

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12513

研究課題名(和文) 弾性率可変マイクロゲルファイバーマトリックスを用いた異種細胞の自発的機能的局在化

研究課題名(英文) Spontaneous functional localization of different type of cells with an elasticity-tunable microfiber gel matrix

研究代表者

木戸秋 悟 (KIDOAKI, Satoru)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号：10336018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の三次元運動を制御することは生体組織工学の重要な基盤技術の一つである。本研究では、弾性率可変および接合度調節可能な光架橋性ゼラチンの電界紡糸マイクロゲルファイバーマトリックスの弾性場設計法を検討し、機能的生体組織の形成の基礎原理となる、細胞自身の『自発的機能的局在化』運動を誘導する三次元微視的培養力学場の設計技術を開発した。その動作例の一つとしてがん細胞の三次元浸潤挙動に対する力学場の効果を検証し、正常細胞を侵入させず、悪性度の高いがん細胞のみを補足する足場材料の設計条件の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Controlling the three-dimensional movement of cells is one of the important fundamental technologies of tissue engineering. In this study, we have investigated the design of mechanical conditions of the artificial extracellular matrix, i.e., the electrospun microgel fiber matrix of photocrosslinkable gelatin capable of modulating the elastic modulus and the degree of fiber bonding. Based on the methodology, we have developed the design technology for three-dimensional microscopic mechanical field to induce the spontaneous functional localization of cells. As one example of its operation, we examined the effect of the mechanical field on the three-dimensional invasion behavior of cancer cells, and successfully designed the mechanical condition of extracellular matrix that captures only malignant cancer cells without penetrating normal cells.

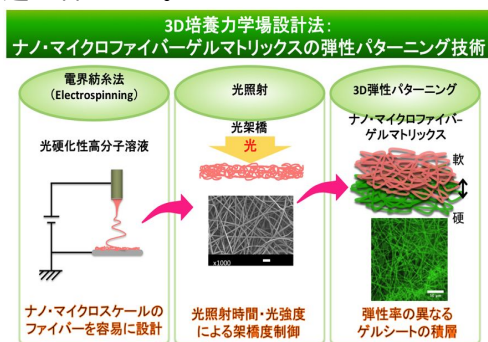
研究分野：医用生物物理学

キーワード：がん転移 腫瘍細胞 細胞運動 組織工学

1. 研究開始当初の背景

病気や怪我で損傷・欠損した生体組織の再生・再建を目指す組織工学においては、細胞からなる組織の機能的構築の原理的理解の拡充と、その知見の実際の組織再生への応用が根本的アプローチの一つである。生体組織は異なる種類の細胞が機能的に局在化した精緻な構造を有するが、その構造構築は異なる種類の細胞がそれぞれ自らの適所へと自発的に移動し生着することで為されており、その現象全体の根底には細胞自体の運動性制御・走性制御が深く関わる。このため、組織工学足場材料の設計において細胞の運動方向と局在化を自在に制御可能な方法論が確立できれば、機能的組織の再生に極めて有効な技術となり得るが、細胞自身の『自発的機能的局在化』のための仕掛けを持った足場材料の設計技術はこれまでに開発されていない。

この課題に関連して研究代表者はこれまでに、細胞が周囲環境の力学的特性を検知して硬い領域へと移動する走性(メカノタクシスと呼ばれる)の制御技術を確立してきた。具体的には細胞培養ハイドロゲルのマイクロスケール分解能での弾性パターンニング技術を独自に開発し、メカノタクシスの自在制御による細胞の長距離ベクトル移動操作材料の開発に成功している(Kidoaki, PlosONE, 2013)。そして本研究開始の時点で、その技術の発展型となる『マイクロゲルファイバーマトリックスの三次元弾性パターンニング技術』(図1)を確立しつつあった。この技術を用いれば三次元マトリックス内での細胞の三次元運動を操作可能であり細胞の局在制御を可能とするものであることから、本研究課題を着想した。



三次元細胞足場材料の弾性分布設計が可能

図1. マイクロゲルファイバーマトリックスの三次元弾性パターンニング技術の模式図。光硬化性高分子を電界紡糸によりナノファイバーマッシュ化し、それを固相光反応により架橋したのち、水溶液中にて膨潤させる。一本一本のマイクロファイバージェルが互いに接合したゲルファイバーマトリックスが形成される。光照射条件の調節によりファイバース弾性率およびマトリックス弾性率を制御可能であり、異なるメッシュの三次元積層によって三次元弾性分布を自在に設計できる。

