

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06580

研究課題名(和文) 遊走や接着に基づく自己組織化現象の理解と活用

研究課題名(英文) Methods for quantitatively analyzing, understanding and controlling behavior of heterogeneous cells in a tissue

研究代表者

長森 英二 (NAGAMORI, Eiji)

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70394898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では組織内細胞挙動を4次元の解像度にて視て理解し、情報を組織設計に活かす技術の実証を目指した。題材として骨格筋組織構築を選択し、骨格筋筋芽細胞組織内における同種細胞(筋芽細胞)および異種細胞(血管内皮細胞, 繊維芽細胞)の動的挙動を定量的に理解し、最終的に挙動を制御することで複雑組織設計に繋がる方法論として構築することを目指した。共焦点レーザー顕微鏡にてタイムラプス観察が可能な薄い板状集塊として積層筋芽細胞シート用い、これをあらかじめ培養した異種細胞の上に配置することで共培養して挙動を観察することに成功した。今後は血管などの複雑構造を有する骨格筋組織を構築する。

研究成果の概要(英文)：Understanding the phenomena for habitat isolation of a heterogeneous cell population in a three-dimensional constructs will be useful for developing biomimetic and functional engineered tissues. To examine the habitation of co-cultured cells, a five-layered human skeletal muscle myoblast (HSM) sheet, regarded as a plate-shaped aggregate, was overlaid onto target cells, namely human skeletal muscle fibroblasts (HSMFs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), with different initial densities on the bottom surface to investigate the behaviors of target cells in the plate-shaped aggregate. HSMFs rapidly and linearly migrated in the vertical direction after detaching from the bottom surface; cells reached the upper layers. HUVECs show a horizontally elongated shape to maintain their horizontal connections with neighboring cells; this led to slow migration in the vertical direction through the formation of net-shaped aggregates in the middle of the five-layered sheet.

研究分野：生物化学工学

キーワード：複雑組織工学 異種細胞挙動 積層細胞シート 4次元細胞挙動解析 自己組織化 骨格筋筋芽細胞 血管内皮細胞 繊維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

将来、より高度な再生医療や創薬スクリーニングを実現するためには、血管などの複雑な構造を有する組織・臓器をできるだけ簡便な行程にて製造するプロセスが必要である。現在、これらのプロセスの開発は、トップダウン方式とボトムアップ方式の両面で進められている(図1)¹⁾。トップダウン方式は二次元あるいは立体的な足場材を含む三次元的な培養場、細胞集塊培養などにおいて、生体内微小環境や組織発生時の機序・順序を再現した培養条件にて分化や組織構造の形成を促し、成功例を見出す条件探索型の戦略である。トライ&エラーの繰り返しにより至適条件を探索するため開発スピードは速いが、原理探究や体系化がスキップされがちで、たとえば、用いる細胞の株間に存在する性質の差(株間差)により再現性が得られないケースが生じるなど、生産プロセスとしての頑強性に問題を生じる頻度が高いと想像される。ボトムアップ方式は微細加工技術などを細胞操作や生物材料加工に展開し、ビルディングブロックである単一細胞あるいは細胞集塊の初期位置を制御することで複雑組織の形成を目指すものである。三次元印刷技術を応用した細胞印刷技術はその代表格であり、他にも、細胞シート積層化法(平面の積み重ね)などが知られる¹⁾。一方で、生体組織においては複数の細胞種が接着や遊走の特徴や周囲の細胞外マトリクスの存在に応じて自律的に動き、棲み分け、不均一な組織を形成する“自己組織化”によ

