



テクニカル レポート 100:

# Tissue Train<sup>®</sup> Culture System

線状3Dマトリックス内  
細胞培養法および機械的負荷法

Authors: Albert J. Banes, Ph.D., Jie Qi, Ph.D., David S. Anderson B.S., P.E., Melissa Maloney M.S., and Ruwan Sumanasinghe Ph.D.

Document: Tissue Train Tech Report, Rev 2.4

08-18-09

*Culturing Cells in a Mechanically Active Environment*<sup>™</sup>  
Flexcell International Corporation • 437 Dimmocks Mill Road, Suite 28 • Hillsborough, NC 27278  
800-728-3714 • (919) 732-1591 • FAX: (919) 732-5196 • [www.flexcellint.com](http://www.flexcellint.com)

COPYRIGHT © 2009 FLEXCELL<sup>®</sup> INTERNATIONAL CORPORATION



## 概要

Flexcell® Tissue Train® 培養システムでは、新案の方法を用いて細胞を三次元(3D)ハイドロゲルあるいは細胞の自己組織化マトリックス内で培養し、機械的に負荷をかけます。このシステムを構成するTissue Train® フレキシブルボトム培養プレートには、ウェル周囲に細胞およびマトリックス接着用のメッシュ様アンカーが付いています。中央に樋状溝(trough)の入った平たい円筒(Trough Loader™)を各フレキシブルウェルの下に置き、Tissue Train® 培養プレートをガasketをはめてベースプレートに装着し、細胞を混合したマトリックスゲル溶液を流し込むことができます(図 1. 左上、図 2. 右)。各平円筒面を走る溝の底部には真空吸引孔が付いています。吸引によりメンブレンが溝の形に変形して、細胞入りハイドロゲルを流すスペースを作ると同時に、マトリックス結合型ナイロンメッシュアンカーの茎部が溝の各端へ入り込み、ゲル構築(コンストラクト)の両極付着点となります(図 3、4)。培養プレートをベースプレートごとCO<sub>2</sub>インキュベーターに37°Cで静置、コンストラクトを溝内の位置に保持した状態で重合(ゲル化)させます。次に真空を解除すると、細胞-ゲルのコンストラクトはプレートのウェル平面まで上ってきます。細胞増殖用メデュムを各ウェルに3 ml 加えてコンストラクトを培養します。機械的負荷の適用にはFlexcell® Tension System を使用し、ユーザー独自のプログラムができます(図 4)。これに特殊なLoading Stations™(弧形 Arcangle™ または円筒形のローディングポスト/loading post)を併用して、細胞-ゲルのコンストラクトや細胞の自己組織化マトリックスに単軸性あるいは同等双軸性の機械的負荷をかけることができます。ユーザーは、FlexSoft® システムソフトウェアを用いて、パーセント伸長度、周波数(頻度)、持続時間などの条件をプログラムし調節することができます。



図1. 細胞-マトリックス構築(コンストラクト)3D培養用 Tissue Train® 培養プレート。左上ウェルではフレキシブルメンブレン下にTrough Loader™ がセットされています。隣接する四つのウェルは、一軸性コンストラクトの細胞及びマトリックスを接着させるアンカーを示します。左下ウェルに示すのは、単軸性張力を適用するための弧形 Arcangle™ ローディングポストです。

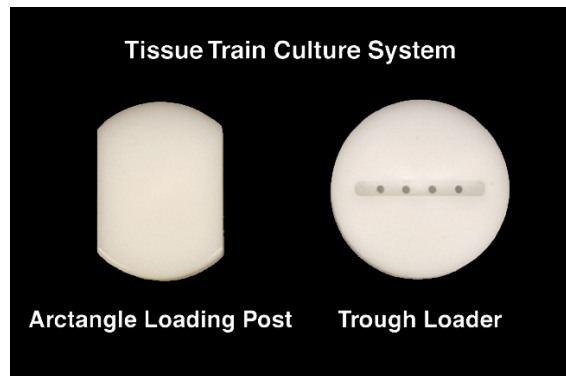


図 2. 弧形 Arcangle™ ローディングポストにより単軸性張力がかけられます; Trough Loader™ により3D細胞-ゲルマトリックスの調製ができます。

## 背景

細胞は、構造と機能両方を有する3Dマトリックス内を集団で満たすことにより、培養系で組織を形成します。そのようなマトリックスは独自の特殊構造、物質組成、生物力学的性質を持っています。組織発育に伴い、その細胞は形成過程の合図に従って、定められた形の細胞外マトリックスを作り上げます。

