

Cell Exercise における力学とバイオの統合
Cell Exercise toward Elastic Cellular Tissue



課題番号：15H05761

金子 真 (KANEKO MAKOTO)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究の概要

細胞に周期圧力を印加しながら培養することでしなやかで強靱な細胞組織を構築する手法を“Cell Exercise”と呼ぶ。任意の加圧印加パターンを実現する加圧培養装置の開発、培養した細胞や細胞シートの力学特性や遺伝子発現の計測や比較、これによる“Cell Exercise”細胞培養に最適な加圧パラメータの同定および、優れた弾性特性が実現するメカニズムの解明を目指す。

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：メカトロニクス、細胞組織力学、Cell Exercise

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者らは細胞に変形負荷を加える細胞ストレス試験という概念を提案してきた。一方、ストレスレベルを下げていくと細胞にとって“ストレス”モードではなく“鍛錬(Exercise)”モードになり、特に筋肉系の細胞では弾性特性に優れた組織構築ができるのではという発想に至った(図1)。予備実験で周期的圧力印加による“Cell Exercise”を行うと、大気圧環境下に比べ格段に強靱な細胞組織が構築できることを発見した。

2. 研究の目的

上記の予備的な結果を踏まえ、本研究ではCell Exercise中に培養機内の細胞同士がどのような力学的性質を見せながら強靱な細胞組織へと成長していくのか、可視化により内在する力学メカニズムを視覚的に捉えるとともに、成長過程の細胞組織の力学特性・遺伝子発現を実測しつつ、Cell Exerciseの最適条件を力学・バイオの両面から総合的に明らかにすることを目的とする。

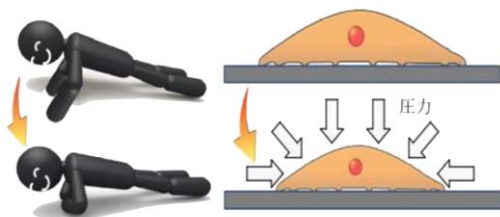


図1. Cell Exercise の概念図

3. 研究の方法

(1)周期加圧印加パターンの可変機能、圧力印加中の細胞の可視化機能、温度・湿度・CO₂濃度の調整機能をもつ多機能インキュベータの開発を行い、これを用いて培養した細胞について(2)周期加圧条件下・大気圧条件下でそれぞれ力学特性の評価を行う。得られた細胞や細胞シートの力学特性を踏まえ、(3)弾性繊維に関わる遺伝子発現をPCRで計測し、Cell Exerciseにおいて強靱な細胞組織が構築されるメカニズムの解明に迫る。また、これらの結果から、しなやかさや破断耐性の観点で弾性特性の向上に最適な加圧パラメータを同定する。

4. これまでの成果

(1) 多機能インキュベータの開発

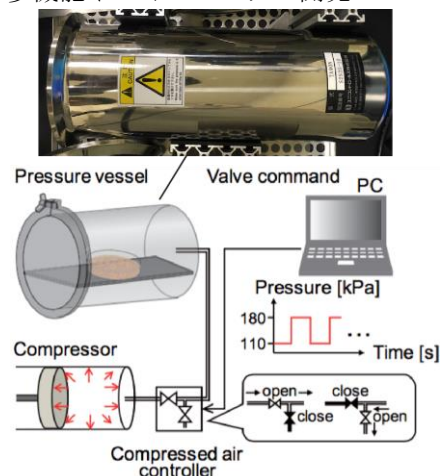


図2. 多機能インキュベータ

図2に示す加圧パラメータ探索用の大容量多機能インキュベータの他、顕微鏡観察用の多機能インキュベータ、pHの変化を抑えより高い圧力印加を目指した液圧方式多機能インキュベータ、周期加圧下・大気圧下の同時観察を可能とするオンチップ多機能インキュベータの各種を開発した。

(2) 細胞組織の力学特性評価

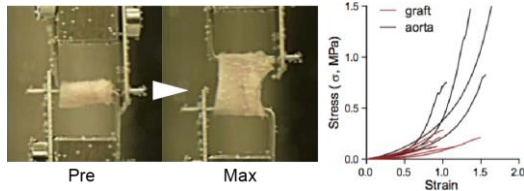


図3. 作製した細胞シートの引っ張り試験

新生児ラットの大動脈平滑筋細胞を用いて Cell Exercise 細胞培養による10層の細胞シートを作製し、これをチューブ状に丸めて図3に示す引っ張り試験を行った。得られた応力-歪曲線からラットの胸部大動脈と同程度の弾性係数を持つことがわかった。また、ヒト臍帯由来の平滑筋細胞で作製した細胞シートの引っ張り試験も行った。