て組織形成が行われ、秩序だった機能や構造を発揮・維持している。

筆者らはこれまでに、前述のボトムアップ方式とトップダウン方式の間を取り持つ技術として、“自己組織化現象を細胞の自律的挙動に基づくプロセスとして体系的に理解し、組織設計に活かす技術”が欠かせないと考え、積層細胞シートを三次元培養や解析の雛型として用いる方法論の開発に取り組んできた。生体内における自己組織化現象を理解するためには、まず組織内における細胞の動的挙動を時空間的な解像度で観察することが必須と考えられる。しかしながら *in vivo* では個々の細胞挙動を経時的に観察することは困難であり、*in vitro* においても評価系を構築する事は容易ではない。図2に示すように、たとえば *in vitro* 研究で多用される球状細胞集塊(スフェロイド)は、その形成手段は簡易であるものの集塊に厚み(数百 μm オーダー)があり、二光子励起レーザー走査型顕微鏡などの最先端技術を用いなければ集塊深部の細胞挙動を動的かつ時空間的解像度により観察することは不可能で、また、集塊は培養面に非接着(浮遊状態)であるため定点観察が難しい。一方で、筆者らが培養雛型として用いている積層細胞シート(板状集塊)は、組織の厚みが数十 μm 程度と薄く、集塊は培養底面に接着しているため、集塊内の細胞の動的挙動を継時的にタイムラプス型共焦点レーザー走査型顕微鏡により捕えることが可能である²⁾。

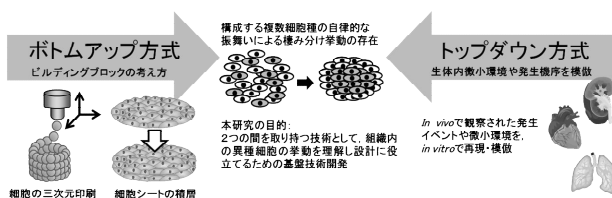


図1. 複雑組織製造に向けた工学的アプローチと本研究の位置付け

	観察	解析
球状細胞集塊 (Cell spheroid)	組織内観察は難 (厚さ~数mm). 定点観測が難.	3-D (X-Y-Z) 解析が複雑
板状細胞集塊 (Cell sheet)	共焦点レーザー顕微観察 が可能(厚さ~50 μm). 定点観測が容易.	2D+1D (X-Y+Z) 解析が容易

図2. 培養雛型としての球状集塊と板状集塊の特徴

2. 研究の目的

本研究では組織内細胞挙動を4次元の解像度にて視て理解し、情報を組織設計に活かす技術の実証を目指した。題材として骨格筋組織構築を選択し、骨格筋芽細胞シート（板状組織）内における同種細胞（筋芽細胞）および異種細胞（血管内皮細胞、繊維芽細胞）の動的挙動を定量的に理解し、最終的に挙動を制御することで複雑組織設計に繋がる方法論として構築することを目指した。

3. 研究の方法

本稿で紹介する研究に用いた培養雛型（共培養系）の概略を図3に示す。ヒト骨格筋芽細胞群（ヒト骨格筋芽細胞（Human skeletal muscle myoblasts, HSMM）を主とし、ヒト骨格筋線維芽細胞（Human skeletal muscle fibroblasts, HSMF）が一定比率で混入している細胞群）からなる培養場としての「細胞シート（充填細胞）」と、挙動を解析する主たる対象であるターゲット細胞（HSMM, HSMF, ヒト臍帯血由来血管内皮細胞（Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC））、培養面、培地、から成る。この培養雛型を再現性高く実現するために、細胞シート積層システム（図4）³が構築された。まずゼラチンスタンプを作製する工程として、シリコン製シートを下に敷いた型枠にゼラチン溶液を滴下し、スタンプを配置、冷蔵によるゼラチン固化後に型抜き台にて離型した。積層細胞シートの形