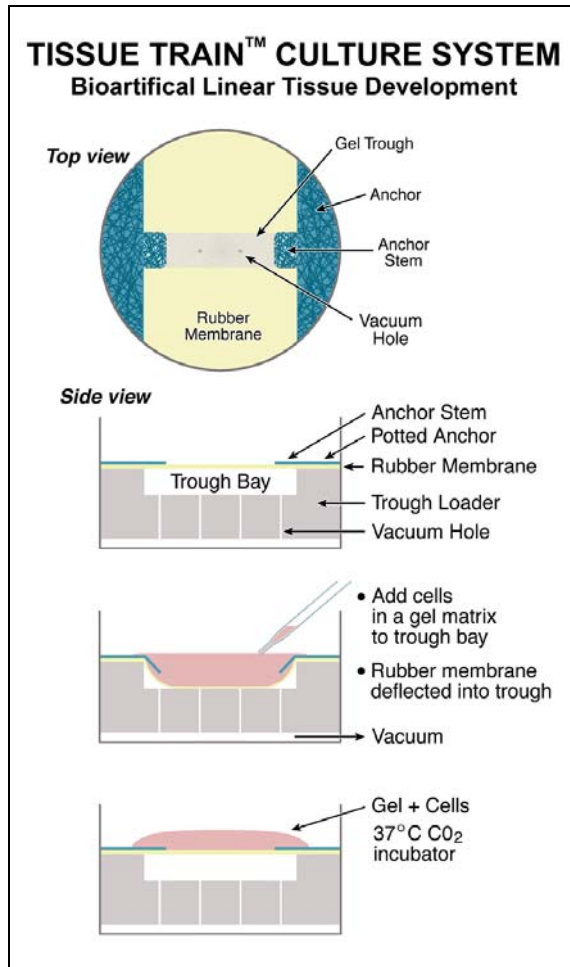


図 3. 上面図ではTissue Train® ウェル内でアンカー茎部に接着した細胞-ゲルの構築(コンストラクト)を示します。真空吸引孔によりラバーストレンは下方に歪み、ゲルのためのスペースを作ります。側面図では溝に一致したメンブレンと溝内に適合したゲルを示します。

機械的歪み刺激には、おそらく内から外へ(inside-out)と外から内へ(outside-in)のシグナル両成分が含まれており、複数の経路を調節しています。Inside-out経路は、成長因子、サイトカイン、ホルモンなどリガンドに反応する細胞収縮に関係し、他方outside-in経路は、インテグリン、focal adhesion complexes (mechanosensory complex)と細胞骨格、細胞接着分子(cell adhesion molecules, CAM)、イオンチャネルとの連結、その他の膜結合した機械刺激検知(mechano-detection)システムを介して細胞へ伝達されるマトリックス変形に関係します(Banes et al., 1995, 2002)。細胞はその内在性緊張を定点に維持するため、適切な機械的歪みレジメンを必要とします。

四肢の固定、就床安静、組織における内在性緊張の低下等が、骨ミネラル損失、組織萎縮、衰弱、一般的には同化作用の低下と異化作用の上昇をきたすことはよく認められています。運動の結果、生物力学的強度の上昇、組織の内在性緊張の上昇等の同化効果が現われます。



図 4. Flexcell® Tension System を使用して、3Dの細胞-ゲルのコンストラクトに調節された伸縮を適用します。

これらのプロセスは細胞により推進されるものということ、従って、機械的負荷により細胞内の経路が変えられるわけです。また、流体せん断応力、基質張力、圧縮負荷などを適用して細胞をダイナミックな緊張環境で培養すると、特に初代分離細胞で、細胞の形、代謝、その他の性質が変わることもよく認められています。さらに、細胞培養を3D環境で行うと同時にダイナミックな伸縮を加えると、静置の2D培養法に比べ、自然の環境により近くシミュレートされます。以上のような理由から、培養界のこの新しい分野に対応して、3Dマトリックス系と細胞及びマトリックスへのダイナミック伸縮の両方を与えられるFlexcell® Tissue Train® 培養システムが開発されました。この3D培養システムでは研究者の方々が独立した装置として使用し、Tissue Train® 培養プレート内のアンカーに連結する、マトリックスゲル内培養用三次元構築あるいは細胞の自己組織化マトリックスを作製することができます。さらに、この成長している組織に調節された伸縮を加えることもできます。ユーザーが特定の周波数、伸長度、持続時間をレジメンに設定して、体内における組織の緊張環境のシミュレーションができます。伸縮レジメンはFlexcell® Tension System (図 4)により制御され、静的あるいは周期的、同等双軸性あるいは単軸性伸縮を適用できます。次に記述するのは、



