

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360402

研究課題名（和文）

システムバイオロジーを基盤とした組織形成機構の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of mechanism for tissue formation technically based on the system biology

研究代表者

紀ノ岡 正博（KINOOKA MASAHIRO）

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40234314

研究成果の概要（和文）：ヒト組織培養中に生じる環境的ヘテロ集団，細胞的ヘテロ集団に対する形成機構の解明を目指し，細胞レベルでの増殖・分化の現象を局所把握，細胞ごとに生じるイベントを生物的パラメータにて整理した．実在培養のデータを基に，細胞間のコミュニケーションを加味したモデル構築を行い，ヘテロ性を考慮し，かつ立体的・時系列的変化に対応したシミュレータにて，仮想培養を実施し，細胞の棲み分けなどの現象解明を行った．

研究成果の概要（英文）：The parameter estimation by considering cell level events which lead to temp-spatial heterogeneity was conducted, and the kinetic model with the parameters was established by considering the cell-cell communication. The kinetic model performed the time and spatial profile of tissue culture, revealed the spatial inhabitation of cell populations in tissue culture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，生物機能・バイオプロセス

キーワード：システムバイオテクノロジー，セルラーオートマトン，シミュレーション，細胞シート，培養軟骨組織

1. 研究開始当初の背景

培養組織において，スカフォード内の立体的な細胞分布は，増殖が培地成分（主に酸素）の供給律速となり，不均一な細胞塊を形成する．さらに，細胞外マトリックス（ECM）も細胞塊形成に連動し，不均一に産生される．よって，細胞塊や ECM に関する生成分布の空間的把握は，たとえば，培養組織の成熟度（自己組織化の度合い）を評価する上で重要な因子となり，細胞分布の変化を考慮した上

で自己組織化の速度論的解析が必要となる．しかし，従来の速度論は，偏微分方程式による決定論的手法であり，細胞塊の立体的形状についての表現することが不可能である．近年では，計算機技術の発達により，Prof. Smallwood らは，計算空間内において，個々の細胞の挙動を表現する手法（セルラーオートマトン手法）を用い，組織構築を解析する技術を構築し（Tissue Eng., 12,2301-2309 (2006))，現在は，2次元から3次元的空间解

析への展開が図られている。しかし、「システムバイオロジーを基盤とした組織形成機構の解明」を目指すうえで、これら一連の培養組織の構築過程において、細胞特性の定量的評価が欠陥しており、有効な指標パラメータが存在していない。

ヒト組織再構築過程は、図1に示すような受動的もしくは能動的集塊形成を伴う機構で大別できる。個々の場合に応じて、刺激導入による活性化、増殖、分化など、培養におけるイベントが複雑に含まれているが、いずれも位置的不均一性（環境的ヘテロ）、細胞不均質性（細胞的ヘテロ）が生じ、細胞間コミュニケーションが存在すると考えられ、遊走を伴った増殖、分化に影響を及ぼす。これまで、ヘテロ条件下におけるヒト組織構築の解明においては、図2に示すように、ミクロ、メソ、マクロレベルの細胞・組織挙動に対し、種々のツール開発を行ってきた。たとえば、図2に示す単細胞評価技術の一貫で、個々の細胞を平面で動的に観察可能な細胞挙動観察ツールを構築し、細胞の運動性評価による軟骨集塊形成機構を解明した。また、集団細胞評価技術の一貫で、集塊形成を効率的に誘導できる培養面を開発し、組織培養と類似した擬空間培養を可能とした（ティッシュアレイツール）。一方、ゲル内における受動的集塊形成を伴う硝子軟骨組織の再構築過程で、共焦点走査型レーザー顕微鏡で取得した細胞分布画像をノイズ除去などの画像処理を自作のプログラムにて実施することで、培養組織内の細胞分布、集塊サイズ、集塊位置的分布を定量的解析できる立体組織片観察ツールを構築した。

さらに、包括的評価技術の基礎的検討では、ゲル内の立体的細胞増殖および集塊形成を表現する速度論モデルを構築し、より詳細な3次元情報の取得および実証を行うことができた。

最近では、細胞間コミュニケーションに関する研究（環境的ヘテロ集団解析）として、立体的組織片観察システムを用い、軟骨細胞の集塊形成機構の解析ならびに集塊内の細胞シグナリングについて研究を行った。ゲル包埋培養において、通常の細胞播種量では正常な集塊を細胞分裂により形成し、ゲル内での増殖は酸素律速から上部に大きな集塊を形成する。しかし、播種量を低下させると、疎な集塊を形成し、遊走性が見られ、その結果、ゲルの中央部に大きな集塊を形成することがわかった。これは、細胞間のコミュニケーションの存在を示唆している。また、こ