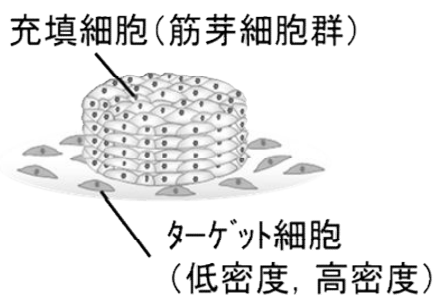


図3. 用いた共培養の雛型

成のために、あらかじめ Cell Tracker Orange で染色した HSMM 群を 24 ウェル温度応答性培養皿（UpCell, セルシード）内に播種し培養し、前述のゼラチンスタンプをウェル上に配置、20 に維持された低温炭酸ガスインキュベーターにて静置することで培養面から剥離した細胞シートをゼラチンスタンプの底面に転写した。このスタンプを引き揚げ次のウェルに移し、この作業を 5 回繰り返すことで、5 層積層細胞シートをスタンプ底面に形成した。最後に直径 35 mm の薄底培養皿上にこのゼラチンスタンプを特製のふたを用いて配置した。ここでは必要に応じて、GFP（Green Fluorescent Protein）を恒常発現する、あるいは Cell Tracker Green 染色されたターゲット細胞を事前に 35 mm 薄底培養皿上に播種・培養してある。この 35 mm 薄底培養皿とスタンプに適量の培地を加え 20 にてさらに放置することで、積層細胞シートを培養面へ十分に接着させた後、37 の炭酸ガスインキュベーターに移動してゼラチンを溶解させ、溶解したゼラチンを含む培地を除去し、改めて新鮮培地を添加することで共培養を開始した。充填細胞およびターゲット細胞の組織内挙動を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて継時的に観

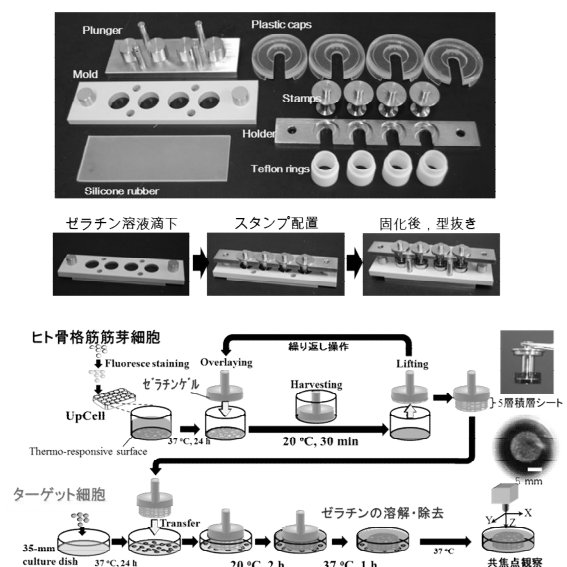


図4. 細胞シートを積層するゼラチンスタンプシステム

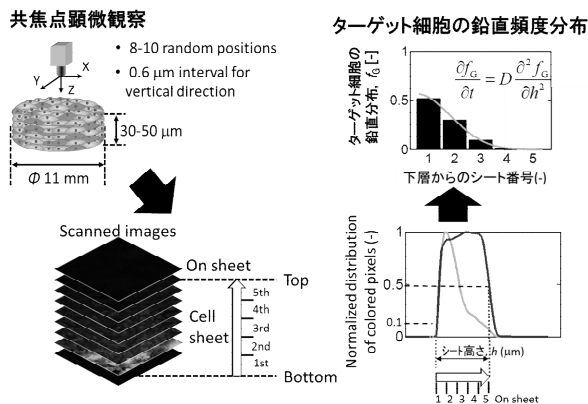


図5. ターゲット細胞のシート内鉛直頻度分布(f_G)の算出

察した。水平方向だけでなく、鉛直方向への遊走挙動を定量的に捉えるため、得られた三次元画像を画像処理し(図5), 5積層細胞シート内におけるターゲット細胞の鉛直方向への存在頻度分布(f_G)を求めた³⁾。

