

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04856

研究課題名(和文)細胞遊走や接着に基づく自己組織化現象の理解と制御

研究課題名(英文) Understanding and regulation of heterogeneous cell behavior inside a 3D cell aggregate

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：複数種の細胞が混合された複合組織における自己組織化現象を理解し、制御するための工学的学問体系の構築は、より高度な再生医療の実現に欠かせない。前課題に引き続き、積層細胞シートの底部に配置された異種細胞の挙動を明らかにすることで、最終的にそれらの挙動を操り、目的の構造を作り上げる技術体系の構築を指向した。実施計画に則り、積層筋芽細胞シートを神経細胞の上部に配置し、筋分化が進行する筋芽細胞組織内における神経細胞の挙動を明らかにすることを試みたが、これら異種細胞を良好に共培養できる条件は見いだせなかった。「複雑組織を作り上げる技術」の前に、「組織を適切に育む培養技術」を開発することが先決である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数種の細胞が混合された複合組織における自己組織化現象を理解し、制御するための工学的学問体系の構築は、より高度な再生医療の実現に欠かせない。積層筋芽細胞シートを神経細胞の上部に配置し、筋分化が進行する筋芽細胞組織内における神経細胞の挙動を明らかにすることを試みたが、これら異種細胞を良好に共培養できる条件は見いだせなかった。三次元培養により所望の構造を有する組織・臓器を作り上げるうえで、異種細胞を共培養する培地・条件を如何に速やかに設定するかは大きな課題である。「複雑組織を作り上げる技術」の前に、「組織を適切に育む培養技術」を開発することが先決である。

研究成果の概要(英文)：Understanding the phenomena for habitat isolation of a heterogeneous cell population in the three-dimensional constructs will be useful for developing biomimetic and functional engineered tissues. To examine the habitation of co-cultured cells, a multi-layered murine skeletal muscle myoblast sheet, regarded as a plate-shaped aggregate, was overlaid onto target cells (murine neuroblastoma cells) on the bottom surface to investigate the behaviors of target cells in the plate-shaped aggregate.

研究分野：生物化学工学

キーワード：遊走 接着 自己組織化 組織工学 共培養 骨格筋筋芽細胞 神経細胞

1 . 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生医療が実現しつつある。現在は分化誘導した単一細胞種を使用した治療が検討されているが、将来、より高度な再生医療や創薬スクリーニングの実現には、複雑構造を有する三次元組織を製造するプロセスの開発(図1)は欠かせない。図1の1) 万能細胞である幹細胞を大量に培養するプロセスについては、従来からの接着培養(平面培養)に加え、大量調製を可能にする集塊浮遊培養(立体的培養)について工学的な検討が進められている。2) 目的細胞への分化誘導、選抜については、未だその機序が十分に明らかではなく、バイオサイエンスや医学の領域で理解と制御に向けた知識の蓄積がなされている段階である。3) 血管や神経など複雑な構造を有する組織・臓器を製造するには、バイオ3Dプリンター技術などが有望でありバイオマテリアル分野の研究者を中心に精力的な検討が進められている。目的細胞を所望の位置に配置し立体的な構造物を作る技術の実現が期待される。4) 適切に育む技術(三次元組織培養技術)については組織内外の環境を適切に保ち必要な物質を不足なく届けるための技術が必要であるが、供給律速に陥る代表例である酸素の運搬方法をとっても、開発技術は不十分と考えられる。5) 出来上がった複雑組織が生体内と同様な機能を発揮するか、適切に評価する方法が必要である。保存、輸送法などについても単一細胞を使用する場合よりも難易になると考えられる。報告者はこれまで、骨格筋組織を題材として、図1の1), 4), 5) に対応する技術として参考文献の1)~3)などの報告を行ってきた。

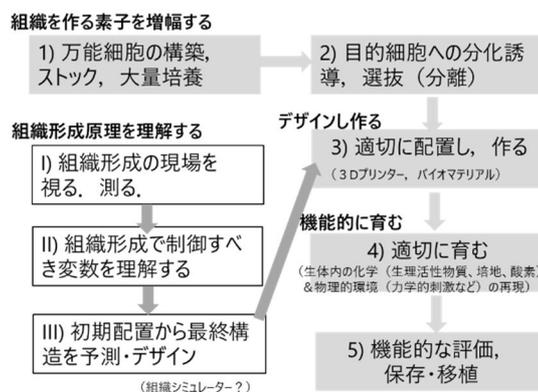


図1 複雑組織を用いた再生医療の実現に必要なもの(全体像)