のヘテロな環境内での酸素分布測定を目指し、針型極細電極を使用し、深さ1 μm ごとの局所的な酸素を測定できる局所成分濃度解析ツール（極細酸素電極、メカニカルステージ、インキュベータ、解析ソフト）を構築し、ゲル内での酸素濃度分布の存在を確認した。

上述の既存技術ならびに研究動向に基づき、本研究では、ヘテロ性を考慮し、かつ立体的・時系列的变化に対応したシミュレータにて、仮想培養（*in silico culture*）を実施する。このシステムバイオロジーを基盤としたシミュレーション構築を、組織レベル（巨視的レベル、mm, cm オーダー）での集塊増殖、分化、シグナリングの機構解明へ展開し、組織生産における工程管理ならびに品質管理への貢献を目指した。

2. 研究の目的

細胞レベル（微視的レベル、 μm オーダー）での増殖・分化の現象を局所把握かつ細胞ごとに生じるイベント（分裂・遊走・物質生成）を生物学的パラメータにて整理する（微視的現象解析）。さらに空間的・時間的積分することにより、細胞間コミュニケーションを加味した組織レベル（局所的かつ巨視的レベル、mm, cm オーダー）で集塊増殖、分化、シグナリング解析の方法論を構築する。また、実在培養（*in vitro culture*）の微分的解析にて得

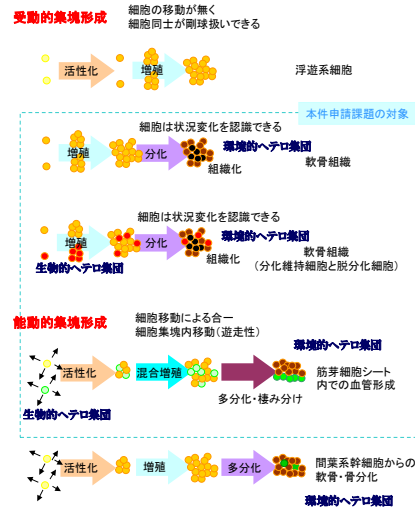


図1 培養中の自己組織化の類別

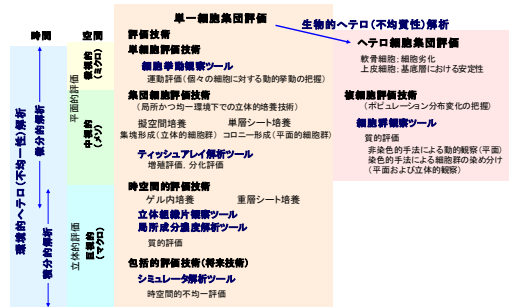


図2 ヘテロ条件下における組織構築の解明

られたデータ群を基に、ヘテロを考慮し、かつ立体的・時系列的变化に対応したシミュレータを構築し、仮想培養(*in silico culture*)を実施することで、積分的解析を目指した「ヘテロな集団内における組織再構築過程の解明」の一端を担う。さらに、細胞的変数として、遊走細胞が混在したヘテロ細胞集団におけるシミュレータを展開することで、細胞的ヘテロ集団が形成する棲み分け機構の解明を行う。将来的には、応用的展開として、移植を前提とした培養組織の生産の観点からスケジュールや組織の成熟度(品質)を定量的に評価するため、「シミュレーションを駆使した“バーチャルプロダクション”を行った上で、実生産を行う“バーチャルファクトリー”を構築する。」ことで、移植用組織生産に対するテーラーメイドプロセスへの展開を図り、培養組織製品の汎用性を導くことが重要であると考えられる。このような、一連の生物学的現象を環境的、細胞的ヘテロな集団と捉え、培養工学的アプローチにて、実在培養における検証と仮想培養としてのシミュレーション結果とを総合的に解析を行う技術、いわゆるシステムバイオロジーを基盤とした研究や方法論の構築については、申請者の知る限りいまだなされておらず、学術的・産業的に重要な課題である。