4. 研究成果

まずターゲット細胞を用いず、充填細胞(HSMM 群シート)を観察したところ、この組織は細胞遊走を源とする“流動性”を有していることが明らかになった³⁾。次に、HSMM 群シートの下部に初期配置されたターゲット細胞(HSMM, HSMF, HUVEC)の挙動(遊走, 接着)を理解する事を試みた。ターゲット細胞の播種密度を変化させることで、ターゲット細胞が単独で存在する条件と周囲の細胞と接着を有する存在する条件をそれぞれ準備し、共培養を開始した。結果、ターゲット細胞の種類および初期細胞密度により異なる挙動、空間的な棲み分けが観察された。充填細胞と同種である HSMM をターゲット細胞とした場合は、共培養開始後に HSMM は鉛直上方向に遊走し、共培養 48 時間において、分子拡散現象のアナロジーと見なせる鉛直方向分布を示した(図6A)。播種密度に依らず HSMM は均一に混合することが確認された⁴⁾。

HSMF をターゲット細胞とした場合、共

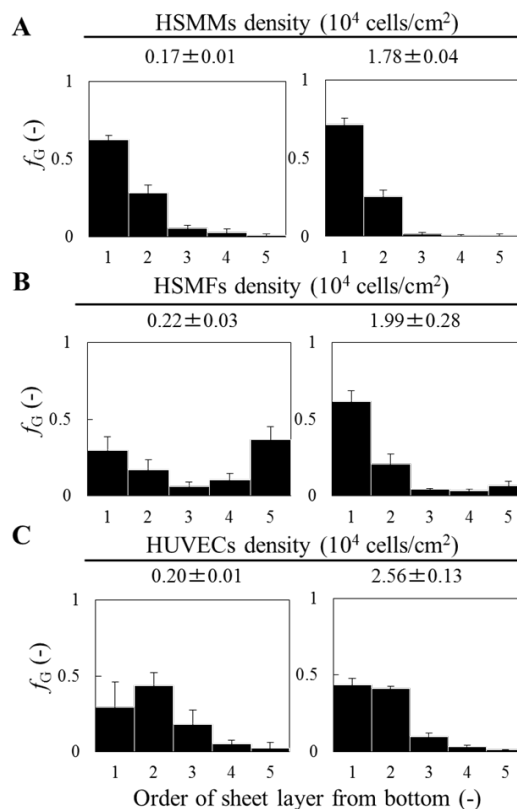


図6. 共培養 48 時間におけるターゲット細胞の鉛直方向頻度分布

培養 48 時間において、それぞれの播種密度において頻度が異なるものの総じてシートの上下部, 下層部に局在が偏り(図6B), 前述の HSMM とは異なる特徴的な頻度分布を示した。シート下層部への局在は HSMF 同士が XY 方向に密に結合した集団形成を伴っていた。一方、シート上部に達した HSMF は周囲の細胞と連結しておら

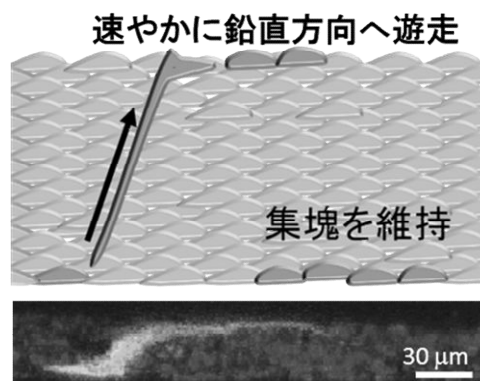


図7. HSMM シート内における混入 HSMF の遊走・棲み分け挙動

ず、培養面から離れると同時に紡錘形の形状を伴いながら Z 方向へ速やかに遊走し、シート上部に達していた(図7)⁴⁾。以上の挙動によって前述の特徴的な鉛直頻度分布は説明された。また、これ以前の検討において、“動く足場”である HSMM 群シートの流動性を見かけの拡散係数 D (図5)を用いて評価したところ、HSMM 群に含まれる繊維芽細胞の比率に応じて流動性が変化することが見出されていた³⁾。具体的には線維芽細胞混入比率 25%では 0%よりもシート全体としての流動性が高くなり、50%では流動性が低下した。この線維芽細胞混入比率が異なるシートで見出された流動性の変調は、前述の共培養実験で明らかにされた HSMM 群シート内における HSMF の単独および集団としての動的挙動により説明することが可能であった。