3Dマトリックス内での細胞培養法と3Dハイドロゲル内の細胞への伸縮適用法です。

## 材料と方法

### A. Tissue Train® 培養プレート内での線状または円状3Dゲル包埋細胞の調製

1. 細胞は初代培養、継代細胞、培養メデュームの選択等プロトコルに従って準備します。必要細胞数は、6ウェルTissue Train® 培養プレートの各ウェルに、線状ゲル用には約200 k/200 µl 必要です。円状ゲル用には、6ウェルTissue Train® 培養プレートの各ウェルに、細胞数約100万/1-2 ml 必要です。
2. 0.05%トリプシン、トリプシン-EDTA、0.05%細菌コラーゲナーゼその他の方法で細胞を基質から遊離させ、メデュームで2回洗浄後、マトリックス蛋白コラーゲンのゲル溶液と、細胞数1000/µl ハイドロゲルの濃度で混合します。ハイドロゲルは、細胞と混合する前に、1 M水酸化ナトリウムを用いてpH7に中和しておく必要があります。細胞を10%ウシ胎児血清、70%ハイドロゲル溶液、20%、5x MEMを含むメデュームに再浮遊させます。最終的にハイドロゲルの1x MEM液にするのが目的です。細胞/ハイドロゲル溶液の組成は次の如くです：
  - 70%容量 ハイドロゲル
  - 20%容量 5x MEM、総容量で濃度1xに調製
  - 10% ウシ胎児血清
  - 細胞、総容量で濃度1000/µlに調製
3. 線状あるいは円状用アンカーの配置されたTissue Train® 培養プレートが使用出来ます。線状の場合、Trough Loader™ を、Tissue Train® 培養プレートのフレキシブルメンブレン直下で溝の長軸をアンカー茎部と平行に、Loading Station™ にセットします(図 3)。Tissue Train® 培養プレートのセット前に潤滑剤をTrough Loader™ ジグ上面に薄く塗布して下さい。潤滑剤により、メンブレンが溝内全体に均一に適合するようになります。
4. Tissue Train® 培養プレートにガスケットを付けてFlexcell® ベースプレート内にセットし、Flexcell® Tension System あるいは他の調節できる真空源に連結します (**ご注意: 真空レベル-90 kPaを確保するため、調節できる真空源にベースプレートを直接連結する必要があります**)。ベースプレートに真空一定の“hold”モードを適用し、フレキシブルメンブレンが変形してTroughLoader™ 溝内に保持されるようにします。FX-3000™、FX-4000™ のシステムで適切な真空レベルを得るには、Tissue Train® Loading Station™ (24 mm)ベースプレート(baseplate)セッティングで、最大伸長度23%を使用することをお勧めします。FX-5000™ システムで適切な真空レベルを得るには、Tissue Train® Loading Station™ (24 mm)プラットフォーム(platform)セッティングで最大伸長度20%を使用することをお勧めします。これらの設定が-90 kPaに同等だからです。ベースプレートの真空チューブの長さが、インキュベーターと培養用フード間をつなぐに十分足りることを確認してください。Flexcell® Tension System を細胞伸縮に使用する際は、チューブが長いと周期性伸縮パフォーマンスを低下させるため必要最小限にします。。最も実際的なのは、Tissue Train® ベースプレートに真空チューブを二セット用意することです。一セットは3Dゲル形成用で、真空源、培養用フード、インキュベーターにまたがるに十分長い必要があります。もう一セットの真空ラインは周期性伸縮プロセス専用で、インキュベーターの孔を経由させる必要があります。このようにアレンジすれば、周期性伸縮プロセスを最適に、かつ潜在的コンタミネーションを最少に抑えることができます。
5. 細胞入りのハイドロゲル液を、ピペットでTissue Train® 各ウェル内のスペースに入れます。最初に溝両端アンカー茎部の下へピペットでゲルを小滴ずつ入れます。次にアンカー茎部を溝内へ押し入れ、ピペットでゲルを上からのせます。最後に溝中央部にピペットを往復させながらゲルを満たし、均一なゲル片を作製します ([www.flexcellint.jp](http://www.flexcellint.jp) Flexcell® ホームページのビデオをご覧ください)。
6. ベースプレートを37°Cインキュベーターに置き、ゲルを37°C、2時間固まらせます(図 3)。ゲルの固化後、真空を解除し、各ウェルに血清入りメデュームを3 ml 加えます。ゲル外観は線状バンドで、Tissue Train® ウェル内の両端アンカーに接着していることが必要です(図 5)。それから、Tissue Train® 培養プレートを、加湿、37°C、CO<sub>2</sub>インキュベーター



