

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05512

研究課題名(和文) 培養環境時空間制御による細胞組織自律形成制御技術の創出

研究課題名(英文) Spatio-temporal control of cellular microenvironment to direct collective cell formation

研究代表者

萩原 将也 (Hagiwara, Masaya)

大阪府立大学・研究推進機構・講師

研究者番号：00705056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来バラつきが大きく解析が困難である細胞集団のパターン形成において、微細加工技術を用いて細胞集団の初期条件を厳密に制御し、細胞集団が形成するパターンの再現性を飛躍的に向上させることを達成した。次に反応拡散モデルによる形態形成因子の時空間シミュレーションと上記再現性の高い細胞培養結果を繰返しフィードバックを行うことで、シミュレーション精度を上げ、実験のみでは解析が困難である分子の時空間変化をシミュレーションで補うことにより、細胞が従っているルールを明らかにし、集団形成システムの一旦を解明した。

研究成果の概要(英文)：We have achieved to develop an in vitro - in silico interface platform for elucidating the logic of multicellular pattern formation. Two-dimensional collective cell pattern formation was achieved using only normal human bronchial epithelial cells. Then, simple microfabrication techniques followed by feedback iteration were used to bridge the gap between the mathematical model and in vitro experiments. The mechanisms underlying pattern formation of bronchial epithelial cells were evaluated using a reaction-diffusion model. The results indicated that long-range inhibition and short-range activation systems determine the direction of collective cell migration to form a specific pattern.

研究分野：組織形成制御

キーワード：細胞環境制御 反応拡散モデル 細胞行動 気管支上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞、ES・iPS 細胞の発展は再生医療の可能性を大きく広げ、これまで既に皮膚や網膜など構造が比較的単純な細胞組織については体外で作製され臨床研究が進んでいる。一方で、体内の多くの組織は複雑で固有の形状を有しており、体外で細胞レベルから三次元構造体を作製することが非常に困難であり、この分野の発展に大きな障害となっている。これに対し体外において組織再生を達成するため、細胞シートの積層化 (T. Okuno et al., 2003)、細胞ファイバーの織込み(S. Takeuchi et al., 2013)など様々な手法が研究されているが、これらは人工的に細胞を配列して組織の最終形状を構成しようという手法であり、細胞自体の活動を考慮して設計されていない。しかし多くの細胞は細胞間でコミュニケーションをとり、自身の位置を感知し移動・増殖を繰り返して組織全体として固有の形状を形成する能力を持っている。そのため人工的に組織形状を作製をしたとしても細胞発達の伝達関数が未知であるため最終形状が設計と異なってしまう問題がある。

2. 研究の目的

本研究では細胞の培養環境を時空間的に制御することで細胞自身の活動を誘導し、細胞レベルから組織レベルへと発達する自律形成を制御するための技術を創出することを目的とする。数理モデルを用いて細胞集団が従っているルールを明らかにし、細胞周りの微小環境を制御することにより、複雑な形状を持つ細胞組織を任意形状に発達させるための設計論を構築する。

3. 研究の方法

(1) フォトリソグラフィによる細胞初期制御

2次元における気管支上皮細胞の分岐形成は、細胞の濃度勾配が高くなるようにガラス基板の上に配置し、さらにその上から形態形成因子の拡散速度を抑えるために細胞外基質で被膜することにより達成可能である。そこで幾何形状を持つ細胞群から分岐形成がどのように起こるのかを解析する。細胞の初期位置制御については、図1に示すようにシリコン基板の上にフォトリソグラフィによりパターンニングした SU-8 の型を作製し、この型に熱硬化性樹脂である PDMS (Polydimethylsiloxane) を流しこみ、マイクロパターンを持つ PDMS の薄膜を作製する。この PDMS 薄膜を培養ディッシュ上に置いてその上から細胞混濁液を滴下して培養することで、マイクロパターンの内側だけに細胞がディッシュに接着し成長するようになる。マイクロパターン内における細胞が一杯になるまで培養を行った後に PDMS 膜を取り除き、その上からゲルで被膜することで実験系が完成する。

(2) 反応拡散モデルによる細胞集団シミュレーション

細胞組織の形態形成は、非常に多くの細胞が複雑に絡みあったひとつのシステムである。しかし個々の細胞ができることは単純な入力と応答の繰り返しのみであると仮定して、細胞が発する形態形成因子のマクロなシグナル伝達により、細胞組織がどのような空間パターンを形成するかを数式で表現したのが A. Turing の反応拡散方程式である。その後、H. Meinhardt がこの反応拡散方程式を大域のネットワーク形成や分岐構造に適用するため、細胞組織のパターン形成を次式で表現している。

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \frac{cA^2S}{H} - \mu A + D_A \nabla^2 A + \rho_A Y \quad (1)$$

$$\frac{\partial H}{\partial t} = cA^2S - \nu H + D_H \nabla^2 H + \rho_H Y \quad (2)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = c_0 - \gamma S - \varepsilon SY + D_S \nabla^2 S \quad (3)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial t} = dA - eY + \frac{Y^2}{1 + fY^2} \quad (4)$$

A, H はそれぞれ活性因子濃度、抑制因子濃度を表し、S は細胞が形態形成する上で必要な栄養物質の濃度であり、Y の増加により消費される。Y はある一定値に達すると固定される生体マーカーであり、これが一定値に達すると活性因子に影響されずに一定値を保ち、細胞がそこに固定され

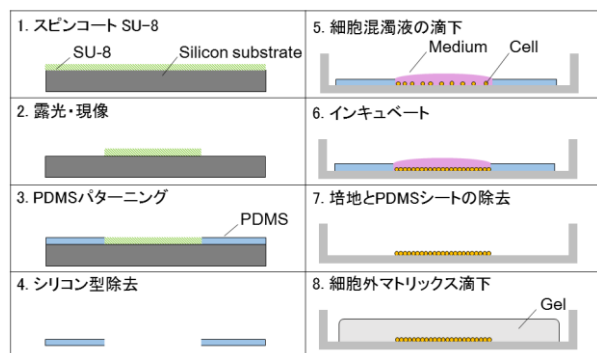


図1. フォトリソグラフィによる2次元細胞集団初期位置制御

たことを示す。それ以外は培養条件によって決定される定数である。本研究では、気管支上皮細胞の集団形成を上記反応拡散モデルを用いてシミュレーションを行う。

4. 研究成果

図2に細胞集団の初期位置を三角形に制御し、その頂点同士を250 μm, 500 μm 離して向かい合わせに置いた実験結果を示す。これまでの我々の研究成果から、細胞集団の初期位置を三角形に配置すると必ず頂点から成長することが確認できている。本結果を利用して頂点から伸びていった細胞集団がお互いにどのようなパターン形成を発生するかを確認した。まず、250 μm では細胞集団は他方を最初から避け Y 字に分かれていくのに対し、2倍離れた500 μm では頂点からまっすぐに伸びた後に他方の集団を避ける方向へと発達していった。

この原因を解析するために反応拡散モデルを用いて細胞から分泌される形態形成因子の二次元濃度分布を算出したところ、実験同様、集団間距離によって異なるが頂点から成長した細胞集団はお互いを避けていくことが確認できた(図3(a))。集団間距離の違いによる頂点からの成長の差は抑制因子が他方の集団へ及ぼす影響範囲を表している。この初期の距離と頂点からの成長距離の関係から抑制因子が及ぼす範囲を特定でき、実験結果と合わせていくことでより正確な抑制因子の拡散速度がわかりシミュレーションの精度を向上させることができる。

次に細胞集団同士が避ける方向へと発達した原因を解析するために500 μm 離れたシミュレーションの黄色い線で区切った部分を一次元の濃度分布としてみたものを図3(b)に示す。細胞が発達するためには栄養因子が必要である。細胞集団が頂点から発達していくにつれて中心付近の栄養因子は両サイドから消費されていき徐々に減少し始める。また、抑制因子は広範囲に影響を及ぼすため、中心付近ではお互いの抑制因子の影響も強くなる。そこで細胞は栄養因子がより多く、抑制因子の影響が小さい方向へと発達するためお互いを避ける方向へと成長しく結果となった。

次に反応拡散モデルによる集団形成に加え、粘弾性による力学相互作用を細胞行動モデルとして仮定し、細胞を面積をもつ粒子に見立てて力学-化学ハイブリッドモデルを構築した。細胞はそれぞれ栄養成分を吸収し活性因子と抑制因子を放出しそれらの相互作用により形成された濃度勾配が細胞行動の方向を決定する。一方、接着した細胞どうしは離れる際に相互に引っ張り合い、近づく際に細胞質の体積より反発力を生じる。これをばね-ダンパモデルを用いて表現した。これにより力学・化学どちらかの相互作用のみを考慮したモデルでは表すことができなかった

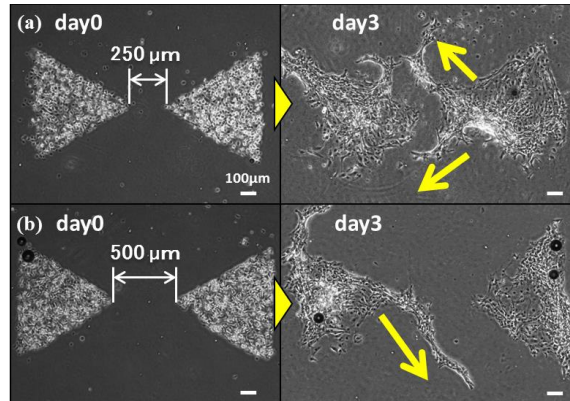


図2. 細胞初期集団形状・距離の制御下による集団形成実験

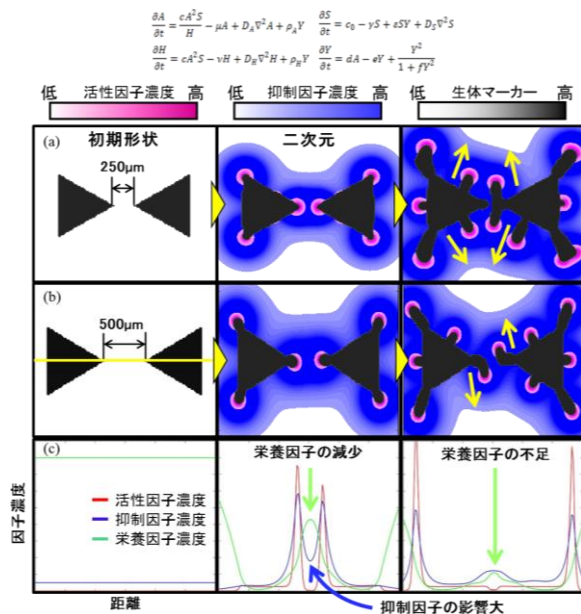


図3. 反応拡散モデルによる集団形成シミュレーション

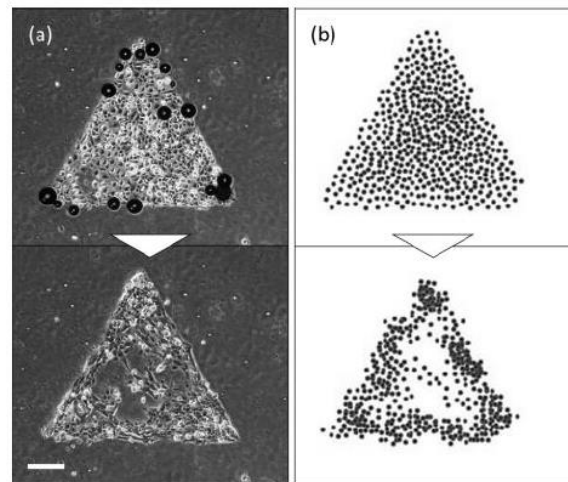


図4. 細胞集団内における個体行動シミュレーション

in vitro実験における個々の細胞動態を、ハイブリッドモデルでは表現することができた(図4)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件) (全て査読有)

1. M. Hagiwara, R. Nobata, T. Kawahara, "Large scale imaging by fine spatial alignment of multi-scanning data with gel cube device", *Applied Sciences*, 8, doi:10.3390/app8020235, 2018.
2. M. Hagiwara, N. Maruta, M. Marumoto, "In vitro experimental model for the long-term analysis of cellular dynamics during bronchial tree development from lung epithelial cells", *Tissue Engineering part C*, 23, 6, pp.323-332, doi:10.1089/ten.TEC.2017.0126., 2017.
3. M. Hagiwara, "An in vitro - in silico interface platform for spatiotemporal analysis of pattern formation in collective epithelial cells", *Integrative Biology*, 8, pp.861-868, 2016. DOI:10.1039/C6IB00073H
4. M. Hagiwara, T. Kawahara, R. Nobata, "Tissue in Cube: In vitro 3D culturing platform with hybrid gel cubes for multi-directional observations", *Advanced Healthcare Materials*, 5, pp1566-1571, 2016. DOI:10.1002/adhm.201600167

[学会発表] (計18件)

1. 丸本萌, 萩原将也, Dynamic analysis of collective cell migration by mechanochemical hybrid model, 第55回生物物理学会年会, 2017.09.19.
2. 萩原将也, 野畑李奈, 川原知洋, In vitro 3D culture platform for environmental control and imaging, 第55回生物物理学会年会, 2017.09.19.
3. Masaya Hagiwara, Rina Nobata, Tomohiro Kawahara, In vitro 3D Culture Platform for Large-Scale Imaging by Hybrid Gel Cube, 12th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, Los Angeles, U.S.A., 2017.04.10.
4. 白石大和, 萩原将也, 自立形成制御にむけた上皮細胞集団のパターン形成ダイナミック解析, 第39回日本分子生物学会, 2016.12.2
5. 丸本萌, 白石大和, 萩原将也, 二次元培養条件制御による細胞集団と個体の行動解析, 第39回日本分子生物学会, 2016.12.2
6. 野畑李奈, 川原知洋, 萩原将也, 多面観察プラットフォームによる細胞組織イメージング, 第39回日本分子生物学会, 2016.12.2
7. Masaya Hagiwara, Rina Nobata, Tomohiro Kawahara, In vitro 3D culture platform for multidirectional imaging, RSC Tokyo International 2016, 2016.09.09.
8. 萩原将也, 野畑李奈, 川原知洋, 多面観察プラットフォームによる細胞組織の大域高解像イメージング, 第34回化学とマイクロナノシステム学会, 2016.09.08.
9. 白石大和, 萩原将也, 培養環境制御による細胞集団コミュニケーション解析, 第34回化学とマイクロナノシステム学会, 2016.09.08.
10. 白石大和, 萩原将也, 培養環境制御による細胞集団パターンの自律形成制御, 第33回化学とマイクロナノシステム学会, 2016.04.26.
11. Masaya Hagiwara, Tomohiro Kawahara, In vitro 3D culturing platform with omni-directional imaging device, CDB Symposium 2016 "Size in development", 2016.03.29
12. 萩原将也, 白石大和, 細胞位置制御による細胞組織の分岐発達メカニズム解析, 日本機械学会バイオエンジニアリング講演会, 2016.01.10.
13. 丸田尚道, 萩原将也, 気管支上皮細胞の三次元分岐再構成における異種細胞が与える影響解析, 第38回日本分子生物学会, 2015.12.01
14. 萩原将也, 培養初期条件制御による気管支上皮細胞の二次元分岐形成メカニズム解析, 第38回日本分子生物学会, 2015.12.01
15. 萩原将也, 培養制御でつなぐ in vitro / in silico インターフェースによる気管支分岐形成メカニズム解析, 第32回化学とマイクロナノシステム学会, 2015.11.27.
16. 萩原将也, 森英樹, 原正之, 二次元気管支分岐形成技術による分岐方向決定メカニズム解明, 第37回日本バイオマテリアル学会, 2015.11.09.
17. Masaya Hagiwara, Spatio-temporal analysis of lung branching morphogenesis by controlling two-dimensional cell positions, The 26th CDB Meeting "Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization", 2015.09.08.
18. Masaya Hagiwara, Dynamic analysis of lung branching morphogenesis by feedback system of Reaction-diffusion model and controlled cell culture, QBiC symposium 2015 "High-Dimensional Data for the Design Principles of Life", 2015.08.25.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

名称：細胞培養用流体チップ

発明者：**萩原将也**

権利者：大阪府立大学

種類：特許

番号：PCT/JP2018/001402

出願年月日：2018. 01. 24

国内外の別： 国外

名称：細胞培養容器、観察用試料セルおよび細胞培養方法

発明者：**萩原将也**，川原知洋

権利者：大阪府立大学，九州工業大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/043675

出願年月日：2017. 12. 15

国内外の別： 国外

名称：細胞培養容器、観察用試料セルおよび細胞培養方法

発明者：**萩原将也**，川原知洋

権利者：大阪府立大学，九州工業大学

種類：特許

番号：日本国特許出願 2017-26036

出願年月日：2017. 02. 15

国内外の別： 国内

名称：細胞培養用流体チップ

発明者：**萩原将也**

権利者：大阪府立大学

種類：特許

番号：日本国特許出願 2017-022223

出願年月日：2017. 02. 09

国内外の別： 国内

名称：細胞培養容器及び観察用試料セル

発明者：**萩原将也**，川原知洋

権利者：大阪府立大学，九州工業大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/082979

出願年月日：2016. 11. 07

国内外の別： 国外

名称：細胞培養容器及び観察用試料セル

発明者：**萩原将也**，川原知洋

権利者：大阪府立大学，九州工業大学

種類：特許

番号：日本国特許出願 2015-237526

出願年月日：2015. 12. 04

国内外の別： 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.nanosq.21c.osakafu-u.ac.jp/ttsl_lab/m_hagiwara/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 将也 (HAGIWARA MASAYA)

大阪府立大学 21 世紀科学研究機構・講師
研究者番号：00705056

(4) 研究協力者

川原 知洋 (Tomohiro Kawahara)
九州工業大学大学院生命体工学研究科
研究者番号：20575162