

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12757

研究課題名（和文）細胞の局所環境の観測・制御技術の開発および細胞走性評価への応用

研究課題名（英文）Development of Observation and Control Technology of Local Environment of Cells for Cytotaxia Evaluation

研究代表者

福島 修一郎（Fukushima, Shuichiro）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号：40362644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞走性に影響を及ぼす力学的な環境要因である細胞外基質の硬さと化学的要因である酸素濃度に着目し、両者の空間分布を制御した状態で細胞をコラーゲンゲルに包埋する3次元培養ができるマイクロ流体デバイスを開発した。また、非線形光学顕微鏡を用いてコラーゲンの微視的な構造を可視化し、時系列の画像から基質の3次元変形場の解析手法を開発した。デバイス内で観測した細胞の遊走動態は、巨視的には一定の勾配をもつ環境要因に応じた単純な指向性を示さなかった。この結果は細胞スケールの局所的な環境要因の不均一さの重要性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞走性に影響する環境要因の空間分布を単純化する培養法を確立して、局所的な環境要因の不均一性の重要性を示した。生体内の環境は複雑で、そのまま細胞応答との関連性を解明することは困難であるため、本研究のように要因を分解・単純化して機構を解明する方法は有効である。細胞走性の機構解明が進めば、再生医療用培養組織の作製法の開発、がん転移の抑制への応用などへの波及効果が期待されるため、力学的/化学的な局所環境からの情報を細胞がどのように受容し、秩序だった応答を実現しているかを明らかにする意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Both mechanical and chemical environmental factors, or stiffness of extracellular matrix and oxygen concentration, affect cytotaxia. To control spatial distribution the factors, we developed the microfluidic device for three-dimensional cell culture, where cells are embedded in collagen gel. Moreover, the microscopic structure of the collagen was visualized by nonlinear optical microscopy. Based on time series of the collagen images, analysis method of three-dimensional displacement of the collagen matrix was developed. Although the environmental factors in the device have macroscopically constant gradient, cell migration did not show the simple directionality corresponded to the environmental factors. These results underline the importance of the nonuniformity of the local environmental factor in cellular scale.

研究分野：生体医工学

キーワード：細胞走性 腫瘍転移 酸素消費 マイクロ流体デバイス 非線形光学顕微鏡 デジタル画像関連法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体機能は細胞の適切な配置によって実現している。発生の過程では、分化した細胞が移動して適切な配置をとることが組織・器官形成において必須である。創傷治癒や血液循環系の恒常性を維持するための血管新生などの組織再構築で細胞の増殖・移動と再配置が重要である。また、適切な配置が破綻する局面としては、がんの転移など病理的な細胞移動がある。このような細胞配置の過程では、方向性のある移動(走性)が重要な役割を果たす。方向性を決定する要因をもとに、環境物質の濃度勾配に依存する chemotaxis (走化性)、周囲の細胞や基質との接触状態に依存する haptotaxis (走触性)、基質の硬さに依存する durotaxis などに分類されて様々な研究がされている。しかし、複雑な生体内の環境下で秩序だった走性を実現する機構の解明には至っていない。

生体内の走性機構の解明が困難な理由として力学的要因を考慮する必要性があげられる。細胞の移動は細胞が発生する牽引力によって実現されているために、細胞外基質との力学的な相互作用が生じている。化学的な環境要因(酸素や増殖因子などの濃度分布)は比較的容易に推定して生体内を模擬した培養モデルに反映させることができるが、力学的要因に関しては、その実態が何かさえ不明で空間分布を定量的に取り扱うのは極めて困難である。走性に関する力学的な環境要因として考えられるのは応力や変位であるが、これらを決定する牽引力の発生に寄与する細胞骨格や接着斑の分布、細胞および基質の材料特性は細胞スケールでは不均一であり、定量化手法は確立されていない。多くの場合は周囲を 3 次元的に囲まれた基質内を移動するため、3 次元培養モデルが必要となる点も機構解明の障害となっている。

細胞走性の機構解明が進めば、再生医療用培養組織の作製法の開発、がん転移の抑制への応用などへの波及効果が期待されるため、力学的/化学的な局所環境からの情報を細胞がどのように受容し、秩序だった応答を実現しているかを明らかにする意義は大きい