前科研費(15K06580)も引き続き、本課題(18K04856)で対象としたのは、3)を実現するために必要な要素(図1のI,II)についてである。現在、組織形成プロセスの開発はボトムアップ的な方法とトップダウン的な方法の両面で開発が進められている(図2)。前者は、高度な微細加工技術等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細胞の初期位置を制御することで複雑な組織形成を目指す。細胞プリンティング法、細胞シート積層化法、磁性化細胞集積法などが用いられるが、細胞が生き物であるが故の制約条件(温和条件の維持など)が多く、また細胞は自律的な遊走・棲み分け等により経時的に位置を変えるため、手法に限界が生じる。後者は、生体内環境や発生機序を培養場や細胞集塊形成に於いて模倣することで細胞の自律的な挙動(自己組織化)を促し、成功例を見出す条件探索型のストラテジーを取る。成果を得るまでは早いものの、体系化された理論が欠如しがちで、種や患者間差のある細胞への汎用性の面でしばしば問題が顕在化する。これらボトムアップ法とトップダウン法の技術的乖離を埋め、ロバストな組織製造プロセスとして統合する事は重要であるが、まず先行して、複数種の細胞が混合された複合組織における自己組織化現象を理解し、制御するための工学的学問体系の構築が欠かせないと考えた。

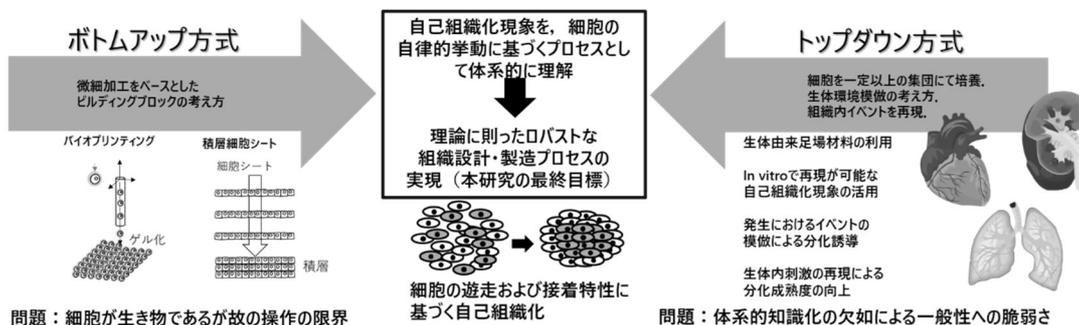


図2 複雑な組織を製造するプロセスの実現に向けた現在のアプローチと欠如している考え方



#### 4. 研究成果

まずターゲット細胞として新たに用いる neuro2a 細胞を増殖培養し、レチノイン酸含有培地で分化培養した。神経突起(軸索)が伸展し、神経様細胞に分化することを確認した(図5)。この状態のターゲット細胞の上部に積層筋芽細胞シートを配置し、挙動を観察することを試みた。しかしながら、積層細胞シートは培養開始後から翌日までの間に培養面から剥がれてしまい当初に計画した共培養が困難であった。培養面への細胞外マトリクスなどコーティング剤の検討を行っても改善できなかった。神経系細胞のターゲット細胞として neuro2a 細胞を選択した理由として、筋芽細胞の増殖、分化培養と培地成分が近い点があったが、筋芽細胞の分化誘導には接着力が不足し積層細胞シートのはく離が生じたと考えられた。実際に、平面培養において筋芽細胞を神経分化培養培地にて培養した結果、筋芽細胞は時間経過とともに培養面から剥がれ、培養7日目には筋分化培地よりも接着している細胞数が非常に少なくなった(図6)。神経分化培地のレチノイン酸を1/10濃度の1μMにしても、結果は同様であり、レチノイン酸が筋芽細胞の接着を著しく弱める作用があると推定された。

