

上皮細胞シートの縦断面イメージングおよび バリア機能評価用マイクロデバイスの開発

Development of Microdevices for Imaging of the Vertical Section and Evaluation of the Barrier Function of the Epithelial Cell Sheet

精密工学専攻 33号 中野正義
Masayoshi Nakano

1. 緒言

上皮細胞は皮膚や血管上皮を構成しており、細胞接着装置によって隣接した細胞同士を強固に接着して上皮細胞シートを形成する。細胞接着装置の1つであるタイトジャンクション (TJ) は接する細胞間において形成され、細胞間をシールすることで細胞間隙での物質透過を制御している。近年 TJ を構成する claudin を標的として細胞間隙経路を介した薬剤吸収促進技術⁽¹⁾が開発されており、TJ バリア機能の評価は薬理学的に重要視されている。

細胞内の構造、動態や機能を調べる手段として、細胞の蛍光イメージングが多く用いられている。その場合、細胞培養ディッシュの底面に広がって接着した細胞を倒立型の顕微鏡で二次元的に観察する方法が一般的である。しかし、この方法では培養面と垂直方向に極性が発達した上皮細胞の構造や機能動態をとらえることは困難である。細胞の観察面垂直方向 (縦断面) を観察するには、共焦点顕微鏡を代表として、多数の二次元スライス画像から三次元情報を再構成する手法が一般的に用いられている。しかし、得られた画像は水平方向の画像と比べて解像度が低く⁽²⁾、画像の取得に時間を要するため、リアルタイムでの細胞シート垂直方向の動態を観察することが困難である。

本研究では、上皮細胞の接着面を顕微鏡視野に対して垂直に配置できる簡便な構造を持つマイクロデバイスを用いて、上皮細胞の縦断面を高解像度でイメージングする手法を提案した。加えて、縦断面イメージングの応用として、上皮細胞シートのバリア機能を簡便に評価できるマイクロチャンバーデバイスの開発を目指した。

2. 細胞縦断面の高解像度イメージング

2.1. 解像度の評価方法

蛍光観察における細胞内構造の解像度を定量的に比較するため、はじめにその評価方法を検討した。細胞骨格のひとつである微小管の蛍光観察を行い、その線維構造のコントラストを比較することで解像度を評価した。コントラストは、輝度分布のシャープさを反映している。その定量化には、取得画像に Sobel Filter というピクセル間の輝度勾配を算出する画像演算を行い、その積算値を取得画像の解像度指標値として採用した (Fig. 1)。

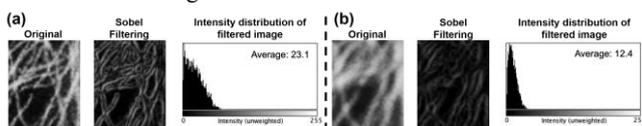


Fig. 1 Comparison of the results of Sobel filtering operation performed for (a) a high-contrast image and (b) a low contrast image. The intensity values in the filtered image for (a) are high at the edge portion of filaments. Average intensity values of all pixels in the image were employed as intensity of resolution.

2.2. シリコン樹脂層による解像度への影響

2.2.1. PDMS 層による解像度への影響

一般的に、高解像度イメージングに使われる高倍率・高開口率の対物レンズは、作動距離 (対物レンズと観察試料の距離) が小さく、薄いカバーガラスを介して観察するように設計されている。ここでは、マイクロデバイスの材料として使われる透明シリコン樹脂 (PDMS) 層の厚さによる細胞平面画像の解像度への影響を調べた。カバーガラス上に様々な厚さの PDMS 層を形成し、その上に播種・培養した後、トランスフェクション試薬により緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合チューブリンを発現させた。カバーガラス上で直接培養した細胞は、微小管の線維構造が極めて明確に確認できた (Fig. 2b)。PDMS 層の厚さが 29, 38, 45 μm (Fig. 2c~e) でも微小管の線維構造が明瞭に確認できた。しかし 74 μm (Fig. 2f) になると、線維構造がぼやけ始め、114 μm (Fig. 2h) では個々の線維を判別することができなかった。