(3) 遺伝子発現計測および評価

周期加圧の振幅と周期の最適条件を、弾性繊維等の遺伝子発現に基づいて評価した。その結果、Fibronectin、Fibrillin-1、Fibrillin-2、Fibulin-4、Lysyl oxidase が加圧培養により多く遺伝子発現していることが明らかになり、最適な加圧パラメータが高圧値180 kPa、低圧値110 kPa、周期500 sであることが見出された。

(4) ラットへの人工細胞シート移植

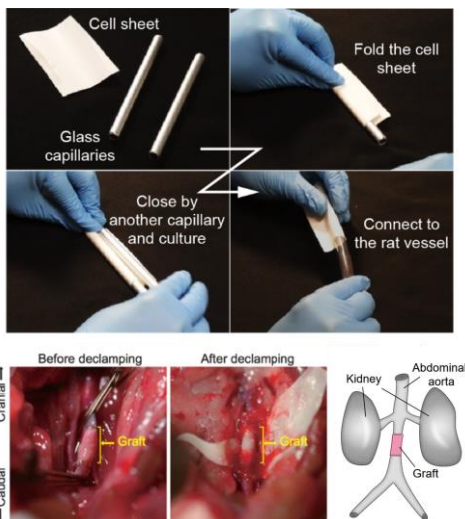


図4. チューブ型動脈グラフトの移植に成功

新生児ラットの大動脈由来の平滑筋を用いた Cell Exercise 細胞培養により、実際のラットの胸部大動脈に匹敵する弾性係数を

持つ10層細胞シートの動脈グラフトを作製し、ラットの体内への移植までを行うことができた。また、移植から2.5ヶ月後の開腹により、移植先のラットの大動脈由来の細胞と十分に接合し、大動脈の血圧にも耐え、動脈として機能していることが確認できた(図4)。

以上の結果は、再生医療応用に向けた Cell Exercise の有用性を強く実証するものである。強度、しなやかさ、in vivo での適合性・成長性を併せ持つグラフトを足場フリーかつ生化学的的刺激フリーで簡便に作製する手法が、今後の再生医療に大きなインパクトを与えることを期待している。

5. 今後の計画

今後はヒト平滑筋細胞シートの弾性特性をより高めることを目指し、多機能インキュベータを改良して最適加圧パラメータの探索領域を広げる。ラットとヒトの in vivo 環境による違いを実験的に確かめるとともに、ビジョンを導入した引っ張り試験でより詳細な強度評価と問題点の洗い出しを行う。また、平滑筋細胞による動脈グラフトだけでなく、心筋細胞、iPS細胞等への Cell Exercise の応用を試みたい。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. U. Yokoyama, Y. Tonooka, R. Koretake, T. Akimoto, Y. Gonda, J. Saito, M. Umemura, T. Fujita, S. Sakuma, F. Arai, M. Kaneko and Y. Ishikawa, Arterial graft with elastic layer structure grown from cells, *Sci. Rep.*, **7**, 140:1-16 (2017).
2. C.-H. D. Tsai, J. Tanaka, M. Kaneko, M. Horade, H. Ito, T. Taniguchi, T. Ohtani, Y. Sakata, An on-chip RBC deformability checker significantly improves velocity-deformation correlation, *Micromachines*, **7**, 176:1-13 (2016).
3. M. Horade, M. Kaneko, C.-H. D. Tsai, H. Ito, N. Higashino, T. Akai, U. Yokoyama, Y. Ishikawa, S. Sakuma and F. Arai, On-Chip Cell Gym, The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017, Las Vegas, USA, 2017.1).
4. 三次元細胞集合体の作製方法, 横山詩子, 石川義弘, 金子真, 佐久間臣耶, 新井史人, 平成26年10月9日公立大学法人横浜市立大学, 大阪大学, 名古屋大学, 特願2014-198224, PCT/JP2015/077477 他多数

ホームページ等

<http://www-hh.mech.eng.osaka-u.ac.jp/~mk/index.html>