筋芽細胞シートの培養面への接着を強固にする方法としてFBSの濃度を上げることが考えられた。1%から6%までFBS濃度を振り、積層細胞シートの形態維持の可否を観察した。結果、筋芽細胞シートの形状を維持するためには3%以上のFBS濃度が好ましいことが判明した(表)。平面培養ではFBS濃度を1%程度とすることで最も筋管の形成が観察されるため、組織培養においてFBS濃度が筋分化に与える影響を調べた。筋分化率はDAPIで核を、アクチニン抗体と蛍光二次抗体にて筋管細胞を染色し、Image Jにて分化率(%)=(筋管中に含まれる核の面積)/(画像中のすべての核の面積)×100で求めた。図7のように組織状態では比較的高いFBS濃度でも低濃度と同様な分化率が得られることが明らかになった。ちなみに、申請者が以前から筋管細胞の活性張力の測定に用いている短冊型コラーゲンフィルム-筋管細胞複合体が発する張力はFBS濃度の上昇と共に大きくなり、FBS濃度の上昇と共にフィルム上に積層する筋管細胞のはく離が抑制されていることが観察された(図8)。

以上のように、積層筋芽細胞シートを形状維持した状態で分化培養し、高い収縮能を発する状態に筋管形成・培養するには、平面培養の分化培地よりも高いFBS濃度が必要であることが判明したが、このような高いFBS濃度では、レチノイン酸を添加してもneuro2a細胞が神経突起を伸展した形状には分化誘導できなかった。

積層筋芽細胞シートを神経細胞の上部に配置し、筋分化が進行する筋芽細胞組織内における神経細胞の挙動を明らかにすることを試みたが、これらの異種細胞を良好に共培養できる培地を見出す事ができなかった。三次元培養により所望の構造を有する組織・臓器を作り上げるうえで、異種細胞を共培養する培

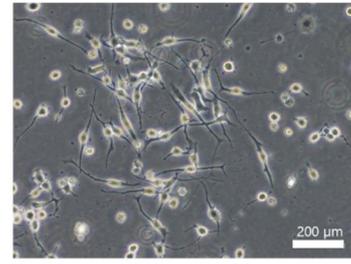


図5 神経分化培地によるneuro2aの分化 (day6)

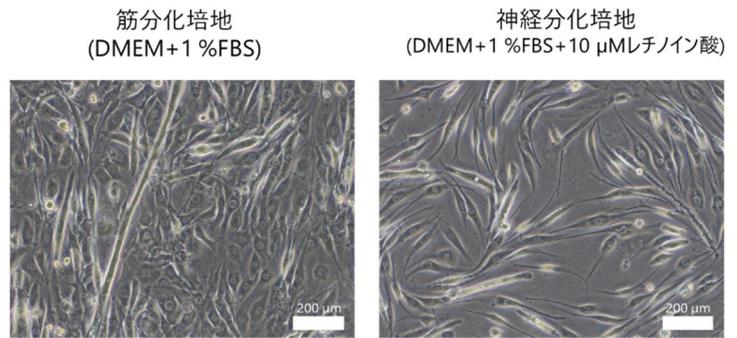


図6 神経分化培地のC2C12の分化への影響(day7)