2. 研究の目的

生体の組織・器官は様々な種類の細胞が機能的に配置・局在化されることでその精巧な生理的活動を遂行する。本研究課題では、このような機能的生体組織の形成の基礎原理となる細胞自身の『自発的機能的局在化』に着目する。異なる種類の細胞が自発的に機能的局在を果たす鍵は、細胞が自身で運動し移動することで適所に生着することにある。本研究では、申請者がこれまでに独自に開発している『マイクロゲルファイバーマトリックスの三次元弾性パターンニング技術』を応用して、細胞の『自発的機能的局在化』運動を誘導する三次元微視的培養力学場の設計技術を確立するとともに、異種細胞の各々の細胞を適所に局在化させ得る細胞操作型の足場材料の開発を目指した。すなわち、細胞足場材料・マトリックスの内部において、細胞の三次元運動の方向制御と、細胞種に応じた任意の適所への局在化の技術と材料の開発を目的とした。

具体的には2年間の研究期間において、上皮・内皮系細胞と間葉系細胞の領域特異的局在化を誘導するハイドロゲルマトリックスの設計指針を確立し、最適材料の構築に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、1)細胞の『自発的機能的局在化』運動を誘導する三次元微視的培養力学場の設計技術を確立し、2)異種細胞を適所に局在化させ、機能組織を構築する細胞操作型足場材料の開発を行う。これらの二つの研究項目につき、各一年の研究期間を充て2カ年計画にて実施した。初年度はマイクロゲルファイバーマトリックスの弾性率の精密制御の手法改良を行なった。そして第二年度には初年度に確立されたゲルファイバーマトリックスの弾性精密設計技術に基づいて、異種細胞の『自発的機能的局在化』の具体的動作系を検証した。

まず、第一段階として、細胞の『自発的機能的局在化』を誘導する三次元的弾性率勾配を組み込んだ足場材料設計技術の確立が必要である。そして最終的な機能組織を構成する複数の種類の細胞のそれぞれについて、細胞種特有の弾性勾配応答性ととも、その細胞の定住に適したマトリックス弾性場に関する知見を得る必要がある。細胞がその種類に依存して定住に適した硬さのマトリックスに局在し得ることについては既に一部の予備データを得ていたが、具体的な動作系を想定した細胞種の選択と、その細胞に対する三次元弾性場の設計条件の把握は未達であった。第一年度にはこの課題に取り組んだ。

次に、第二段階として、三次元弾性分布を設計したマトリックスにおいて、異種の細胞が狙った領域へと自発的に移動・局在するかを検証する。本研究では、がん治療をターゲットとして、腫瘍細胞の三次元浸潤特性

における表現型に依存して、正常上皮細胞は侵入せず、悪性度の高いがん細胞のみが浸潤する三次元弾性場の条件を調べることで、細胞の自発的機能的局在化の実際の動作系の最初の事例を示すこととした。がん細胞の移動浸潤の系では、マトリックスに抗がん剤を仕込んでおくことで、浸潤したがん細胞のみを殺傷する機能的足場材料の実施例となり得る。

4. 研究成果

圧縮度調整によるファイバー間接合度制御と細胞侵入の抑制

ゲルマトリックスのファイバー間接合度の制御は、光照射時のメッシュシート圧縮により行った。メッシュシートを任意の厚みのスペーサーと共に2枚のカバーガラスで挟み、さらに上下から磁石で挟むことによって加圧した。光照射時間一定で、メッシュシート圧縮率を制御した条件のもとで作製したゲルマトリックスのシート表面弾性率を、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた微視的圧入試験により測定した。光照射時間一定、すなわちゲルファイバー個々の弾性率 (ファイバー弾性率) は圧縮条件によらず一定であるにも関わらず、シート表面弾性率は、圧縮率の増大に伴う増大を示した。ゲルマトリックスにおいては、ファイバーが積層した多孔質構造のために、各ファイバーが固定されておらず、AFM による表面圧入を行う場合、ファイバーのたわみ・変形の寄与が測定される。光照射時にメッシュシートを圧縮することで、ファイバー間の接合点数が増加する。すなわち、高圧縮条件では接合点間ファイバー長が短くなり、ファイバーの拘束度が高まるため、低圧縮条件に比べてファイバーの変形が抑制されると考えられることから、高圧縮条件ではファイバー表面の弾性率をより強く反映したと考えられる。

さらに、ファイバー間接合度を制御したゲルマトリックス上で乳腺由来強転移性がん細胞 MDA-MB-231 を培養すると、低接合条件

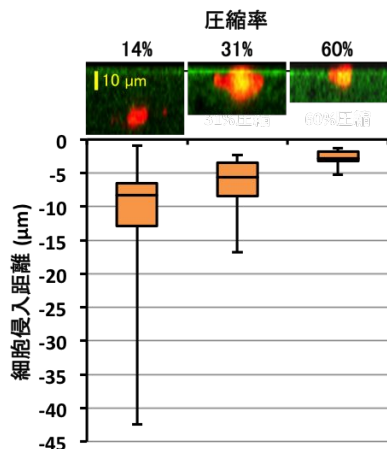


図 2. ファイバー間接合度の調節による細胞侵入の制御

では内部への侵入が見られたのに対し、高接合条件では侵入が抑制された。したがって、MDA-MB-231 は空隙率の高いマトリックスを好んで浸潤することが示唆された (図 2)。

力学場条件に対する細胞侵入挙動の定量的評価

細胞侵入の力学場条件に対する応答性を評価するため、無圧縮低接合の細胞侵入可能な空隙を確保した条件のもとで、メッシュシートに対する光照射時間の調節によりファイバー弾性率を制御したゲルマトリックスを作製した。ゲルファイバーをガラス基材上に低密度に固定し、個々のファイバーに対して AFM の微視的圧入試験による弾性率測定を行い、光照射時間の増大に伴うファイバーの硬化を確認した (図 3)。20 kPa、49 kPa、80 kPa のファイバーからなる低接合ゲルマトリックスにおいて、MDA-MB-231 と正常な乳腺由来の上皮細胞 MCF-10A をそれぞれ播種・培養した。培養 2 日目、および 7 日目にパラホルムアルデヒドにより固定したのち、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による断層観察を行い、培養終了時のゲルマトリックス中の細胞の形態や局在の様子を観察した (図 4)。

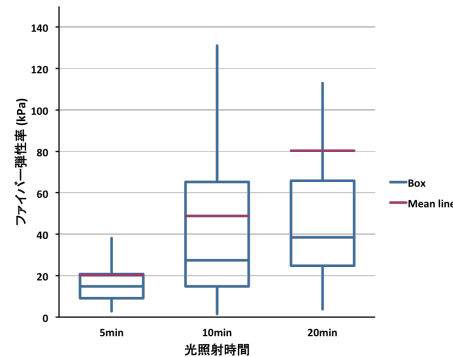


図 3. ファイバー弾性率の光照射時間依存性

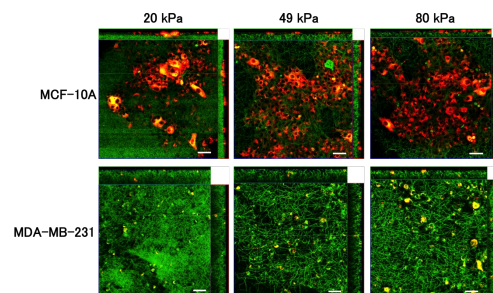


図 4. 培養 7 日目の細胞 (scale bar: 50 μm)

形態観察の結果、MCF-10A は、いずれの弾性率条件においてもゲルマトリックスの表面付近に留まって伸展し、隣接した細胞どうしが接着した状態で存在しており、シート状の増殖が見られた。一方、MDA-MB-231 は、細胞同士の接着が見られず、ゲルマトリックスの表面および内部でそれぞれが離れた状態

で存在していた。

ゲルマトリックス中の細胞の分布は、ゲルマトリックスの深さ方向に対する細胞の赤色蛍光の強度分布として評価した(図 5)。培養 2 日目では、MCF-10A と MDA-MB-231 の分布は類似しており、いずれの条件でも表面付近に存在していた。しかしながら、培養 7 日目になると、がん細胞においてゲルマトリックス内部への分布の広がりが見られ、特にファイバー弾性率 20 kPa のゲルマトリックスで顕著で最大で 40 μm 以上の侵入が見られた。

さらに、ゲルマトリックス内部への細胞侵入をより定量的に評価するため、細胞侵入率を次のように定義した。まず、位相差顕微鏡観察から MCF-10A と MDA-MB-231 の大きさが同じであることを確認し、ImageJ の粒径解析により直径 16.3 μm と定量した。次に、ゲルマトリックス表面から細胞 1 つ分、すなわち 16.3 μm 以上内部を侵入と見做し、蛍光強度分布の全体に占める侵入の割合を細胞侵入率として評価した。MCF-10A と MDA-MB-231 とを比較すると、MDA-MB-231 の方が高い侵入率を示し、培養 7 日目にはその割合はさらに増大した。培養 7 日目には、ファイバー弾性率 20 kPa のゲルマトリックスにおいて、分布の広がりと同様に、他の条件に比べて高い侵入率を示した。以上より、MDA-MB-231 の侵入には最適な弾性率の存在が示唆された。