に置きます。これで、培養の観察や種々機能分析ができます。マトリックスのゲル化後あるいは細胞の自己組織化マトリックス形成後ならば、ユーザーのプロトコールとハイドロゲル内の細胞応答の型に従い、下記Bのように、いつでも培養に機械的負荷をかけることができます。しかしながら、細胞に適用する伸縮緊張の伸長度、周波数(頻度)、持続時間は、特定の使用目的またはパラメーターに即して研究者の方が決定しなければなりません。



図 5. Tissue Train® 培養プレート内の3D線状組織コンストラクト。

7. プレーティング直後、倒立位相差顕微鏡を用いて、ゲル内に球形の細胞が観察されます。第1日目までに、細胞はマトリックスに接着し、分散し始めます。次に、細胞は相互間にアタッチメントを形成し、コミュニケーションをとるようになります。第3-5日目までに、細胞はマトリックスを再編成、収縮して一本の線状バンドに形成します(図 6)。
8. ユーザーはゲル内での細胞形態、編成、遊走、分裂、遺伝子発現、蛋白質発現/分泌、仲介物質分泌、DNA および蛋白質合成などをモニターすることができます。

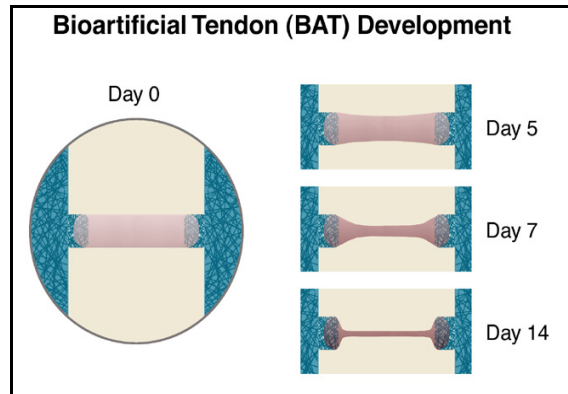


図 6. アンカーと茎部の線状構成配置を用いて生物学的的人工腱 (bioartificial tendon, BAT) が構築できます。細胞はマトリックスを合併し、やがてゲルを収縮します。Garvin et al., 2003.

#### B. Tissue Train® 培養システムを用いた3Dゲル内細胞への調節性伸縮力の適用

1. Flexcell® Tension System を用いて、細胞-マトリックスのコンストラクトに制御された伸長度(伸縮)、周波数、持続時間に休息時を加えたレジメンを適用し、3Dマトリックス系で機械的負荷をかけることができます。
2. レジメンのパラメーターは、細胞のコンストラクトが破壊されないよう事前に試験する必要があります。普通、細胞-マトリックスのコンストラクトは1-3%伸長度で一日当たり数分から数時間、マトリックスの破壊なくストレッチできます。心筋細胞の場合、筋細胞-マトリックスのコンストラクトはマトリックス内で鼓動周波数を一週間以上維持することができます。
3. Flexcell® FX-3000™ あるいはFX-4000™ のシステムにTissue Train® 培養プレートを使用すると、レジメンに伸縮範囲 0→23% (伸長度)、周波数範囲 0.1→5.0 Hzでプログラムできます。これがFX-5000™ システムでは、レジメンに伸縮範囲 0→20% (伸長度)、周波数範囲 0.01→5.0 Hzでプログラムできます。なお、高周波数ではシステムの高伸縮域維持能に限界があることにご注意下さい。レジメンをダウンロードする際に、Tissue Train® Loading Station™ (24 mm) プラットフォーム(platform)セッティングを選択してください。
4. Tissue Train® をFX-2000™ システムと共に使



用する場合、添付のTissue Train® プレート用真空 vs. 伸縮データを用いて下さい。FX-2000™ では真空レベルを-40 kPaより上げられないため、Tissue Train® コンストラクトに対して加えられる最大伸縮度は6%であることにご注意ください。

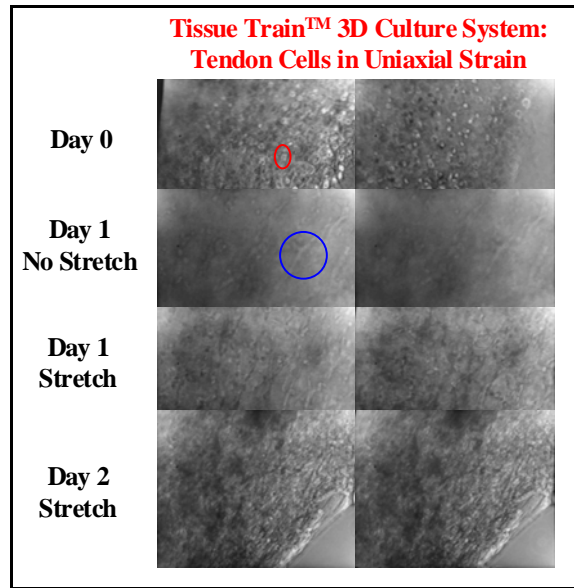


図 7. 3Dコンストラクト内の細胞は最初球形(赤い円で示す)、それから接着し、分散します(Day1に青い円で示す)。1%伸長度でストレッチ適用すると細胞拡散が促進されます。