各 PDMS 層の厚さについて 10 個の細胞を撮像し、2.1 節で述べた解像度指標を算出した。その結果、PDMS が厚いほど解像度指標値は小さくなることを確認した (Fig. 2i)。また PDMS 層の厚さが 30~50 μm 程度になると、カバーガラス上の指標値が約 1/2 倍になることがわかった。

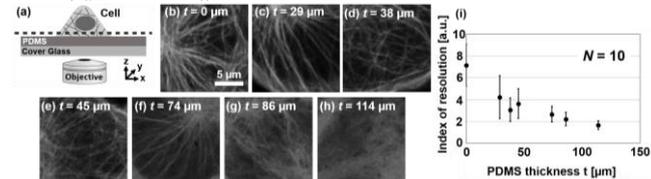


Fig. 2 (a) Schematic of the experimental system. (b)~(h) Fluorescent images of microtubules of MDCK cells on a cover glass and on the PDMS layers with different thicknesses. (i) Dependence of the index of resolution on the PDMS layer thickness.

2.2.2. 硬質シリコン樹脂による解像度の向上

マイクロデバイスの作製には PDMS が多く使用されているが、その屈折率は 1.4 程度であり、カバーガラスのそれ (屈折率: 1.50) とは差異があるため、解像度の低下につながる。ここでは、屈折率がカバーガラスに近い硬質シリコン樹脂 (屈折率: 1.52) を使用して 2.2.1 項と同様の実験を行った。厚さ約 100 μm の硬質シリコン樹脂層と PDMS 層の上にそれぞれ細胞を接着させ、細胞平面画像を取得した。その結果、硬質シリコン樹脂において微小管の線維構造をより鮮明に撮像可能であった (Fig. 3ab)。また、解像度指標値も硬質シリコン樹脂が高い値を示したため、鮮明な細胞画像を得るには、デバイス材料として硬質シリコン樹脂の利用が有用であることが分かった。

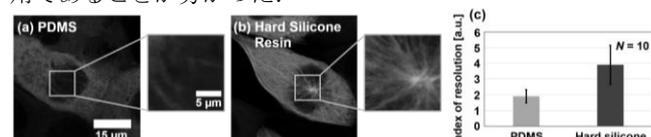


Fig. 3 Fluorescent imaging of microtubules of MDCK cells on the PDMS-coated glass (a) and the hard silicone resin-coated glass (b).

2.3. マイクロデバイスを用いた細胞縦断面イメージング

2.3.1. マイクロデバイスの作製

簡単なマイクロ流路構造を持つ2種類のマイクロデバイスをソフトリソグラフィによって作製した。凹型の溝構造を持ち上側が開放状態にある開流路デバイス (Open Channel Device: OCD) (Fig. 4a) およびマイクロ流路がカバーガラスとPDMSによって閉じられた閉流路デバイス (Closed Channel Device: CCD) (Fig. 4b) である。OCDは上側が開放状態であるため、細胞培養が容易であるという利点がある。しかし構造の作製上、カバーガラスと観察細胞の間にPDMS層が存在し、解像度への影響が考えられる。CCDは流路の底面がカバーガラスのため、観察細胞とカバーガラスの間にPDMS層が存在しない。そのため高解像度の細胞画像の取得が期待できる。但し、狭い閉流路内では細胞への培地供給が不十分となり、細胞培養に難が生じる。

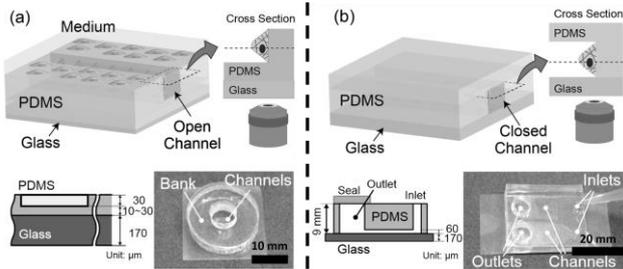


Fig. 4 Schematic of the vertical-section live imaging devices for epithelial cells. (a) Open Channel Device (OCD) and (b) Closed Channel Device (CCD).