2. 研究の目的

細胞の化学的局所環境(培地中の生理活性物質の濃度、酸素濃度)と力学的局所環境(基質の材料特性)を独立に制御可能な 3 次元培養モデルを構築する。また、生細胞を長期追跡できるように顕微鏡測系を改良し、細胞-基質間の力学的相互作用を定量化するための 3 次元変位解析法を確立する。これらを用いて腫瘍細胞の走性評価をおこない、細胞移動の方向性が実現される機構を検討する。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスを用いた局所培養環境の制御

マイクロ流体デバイスは微細加工したシリコン基板の鋳型を用いたソフトリソグラフィによってシリコン樹脂を成形して作製するものである。これまでに開発したデバイスでは、培養チャンバ内に充填された細胞の足場となるコラーゲンゲルを囲む培養液流路とガス流路があり、還流する培養液とガスの組成を変化させることで、化学的環境要因である物質濃度勾配を容易に制御することができる。また、細胞の増殖・移動の継時的な観察が容易である利点もある。

(2) 非線形光学顕微鏡を用いた細胞および基質の可視化

非線形光学顕微鏡は、超短パルスレーザーによって励起される第 2 高調波発生光(SHG 光)と 2 光子励起蛍光を観測して画像化するものであり、培養基質のコラーゲンと蛍光標識した細胞の 3 次元画像を取得できる。SHG 光強度は焦点内のコラーゲンの密度と配向に依存するので SHG 光強度と材料特性に相関があると考えられ、材料特性の非侵襲計測法に応用できる。SHG 画像を取得するために必要な入射光強度が強いために生細胞の経時観察には適していないという問題点を克服するために、ハロゲン/水銀ランプ光源による透過光/蛍光画像取得機構を構築した。

(3) 3 次元変位解析

細胞の牽引力が基質に作用した結果の変位場は走性評価の定量指標として有用である。コラーゲンゲルの SHG 画像の線維構造はデジタル画像相関法による変位解析のマーカーとして利用できる。非線形光学顕微鏡で取得した 3 次元スタック画像に適用した 3 次元変位解析へ拡張した解析プログラムを MATLAB (MathWorks 社)を用いて開発し、ゲル内培養した細胞の移動による 3 次元変位場を解析した。

(4) 傾斜構造培養基質の作製

力学的な局所環境の制御を目的とした基質の硬さが段階的に変化する傾斜構造培養基質の作製法を新たに開発して、3 次元 durotaxis 評価系を確立した。コラーゲンゲルの硬さは、コラーゲンの密度やゲル化時の pH によって変化することが知られており、ゲル化前の密度または pH が

異なるコラーゲン溶液を接触させた状態でゲル化させると、境界部における拡散により密度または pH の勾配が形成されて段階的に線維構造が変化するゲルを調整できる。マイクロ流体デバイスの培養チャンバの形状を最適化して、細胞にとって有意な 1 方向の傾斜構造ゲルを再現性よく作製することに成功した。従来の durotaxis 評価系では合成高分子ゲルを用いる場合が多いために細胞をゲルに包埋する 3 次元培養に適していないが、本研究で開発した培養基質では 3 次元環境の細胞走性を検討できる。

(5) 酸素環境の制御と計測

細胞がおかれている酸素環境は化学的環境要因として走性に影響を及ぼす。特に局所的な低酸素状態は、血管新生、創傷治癒、腫瘍の増大や転移などに関連した細胞走性への影響が大きいので、酸素濃度勾配がある培養環境を実現するマイクロ流体デバイスを開発して、酸素濃度を実測した。

4. 研究成果

(1) 細胞および基質の可視化と変位場解析

本研究ではマイクロ流体デバイス内でコラーゲンゲルに包埋した蛍光標識細胞を観測した。非線形光学顕微鏡を用いると SHG 像と蛍光像の 3 次元スタックを同時に取得でき (図 1 上段)、時系列の画像をもとに変位解析が可能となる。マイクロ流体デバイスの培養チャンバの高さを 100 μm としたので、高さ方向の細胞の移動を抑制した状態でゲル内の細胞遊走を追跡観測できるようになった。試料の高さ (顕微鏡の光軸方向) が薄いことは、低強度の入射光でも高品質の画像を取得できる利点もある。