充填細胞 (HSMM 群) とは異種である HUVEC をターゲット細胞とした場合には、播種密度(周囲の同種細胞との接着の有無)によらず共培養開始直後から細胞形態が伸展し始め、Z 方向へ緩やかに遊走し、共培養 48 時間では集団的に遊走したことを示す鉛直頻度分布が得られた(図6C)⁴⁾。共培養 96 時間では、積層 HSMM シートの上部、中層部にそれぞれ局在し、上部の細胞は島状の細胞集塊を、中層では XY 方向に広がった内皮ネットワーク(網状集塊)の形成を伴った⁵⁾(図8)。ここで、積層中間層に達するまでに周囲の同種細胞と衝突・接着・結合することで網状構造を形成することが出来た HUVEC は Z 方向への物理的な抵抗が生じ中層部に局在したものと考えられた。一方、周囲の細胞と連結出来なかった余剰な HUVEC は単独状態となり、上部に抜け出たものと考えられた。組織内部における HUVEC の衝突頻度や接着力を高めることが、密に張り巡らされた網状集塊を形成するためには重要であり、これは

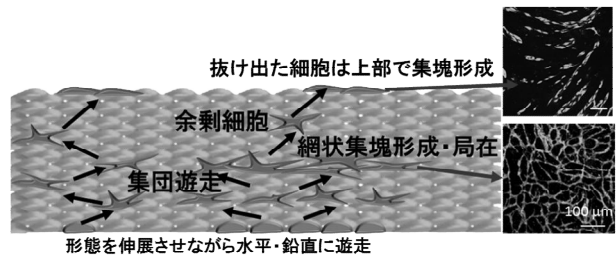


図8 HSMM シート内における混入 HUVEC の遊走、様み分け挙動

初期播種密度や培地成分に依存する。HSMM 群シートの積層数を変え組織厚みを変化させたところ、シート厚みが十分でない場合には HUVEC は素早く上部へ抜け出すことが観察された。つまり組織内で HUVEC 同士が伸展・衝突・接着するまでの時間(遊走距離)を十分に確保することが重要であることが示された⁶⁾。

以上のことから、板状集塊である積層細胞シートを組織培養・解析型として用いることで、HSMM 群組織内部における HSMM, HSMF, HUVEC の挙動を、定量性を伴って明らかにすることができた。血管内皮細胞を筋芽細胞組織内に封じ込めるための技術として薬剤(血管内皮細胞の遊走や接着性を高めるサイトカインなど)の添加や、物理的に内皮細胞の漏れだしを抑える検討を行っており、これについては引き続き行う科研費基盤 C (18K04856)にて取り組み、報告する。組織内異種細胞の挙動を理解し制御する方法論の実証を通じて、複雑な構造を有する機能的骨格筋-神経系組織の構築を目指していきたい。

参考文献

- 1) 尾上弘晃ら: 日本生物工学会誌, 4, 161-165 (2014).
- 2) Ngo, T. X. et al.: Int. J. Tissue Regen., 5, 37-45, (2014).
- 3) Kino-oka, M. et al.: J. Biosci. Bioeng., 113, 128-131 (2012).
- 4) Nagamori, E. et al.: Curr. Nanosci., 10, 173-178 (2014).
- 5) Nagamori, E. et al.: Biomaterials, 34, 662-668 (2013).
- 6) Ngo, T. X. et al.: Biotechnol. Lett., 35, 1001-1008 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Li Menglu, Nagamori Eiji, Kino-oka Masahiro* Disruption of myoblast alignment by highly motile rhabdomyosarcoma cell in tissue structure. Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, 2, 259-264 (2017) 査読有

Ngo, T.X., Nagamori, E., Shimizu, T., Okano, T., Taya, M., Kino-oka, M.* In vitro models for angiogenesis research: a review, International Journal of Tissue Regeneration, 5, 2, 37-45 (2014) 査読有

