

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20107

研究課題名(和文) 模擬微小重力環境下での革新的細胞挙動観察技術の開発

研究課題名(英文) Development of cell observation system under a simulated microgravity

研究代表者

境 慎司(SAKAI, SHINJI)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：20359938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙空間での生活が人類に与える影響を予測するには、地球上で個々の細胞について模擬微小重力環境下にてその挙動を観察するための技術の開発が不可欠である。このため本研究課題では、そのための要素技術の開発に取り組んだ。具体的には、細胞の生存に影響を与えないような微小な空間に閉じ込め、また模擬微小重力環境発生装置上で細胞の連続撮影を行うシステムの開発を行った。その結果、ガラス基板上に細胞の増殖可能なドーム状の空間を構築するための方法の開発に成功するとともに、さまざまな材料からそのドーム状空間を作製することに成功した。また、顕微鏡レンズを搭載した無線撮影システムの構築にも成功することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、人類の宇宙へのさらなる進出は間違いないところであり、宇宙空間で人類がどのような影響を受けるのかを明らかにしておくことは、社会的な興味・関心も高く、そのような技術の確立に対する社会的な要請も強い。本研究では、そのための要素技術を開発することに成功した。この研究成果は、これまでの技術では極めて困難であった、模擬微小重力環境下での細胞を使ったさまざまな検討に利用可能であると考えられる。このため学術的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Development of technology to observe the behavior of individual cells on the earth under simulated microgravity environment is essential to predict the influence of life in space on humanity. For this reason, in this research project, we worked on the development of elemental technology for that purpose. Specifically, we have developed a system that confines cells in a very small space that does not affect cell survival, and continuously observe cells on a simulated microgravity environment generator. As a result, we succeeded in developing a method for constructing a dome-like space suitable for cellular growth on a glass substrate, and succeeded in making the dome-like space from various materials. We also succeeded in constructing a wireless imaging system equipped with a microscope lens which is suitable for observing the behaviors of the cells in the dome-like space.

研究分野：生物化学工学

キーワード：宇宙空間 細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

宇宙空間での人類の活動がさらに拡大していくためには、重力の生命への影響を理解・解明することは必要不可欠である。一方、そのために最も有効である宇宙空間での実験実施は、軌道上の実験リソース（宇宙飛行士の活動時間、実験装置など）の制限により、大きな制約を受けている。すなわち、そのような制約を受けずに多くの実験が実施可能になれば、当該研究領域の急速な発展がもたらされることは間違いない。ここで、生命の最小構成単位である細胞を使用した研究に着目すると、この制約を克服すべく、重力方向を連続的に変化させることで微少重力環境を再現可能な、三次元重力分散型模擬微小重力装置（3D-クリノスタット）が利用されている。しかし、この装置を用いた三次元的に細胞間相互作用が存在する状態での培養では、現在のところ連続観察は不可能である（二次元平板上での培養のみ連続観察可能）。これは、三次元的細胞間相互作用を実現するために、培養液に浮遊させた状態で細胞を培養すると、培養液の流動により、観察カメラの視野内に細胞を固定できないためである。したがって、既存の模擬微小重力環境下での三次元的培養では、培養終了時の解析から、その影響が調べられている。一方、地球上1Gの研究では、タンパク質発現、細胞挙動のリアルタイム観察とそれにもとづく解析が、生命の理解に重要であることは、広く認識されている。よって、細胞間相互作用が存在する三次元培養場の細胞を3D-クリノスタット内で連続観察できる方法を確立できれば、重力が生体に与える影響に関する多くの知見の獲得に繋がる。しかし、現在、実際の宇宙空間で実験を行う以外にそれを実現する方法は存在しない。このためそれを容易に可能とするようなシステムの開発が求められている。

### 2. 研究の目的

宇宙空間での実験の実施は、軌道上の実験リソースの制限（宇宙飛行士の活動時間、設備など）により十分な量を確保することは困難である。このため本研究では、地球上で再現された模擬微小重力環境下での連続観察を可能とする革新的な三次元的細胞培養観察法を創出することを最終的な目的とした。具体的には、細胞が三次元的に相互作用しながら増殖していく様子を、模擬微小重力環境下でリアルタイムモニタリングできる方法の開発を目指す。この実現は、これまで我々が独自に開発を行ってきた、10個程度の動物細胞を、生存を維持したまま格納し、成長させることが可能な中空空間を有するマイクロカプセルに関する技術と、既存の模擬微小重力環境再現技術を融合させることにより行う。なお、既存の模擬微小重力環境下での連続的観察技術では、平板上で二次元的に相互作用しながら増殖する細胞の挙動しか観察することはできない。このため、本方法の開発に成功すれば、模擬微小重力環境下でのより生体内に近い環境における細胞の動きや、細胞内でのタンパク質発現などの新たな知見獲得が可能となる。さらに、細胞の存在するカプセル中空部分のマトリックスを適宜制御することも可能であり、その効果までも含んだ環境下での細胞の観察をも可能とするものである。

