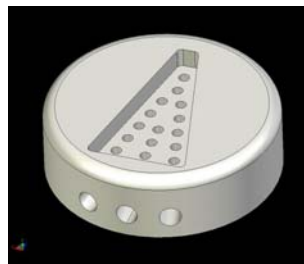




テクニカル レポート 104:

Trapezoidal Trough Loader™

バイオアーティフィシャルティッシュー
三次元ゲル構築作製装置



Authors: Ruwan Sumanasinghe, Ph.D., Albert J. Banes, Ph.D., Jie Qi, Ph.D.

Document: Trapezoidal Trough Loader Tech Report, Rev 1.3

08-18-2009

Culturing Cells in a Mechanically Active Environment™
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

COPYRIGHT © 2009 FLEXCELL® INTERNATIONAL CORPORATION



アプリケーション

Trapezoidal Trough Loader™ は、ゲル包埋細胞三次元(3D)培養系で、アキレス腱に類似した形体のバイオアーティフィシャルティッシュ (bioartificial tissues, BATS) を作製するようにデザインされたものです。Flexcell® Tissue Train® 培養システムと共に使用して、台形をした組織構築を形成します。

Tissue Train® 培養システムでは、新案の方法を用いて細胞を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。このアンカーの幅は、台形ゲルの上下底各端で適合するようにデザインされています(図 1)。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、窪み(トラフ)のある平たい円筒を中央を走る気孔点線で中心を合わせて各フレキシブルウェルの下に置き、細胞を混合したマトリックスゲルを流し込むことが出来ます(図 1、2)。真空吸引するとメンブレンがトラフの形に変形して、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台形のトラフ各端へ入り込み、ゲル構築(コンストラクト)の両極付着点となります(図 3)。培養プレートをベースプレートごとCO₂ インキュベーターに37°Cで静置、コンストラクトをトラフ内の位置に保持した状態でゲル化させます。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。細胞増殖用メデューム(3 ml)を各ウェルに加えて、実験プロトコルに従ってコンストラクトを培養します。

細胞包埋したコンストラクトへの機械的負荷の適用には、Flexcell® FX-5000™ Tension Systemを使用します(図 4)。特殊なローディングポスト(弧形 Arctangle™ posts、円筒形 loading posts)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出来ます。パーセント伸長度、周波数(頻度)、持続時間等の条件は、FX-5000™ FlexSoft® ソフトウェアによりユーザーがプログラムし、コンピューター制御装置から調節します。



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Trapezoidal Trough Loader™ がセットされています。隣接する4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、単軸性負荷を適用するための弧形 Arctangle™ ローディングポスト (loading post) です。

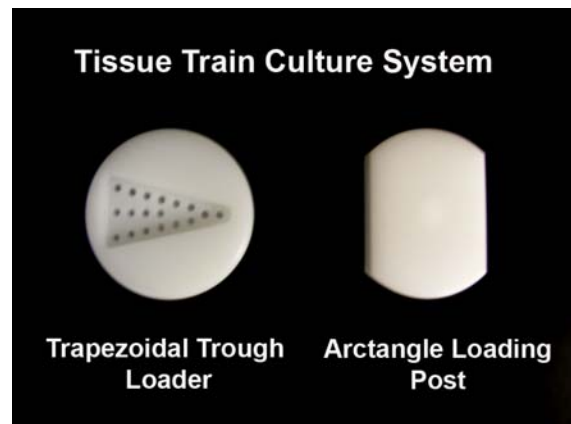


図 2. Trapezoidal Trough Loader™ は細胞-ゲル3Dマトリックスの調製に用いられ、Arctangle™ ローディングポストは、その3D細胞包埋ゲルに単軸性負荷を適用するために用いられます。

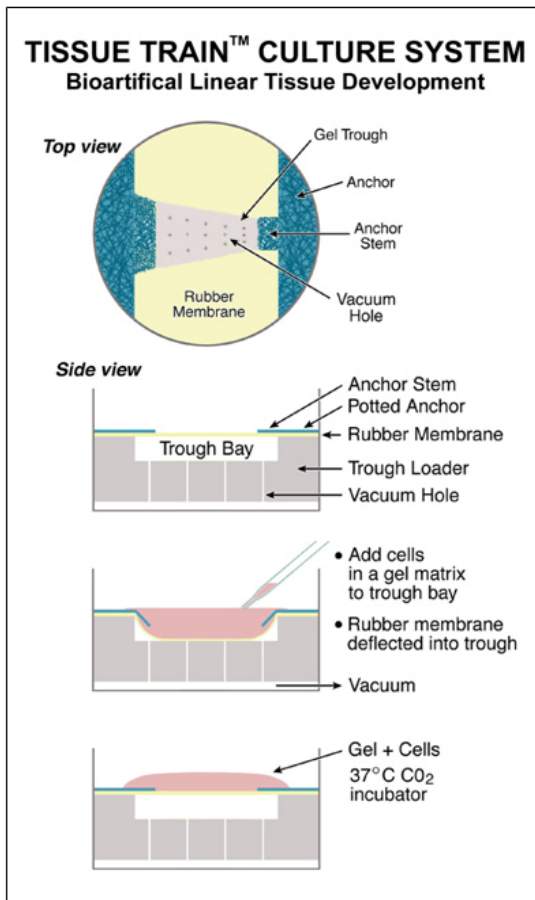


図 3. 上面図では、Tissue Train® ウェル内でアンカー茎部に接着した細胞-ゲルの構築(コンストラクト)を示します。側面図で示すように、真空によりラバーメンブレンは下方に吸引されて窪み(trough)に適合して変形し、ゲルのためのスペースを作ります。



図 4. Flexcell® FX-5000™ 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力を適用します。

背景

培養系で構造と機能両方を有する組織を形成するには、1)細胞、2)マトリックス、3)メデュームと成長因子、4)機械的刺激など、幾つかの基礎的条件が必要です。これらの条件は互いに関連しており、同時に作用して、構造的に強靱で生物力学的な力に耐えることのできる組織を形成します。組織発育に伴い、その細胞はさらされる環境刺激に基づいた独自の組成を有する細胞外マトリックスを作り上げます。この細胞外マトリックス構成の誘発には、複数のシグナル伝達経路が関係している可能性があります。その中の幾つかの回路はマトリックスの機械的歪みにより調節され、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、その他の膜結合蛋白を介して細胞内へ伝達されます。さらに、細胞はサイトカイン、成長因子、ホルモンなど、マトリックスの機械的歪みの結果として放出されるリガンドにも応答します(Banes et al., 1995, 2002)。筋骨格組織の統合性と強度を維持するために、細胞はその内在性緊張を定点に維持することを要求します。細胞の内在性緊張が無いと、その組織は自体の強度を失い、破損あるいは骨折をきたすこととなります。逆に機械的に活性化環境で細胞培養すると、細胞の代謝を上昇し、細胞の形態その他の性質が変化します。それゆえ、培養系で組織形成している細胞に、機械的活性化環境(張力、せん断応力、圧縮力)を創り出し維持してやることは、きわめて重要です。

母組織と多少とも同等な組織を培養系で誘発するには、生体系に類似した環境条件を作ることが最も重要で、その環境のタイプ(2Dまたは3D)、組織マトリックスの大きさや形などが挙げられます。三次元マトリックスは生体内に類似した細胞編成を促進させ、他方、組織マトリックスの大きさや形はそのマトリックス内に起こる生理学的な力のタイプ、大きさ、方向、分布などに直接関わってきます。組織構成はその組織の受ける力のタイプによっても左右されます。解剖学的位置によっては、同一組織内の異なる部位で張力と圧縮力を受ける結果、複数の組織構成を持つ組織もあります。アキレス腱はその一例で、実質(引張力の存在する部分)が高密度の線維性結合組織から構成されているのに対し、腱が踵骨を圧迫する部位(圧縮力の存在する部分)は線維軟骨性組織から構成されています。組織の形はまた、その破損



位置に関しても主要な役割を演じています。アキレス腱断裂のほとんどは腱が骨と合流する、厚みの最もない踵骨連結部であることも示されます。それゆえ、組織の破損機序やその治癒機序の研究推進のためには、その組織の原形を培養系でシミュレートする必要がありますことが明らかです。Trapezoidal Trough Loader™ は、組織工学におけるこのようなニーズに対応するために開発されたものです。既存のTissue Train® 培養システムと併用することにより、台形をした、両端でナイロン製アンカーに連結する、3Dの細胞包埋組織コンストラクト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、特定の周波数(頻度)、伸長度、持続時間をレジメンに設定して、生理的条件に基づく緊張環境のシミュレーションが可能です。伸縮レジメンはFlexcell® FX-5000™ 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。

材料と方法

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ゲル内の細胞への伸縮適用法です。

A. Tissue Train® 培養プレート内での台形をした3Dゲル包埋細胞の調製

1. 細胞は初代培養、継代細胞、培養メデューム選択等プロトコルに従って準備します。
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、血清入りメデュームを加えてトリプシン、コラーゲナーゼを失活します。
3. 細胞数カウントを行い、必要細胞数をとります。台形ゲル用には各ウェルに約700 k/700 µl、Tissue Train® 培養プレート当り6ウェル分必要です。
4. メデュームで2回洗浄して、トリプシン、コラーゲナーゼを除去します。
5. マトリックス蛋白コラーゲンのハイドロゲル溶液と、細胞数1000/µlゲルの濃度で混合します。

ご注意: ゲル溶液は、細胞と混合する前に、1M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%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/ゲル液の組成は次の如くです:

- 70%容量 ハイドロゲル溶液
- 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

6. ゲルコンストラクトの作製には、台形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。Trapezoidal Trough Loader™ ジグを、Tissue Train® 培養プレートのフレキシブルメンブレン直下で、台形トラフの長軸をアンカー茎部と平行にして、Loading Station™ にセットします。Tissue Train® 培養プレートへセット前に、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、メンブレンが抵抗なく均一にトラフの形に適合するようになります。
7. Tissue Train® 培養プレートをBioFlex® ベースプレートにガスケットを付けてセットし、Flexcell® Tension System その他の真空源に接続します。

ご注意: FX-2000™ ユーザーは真空レベル-90 kPaを確保するため、調節性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。FX-2000™ では最大真空レベル-40 kPaまでしか得られません。

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Trough Loader™ のスペースに保持されるようにします。FX-5000™ 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)のプラットフォーム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足りることを確認して下さい。



ご注意: Flexcell® Tension System をストレッチングに使用する際は、チューブが長いと周期性伸縮機能が低下するため、必要最小限にしてください。

- 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。最初に台形トラフ両端のアンカー茎部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。最後にトラフ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。
- 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。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。ゲル外観は台形バンド状で、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)。必要ならば、ここで培養プレートをベースプレートから外します。
- この台形コンストラクトをユーザーのプロトコルに従って培養します。これで、培養の観察や種々機能分析ができます。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。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、いつでも培養に機械的負荷をかけることができます(下記Bを参照)。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、特定の使用目的に即して研究者の方が決定しなければなりません。

典型的には、プレーティング直後、倒立位相差顕微鏡によりゲル内に球形の細胞を観察することができます。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、収縮して一本の紐状バンドに形成します(図 5)。

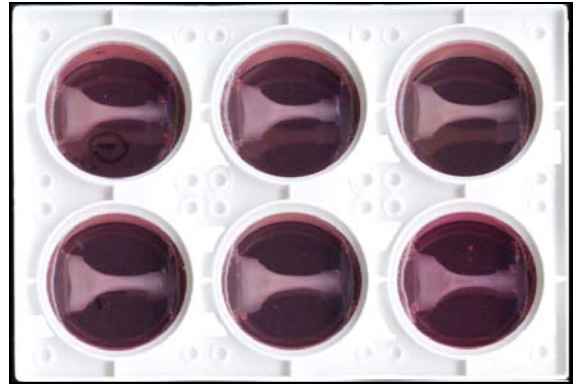


図 5. Tissue Train® 培養プレート内に作製された、台形をした3D組織コンストラクト。

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の適用

- Flexcell® FX-5000® 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。
- レジメンのパラメーターは、細胞のコンストラクトが耐えるかどうか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、マトリックスの破損なくストレッチできます。
- Tissue Train® 培養プレートを使用すると、レジメンに伸縮範囲 0→20%(伸長度)、周波数(頻度)範囲 0.01→5.0 Hzでプログラムできます。レジメンをダウンロードする際に、プラットフォームセッティングでTissue Train® Loading Station™ (24 mm)を選択して下さい。
- Tissue Train® をFX-2000™ システムと共に使用する場合は、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。

ご注意: 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。

ご注意: FX-2000™ では真空レベル-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%です。

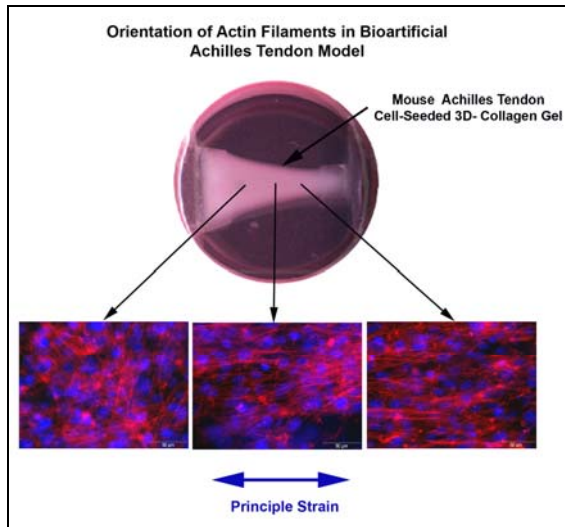


図 6. ネズミのアキレス腱分離細胞を包埋した、生物学的人工組織(バイオアーティフィシャルティッシュ)のモデル例(1%伸長度、1Hzでストレッチした像)で、コンストラクトの異なる位置における、アクチンフィラメントの方向性を示します: アクチンフィラメント(赤)、細胞核(青)。

Tissue Train® 参考文献

Sumanasinghe, R.D., Qi, J., Wang, J., Tsuzaki, M., Wall, M., Pfeiler, W., Lobo, E., Hart, D.A., Banes, A.J., Cell Orientation and local strain distribution in an in vitro Achilles tendon tissue engineering model. Podium presentation. International symposium on ligaments and tendons-VIII, Annual conf., March 1, 2008, Stanford, CA.

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 49th 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 48th Annual Meeting, ORS, Feb 10-13, 2002, Dallas, TX.

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 Corp. のTissue Train® 培養システムは、以下に掲げる合衆国あるいはインターナショナル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