表 C2C12積層細胞シートの形状維持にFBS濃度が与える影響

FBS濃度	サンプル数		はく離・破損数
	1	2	
1%	3	3	3
2%	3	2	2
3%	3	0	0
4%	3	0	0
5%	3	0	0
6%	3	0	0

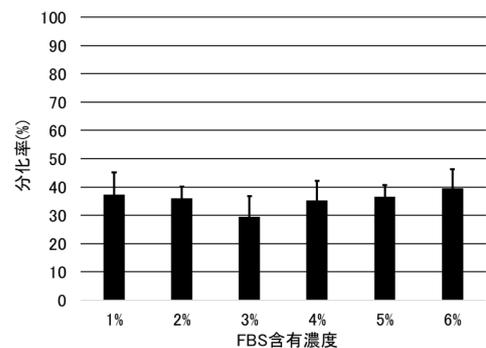


図7 FBS濃度が組織状の筋芽細胞分化に与える影響

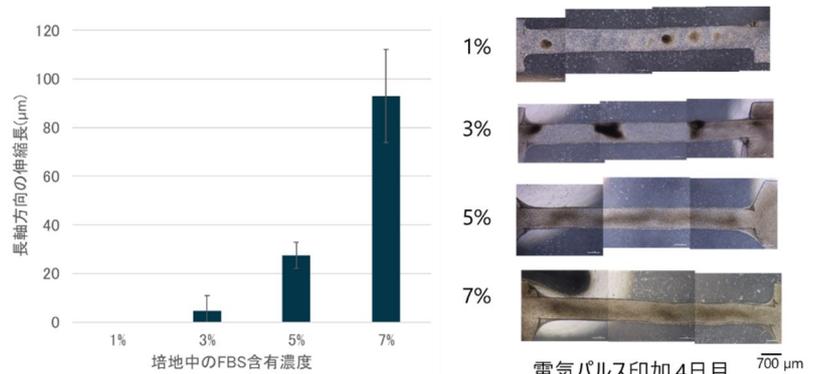


図8 FBS濃度が短冊型コラーゲンフィルム上の筋管細胞の活性張力と接着に与える影響

地をどのように設定するかは大きな課題である。また組織状態にある細胞集塊の内部まで培地成分や酸素を供給する方法の開発も重要である。「複雑組織を作り上げる技術」の前に、「組織を適切に育む培養技術」を開発することが先決である。

## 5. 参考文献

- 1) Suman Chandra Nath, Eiji Nagamori, Masanobu Horie, Masahiro Kino-oka, Culture Medium Refinement by Dialysis for the Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Suspension Culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40, 1, 123-131 (2017)
- 2) Fujita, H., Shimizu, K., Nagamori, E., Novel method for measuring active tension generation by C2C12 myotube using UV-crosslinked collagen film. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3), 482-489. (2010)
- 3) Fujita, H., Shimizu, K., Morioka, Y., Nagamori, E., Enhancement of C2C12 differentiation by perfluorocarbon mediated oxygen delivery. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110 (3), 359-362. (2010)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hideaki Fujita, Keisuke Mae, Kouki Nagatani, Masanobu Horie, Eiji Nagamori	4. 巻 131(5)
2. 論文標題 Effect of hydrogen peroxide concentration on the maintenance and differentiation of cultured skeletal muscle cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 572-578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masanobu Horie, Ran Ding, Sumire Nagasaka, Saki Ohsumi, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda, Eiji NAGAMORI, Hideaki Fujita, Takuo Kawamoto	4. 巻 130(1)
2. 論文標題 The effect of cell-extracellular matrix interaction on myogenic characteristics and artificial skeletal muscle tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 98-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Koma*, Takahiro Kishida, Hayato Yamanaka, Kunihiko Moriyoshi, Eiji Nagamori, and Takashi Ohmoto	4. 巻 126(5)
2. 論文標題 Escherichia coli chromosome-based T7-dependent constitutive overexpression system and its application to generating a phenylalanine producing strain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 586-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長森英二	4. 巻 96(7)
2. 論文標題 ヒトiPS細胞大量培養を効率化する操作	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 8-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長森英二	4. 巻 18(2)
2. 論文標題 iPS細胞の分化培養・分化細胞/組織の培養工学(現状と展望)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊PHAMSTAGE	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長森英二
2. 発表標題 骨格筋細胞を機能的に育み, 計測する技術
3. 学会等名 情報計算化学生物学会(CBI学会)2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長森英二
2. 発表標題 酸素運搬体を用いた超高密度かつ機能的な細胞培養
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長森英二, 九鬼真奈絵, 四辻史也, 西川美和子, 近藤孝志
2. 発表標題 半導体加工技術で作製した微細な「ざる」を用いた培地-細胞分離
3. 学会等名 日本再生医療学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷 洸輝, 堀江 正信, 藤田 英明, 長森 英二
2. 発表標題 培養骨格筋組織の形状および機能の維持に適したFBS濃度の探索
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前 佳佑, 堀江 正信, 藤田 英明, 長森 英二
2. 発表標題 過酸化水素が骨格筋細胞の構造と機能に影響を与える濃度域の検証
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸田隆寛, 駒大輔, 大橋博之, 山中勇人, 森芳邦彦, 長森英二, 大本貴士
2. 発表標題 T7発現系を応用したプラスミドフリーで誘導剤が不要なフェニルアラニン高生産菌の開発
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 長森英二 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 676
3. 書名 医薬品モダリティの特許戦略と技術開発動向	

1. 著者名 長森英二 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー・リサーチ	5. 総ページ数 326
3. 書名 骨格筋研究を核とした筋スマート社会（監修：長森英二）	

1. 著者名 長森英二、他83名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 420
3. 書名 再生医療の開発戦略と最新研究事例集	

1. 著者名 長森英二（監修者）、他54名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシーリサーチ	5. 総ページ数 印刷中
3. 書名 骨格筋研究を核とした筋スマート社会	

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪工業大学工学部生命工学科生物プロセス工学研究室  
<http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~nagamori/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------