

氏名	たけだ いおり 武田 伊織
所属	システムデザイン研究科 システムデザイン専攻
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	シス博 第72号
学位授与の日付	平成28年3月25日
課程・論文の別	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	微粒子を応用した微細構造化足場の作製とその幾何形状が細胞の接着と成長に及ぼす影響
論文審査委員	主査 准教授 金子 新 委員 教授 諸貫 信行 委員 教授 藤江 裕道 委員 教授 初澤 毅(東京工業大学)

【論文の内容の要旨】

細胞の機能解明は、がんやアルツハイマーなどに対する先進医療にとって必要不可欠となりつつあり、特に生体外での培養細胞を用いた研究が進められている。しかし、平坦なディッシュ上で培養した細胞は解析に適した位置制御などが困難であり、ナノ・マイクロ技術を活用した細胞のパターニングが注目されている。

細胞のパターニングは非自律的手法と自律的手法に大別される。前者はマイクロプローブなどによる細胞のマニピュレーションであり、その位置制御性は高いがスループットの低さや細胞への侵襲性が課題である。後者は、細胞が接着する基板（以下、足場）表面に特定の高分子薄膜や微細形状を作製すると、接着性の違いにより細胞が自律的に配置する。この手法はスループットが高く、細胞に対する侵襲性も低い。以下に示す課題がある。微細形状は主に半導体プロセスで作製されるが、工程が煩雑で装置・製造コストも高く、使い捨てとなる足場作製には適していない。また、表面の幾何形状と細胞接着性の関係は体系的に調査されておらず、形状の設計指針は確立していない。

上記の課題を解決するため、本研究では微粒子の自己整列技術に着目した。溶液中に分散した微粒子は蒸発時の液架橋力によって自己整列し、粒径等に応じた様々な幾何形状を持つ表面を創成する。このような微粒子列は簡易かつ大面積に作製可能で、細胞接着の足場として応用できると考えられる。しかし、ナノメートルオーダーの微粒子とその化学的効果に着目した研究は報告されている一方で、（サブ）マイクロメートルオーダーの微粒子やその表面幾何形状に着目した研究はほとんどない。

そこで本研究では、粒径（サブ）マイクロメートルオーダーの微粒子列の細胞接着足場への応用を試みるとともに、算術平均粗さ等の表面の幾何的特徴量が細胞の接着・成長に及ぼす影響を明らかにすることを大目的とする。具体的には以下の①～③を小目的として研究を進めている。

- ① 微粒子の自己整列による微細構造化足場の作製
- ② 微粒子列を用いた細胞パターンニングの実証とその基礎特性の解明
- ③ 表面の幾何的特徴量が細胞接着に及ぼす影響の調査

本論文は5章から構成される。

第1章は緒論であり、研究背景となる微細構造と細胞接着に関する先行研究の成果や課題についてまとめ、次いで本研究の目的、アプローチ、および研究上の位置付けを示している。

第2章では、微粒子の自己整列構造の作製について示している。直径 $0.5\sim 2\mu\text{m}$ のシリカ(SiO_2)またはポリスチレン(PS)微粒子の懸濁液を準備し、以下の2種類の方法で自己整列を試みている。一方は、ガラス基板およびPSディッシュ上に懸濁液を滴下し、不規則形状の微粒子列を作製している。他方は、マイクロコンタクトプリントでガラス基板上に疎水性単分子膜のラインパターンを形成し、同基板に移流集積法を適用することで、幅数 $10\mu\text{m}$ のライン状の微粒子列(微細構造)を作製している。いずれの手法においても微粒子列は六方最密充填となり、その表面には深さ $0.25\sim 1\mu\text{m}$ の周期的な凹凸が形成されている。

第3章では、微粒子列を用いた細胞のパターンニングについて示している。微粒子列を作製したPSディッシュとガラス基板のいずれにおいても、その平面部に比べて微粒子列への接着細胞数が多いことがわかった。一般に、 SiO_2 の細胞接着性は低いとされるので、微粒子列の表面幾何形状が細胞接着性を向上させたと考えられる。次いで、ライン状の微粒子列の場合には、PC12, HeLa, C2C12細胞はいずれも微粒子列上に選択的に接着、配列した。すなわち、微粒子列による細胞の自律パターンニングが実証できた。ただし、微粒子列の間隔が $60\mu\text{m}$ 以下の構造では、90%以上の細胞が微粒子列に接着したが、 $80\mu\text{m}$ 以上では次第に減少した。培養中のインプロセス観察から、細胞は遊走を経て、播種後24時間で微粒子列に到達していた。すなわち、細胞パターンニングには細胞の遊走距離を考慮した構造設計が必要である。播種後1週間のHeLa細胞は微粒子列のみを覆っており、微粒子列上での選択的細胞成長も確認できた。

第4章では、表面の幾何的特徴量が細胞の接着と成長に及ぼす影響について示している。本研究では、細胞の接着面積等の観点から、算術平均粗さ Sa , 歪度 Ssk , 尖度 Sku という3つの幾何的特徴量に着目している。これらは凹凸の深さ, 対称性, そして分布を表してお

り，それらの異なる表面を次のように作製している．微粒子列をマスクとして Si ウエハをドライエッチングし，高さ数 10 nm～数 100nm のマイクロピラー配列を形成する．この形状をマスターとして転写することで， Sa が 13~46nm， Ssk が -0.6~0.8，そして Sku が 2.7~3.3 の微細形状をもつシリコーン樹脂 (PDMS) の作製に成功した．これらの PDMS 上で細胞を培養した結果， Ssk が小さいほど微細形状への接着細胞数が多くなるが， Sa や Sku との相関は低いことがわかった．また，細胞の成長方向は特徴量にかかわらず微細構造に沿っていた．微細構造化した PDMS に比べて微粒子列の方が細胞はより選択的に接着するが，これは微粒子間の空隙がグルコースの供給路として機能したためと考えられる．

第 5 章は結論であり，本論文で得られた成果についてまとめるとともに，今後の展望について述べている．