3. 研究の方法

実際培養系における細胞挙動および組織構築に関する定量的解析と仮想培養系のための培養シミュレータの構築を並行して行う。ここで、図3に示すように、培養シミュレータの構築は、セルラーオートマトン法を用い、液相分布および細胞分布を計算する仮想培養プラットフォームからなり、細胞挙動ならびに培養操作を加味した細胞挙動モジュール培養操作モジュールを組み合わせることにより、種々の組織構築過程を表現できると考える。

本助成期間では、表1に示すような種々の細胞挙動を有するモデル集塊形成組織として、角化細胞からなる培養表皮シート(1. 上皮シート形成機構)、軟骨細胞をコラーゲンに包埋した培養軟骨(2. ゲル内細胞集塊の形成機構)、筋芽細胞シートにおける血管ネッ

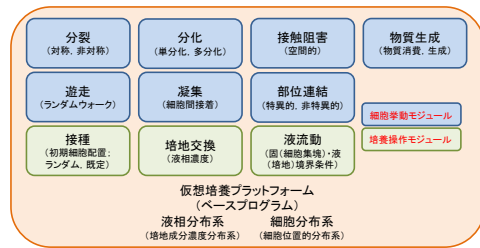


図3 種々のモジュールからなる培養シミュレータネットワーク形成(3.細胞シート内血管形成機構)を対象に検討を行い、システムバイオロジーを基盤とした組織形成シミュレータの構築を実施した。

4. 研究成果

(1) 上皮シート形成機構

角化細胞などの上皮細胞は、積層シートを形成する。その際、分化時には、基底層(最下層)において、非対称分裂(分裂細胞(基底層)と非分裂細胞(基底上層))を引き起こし、積層化を引き起こす。さらに、基底層における増殖可能細胞の頻度は、経時的に減少し、積層シート内での基底層の安定性は、シートの重層能力および、移植後の治癒効果に影響を及ぼす。そこで、分裂、接触阻害を考慮した単層培養時の増殖モデルと併に、分化時の積層過程における基底層安定性を定量的に評価することで、安定性を考慮した上皮シート形成モデルを構築した。

さらに、角化細胞の遊走性も考慮することで、単層時での細胞コロニー形成を経た重層過程まで、一貫した培養経過を表現できるシミュレーションモデルを完成することができた。また、本モデルに対して実際培養系における細胞挙動および組織構築に関する定量的解析を実施し、本モデルの有効性について実証し、表皮シート内の鉛直方向における不均一な細胞分化過程には、基底層の安定化が重要な役割を担うことを導き出した。

(2) ゲル内細胞集塊の形成機構

軟骨組織の培養において、ゲル内での酸素やタンパクなどの培地成分物質移動現象、細胞増殖、細胞外マトリックス生成が時空間的変

表1 種々の組織構築過程における細胞挙動と細胞挙動モジュールの選択

対象培養組織	細胞	集塊形成機構	細胞挙動モジュール
A. 上皮(表皮)シート	角化細胞	受動的; 非対称分裂, 単分化, 接触阻害 積層化, 培地消費	分裂, 分化, 接触阻害, 物質生成
B. 軟骨組織	軟骨細胞	受動的; 対称分裂, 単分化, 接触阻害 培地消費, ECM生成 能動的(低播種密度時); 走化性, 非特異的連結	分裂, 分化, 接触阻害, 物質生成 遊走, 凝集, 部位連結
C. 筋芽細胞シート	筋芽細胞 血管内皮細胞	受動的; 単分化, 細胞流動, 培地消費, ECM生成 能動的(内皮細胞混合時); 遊走, 特異的連結, 棲み分け(血管ネットワーク)	筋芽細胞; 遊走, 分化, 接触阻害, 物質生成 内皮細胞; 遊走, 凝集, 部位連結

化を伴って組織が形成される。ヘテロな環境（濃度分布）は、増殖をヘテロに変化させ、よりヘテロな細胞分布を生じさせると考えられる（受動的集塊形成）。細胞分裂、接触阻害、培地消費を考慮し受動的集塊形成を表現できる3次元増殖モデルを設計し、酸素、タンパクの物質移動を考慮した空間的細胞増殖モデルを構築し、培養組織形成を解析した。特に酸素分布においては、培養軟骨組織内に極細電極を直接挿入するシステムを構築し、実測を試みた。本測定により、培養軟骨のゲル内部では、細胞の増殖とともに、常時酸素供給不足であることを導き出した。また、培養後期においては、ゲル表層において、大きな細胞集塊の形成が見られ、ゲル内部への酸素供給を阻害するだけではなく、酸素以外の高分子物質移動がそれ以上に律速段階であることが示唆された。ゲル内の物質移動を考慮した増殖モデルを構築し、実測値と推定値が良好に一致することが分かった。さらに、シミュレーション結果により、ゲル内の細胞不均一性が生じる原因は、細胞の増殖とともに物質移動の阻害により、培地成分の不均一性を引き起こし、さらにその不均一性は、細胞増殖の不均一性を生み出し、その結果さらに培地濃度の不均一性を上乘せするといった、加速的な現象であることが分かった。