Nagamori, E., Oda, M., Nakamura, T., Shimizu, T., Okano, T., Kino-oka, M.* Spatial habitation of heterologous cells in a multi-layered myoblast sheet due to the differences in their behaviors of migration and cell-cell connection, Current Nanoscience, 10, 173-178 (2014) 査読有

Ngo, T.X., Nagamori, E., Kikuchi, T., Shimizu, T., Okano, T., Taya, M., Kino-oka, M.* Endothelial cell behavior inside myoblast sheets with different thickness, Biotechnology Letters, 35, 1001-1008. (2013) 査読有

Nagamori, E., Ngo, T. X., Takezawa, Y., Sawa, Y., Saito, A., Shimizu, T., Okano, T., Taya, M., Kino-oka, M.* Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet, Biomaterials, 34, 662-668. (2013) 査読有

Kino-oka, M.*, Ngo, T. X., Nagamori, E., Takezawa, Y., Miyake, Y., Sawa, Y., Saito, A., Shimizu, T., Okano, T., Taya, M. Evaluation of vertical cell fluidity in a multilayered sheet of skeletal myoblasts, Journal of Bioscience and Bioengineering, 113, 128-131. (2012) 査読有

〔学会発表〕(計19件)

長森英二, 積層細胞シートを培養・解析雛型とした組織内混入異種細胞の挙動理解と制御, 化学工学会第48回秋季大会 徳島 2016年9月

(招待講演) 長森英二, 積層細胞シートを培養・解析雛型とした組織内混入異種細胞の挙動理解と制御, 第55回日本生体医工学会大会 富山 2016年4月

中村 匡, 長森英二, 紀ノ岡 正博, 積層筋芽細胞シートへの間葉系幹細胞混入条件が内皮細胞網状集塊維持に与える影響, 第15回日本再生医療学会総会 大阪 2016年3月

長森英二, 積層細胞シートを培養・解析雛型とした組織内混入異種細胞の挙動の理解と活用, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、合同大会) 神戸 2015年12月

長森 英二, Das Puspa, 紀ノ岡 正博, 均一な血管内皮細胞ネットワークを有する積層筋芽細胞シートの構築, 第67回日本生物工学会大会 鹿児島 2015年10月

長森英二, 岩田利彦, 紀ノ岡正博, 移植用筋芽細胞群シート形成時に存在する変数がサイトカイン生成能に与える影響, 化学工学会第80回年会 東京 2015年3月

李 夢露, 長森英二, 紀ノ岡正博 紋筋肉腫由来 RD 細胞の筋芽細胞シートへの混入が内皮細胞ネットワーク形成に与える影響, 化学工学会第80回年会 東京 2015年3月

中村 匡, 長森英二, 紀ノ岡正博, 積層筋芽細胞シート内の間葉系幹細胞が血管内皮細胞挙動に与える影響, 化学工学会第46回秋季大会 福岡 2014年9月

長森英二, 岩田利彦, 紀ノ岡正博, ヒト骨格筋筋芽細胞群における異種細胞間接触がサイトカイン生成能に与える影響, 第66回日本生物工学会大会 札幌 2014年9月

他, 省略

〔図書〕(計3件)

長森英二

(解説) 三次元組織内における動的な細胞挙動を観察・理解し複雑組織設計に活かす

日本生物工学会誌 94(9), 23-26 (2016)

長森英二

(著書) 編 再生組織・臓器の製造技術の開発 1章再生組織・臓器の製造技術の開発(プリンター・装置の開発)“組織内細胞挙動を理解し複雑組織設計に活かすための培養・解析雛型としての積層細胞シート” 230ページ(p.135-140)

バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線, CMCリサーチ, 2016年 紀ノ岡正博, 長森英二

(著書) 細胞シート内での血管内皮ネットワーク形成

幹細胞医療の実用化技術と産業展望 293ページ(p143-148) シーエムシー出版, 2013年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~nagamori/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長森英二 (NAGAMORI, Eiji)

大阪工業大学・工学部・生命工学科・准教授
研究者番号: 70394898