

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05761

研究課題名(和文) Cell Exerciseにおける力学とバイオの統合

研究課題名(英文) Cell Exercise toward Elastic Cellular Tissue

研究代表者

金子 真 (KANEKO, MAKOTO)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：70224607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 114,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトは筋トレによって筋肉を増強することができる。これと同じことは細胞レベルでも期待できる。ヒトの臍帯動脈平滑筋細胞をシリンジに入れ、低圧側110-高圧側180kPaかつ周波数0.002Hzの条件で周期的静水圧印加を行ったところ、細胞播種後30分で大気圧培養と比較して、細胞サイズに統計的有意差が見られた。この条件を基に、ラットの血管平滑筋細胞を用いて同様の工程で10層のシートを作製し、ラットに移植したところ、人工血管として機能することが明らかになった。また人工血管の最大破断応力は、ラットの動脈のそれとほぼ同等なレベルになった。平滑筋細胞だけでなく、心筋細胞に対しても興味深い違いが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は主要な死因であり、その中でも心筋梗塞や狭心症といった冠動脈疾患は大部分を占める。心筋梗塞の治療法として冠動脈バイパス手術が施行されているが、特に細い血管において、臨床で利用可能な小口径の人工血管は存在せず、そのため内胸動脈や大腿静脈など自己血管を使用しているのが現状である。近年Tissue Engineering技術により血管の再生を試みる研究が数多くなされているが、現在のところ臨床応用可能な理想的な人工血管は開発されていない。本研究では、ヒト臍帯動脈平滑筋細胞などヒト由来細胞を用いて動脈用血管グラフトを作製することを究極のゴールにしているという点で、社会的意義はきわめて大きい。

研究成果の概要(英文)：By imparting periodic pressure, we can expect cellular tissue with highly elasticity. This is what we call Cell Exercise. We could confirm statistically meaningful difference of cell growth between with and without Cell Exercise under the low pressure of 110 kPa and the high pressures of 180 kPa with the frequency of 0.002Hz even at 30min after cell seeding. By using human umbilical artery smooth muscle cells under Cell Exercise, we confirmed a thin cell sheet with the formation of elastic fiber. By repeating the cycle, we succeeded in obtaining 3D multi-layered cell sheet. We applied the same procedure for the rat artery smooth muscle cells and confirmed that the 10-layered cell sheet can work as an artificial blood vessel through the transplantation surgery. The tensile test of artificial blood vessel showed that the maximum breaking stress is almost same as that of rat. We confirmed the effect of Cell Exercise for cardiac muscle cell as well as smooth muscle cell.

研究分野：メカトロニクス

キーワード：Cell Exercise 細胞シート 平滑筋細胞 周期的静水圧印加 細胞培養 人工血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、狭窄部が内蔵されたマイクロ流路内で細胞の変形能が失われるまで往復運動させる細胞ストレス試験を先行技術として保有していた。一方、細胞ストレスのレベルを下げていくと、やがて細胞にとってエクササイズの状態になり、筋肉系細胞の平滑筋細胞の弾力性があげられるのではないかとこの発想に至った。この技術が横浜市立大学医学部細胞培養グループの目に留まり、共同研究を始めるに至ったのが、本研究開始の背景である。この方法は、化学薬品を使って細胞接着を行うのではなく、細胞同士をくっつける接着剤のような役目を演じるフィブロネクチン線維形成を細胞自身が必要に応じて生成するメカニズムを期待しているため、ヒトに優しい再生医療にも繋がる可能性があることも追い風になっている。

2. 研究の目的

筋芽細胞 30 万個/ml を培養器に入れ、圧力振幅 70kPa、周期 20 秒で 12 時間加圧を行ったところ、大気圧下で通常培養した場合に比べ、細胞組織断面積レベルで最大 2 倍、“弾力性”を作り出す遺伝子発現レベルで最大 2 倍増加することを発見した。このように“Cell Exercise”が細胞組織構築に重要なファクターになることを知った上で、当該研究では、“Cell Exercise”中に培養器内の細胞同士がどのような力学的性質を見せながら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、遺伝子発現の様子を実測しつつ、最終的に“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している。

3. 研究の方法

細胞組織の力学メカニズムの可視化機能、圧力印加パターン可変機能、実時間 CO₂ 濃度調整機能を搭載した多機能インキュベータを 3 台研究開発する。その基本仕様は以下の通りである。Cell Exercise 下と一定大気圧環境下での播種直後の平滑筋細胞の振る舞いが同時に単一顕微鏡で Time Lapse 撮影できる On-Chip インキュベータ、Cell Exercise により 3D 多層細胞シートを製作することができる多層細胞シート用インキュベータ、さらに顕微鏡観察用窓を内蔵した心筋細胞用インキュベータ。

On-Chip インキュベータには、2 組の独立した培養チャンパー付き流路が組み込んであり、同一細胞集団を二グループに分けて一方は Cell Exercise 用チャンパー、もう一方は一定大気圧環境用チャンパーに同時に播種し、その後の細胞単体の成長過程が同時観察できる仕組みになっている。多層細胞シート用インキュベータでは一日目に細胞群を培養皿に播種し、二日目に Cell Exercise を行うというプロセスを 1 サイクルにし、例えば 10 サイクル (20 日間) で 10 層の細胞シートが作製できる仕組みになっている。なお、最適圧力印加パラメータについては、多層細胞シート用インキュベータを用いて、遺伝子発現、力学特性の観点から考察する。さらに心筋細胞用インキュベータでは顕微鏡観察用窓を通じて拍動現象が観察できるようになっている。なお心筋細胞に関しては、数時間の Cell Exercise 後、大阪大学医学系研究科に持ち込み、遺伝子発現の観点から Cell Exercise の有無による違いを調べる。また多層細胞シートの力学特性については、引っ張り試験器を用いて、特に最大破断応力を計測し、ラット動脈管の最大破断応力と比較する。さらに多層細胞シートに十分な弾力性、最大破断応力が確認された時点で、直径 1 mm のガラス棒に多層細胞シートを巻き付けて人工動脈を作成し、その後数日間培養して各層間の自己接着が確認された時点で、ラットに対して動脈移植を行い、成功した場合には、一か月から二か月後に開腹し、人工動脈がどの程度母体とバイオ的な連結ができていないのか確認する。さらにヒトの平滑筋細胞を使った弾力性に富んだ多層細胞シートさらには人工血管の製作に向け、考察及び予備実験を行う。

4. 研究成果

申請時の研究目的に対する成果は成果(1), (2)に整理している。さらに当初目的には組み込まれていない想定外の成果についても成果(3), (4), (5)で言及している。

(1)成果 1 「Cell Exercise 中に培養器内の細胞同士がどのような力学的性質を見せながら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。」: 平滑筋細胞を播種した直後からその成長度合いを On-Chip インキュベータにより観察した結果、Cell Exercise の有無に関係なく、細胞播種して 30 分後には投影面積は、播種直後の投影面積に比べ、2 倍から 5 倍にまで成長することが Time Lapse 撮影でわかった。ただし成長率は Cell Exercise した場合の方が、一定大気圧下で培養するよりも大きく、両者の間に統計的有意差が確認できた。さらに多層細胞シート用インキュベータを使って Cell Exercise しながら 3D 細胞シートを製作したところ、一定大気圧下で培養するよりも弾力性の源になるフィブロネクチン線維形成が促進されることが、免疫細胞化学染色による可視化により確認することができた。
<引用文献> 主な発表論文、

(2)成果 2 「成長過程の細胞組織の力学特性、遺伝子発現の様子を実測しつつ、最終的に 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。」: 多層細胞シート用インキュベータを用いて、Cell Exercise 時に使用する周期静水压印加時の高圧側圧力、低圧側圧

力、周期について多層細胞シート用インキュベータの許容範囲内で全探索を行ったところ、低圧側 110-高圧側 180kPa かつ周波数 0.002Hz (周期 8 分) の条件で、遺伝子発現の観点から最適となった。特に意外だったのが、生体の鼓動周波数や呼吸周波数とはかけ離れた極低周波数だったことである。このレシピアに関しては、現在特許申請中である。この条件下で 10 層細胞シートを作成し、引っ張り試験器を用いて最大破断応力を計測したところ、ラット動脈管の最大破断応力とほぼ同レベルの値となった。

<引用文献> 主な発表論文

(3)成果3「人工動脈のラットへの移植手術に成功」: 直径 1 mm のガラス棒に多層細胞シートを巻き付けて人工動脈を作成し、各層間の接着が確認できたところで、ラットへの動脈移植を試みたところ、無事移植手術は成功した。さらに移植手術後、1.5 ヶ月後に開腹したところ、移植した人工動脈外壁に母体側から無数の毛細血管が伸びてきているのが確認できた。

<引用文献> 主な発表論文

(4)成果4「ヒト臍帯動脈平滑筋細胞」: ヒトの平滑筋細胞を用いて予備実験を行った結果、臍帯動脈平滑筋細胞を使った場合、従来よりも弾力性の高い多層細胞シートを製作することができた。この結果は、将来的にヒトの血管移植を行う際、臍帯動脈平滑筋細胞をつかって多層細胞シートを製作するのが弾力性に富んだ人工血管の近道になることを示唆している。

<引用文献> 主な発表論文

(5)成果5:「心筋細胞への応用」Cell Exercise を心筋細胞に応用したところ、大気圧下での培養では見られない心筋細胞肥大時の分子マーカーである BNP 遺伝子発現が観察された。心臓自身に送る冠動脈の機能が低下すると酸素供給量が減り、ひいては心筋梗塞等の心臓疾患に繋がる。機能低下した部位と対称位置の部位は心臓機能を援助するため、活性化することが知られている。興味深い点は、心筋細胞に対して Cell Exercise を行うと、意外にも心筋梗塞時に活性化する側に観察されるバイオマーカーが確認できたことである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 42 件)

M. Horade, Tsai Chia-Hung Dylan, and Makoto Kaneko, On-Chip Cell Incubator for Simultaneous Observation of Culture with and without Periodic Hydrostatic Pressure, *Micromachines*, 査読有, 10 巻(2), 2019, 133:1-12, DOI: [10.3390/mi10020133](https://doi.org/10.3390/mi10020133)

Lim Jiwon, Choi Andrew, Kim Hyung Woo, Yoon Hyungjun, Park Sang Min, Tsai Chia-Hung Dylan, Kaneko Makoto, Kim Dong Sung, Constrained Adherable Area of Nanotopographic Surfaces Promotes Cell Migration through the Regulation of Focal Adhesion via Focal Adhesion Kinase/Rac1 Activation, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 査読有, 10 巻, 2018, 14331-14341, DOI: 10.1021/acsami.7b18954

Y. Higaki, B. Froehlich, A. Yamamoto, R. Murakami, M. Kaneko, A. Takahara, and M. Tanaka, Ion Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials between Solid Substrates and Cell-Sized Particles Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly(sulfobetaine) Brushes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, 121 巻, 2017, 1396-1404, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b11540

H. Ito, R. Murakami, S. Sakuma, C.-H. D. Tsai, T. Gutsmann, K. Brandenburg, J. M. B. Poeschl, F. Arai, M. Kaneko, and M. Tanaka, Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling, *Scientific Reports*, 査読有, 7 巻, 2017, 43134:1-14, DOI: 10.1038/srep43134

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, *Scientific Reports*, 査読有, 7 巻, 2017, 140:1-16, DOI: 10.1038/s41598-017-00237-1

[学会発表](計 86 件)

M. Kaneko, "Beyond Human Technology" Opens a New Bio/Medical World, IEEE 2019 International Conference on Mechatronics 招待講演 (2019 年), Ilumenau (Germany), <https://iee-icm2019.org/keynote-speakers/>

M. Kaneko, Bio Heritage: Enucleation of Red Blood Cell, IEEE 2018 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science 招待講演 (2018 年), 名古屋

U. Yokoyama, How "Human arterial graft" should be fabricated?, 2018 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems 招待講演 (2018 年), Shenzhen (China)

[図書](計 4 件)

横山詩子、齋藤純一、他、ガイドン生理学 原著第 13、エルゼビア・ジャパン社 (2017)(総ページ数 1100)

横山詩子、南沢享、他、新版 先天性心疾患を理解するための臨床心臓発生学(発行確定)、メジカルビュー社 (2017)(発刊印刷中につき総ページ数未定)

U. Yokoyama, S. Minamisawa, and Y. Ishikawa, 他、Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease、Springer (2016) (総ページ数 383)

新井史人、佐久間臣耶、Chia-Hung Dylan Tsai、金子真、他、組織工学ライブラリ マイクロロボティクスとバイオの融合 1 細胞の特性計測・操作と応用、コロナ社 (2016) (総ページ数 270)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：三次元細胞集合体の作製方法

発明者：横山詩子、石川義弘、金子真、佐久間臣耶、新井史人

権利者：横浜市立大学、大阪大学、名古屋大学

種類：日本国特許出願

番号：2015-033064

出願年：2015

国内外の別：日本国内

この特許申請はその後、整理番号 S2014-1630 で 2017 年に国外 PCT 出願中。

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

市民講座を 2017 年 12 月 10 日 (大阪大学中ノ島キャンパス) 及び 2019 年 3 月 23 日 (横浜市開港記念会館) にてそれぞれ開催。100 人近くの参加があった。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：東森 充

ローマ字氏名：Mitsuru Higashimori

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 30346522

研究分担者氏名：横山 詩子

ローマ字氏名：Utako Yokoyama

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 70404994

研究分担者氏名：高山 俊男

ローマ字氏名：Toshio Takayama

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 80376954

研究分担者氏名：洞出 光洋

ローマ字氏名：Mitsuhiro Horade

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：30583116

研究分担者氏名：蔡 佳宏

ローマ字氏名：Tsai Chia-Hung

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：20647490

研究分担者氏名：田中 陽

ローマ字氏名：Yo Tanaka

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号（8桁）：40532271

研究分担者氏名：田中 信行（2018.9.6-2019.3.31）

ローマ字氏名：Nobuyuki Tanaka

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：研究員

研究者番号（8桁）：00724692

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坂田 泰史

ローマ字氏名：Yasushi Sakata

研究協力者氏名：新井 史人

ローマ字氏名：Fumihito Arai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。