG)、及び光分解性(PCP)を示す三種類の分子を 1:999:9000 の比率で溶かしたメタノール溶液を作用させることで光応答基板を調製した。視野絞りの位置に円形のパターンを有するフォトマスクを挿入した蛍光顕微鏡を用い、この基板に対して紫外光をパターン化照射した。次に無血清培地中で培養上皮細胞株の MDCK 細胞を 1.0×10^5 個/cm² の濃度で播種し、1 時間後に血清培地の添加、2 時間後に培地交換による浮遊細胞の除去を行うことで、幾何学形状の制御された細胞集団を

形成した。顕微鏡に付属した培養装置で細胞を培養環境 (37℃, 5%CO₂) に保ちながら、5 分ごとに細胞の位相差画像を撮影し、終夜細胞の移動挙動の観察を行った。MATLAB 上で作成したプログラムを用いた得られた画像を、適当な時相間隔で PIV 解析(10 時相の場合は 1-11, 2-12, 3-13...)し、細胞の動きの可視化・定量化した。

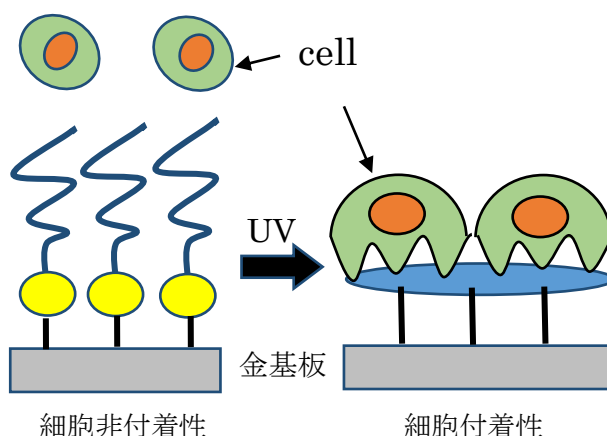


図1 光応答基板の原理

光照射に応じて表面が細胞非付着性から細胞付着性へと変化する

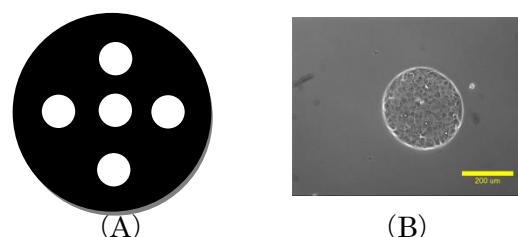


図2 光パターニング

(A) フォトマスクの模式図。(B) 光パターニングされた MDCK 細胞。スケール：200 μm

PIV analysis of cell clusters geometrically confined on a photoactivatable substrate
Tasyuya Miyama, Takafumi Komoda, Michiko Sugawara, Jun Nakanishi, and Makiko Nonomura

3 結果と考察

(1) パターニングの結果

種々の大きさの円形スポットを作製し、細胞パターニングを行ったところ、大きいサイズのスプレッドの方がきれいな円形の細胞パターンが形成された (図2)。これは、大きいスプレッドの方が細胞間の相互作用が強いため、培地交換にうけるせん断力に対する耐性があるからであろう。

(2) PIV 解析に関する検討

PIV は探索領域内を設定した検査領域を設定してパターンマッチングにより流れを検出する方法である (図3)。この際、時相間隔が短すぎると計算時間が長くなり効率が悪い。また、時相間隔が長すぎると正しく細胞の動きを表せない可能性がある。そこで、細胞の動く速度に合わせた時相間隔を求める必要がある。これを踏まえ、最初に 10 時相と 20 時相間隔で PIV 解析した結果を比較したのが図 4-A,B である。どちらにおいても、円形スポットの周囲では渦を巻いているように移動しているが、中心付近ではあまり動いていない様子が確認できた。これはスポットの大きさとも関係があり、大きい円であると中心部分が特に密になり易く、外側だけが自由に動くようであった。

ただ、20 時相間隔の結果と 10 時相間隔の 2 間隔分の結果を比較してみると、ベクトルの向きが逆になっている箇所も存在した。、時間間隔が長くなると細胞の形状の変化や、分裂などの影響があり、近似している別の細胞をトラッキングしている可能性もあるため、今後更なる条件検討の必要がある。

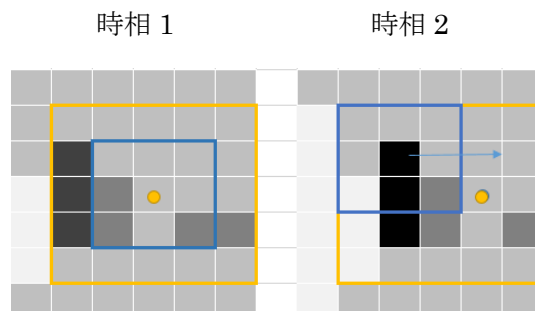


図3 PIV の原理

青枠が検査領域、黄枠が探索領域を示す。

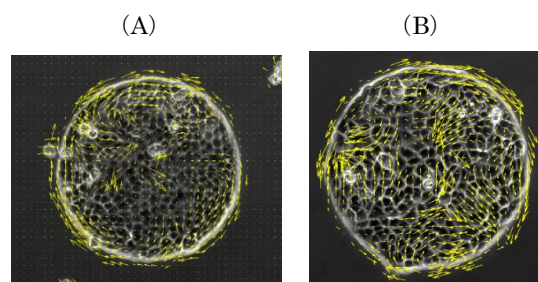


図4 PIV 解析

(A)10 時相での PIV 解析 (B)20 時相での PIV 解析

5 まとめ

以上より、光応答基板を用いた PIV 解析を行ったが解析結果としては時相間隔が異なっても移動する大きさは違うが向きは近似していることが分かった。

今後は PIV データを元にした相関関数の計算などを求めつつ、光応答基板の特徴を活かして細胞集団の大きさや基質の接着力の影響を調べ、外部環境による細胞集団性を調節に関する知見をさらに深めていくつもりである。

6 参考文献

- 1) PloS One, **2014**, *9*, e91875
- 2) Integr. Biol. **2013**, *8*, 1026