本研究期間には、①マイクロカプセルの膜特性を制御することによって内部の細胞挙動にどのような影響が出るのかを調べること。②マイクロカプセルに関する検討により得られた情報をもとに、より、模擬微小重力環境下での連続観察に適した培養容器を開発すること。③連続的に動いている微少重力再現装置上で連続的に対象物を観察し、データを採取できるシステムを構築すること。を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ①マイクロカプセルの膜特性の制御

細胞を包括するための微小なマイクロカプセルの膜材料が内部に包括される細胞に与える影響について調べるために、アルギン酸およびヒアルロン酸にフェノール性水酸基を導入した誘導体を作製した。次いで、この高分子水溶液に西洋わさび由来ペルオキシダーゼを溶解させた。その後、直径約100  $\mu\text{m}$  のゼラチンゲルビーズに、マウス繊維芽細胞（10T1/2細胞）もしくはヒトガン細胞（HeLa細胞）を包括したものに分散させた後、これまでに開発した方法にて、直径約200  $\mu\text{m}$  の細胞包括ゼラチンゲルビーズを含むアルギン酸、もしくはゼラチンゲルビーズを作製した。このゲルビーズを37°Cの培地に浸すことで、内部のゼラチンを溶解させて、生存した細胞を含む微小なカプセルを作製した。培養期間の経過に伴う細胞の挙動の変化を顕微鏡で観察するとともに、細胞の増殖速度を評価することで、マイクロカプセル膜の特性が細胞に与える影響の評価を行った。

#### ②細胞を連続的に観察するための細胞固定培養容器の開発

当初は微小なマイクロカプセルを新たに開発する固定具で固定して観察することを目指した。しかし、ヒドロゲルの皮膜を壊さずに固定できる固定具の開発は難しく、途中で断念しなければならなかった。そこで、ガラスの基板に次のようにして細胞を包括する半球状の中空ドームを形成させた。まず、ガラス基板上に細胞を分散させたゼラチン溶液にドームの形成に必要な成分を溶解させた溶液を直径1 mmの半球状にスポットし、その後冷却してゲル化させた。次いで、ドームの皮膜を含む水溶液に浸し、ゼラチンゲルから拡散していく反応物質によりゲルを形成させた。この後に、37°Cで培養することで、内部のゼラチンを溶解し、細胞の増殖空間を確保した。このドームの有用性の評価は、大腸菌および浮遊細胞を用いて行った。より具体的には、ゼラチン水溶液に溶解させておく反応成分として塩化カルシウムもしくはグルコース、もしくは西洋わさび由来ペルオキシダーゼを使用した。また、このそれぞれにより、半球

状のゼラチンゲル上に皮膜として形成させる物質として、アルギン酸ナトリウム、もしくはフェノール性水酸基を導入したアルギン酸、ゼラチン、ヒアルロン酸を使用した。

### ③連続観察システムの構築

模擬的に微小重力を発生させるための装置は、常に対象物にかかる重力の方向を変化させるために動いている。このため、連続的かつ安定的に細胞を観察するためには、無線でデータを送信しつつ、対象物を顕微鏡と同等程度の倍率で観察できなければならない。そこで、モバイルカメラに、拡大鏡を取り付け、連続的に回転しているモータに固定した状態で、画像の撮影とそのデータの送信ができるかどうかを確かめた。

## 4. 研究成果

### ①マイクロカプセルの膜特性の制御

細胞を格納するマイクロカプセルの皮膜特性の制御により、細胞の挙動がどのように変化するかを検証するために、皮膜を、フェノール性水酸基を導入したアルギン酸もしくはヒアルロン酸から作製した。図1はその結果である。10T1/2細胞は、アルギン酸誘導体のカプセル内ではほぼ増殖しなかった。これに対して、ヒアルロン酸誘導体のカプセル内では、カプセル内表面、すなわち、ヒアルロン酸誘導体のゲルに接着しながら増殖した。また、ヒトガン細胞であるHeLa細胞は、アルギン酸誘導体のカプセル内では、小さな凝集体を形成しながら増殖し、一方で、ヒアルロン酸の誘導体のカプセル内では、10T1/2細胞と同じく、カプセル内表面に接着して増殖した。これらの結果から、観察の対象とする細胞毎に、カプセルの皮膜組成を制御することで、異なる挙動を観察できることがわかった。これまでに、本検討で用いた方法に適用可能な西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応を使ってゲル化させることのできる材料は10種類以上報告されている。したがって、適当な材料を選択することで、模擬微小重力環境下での細胞と材料の相互作用に関する検討を行うことができることが示された。