自作した変位解析プログラムを検証するため、基質の硬さを変化させたときの変位場を解析した (図 1 下段)。基質の硬さはゲルに添加する白金の濃度を変えて調整した (ヤング率 E : 3 kPa, 12 kPa, 28 kPa)。細胞の変形は、薬剤 (Cytochalasin-D, 1 mM) により細胞発生力を開放して誘発させた。ゲルの弾性率が大きいほど変位の最大値は大きくなり、変位分布の最頻値も大きくなった。細胞が一定の力を発生すると仮定すると矛盾する結果であるが、2 次元環境下と 3 次元環境とで異なる挙動[1]を考慮すると妥当な結果といえる。

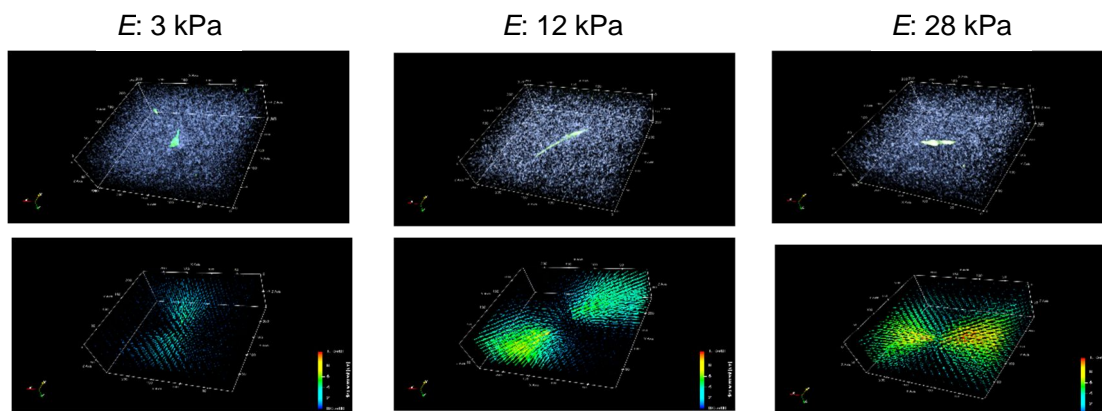


図 1 細胞収縮時の基質の変形場

上段：細胞 (蛍光像) と基質 (SHG 像) の可視化, 下段：変位場

(2) 傾斜構造培養基質における細胞郵送

基質の硬さが段階的に変化する傾斜構造のコラーゲンゲルを調整するためのマイクロ流体デバイスを設計した (図 2)。水酸化ナトリウム溶液の添加量を変えて pH6 と pH8 に調整した同密度のコラーゲン溶液を接触させた状態で 37 $^{\circ}\text{C}$ まで加温してゲル化させた。

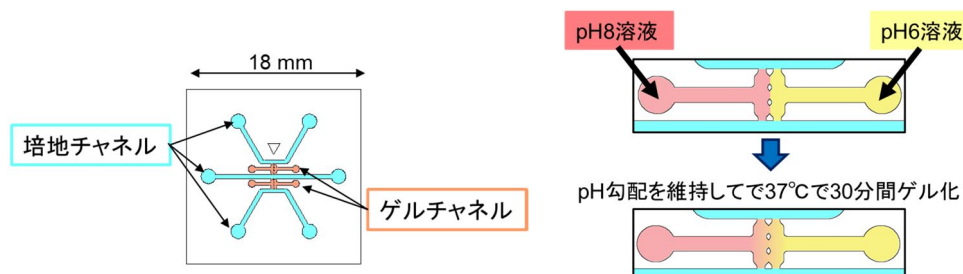


図 2 傾斜構造ゲルの作製方法

pH 勾配を維持してゲル化した基質の SHG 像を取得し (図 3), コラーゲン線維の太さと密度が pH 依存的に変化する傾斜構造を確認した . コラーゲンゲルの材料特性を実測した従来研究 [2] の結果と合わせると , pH 勾配下で作製したゲルの硬さは段階的な分布と推察され , 細胞走性に及ぼす力学的環境要因の解析に応用できると考えられる .

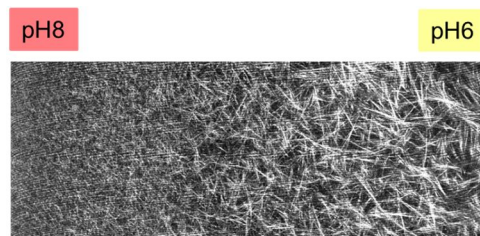


図 3 傾斜構造ゲルの SHG 像

傾斜構造ゲル内に包埋した細胞の遊走を追跡した結果を図 4 に示す . 均一構造のゲルでは遊走の指向性はみられないのに対し , 傾斜構造ゲルでは高 pH 側へ遊走する傾向がみられた . これは基質構造の違いが細胞走性に影響があることを示しており , 本デバイスは 3 次元 durotaxis 評価系として有用である .