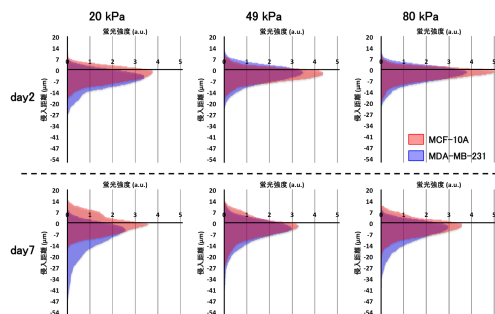


図 5.異なる弾性率のマイクロファイバーゲルマトリックスに対する MCF-10A および MDA-MB-231 細胞の侵入距離

MCF-10A と MDA-MB-231 の差異は、細胞本来の性質を反映した結果であると考えられる。すなわち、上皮細胞の表現型を有する MCF-10A は、E-カドヘリンを介した細胞間接着が強固であるのに対し、間質細胞の表現型を有する MDA-MB-231 では、インテグリンが高発現しており、その基質接着に基づく高い牽引力が発揮されたと考えられる。一方で、MDA-MB-231 の侵入の弾性率応答性は、がんの転移挙動の一端に関わるものと推測できる。がんの転移において、転移先の臓器が、がん細胞の分泌物の遠隔作用の影響を受けて硬化することが近年知られており⁵⁾、本研究で得られた知見は、転移先の臓器・組織において浸潤しやすい力学場条件が存在することを示唆するものである。

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 3 件)

木戸秋 悟、細胞操作メカノバイオマテリアルの設計と幹細胞操作材料への応用、Clinical Calcium、査読無、26 巻、2016、123-128.

木戸秋 悟、メカノバイオマテリアル、医学の歩み、査読無、257 巻、2016、1119-1123.

木戸秋 悟、細胞操作メカノバイオマテリアル、バイオマテリアル、査読無、34 巻、2016、112-119.

〔学会発表〕(計 9 件)

木戸秋 悟、細胞を操るナノ・マイクロファイバーステム、第 67 回医用高分子研究会、2017 年 03 月 06 日、東京理科大学森戸記念館(東京都)

藤澤 貴宏、木戸秋 悟、力学的強度の制御を可能とする光架橋性コラーゲンゲルの開発、第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日、つくば国際会議場(つくば市)

仲村 悠、木戸秋 悟、がん細胞の浸潤能診断のための弾性率可変マイクロファイバージェルマトリックスの設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016 年 11 月 22 日、福岡国際会議場(福岡市)

藤澤 貴宏、木戸秋 悟、力学的強度の制御を可能とする光架橋性コラーゲンゲルの開発、第 65 回高分子討論会、2016 年 09 月 15 日、神奈川大学横浜キャンパス(横浜市)

佐々木 沙織、江端 宏之、大園 拓哉、木戸秋 悟、細胞培養リクルハイドロゲルの開発と設計、第 65 回高分子討論会、2016 年 09 月 14 日、神奈川大学横浜キャンパス(横浜市)

Thasaneeya Kuboki, Takeharu Nagai, Yoshiyuki Arai, Tomoki Matsuda, Satoru Kidoaki. Live imaging of paxillin in durotactic migrating cells on the micro-elastically patterned hydrogels, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会、2016 年 01 月 09 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都)

木戸秋 悟、細胞を操作するマイクロ・ナノメカニクスシステム、化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会、2015 年 11 月 26 日、北九州国際会議場(北九州市)

Satoru Kidoaki. Mechanobio-materials manipulating motility and functions of stem cells, 26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2015 年 11 月 23 日、

名古屋大学豊田講堂（名古屋市）
仲村 悠，木戸秋 悟．弾性率可変マイクロファイバージェルマトリックスにおけるがん細胞の三次元運動表現型評価，第53回日本生物物理学会，2015年09月13日、金沢大学角間キャンパス（金沢市）

6．研究組織

(1)研究代表者

木戸秋 悟（KIDOAKI, Satoru）
九州大学・先導物質化学研究所・教授
研究者番号：10336018