この検討と平行して、ポリジメチルシロキサンやアガロースゲルなどの素材から作った固定具で、培養液に浸したカプセルを固定することを試みた。しかし、直径200 $\mu\text{m}$ 程度の球状のカプセルを再現性よく、流動する培養液中で保持する技術を確立することは難しく、継続して検討を行っていく必要があることが明らかとなった。

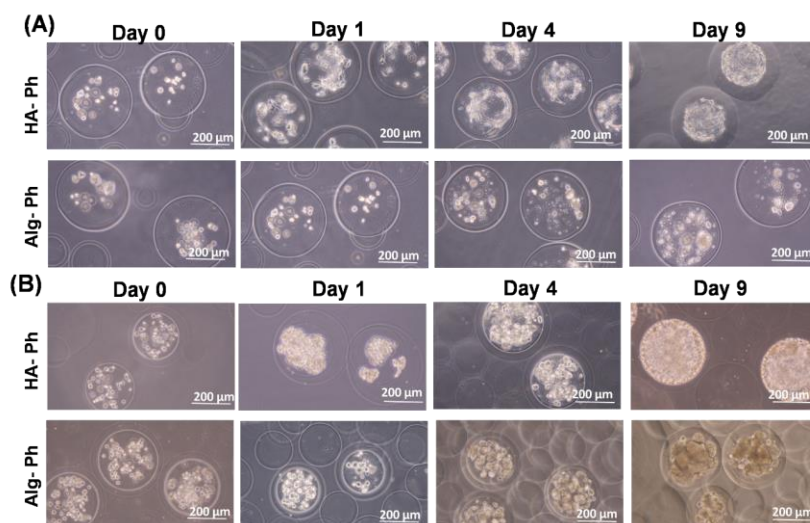


図1. フェノール性水酸基導入アルギン酸(Alg-Ph)もしくは同ヒアルロン酸(HA-Ph)を皮膜とするカプセル内の (A)マウス線維芽細胞(10T1/2細胞)および (B)ヒトガン細胞(HeLa細胞)の挙動。<sup>1)</sup>

### ②細胞を連続的に観察するための細胞固定培養容器の開発

模擬微小重力環境下での連続観察においては、付着依存性の細胞は何かが付着した状態で存在し、非付着依存性の浮遊細胞は浮いた状態で存在することが、微小重力環境が細胞に与える挙動を理解する上では重要と考えた。また、マイクロカプセルの欠点として、それ自体が元来固定されていないことから、固定しなければ、顕微鏡などを使って連続的に観察することができないことが挙げられる。そこで、ガラス基板上に、半球状のドームを作製する方法の開発に取り組んだ。まず、アルギン酸ナトリウムをドームの皮膜として、大腸菌をドーム内に閉じ込めたものを作製した。未修飾のガラス基板を用いた場合には、培養液の中で安定にドームが存在し続けることができないものを作製することができなかった。さらに、アルギン酸と静電的に相互作用するアミノ基の修飾を行ったものを使用したが大きく安定性が向上することはなかった。そこで、新たにガラス基板にアルギン酸と結合を形成する表面修飾を行うことで、培養液の中でもドームが基板から剥離することなく、形状を維持させることができた(図2)。このゲルドームの内部に、浮遊細胞としてヒト白血病細胞(K562細胞)を包括したところ、内部に浮遊状態で増殖させることができた(図3)。さらに、ガラス基板の底面から顕微鏡で観察すると、細胞の状態をはっきりと確認することもできた。以上より、新たに模擬微小重力環境下での細

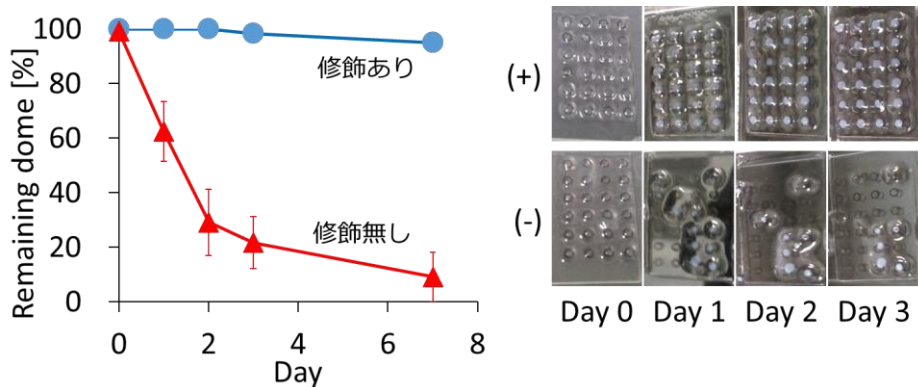


図 2. 培養液中での時間経過に伴うアルギン酸ゲルドームのガラス基板上的に残存パーセントの変化 (左) と写真 (右).