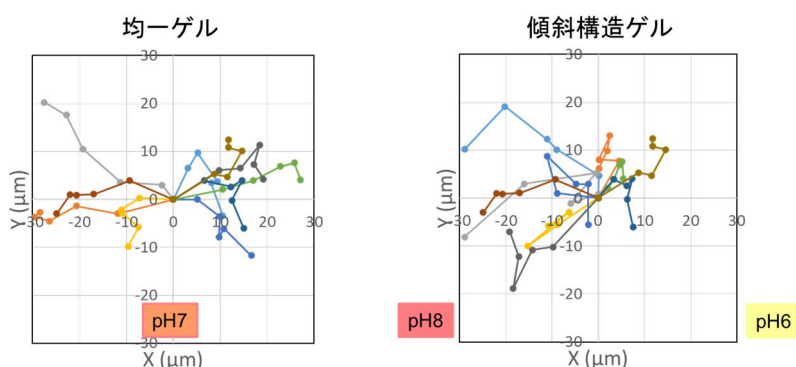


図 4 傾斜構造ゲル内の細胞遊走

(3) 酸素濃度勾配環境下の細胞培養

酸素濃度分布の勾配を実現するために , 2 本の酸素濃度ガスを流す流路 (ガスチャネル) を設

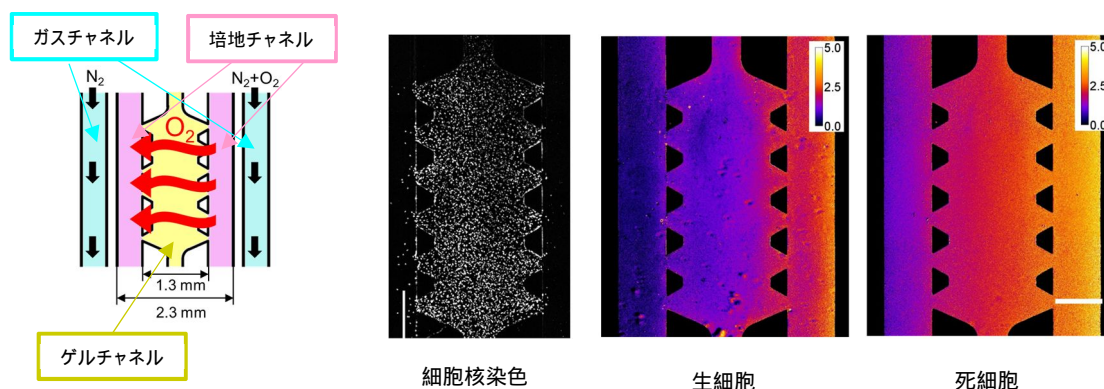


図 5 酸素濃度の測定

けたマイクロ流体デバイスを作製した . 一方の流路に酸素濃度 5% のガスを流し , 他方に酸素濃度 0% (窒素) のガスを流して , 両者の間の細胞培養領域 (ゲルチャネル , 培地チャネル) で 1 方向の酸素濃度勾配を制御した . 燐光の酸素消光性に基づいて酸素濃度は測定した結果を図 5 に示す . 一方向の酸素濃度分布が実現しており , 細胞の酸素消費による濃度勾配の低下も確認できたことから , 本デバイスの有効性が確認できた . さらに , ここで実測した酸素消費量をもとに酸素輸送モデルを構築し , 有限要素法による酸素環境シミュレーションに成功した .

< 引用文献 >

- [1] Abbott A, "Biology's New Dimension" *Nature* **424**, 870–872 (2003)
- [2] Raub CB et al., "Image Correlation Spectroscopy of Multiphoton Images Correlates with Collagen Mechanical Properties" *Biophys J.* **94**, 2361-2373 (2008)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東 晴斗, 福島 修一郎, 松井 翼, 松永 大樹, 出口 真次
2. 発表標題 細胞による細胞外基質の変形の定量評価
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 晴斗, 福島 修一郎, 松井 翼, 松永 大樹, 出口 真次
2. 発表標題 細胞によるコラーゲン基質の変形の定量化
3. 学会等名 日本機械学会 関西支部講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------