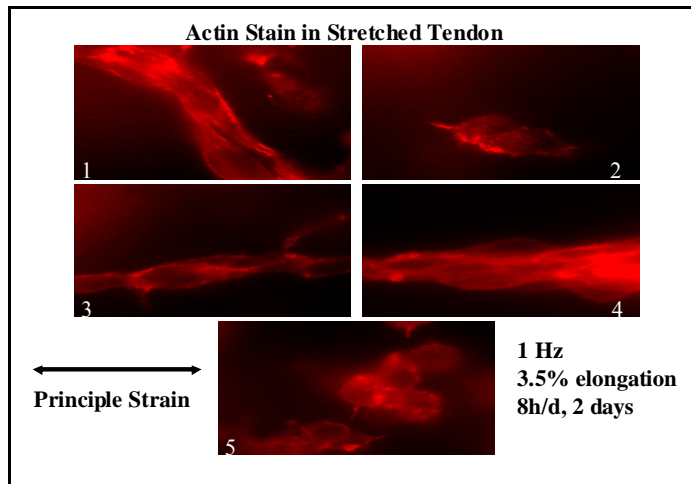


図 8. 3Dゲル内でストレッチされた細胞はアクチンを重合し、配列します。

### Tissue Train® 参考文献

Garvin, J., Qi, J., Maloney, M., and Banes, A.J., A Novel System for Engineering Bioartificial Tendons and Application of Mechanical Load. Tissue Engineering Journal, Oct. 2003, Vol. 9, No. 5, 967-979.

Triantafillopoulos, I.K., Karas, S.G., Bowman, Jr. K.F., Yang, X., Evans, G.A. and Banes, A.J. Anabolic Steroid and Load Enhance Matrix Remodeling and Biomechanical Strength of Bio-artificial Tendons. Abstract 49<sup>th</sup> Annual Meeting, ORS, Feb 2-5, 2003, New Orleans, LA.



Banes, A.J., Qi, J., Maloney, M., Almekinders, L., and Bynum, D. Bioartificial Tendons: A Model 3D System for Testing Tenocyte Responses to Drugs, Cytokines and Mechanical Load ex vivo. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Accepted 12, 2002.

Garvin, J., Baldwin, N., and Banes, A.J., Novel Culture System for the Development of a Bioartificial Tendon. Abstract 48<sup>th</sup> Annual Meeting, ORS, Feb 10-13, 2002, Dallas, TX.

Triantafillopoulos, I.K., Banes, A.J., Bowman, K.F. Jr., Maloney, M., Garrett, W.E. Jr., Karas, S.G. Nandrolone decanoate and load increase remodeling and strength in human supraspinatus bioartificial tendons. Am J Sports Med, 2004, 32(4):934-943.

Guilak, F., Jones, W.R., Ting-Beall, H.P., and Lee, G.M. The Deformation Behavior and Mechanical Properties of Chondrocytes in Articular Cartilage. Spine 1999 Dec. 1, 24(23); 2475-2483.

Banes, A.J., Tsuzaki, M., Yamamoto, J., Fisher, T., Brigman, B., and Miller, L. Mechanoreception at the cellular level; The detection, interpretation, and the diversity of responses to mechanical signals. Biochem. & Cell Biology Vol.73; 349-365, 1995.

Banes, A.J. Mechanical strain and the Mammalian cell; Physical Forces and the Mammalian Cell. Academic Press,ed., John Frangos, pg 81-123, 1993.

## Flexcell® 特許

Flexcell® International Corporation のTissue Train® 培養システムは、以下に掲げる合衆国あるいは国際的パテントとその他申請中のパテントにより保護されています:

US Patent	4,789,601
US Patent	4,822,741
US Patent	4,839,280
US Patent	5,122,470
US Patent	5,518,909
US Patent	5,593,891
US Patent	6,037,141
US Patent	6,048,723
US Patent	6,218,178
US Patent	6,472,202
US Patent	6,586,235
Japanese Patent	25-28174
German Patent	3855631.6
United Kingdom Patent	0,365,536
Canadian Patent	2,204,862