(3) 細胞シート内血管形成機構

5層の筋芽細胞積層シートにおいて、動的観察を行ったところ、細胞シート内において、活発な流動が生じており、細胞シートは動く足場であると考えられた。そこで、シートの流動性について、分子の拡散現象と見立て、定量的解析を行ったところ、シート内の細胞の位置、シート密度、細胞種によりその流動は変化することを見出した。また、積層細胞シート内における細胞流動性を表現できるモデルを構築し、実挙動との比較を行うことを可能とした。

また、5層の筋芽細胞積層シート内に混在する繊維芽細胞や内皮細胞の局在性について、検討を行ったところ、繊維芽細胞はシート上方に、内皮細胞はシート上方または内部に棲み分けることを見出した。さらに、内皮細胞のネットワークはシート内部でのみ生じることが分かった。これらの現象に対して、定量的に細胞挙動解析を行い、得られた情報を基に、計算を行い、システムバイオロジーを基盤とした組織形成シミュレータの構築の完成度を高め、各モジュール化を構築した。結果、実挙動と同様な仮想培養を行うことができ、今後は、細胞シート（板状集塊）だけではなく、球状集塊についての混在する細胞の挙動特徴に基づく棲み分け機構の解明を行ってゆくこととした。

一方、細胞シートのもととなる細胞群の増殖過程についてモデル化を試みた。筋芽細胞と

繊維芽細胞が混在する継代培養における個々の細胞増殖は、筋芽細胞の分化の頻度ならびに個々の倍加時間により、それらのポピュレーション比率が変化することが分かった。今後本モデルにより効率的な培養手法の計画を設計できるものと考えられる。

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4件)

1. M.M. Nadzir, M. Kino-oka, K. Sugawara, M. Taya: "Effect of Preservation Conditions of Collagen Substrate on Its Fibril Formation and Rabbit Chondrocyte Morphology", J. Biosci. Bioeng. in press (2012) (査読あり)

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/13891723>

2. M. Kino-oka, T.X. Ngo, E. Nagamori, Y. Takezawa, Y. Miyake, Y. Sawa, A. Saito, T. Shimizu, T. Okano, M. Taya: "Evaluation of Vertical Cell Fluidity in a Multilayered Sheet of Skeletal Myoblasts", J. Biosci. Bioeng., 113(1), 128-131(2012). (査読あり)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.001

3. M.M. Nadzir, M. Kino-oka, N. Maruyama, Y. Sato, M.-H. Kim, K. Sugawara, M. Taya: "Comprehension of Terminal Differentiation and Dedifferentiation of Chondrocytes during Passage Cultures", J. Biosci. Bioeng., 112(4), 395-401(2011). (査読あり)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.06.005

4. M.-H. Kim, N. Tsubakino, S. Kagita, M. Taya, M. Kino-oka: "Characterization of Spatial Cell Distribution in Multilayer Sheet of Human Keratinocytes through a Stereoscopic Cell Imaging System", J. Biosci. Bioeng., 112(3), 289-291 (2011). (査読あり)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.05.015

[学会発表](計24件)

1. 織田将史ら: 積層筋芽細胞シート内部における異種細胞の棲み分け挙動の解析, 化学工学会第77回年会, 2012年3月15-17日, 東京

2. 大野翔太ら: 異種細胞が混在する集塊における棲み分け挙動の解明, 化学工学会第77回年会, 2012年3月15-17日, 東京

3. 趙瑛梓ら: 細胞密度の異なる積層筋芽細胞シート内における内皮細胞の三次元挙動解析, 化学工学会第77回年会, 2012年3月15-17日, 東京

4. 岸杏子ら: 骨格筋由来筋芽細胞および繊維芽細胞混在継代培養におけるポピュレーション

変化, 化学工学会第 77 回年会, 2012 年 3 月 15-17 日, 東京

5. 紀ノ岡正博: 移植を目指した筋芽細胞シートの新規品質評価法, 第 34 回日本分子生物学会年会(招待講演), 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜

6. M. Kino-oka: Manufacturing of Cell Sheet for Clinical Application, Italy in Japan 2011 Science, Technology and Innovation(招待講演), 2011 年 11 月 11 日, 大阪

7. M. Kino-oka ら: Novel Method for Quality Control of Myoblast Sheet Toward Clinical Transplantation, 2011 AIChE Annual Meeting, 2011 年 10 月 16-21 日, Minneapolis

8. M. Kino-oka: Process and quality controls of myoblast sheet production, International Conference on Biofabrication 2011 in Toyama, 2011 年 10 月 6-8 日, 富山

9. T. X. Ngo ら: 積層筋芽細胞シート内における内皮ネットワーク形成, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 26-28 日, 東京

10. 大澤堯輝ら: 筋芽細胞シート中の血管内皮ネットワーク形成に対する薬剤添加の効果, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 26-28 日, 東京

11. 岩橋淳ら: 積層筋芽細胞シートにおけるサイトカイン生成能の解析, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 26-28 日, 東京

12. 大野翔太ら: 仮想空間における細胞積層シート内の異種細胞の空間的不均一性の表現, 化学工学会第 43 回秋季大会, 2011 年 9 月 14-16 日, 名古屋

13. 紀ノ岡正博: 血管ネットワークを有する積層筋芽細胞シートの利用, 第 27 回日本 DDS 学会(招待講演), 2011 年 6 月 9,10 日, 東京

14. 紀ノ岡正博: 積層細胞シート内の流動, 第 34 回日本バイオロジック学会年会(招待講演), 2011 年 6 月 3,4 日, 大阪

15. 浦栢信吾ら: 遊走性を考慮した筋芽細胞増殖過程の把握, 化学工学会第 76 年会, 2011 年 3 月 23 日, 東京(Web 掲載のみ)

16. 大野翔太ら: シミュレーションによる筋芽細胞シート内における繊維芽細胞の位置的不均一性の表現, 化学工学会第 76 年会, 2011 年 3 月 23 日, 東京(Web 掲載のみ)

17. 趙 瑛梓ら: 異なる細胞密度の筋芽細胞シート内における内皮細胞ネットワーク解析, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月 1,2 日, 東京

18. 織田将史ら: 積層細胞シート内における異

種細胞の流動性評価, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月 1,2 日, 東京

19. 金鍾弼ら: 培養条件による筋芽細胞および繊維芽細胞のポピュレーション変化, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月 1,2 日, 東京

20. 紀ノ岡正博: 細胞シート培養における魅力, 第 10 回日本再生医療学会総会(招待講演), 2011 年 3 月 1,2 日, 東京

21. 浦栢信吾ら: 培養場における質的不均一性を表現可能な細胞挙動モデルの構築と組織生産プロセスへの適用, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010 年 9 月 6 日, 京都

22. 大野翔太ら: 細胞シート内における流動挙動のシミュレーション, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010 年 9 月 6 日, 京都

23. 大田聡二郎, 紀ノ岡正博: ヒト角化細胞の重層化における基底層の安定性を考慮した細胞挙動モデルの構築, 平成 22 年度日本生物工学会大会, 2010 年 10 月 29 日, 宮崎

24. M. Kino-oka: Kinetic Modeling Shows the Heterogeneous Development of Cultured Tissues, TERMIS 2nd World Congress, 2009 年 9 月 1 日, Seoul, Korea

[図書](計 5 件)

1. 長森英二, 紀ノ岡正博: “細胞・組織培養工学の体系化を目指して”, 未来医学, No.26, pp.2-8 (2011)

2. 紀ノ岡正博: “第 8 章 再生医療のための研究に有用な培養装置・実験器具の開発”, ものづくり技術からみる再生医療—細胞研究・創薬・治療—, pp.161-168, シーエムシー出版, 東京 (2011)

3. 紀ノ岡正博: “板状細胞集塊の魅力”, HAB Newsletter, 18(1), 6-9 (2011)

4. 浦栢信吾, 大野翔太, 紀ノ岡正博, 田谷正仁: “移植用組織生産における細胞挙動シミュレーション”, ケミカルエンジニアリング, 55(11), 814-818 (2010)

5. 紀ノ岡正博, 田谷正仁: “4 章・8 培養工程における増殖シミュレータ”, 遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術」(田畑泰彦編), pp. 321-327, メディカルドゥ, 大阪 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紀ノ岡 正博 (Kino-oka Masahiro)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 40234314