2.3.2. 縦断面画像の解像度評価

本実験では、PDMS製開流路デバイス (PDMS OCD, Fig. 5a), 硬質シリコン樹脂製開流路デバイス (Hard Silicone OCD, Fig. 5b), およびPDMS製閉流路デバイス (PDMS CCD, Fig. 5c) の3つを用い、流路側面に接着した細胞を撮影して縦断面画像を取得した。また、カバーガラス上に接着した細胞の平面画像 (Fig. 5d) および再構成縦断面画像 (Fig. 5e) を撮像し、それぞれのデバイスから得られた細胞画像を比較した。それぞれの画像について解像度指標値も算出した (Fig. 6)。

この結果、OCDでは、デバイス材料を硬質シリコン樹脂に変更することで、解像度が僅かに向上した。CCDでは、一般的な細胞平面画像と同様の高解像度で縦断面観察が可能であることを確認した。また全てのデバイスにおいて再構成縦断面像と比較して、高い解像度指標値が得られ、デバイスの使用により解像度の向上が確認された。

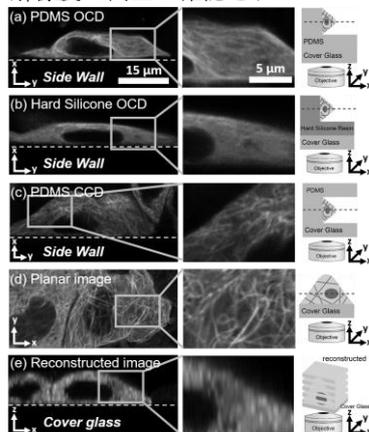


Fig. 5 Imaging of GFP-tagged microtubules obtained with five conditions. (a) PDMS OCD, (b) Hard Silicone OCD, (c) PDMS CCD, (d) Planar image on a cover glass and (e) a reconstructed image on a cover glass.

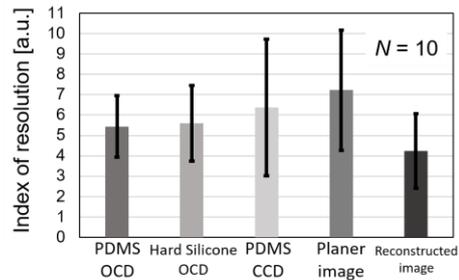


Fig. 6 Index of resolution for five conditions examined in Fig. 5. Average and standard deviations of 10 cells were shown.

2.3.3. タイトジャンクション(TJ)の蛍光イメージング

提案手法の応用として、TJの蛍光イメージングを行い、そのシート垂直方向の局在を高解像度で観察できるかを検証した。TJを構成するタンパク質 (claudin-4) にGFPタグを付与したものを発現させたMDCK細胞を準備し、PDMS製OCDおよびCCDにより縦断面像を撮影した。Fig. 7に、生細胞のライブイメージング画像を示す。OCD, CCDともに細胞がマイクロ流路の側壁にシート状に整列していることを確認した (Fig. 7ab)。またCCDでは細胞間上部の強い蛍光により、claudin-4が細胞上部の接触部分に多く局在していることが示唆された (Fig. 7c)。さらに、上皮細胞の頂端側に発現するZO-1タンパク質のイメージングを行った。この実験は、固定細胞に抗体を用いた免疫染色を施して行った。その結果、2つのデバイスともにZO-1が細胞上部のみに局在していることが観察され、本デバイスの有効性が確認された (Fig. 8)。

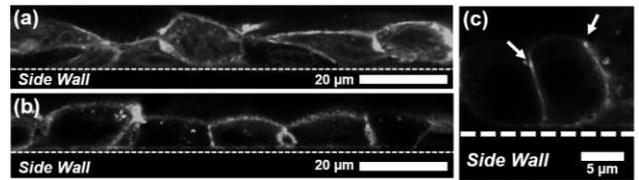


Fig. 7 Live imaging of the vertical section of MDCK cells. Single-scan sectional image of MDCK epithelial sheet in PDMS OCD (a) and PDMS CCD (b). (c) Zoomed image of MDCK cells in PDMS CCD. Fluorescence is GFP-tagged claudin-4.

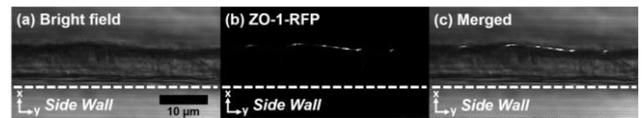


Fig. 8 Vertical imaging of fixed MDCK cells adhering on the sidewall of PDMS CCD. (a) Bright field image. (b) ZO-1-RFP image. (c) Merged image.

3. 上皮細胞シートのバリア機能評価

3.1. 実験系

次に、細胞縦断面イメージングを行いながら、上皮細胞シートのバリア機能を簡便に評価できるマイクロデバイスの開発を目指した。当研究グループでは、以前に、細胞よりも小さい断面積を持つマイクロチャンバーアレイを用いた接着性細胞の膜輸送機能を評価するデバイスを報告した⁽³⁾。この系を応用して、上皮細胞シートの物質透過を評価する実験系の構築を行った。その実験の概要をFig. 9に示す。上皮細胞は基板への接着が特に強く、培養中にマイクロチャンバー内に侵入してその空間を埋めてしまうことが懸念された。そのため、チャンバーの内部にコラーゲンゲルを充填することで、デバイス表面上に上皮細胞の単一層を形成させることを目指した。培地中には透過物質のモデルである蛍光デキストランを添加しているため、細胞のTJ形成後に上側の培地 (バッファ) を洗い流すと、チャンバー内部のみに蛍光デキストラ

ンが残留する。続いて、TJの開口を促す薬剤等を添加すると、細胞間に浸透してチャンパー外部に流出し、その空間における蛍光強度が減少する。この方法により、チャンパー内の蛍光輝度変化を計測することで、薬剤に対する上皮シートのバリア機能評価を行った。

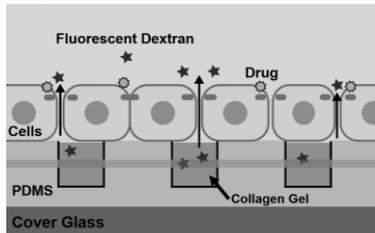


Fig. 9 Conceptual diagram of the assay system for the barrier function of the epithelial cell sheet.

3.2. マイクロデバイスの作製および実験手順

3.2.1. 縦穴型マイクロチャンパーデバイスの作製

シリコン基板上に感光性レジストをパターンニングし、それをマスクとして深堀りエッチングを行うことでマイクロチャンパーの鋳型を作製した。この鋳型にPDMSを流し込み、硬化させた後に離型することで、1辺10~25 μm 、高さ25 μm の四角柱状チャンパーアレイを作製した。細胞の侵入を防ぐ目的で、チャンパー上にコラーゲンゲル溶液 (Cellmatrix Type-I-A, 新田ゼラチン) を滴下し、カバーガラスの辺を用いてデバイス表面をスキージすることで、チャンパー内にコラーゲンゲル溶液を充填させた (Fig. 10a)。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間加温することで、コラーゲンゲル溶液をゲル化させた。レーザー顕微鏡によりデバイスの表面形状を測定したところ、チャンパー内にコラーゲンゲルが充填されていることを確認した (Fig. 10b)。

3.2.2. 縦穴型マイクロチャンパーデバイスの実験手順

デバイス上に、トリプシン処理で分散させたMDCK細胞を播種した。細胞は、GFPを融合させたClaudin-4 (TJの構成タンパク質) を恒常発現させたMDCK細胞を作製して使用した。蛍光デキストラン (Cascade blue-conjugated dextran, M.W. 10,000) を添加した培地を用い、1~2日間インキュベーションして細胞を培養した。その後、培地をバッファに交換し、レーザー共焦点顕微鏡のタイムラプス撮影を行うことで、培地の洗浄前後におけるチャンパー内の蛍光強度変化を測定することにより細胞シートのバリア機能の評価を行った。

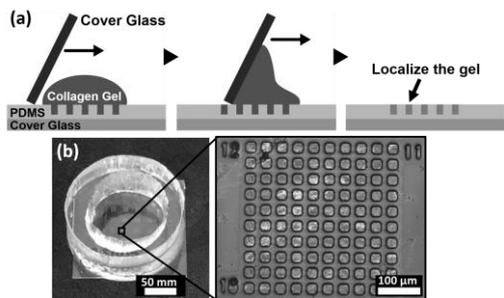


Fig. 10 (a) Fabrication procedure of the gel-filling microchamber device. (b) Overview and a microscope image of the actual device.

3.2.3 横穴型マイクロチャンパーデバイスの作製

縦穴型マイクロチャンパーデバイスでは、細胞とマイクロチャンパーが同じ観察軸上に存在する。この場合、細胞質やバルク空間に存在する基質からの蛍光がマイクロチャンパー内に漏れ込み、バックグラウンドとして干渉する。そこでデバイスの側壁にマイクロチャンパーが形成されている横穴型マイクロチャンパーデバイスを作製した。このデバイスでは、細胞は観察面に対して垂直に接着するように作られて

いるため、細胞シートを横切る物質透過を直接観察でき、かつ細胞と重なることなくチャンパー内を観察できる。デバイスの作製手順を Fig. 11 に示す。マイクロチャンパーアレイを備えたPDMS塊をチャンパー構造部に沿って切断した。次にチャンパー内部にコラーゲンゲルを充填し、切断したPDMS面をカバーガラスに接合した (Fig. 11a)。最後にPDMSで作られた2つのハープリングを、培地を保持するための槽として接合した。完成したデバイスの画像を Fig. 11b に示す。

3.2.4. 横穴型マイクロチャンパーデバイスの実験手順

縦穴型マイクロチャンパーデバイスと同様の方法で、トリプシン処理によって分散させたMDCK細胞をデバイスに播種した。細胞培養時、デバイスはチャンパー側を下側にして静置し、コラーゲンゲルで満たされたチャンパー上に細胞を接着させた。1~2日間インキュベーションして細胞を培養した。細胞観察時には、カバーガラスが底面になるようにデバイスを90 $^{\circ}$ 反転させた (Fig. 11c)。この状態では、細胞シートとチャンパー内部を同様の焦点面で観察することができる (Fig. 11d)。

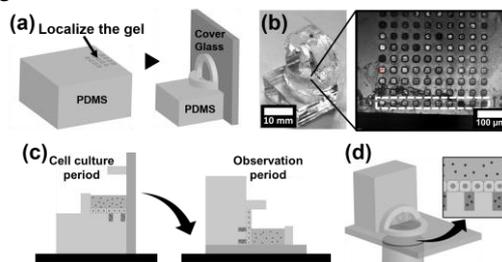


Fig. 11 (a) Fabrication process of the horizontal microchamber device. (b) Overview and a microscope images of the actual device. (c) The device is flipped 90 $^{\circ}$ for vertical observation of microchambers and cells. (d) Microscope imaging.

3.3. 実験結果

3.3.1. 縦穴型マイクロチャンパー上の細胞形態

コラーゲンゲルで満たされたチャンパー上に接着した細胞を観察した (Fig. 12)。細胞播種30分後では細胞は球形のままチャンパー上にとっていた。培養を1日間行くと細胞はマイクロチャンパー上を覆うように接着した。一方、ゲルを充填していないデバイスではチャンパー内に細胞が侵入していた。培養2日目では、ゲルを充填したデバイスにおいてもMDCK細胞はチャンパー内に侵入したが、異なる接着細胞 (HeLa細胞) はチャンパー上に広がって接着していた。

Culture period	Device	MDCK Cell		HeLa Cell	
		Without Gel-Filling	Gel-Filling	Without Gel-Filling	Gel-Filling
30 min	Without Gel-Filling				
	Gel-Filling				
1 day	Without Gel-Filling				
	Gel-Filling				
2 day	Without Gel-Filling				
	Gel-Filling				

Fig. 12 Imaging of cells adhering on vertical microchambers filled with collagen gel. Fluorescence is from the GFP-tagged claudin-4.