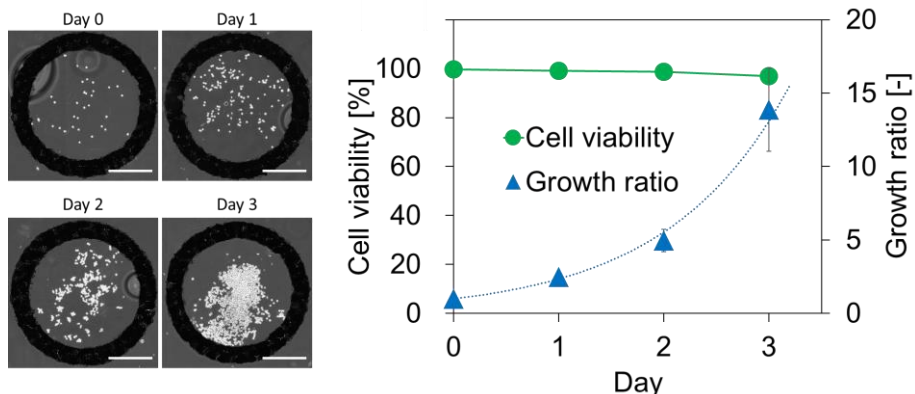


図 3. ドーム内の K562 細胞の増殖の様子を示す写真(左)とグラフ(右). 写真中の Bar: 400  $\mu$ m.

胞の観察に用いることのできる細胞培養容器の開発に成功した。

さらに、上述した方法では負に帯電した多糖であるアルギン酸のドームのみしか作製できないことから、アルギン酸以外の多糖やタンパク質などさまざまな材料から、ゲルドームを作製するために、西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応を使った方法を開発した。細胞とゼラチンおよびグルコースを含む溶液をスポットした後に、西洋わさび由来ペルオキシダーゼとドームの皮膜にしたいフェノール性水酸基を導入した高分子とグルコースオキシダーゼを含む水溶液に浸すことにより、ヒアルロン酸、ゼラチン、キトサンなどの誘導体から細胞を含むドームを作製することに成功した (図 4)。また、その内部で細胞を増殖させることにも成功した。これによって、細胞の特性に応じてさまざまな材料からなるドームを作製可能であり、それにもとづいた細胞の観察を行える方法の開発に成功した。なお、西洋わさびを使用する方法としては、上述した手順とは別に、西洋わさび由来ペルオキシダーゼを細胞とゼラチンの混合溶液に含ませておき、ガラス基板上で固まらせた後に、微量の過酸化水素とドームの皮膜にしたい材料の水溶液に浸すという方法も開発した。この方法においても同様に、さまざまな材料から細胞を含むゲルドームを作製することに成功した。現段階では、いずれの方法が優れているのかは現段階では不明である。今後、より詳細な検討を続けていく。

### ③連続観察システムの構築

当初の予定通り、市販のモバイルカメラに顕微鏡のレンズを取り付けたシステムを作製し、これを用いて細胞培養皿上の細胞を観察することに成功した。さらに、無線によって撮影した画像を送信することもできた。このシステムは、モバイルカメラがバッテリーで駆動することから外部電源との接続が不要である。このため、回転ステージの上に設置して、そのステージを回転させながら画像の撮影、送信も行うことが可能であった。

以上示したように、本研究課題で目的とした模擬微小重力環境を発生させる装置で連続的に細胞挙動を観察するために必要な要素技術の開発に成功することができた。今後は、これを搭載したシステムを作製し、各種細胞をさまざまなゲルドームに包括し、その挙動の観察から宇宙空間での細胞挙動の予測に取り組む。

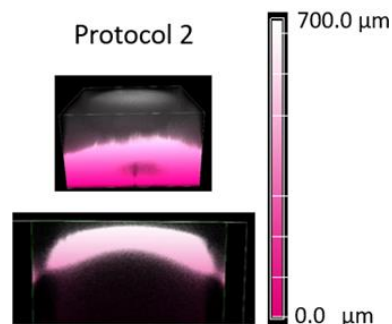


図 4. 作製したゼラチン誘導体ドームの共焦点顕微鏡写真.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1) Mehdi Khanmohammadi, Shinji Sakai, Masahito Taya; Characterization of encapsulated cells within hyaluronic acid and alginate microcapsules produced via horseradish peroxidase-catalyzed crosslinking, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 30, 295-307 (2019).

〔学会発表〕（計 1 件）

藤原 央之, 境 慎司, 戸井田 力, 中畑 雅樹, 田谷 正仁, 藤田 聡史; ヒドロゲルドームを配列した浮遊細胞アレイの開発, 化学工学会第 83 年会 (2018 年).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/sakailabo/home.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし