

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01287

研究課題名(和文)非線形光学顕微鏡を用いた細胞培養過程の非侵襲観測

研究課題名(英文) Non-invasion observation of the cell culture process by nonlinear optical microscopy

研究代表者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA, Shuichiro)

大阪大学・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の培養環境を細胞スケールで制御することの重要性をマイクロ流体デバイスを用いて検証した。酸素濃度制御型デバイスにより、従来法では制御が困難な異なる酸素環境の細胞の共培養を実現することができた。また、細胞培養過程の非侵襲観測の方法として、非線形光学顕微鏡の有用性を示した。コラーゲンゲルを培養基質とする場合は、第2高調波発生光を用いた基質構造の可視化および変形解析が力学的環境要因の検討に有効である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は十分に検討されていない細胞スケールの微小領域における培養環境に着目しているのが本研究の特徴である。現状のマクロな制御によって実現した培養環境は、細胞スケールで見るとおそらく不均一であり、これが組織の品質に影響を及ぼしている可能性が高い。微小領域の環境制御が実現できれば、より均質な細胞を高効率で取得することが期待できる。また、微小流体デバイスを応用した小型培養器で集密化が実現すれば、培養工程の自動化への対応も容易になる。

研究成果の概要(英文)：The importance of controlling microscopic culture environment in cellular scale, was verified using microfluidic devices. By using an oxygen concentration controlled device, it was possible to realize the co-culture of the cells in different oxygen environment, which is difficult to control by the conventional methods. Moreover, the usefulness of nonlinear optical microscopy was shown as a method of non-invasion observation of the cell culture process. Visualization and deformation analysis of the substrate structure using second harmonic generation light are effective for the examination of the mechanical environmental factor, when the collagen gel is made to be culture substrate.

研究分野：生体医工学

キーワード：再生医工学 組織工学 第2高調波発生光 コラーゲン マイクロ流体デバイス 血管新生 培養軟骨  
低酸素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の実用化をすすめるためには培養組織の製造技術の開発が不可欠である。臨床段階にある単純な構造の組織から、より複雑な構造の高機能な組織の移植へと展開するうえでは、培養組織の品質管理の重要性は今後ますます高まると考えられる。現状の製造工程・品質管理に関して、細胞の分化・増殖の観測および制御技術は十分とはいえない。特に、培養過程の非侵襲的な経時観測と分化・増殖に影響する細胞スケールの微視的環境制御の必要性は高い。微視的な環境としては増殖因子などの生化学的要因のみではなく、細胞外基質の硬さなどの力学的要因を考慮する必要がある。

### 2. 研究の目的

培養組織の作製工程の効率化および品質向上を実現するために、マイクロ流体デバイスを用いた細胞スケールの微小領域における培養環境の制御技術と、非線形光学顕微鏡を用いた非侵襲的な細胞機能評価法を確立する。細胞スケールの微小培養領域の環境因子として酸素濃度と細胞外基質の力学特性に着目する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体デバイス(図1)はシリコン (PDMS) を材料としてソフトリソグラフィ法で作製した、デバイス中央の培養チャンバ(幅: 1300  $\mu\text{m}$ , 高さ: 200  $\mu\text{m}$ ) に培養液を供給する流路(幅: 500  $\mu\text{m}$ ) と酸素濃度を調整したガスを流すための流路(幅: 500  $\mu\text{m}$ ) を配置し、PDMS 壁内の拡散により培養チャンバの酸素濃度の制御を可能にした。異なる酸素濃度ガスを流した場合には培養チャンバ内に1方向の酸素濃度勾配を実現できる。培養液チャンネルに異なる組成の培養液を流して生化学的な環境要因を制御することも可能であり、異種細胞の共培養にも応用できる。

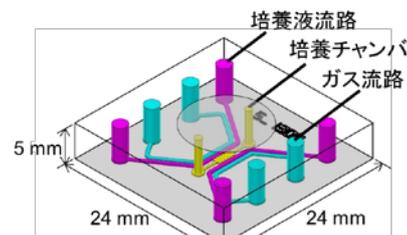


図1 マイクロ流体デバイス

#### (2) コラーゲン基質の可視化と変位解析

3次元培養基質として用いられるコラーゲンを第2高調波発生光 (SHG 光) を用いて非侵襲的に可視化した。超短パルスレーザを光源とする非線形光学顕微鏡を構築し、コラーゲン基質からの SHG 光と蛍光標識した細胞から2光子励起蛍光を同時取得して画像化した。

ゲルの変形解析では、SHG 画像をもとにしたデジタル画像相関法でゲルを構成するコラーゲン線維の変位解析をした。コラーゲンの SHG 光発生効率は特異的に高いので、染色やマーカー添加なしで変位解析に必要な画像を取得することができる。染色剤やマーカーは細胞接着の阻害要因となりえるので、SHG 画像を用いる利点がある。SHG 光を用いてコラーゲンを顕微観測するとコラーゲン線維の構造を可視化できるので、マーカー不要の変位解析が可能となる。

### 4. 研究成果

#### (1) 酸素濃度分布の検証

マイクロ流体デバイスによる酸素濃度の制御の有効性を確認するために、りん光の酸素依存消光性を利用した光学的計測により酸素濃度を実測し、細胞の低酸素応答を検証した。デバイス底面にりん光体微粒子を付着させ、既知酸素濃度のガスで平衡した状態できりん光画像を取得後、りん光強度と酸素濃度の校正をした。

2本のガス流路に異なる酸素濃度のガス(0%, 5%)を流した場合は、培養チャンバ内ではほぼ線形な勾配の酸素濃度分布となり、培養チャンバ内の細胞のなかで低酸素となる一部の細胞のみで低酸素誘導因子(HIF-1 $\alpha$ )が発現することを免疫染色で確認した(図2)。従来の低酸素培養実験では均一な酸素濃度場における細胞応答の解析しかできないのに対し、本デバイスを用いた場合では異なる酸素環境の細胞を共培養できるので、より生体内の環境に近い空間分布をもつ酸素濃度場に対する細胞応答の解析への応用が期待される。

フィブリンゲル内に高密度播種した線維芽細胞をデバイス内で培養して酸素濃度を計測した結果、細胞が死んでいる場合は数値計算結果と一致したが、細胞が生きている場合は低酸素の領域が増加した。この結果は培養中の細胞の酸素消費が無視できないことを示しており、数値計算モデルを細胞の酸素消費を考慮して構築する必要がある。従来の酸素濃度計測法では培養組織内の酸素濃度分布を細胞スケールで実測することは困難だったため、本研究で確

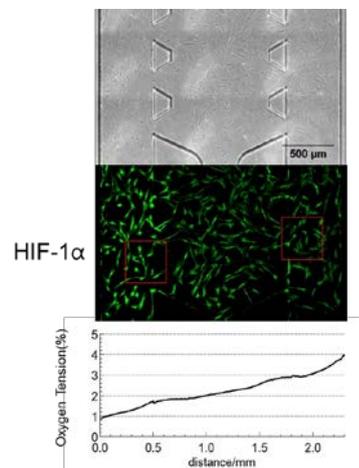


図2 酸素濃度分布と低酸素誘導因子の発現の関係

立した酸素濃度計測法で実際の酸素分布を把握できる意義は大きい。

### (2) 培養組織モデルの構築

観測対象とする培養モデルとして、血管新生および関節軟骨に着目して培養系を構築した。

血管新生モデルでは、低酸素による新生血管の発芽をマイクロ流体デバイス内で再現するために、血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養をおこなった。デバイス中央のチャンネルをフィブリンゲルを充填して血管外組織とみため、ゲルの側面に隣接した2つのチャンネル壁にそれぞれ異なる細胞を播種して初期状態とした。血管内皮細胞を播種したチャンネルでは播種後 2 日目には強固な細胞間接着が完成した血管壁様構造が確認できた。細胞播種チャンネルのさらに外側には規定酸素濃度の混合ガスを灌流するためのガスチャンネルが設置してあり、2つの細胞播種チャンネルを異なる酸素濃度に制御できる。今回は低酸素暴露する線維芽細胞側のガスチャンネルの酸素濃度を 0%に、通常酸素の血流に暴露される内皮細胞側のガスチャンネル酸素濃度を 10%に設定することで、異なる酸素環境おかれた細胞の共培養を実現した。それぞれの細胞の酸素環境を確認するために、酸素不足状態で発現する低酸素誘導因子 HIF- $\alpha$  の免疫染色を行ったところ、線維芽細胞内でのみ HIF- $\alpha$  の発現がみられ、所期の酸素環境における培養状態が実現できていた。

関節軟骨培養モデルでは、再生医療で臨床応用されている自家軟骨培養組織の製造工程に従って、ウサギ膝関節由来軟骨細胞をコラーゲンゲルに包埋した培養軟骨をマイクロ流体デバイスのチャンネル内で作製した。通常播種密度で3週間培養すると、軟骨小腔様の細胞集団が形成され、軟骨基質である2型コラーゲンの産生が確認できた。これらの結果はデバイス内でも従来の培養系と同様に正常な軟骨細胞が維持できてきていることを示している。従来の培養系ではゲル内部の細胞を培養状態で観測することはできないが、デバイスを用いることで時系列観測が容易となるので、培養条件の最適化への貢献が期待できる。

### (3) 傾斜構造細胞外基質の作製

細胞外基質の硬さは方向性のある細胞遊走に影響を及ぼすことが知られている。培養系の細胞外基質の硬さを変化させる従来法では、構成物質の密度や添加する架橋剤の濃度勾配によって硬さが徐々に変化する傾斜構造を実現している。しかし、これらの基質の微視的な組成が異なっているため、細胞が感受している硬さの実態がどのようなものは不明である。そこで、pH 勾配があるマイクロ流体デバイスの流路内でコラーゲンをゲル化することで新たな傾斜構造基質を作製した。SHG 光を用いて作製したコラーゲン基質の構造を観測した結果 (図3)、太く疎な線維から細く密な線維に段階的に変化する傾斜構造が確認できた。この傾斜構造基質内に腫瘍細胞を播種して遊走を観測したところ、細く密な線維構造側への移動が顕著にみられた (図4)。

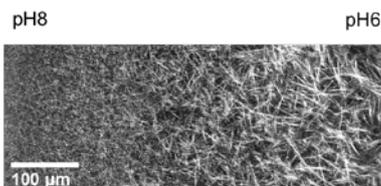


図3 傾斜構造ゲルの SHG 画像

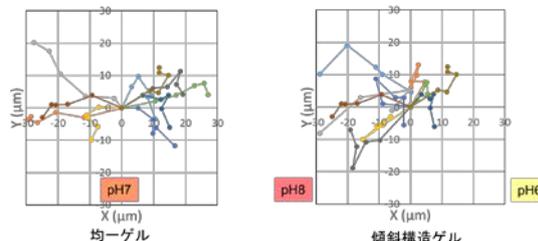


図4 細胞遊走の軌跡

### (4) 傾斜構造細胞外基質の作製

細胞が接着するときには基質を引っ張るために変形が乗じる。この引張力は細胞機能の評価指標となるので、基質の変形をもとに細胞の引張力を定量化する牽引力顕微鏡の開発されてきた。従来方法では変形解析のマーカーとなる蛍光ビーズを分散させた合成高分子製の基質を用いているが、生体内環境の再現という点では十分ではない。そこで本研究では生体内に近い環境を再現できるコラーゲンゲルを用いた基質の変形解析方法の検討をした。線維芽細胞をコラーゲンゲルの表面に播種して接着する過程の2時刻で SHG 画像を取得し、デジタル画像相関法で基質の変形を定量化した結果は基質の局所構造を反映したものと考えられる不均一な分布となっていた (図5)。SHG 光強度はコラーゲン線維の密度・配向に依存しているためにゲルの材料特性の指標となる。局所的な密度と配向度が高い線維ほど SHG 光強度が高くなることから、ゲルの硬さと SHG 光強度には正の相関があると推察される。これは、SHG 画像をもとにした材料

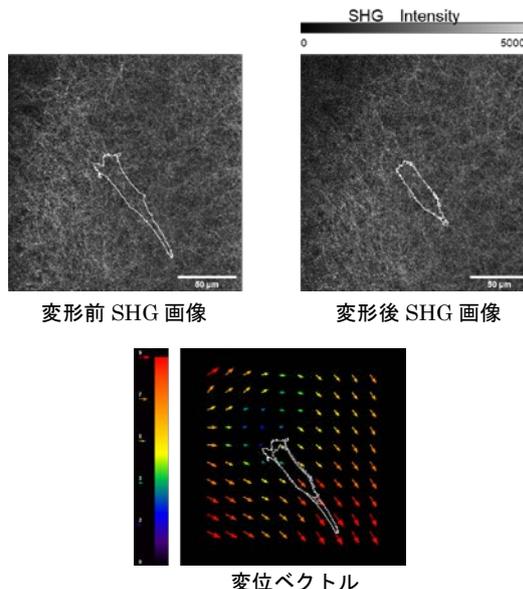


図5 コラーゲン基質の変形解

特性の評価の可能性を示しており、細胞スケールでは不均一なコラーゲンゲルの変形を解析する上で有用である。基質の硬さに依存する走性をもつ細胞をコラーゲンゲル上に播種して遊走の経時観察を行った結果、SHG強度分布と細胞の移動方向には、基質硬さと移動方向と同様の関連があり、SHG光強度による材料特性評価に妥当性が示された。SHG画像をもとにした変位・材料特性解析を用いることで、組織形成・再生過程における細胞動態に関する有用な知見が得られると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Hirose K., Aoki T., Furukawa T., Fukushima S., Niioka H., Deguchi S., Hashimoto M., Coherent anti-Stokes Raman scattering rigid endoscope toward robot-assisted surgery, Biomedical Optics Express, 査読有, Vol. 9, 2018, pp. 387-387.  
DOI: 10.1364/BOE.9.000387
- ② Matsuda Y., Miura J., Shimizu M., Aoki T., Kubo M., Fukushima S., Hashimoto M., Takeshige F., Araki T., Influence of nonenzymatic glycation in dentinal collagen on dental caries, J Dent Res, 査読有, Vol.95, 2016, pp. 1528-1534.  
DOI: 10.1177/0022034516662246

〔学会発表〕(計8件)

- ① 福島修一郎, 傾斜構造のコラーゲン基質を用いた細胞遊走評価, 第41回日本バイオレオロジー学会年会, 2018年.
- ② 畝河内拳, 不均一酸素環境における共培養血管新生モデル, 日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年.
- ③ 高藤駿介, コラーゲンゲルの微視的構造が細胞遊走に与える影響, 日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年.
- ④ 福島修一郎, ラマン顕微鏡を用いた細胞内の脂質動態追跡, 第1回中性脂肪学会学術集会, 2017年.
- ⑤ Hirose K., Visualization of myelinated nerve using coherent anti-Stokes Raman scattering rigid endoscope, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016.
- ⑥ Fujitaka N., Observation of cellular response to oxygen tension using microfluidic devices, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

sml.me.es.osaka-u.ac.jp

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：紀ノ岡 正博

ローマ字氏名：KINO-OKA Masahiro

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：40234314

研究分担者氏名：橋本 守

ローマ字氏名：HASHIMOTO Mamoru

所属研究機関名：北海道大学

部局名：情報科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70237949

※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。