3.3.2. 縦穴型チャンパーによる細胞シートバリア機能評価

細胞のコラーゲンゲル充填チャンパーへの侵入が見られなかった培養1日目において、チャンパー内の蛍光デキストランの漏出評価を行った。バッファ洗浄前のチャンパー内の蛍光画像を Fig. 13b に、洗浄後5分後の蛍光画像を Fig. 13c に示す。洗浄前は全てのチャンパー内で高い蛍光強度を示し

ているが、洗浄5分後では、チャンパーによって輝度の濃淡が見られた。Fig. 13aに示した、接着した細胞の分布と比較すると、細胞に高密度に覆われている●印付きの矢印で示したチャンパーでは蛍光が残存しているが、細胞接着がない、×印付きの矢印で示したチャンパーでは蛍光が見られなかった。

続いて30秒毎のタイムラプス撮影画像を取得し、ImageJによる画像解析により、全100チャンパー内の蛍光強度の変化を求めた。洗浄前のチャンパーごとの蛍光輝度値で正規化した、代表的な相対輝度の時間変化をFig. 13dに示す。細胞が高密度に接着していたチャンパー(●)、低密度に接着していたチャンパー(▲)および細胞接着のないチャンパー(×)の3種類について輝度変化をプロットした。細胞が高密度に接着していたチャンパーでは、蛍光強度の減少がゆるやかで、30分後でも洗浄前の輝度値の約5割の蛍光強度を維持していた。細胞接着が低密度の領域にあったチャンパーでは、洗浄直後には高い輝度値を示したが、前者に比べて輝度値の減少が速く、30分後には洗浄前の約1割になった。細胞接着がないチャンパーでは、洗浄直後の観察開始点において蛍光輝度が洗浄前の約2割に減少しており、蛍光デキストランがバッファとともに洗い流されたことが示唆された。

最後に、TJを開口させることが知られているEDTA⁽⁴⁾を0.5mM添加したバッファを洗浄に用いてチャンパーの蛍光輝度の変化を測定した(Fig. 13e)。観察開始から15分後まではEDTA有無による蛍光強度の減少に違いは見られなかったが、15分以降ではEDTAの添加により輝度の減少率の増加が確認された。

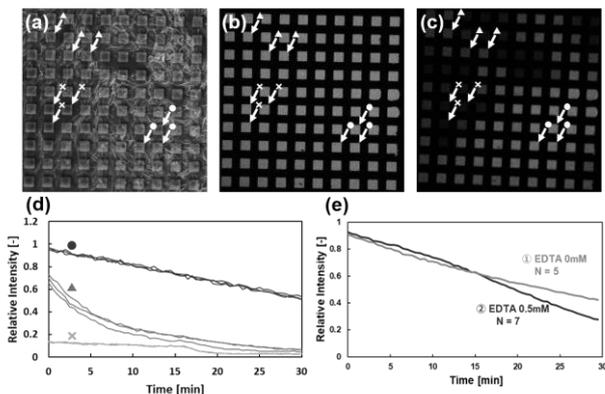


Fig. 13 (a-b) Fluorescent images of cells and microchambers before washing. (c) Fluorescent image of microchambers after washing. (d) Time variation of the intensity of fluorescent dextran for selected microchambers. (e) Time variation of the intensity of fluorescent dextran with and without presence of EDTA.

3.3.3. 横穴型チャンパー上の細胞形態

横穴型マイクロチャンパー上に接着した細胞を観察した(Fig. 14)。培養1日目においてゲルを充填していないデバイス内のチャンパーを観察したところ、チャンパー内に細胞が侵入していた。一方、コラーゲンゲルが充填されたチャンパーでは、細胞はマイクロチャンパー上を覆うように接着した。しかし、培養2日目では細胞のチャンパー上部への侵入が確認された。以上の結果から、横穴型においても、縦穴型と同様に、培養2日目ではチャンパー内に細胞が侵入することが分かった。

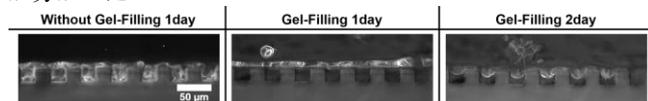


Fig. 14 Microscope images of cells adhering on horizontal microchambers without and with the collagen gel. Fluorescence is from the GFP-tagged claudin-4.

3.3.4. 横穴型チャンパーによる細胞シートバリア機能評価

培養1日目において細胞接着によるチャンパー内部の密閉性を評価した(Fig. 15)。洗浄30分後、蛍光強度は洗浄前の約30%に低下した。この蛍光漏出速度は高密度の細胞接着が観察された縦穴型チャンパーより大きい、低密度および細胞接着が見られない縦穴型チャンパーより小さい。そのため横穴型チャンパーでは、ある程度の細胞接着による密閉が存在することが分かった。またEDTA 0.5mMをバッファに投与した場合の蛍光強度の漏出速度と比較した。Fig. 15cに示すように縦穴型チャンパーとは異なり、EDTA有無による蛍光強度の減少に違いは見られなかった。横穴型デバイスの構築法を確立し、かつチャンパー内蛍光強度の時間変化取得が可能であることを示したが、その定量評価には、チャンパー上に高密度な細胞シート形成を実現する培養条件や薬剤刺激の条件をより詳細に検討し、評価する必要がある。

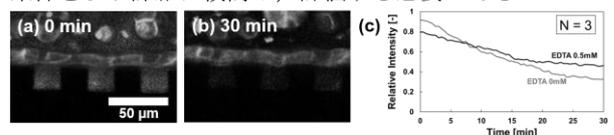


Fig. 15 (a-b) Fluorescent images of cells and microchambers after 0 min and 30 min of medium exchange, respectively. (c) Time variation of the intensity of fluorescent dextran with and without presence of EDTA.

4. 結言

本研究では、上皮細胞シートの高解像度な縦断面イメージングおよびバリア機能評価を行うためのマイクロデバイスの開発を行った。始めに縦断面イメージングを行うためのOCDおよびCCDという異なる形状・特長を持つ2種類のデバイスを作製した。2種類のデバイスにおいて、共に共焦点顕微鏡による再構成縦断面像よりも高い解像度の細胞縦断面像を1スキャンで得ることに成功した。また、上皮細胞シートの機能に大きな役割を持つTJの縦断面方向からの高解像度イメージングに成功した。上皮細胞シートの垂直方向の動態の1つであるバリア機能の評価のために、細胞シートがマイクロチャンパーを覆うように設計された2種類のマイクロデバイスを開発した。縦穴型マイクロチャンパーでは、細胞の接着密度に応じてチャンパー内基質の漏出が異なることを計測により示し、本手法の妥当性を確認した。イメージングに優れた横穴型マイクロチャンパーでは、定量性に課題が残るものの、チャンパー内部と上皮細胞シートを同じ視野で観察でき、細胞内動態とバリア機能の評価を同時に行えることを示した。本研究は、上皮細胞シートにおける局所的な構造および物質透過機能の解明に繋がることが期待される。

参考文献

- (1) Tomita, M et al., Absorption-enhancing mechanism of EDTA, Caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 cells, *J. Pharmaceut. Sci.*, **85-6** (1996) pp. 608-611.
- (2) Teshima, T et al., High-resolution vertical observation of intracellular structure using magnetically responsive microplates, *Small.*, **12** (2016) pp. 3366-3373.
- (3) Tsugane, M et al., Microchamber device for detection of transporter activity of adherent cells, *Front Bioeng. Biotech.*, **32-3** (2015) e0132963.
- (4) Wang, X et al., Exploring tight junction alteration using double fluorescent probe combination of lanthanide complex with gold nanoclusters, *Sci. Rep.*, **6** (2016) 32218.