

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12041

研究課題名(和文) 自公転式攪拌装置を用いた組織培養および流体環境が細胞に及ぼす影響の検証

研究課題名(英文) Effect of fluid environment using a rotation/revolution-type agitator on cell properties in tissue culture

研究代表者

村松 和明 (Muramatsu, Kazuaki)

東京電機大学・理工学部・教授

研究者番号：90408641

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)：本研究では、組織培養における自転公転式攪拌技術の利用、および流体環境が血液細胞の特性に及ぼす影響を明らかにした。軟骨細胞の初代培養では、酵素消化により軟骨組織から軟骨細胞を単離する際、自転公転式攪拌技術の活用が有効な手段であることが示された。また、血球に対する動的環境の影響を評価するため、同攪拌技術を用いて単球性細胞株THP-1を培養した結果、静置培養群と比較し、化学走化性因子で誘導される細胞接着性や遊走活性は、動的培養群で有意に向上し、種々の細胞接着性受容体の遺伝子発現を亢進させた。これら現象は株化細胞に限らず、ラット骨髄から単離した正常白血球による評価においても同様であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療では、限られたドナー組織から高効率でより多量の正常細胞を単離する必要がある。本研究では、細胞単離時の酵素消化において、攪拌技術の違いが細胞回収量の差となるデータを示し、自転公転式攪拌技術が細胞の調製に有効な攪拌技術であることを証明した。

また、生命科学研究では、細胞機能を解明するため、in vitro培養による特性解析が行なわれる。通常、細胞培養は静置系で実施されるが、あらゆる細胞は生体内で機械的刺激を受容しており、血球の場合には循環に伴う剪断応力が伴う。本研究では、細胞への侵襲が少ない自転公転式攪拌技術を活用し、動的環境下における血球の細胞機能を明らかにした点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the utility of the rotation/revolution-type agitator for cell/tissue culture and the effect of the fluid environment on the characteristic of blood cells. In the primary culture of chondrocytes, it was shown that the utilization of rotation/revolution agitation is an effective method for isolating chondrocytes from cartilage tissue by enzymatic digestion.

On the other hand, in order to evaluate the effect of the dynamic environment on blood cells, the monocyte cell line THP-1 was cultured using the rotation/revolution agitation. As a result, the cell adhesion and migration activity induced by chemotactic factor were significantly activated in the dynamic condition group and the gene expression of various cell adhesion receptors was enhanced as compared with the static condition group. These results were also confirmed in the evaluation by normal leukocytes isolated from rat bone marrow.

研究分野：生体医工学

キーワード：自公転式攪拌 流体環境 組織培養 白血球

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、バイオマテリアルや培養軟骨を活用した関節軟骨の組織再生研究の過程で、培養操作における攪拌・混合技術の重要性を認識してきた。すなわち、軟骨組織を酵素で消化し正常細胞を単離する際の効率化や、ゲル内で培養細胞を三次元培養する際の均質な内包化技術が重要であった。これらを解決する手段の一つとして、自公転式攪拌技術が活用できることを見出した。

この研究過程において、自公転式攪拌操作が細胞に与えるダメージを検証するため、溶血試験および浮遊性細胞 HL60 の生存率とマクロファージ分化能を評価（短時間試験）したところ、溶血（細胞傷害性）は示されず、PMA（phorbol 12-myristate 13-acetate）処理による HL60 のマクロファージ分化（接着性の獲得）は亢進された。従って、動的環境下での浮遊性細胞の培養において、自公転式攪拌操作は細胞膜に対する物理的損傷を与えず、細胞活性には影響を及ぼすことが示唆された。従って、自公転式攪拌技術は細胞に低侵襲な動的培養法として確立することが可能であると同時に、生体内で循環する浮遊細胞の特性解析に有用であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

生命科学研究や再生医療研究では、組織培養過程において、対象とする細胞の選択的な増殖や分化の制御が重要である。接着性の動物細胞では、適切な添加因子や三次元担体を含む培養基材の選択等により細胞の表現型は大きく変わる。さらに生体内環境を模倣した様々な動的培養モデル（伸展/圧縮、重力等の機械的刺激）が構築され、細胞研究に役立っている。それにも関わらず、白血球などの浮遊細胞では、従来の静置培養系によるデータ取得がほとんどであり、生理的条件（血液循環）に近い動的環境が反映された細胞特性の挙動に関する研究は進歩していない。本研究は、*in vivo* の生理的環境（血液循環）で受ける細胞と媒体との剪断応力が白血球の刺激応答性や遊走性の促進に作用するとの仮説を立て、自公転式攪拌装置を活用した浮遊細胞の攪拌培養法を構築すると同時に、攪拌培養された白血球の分化特性や遊走能の変化の検証を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組織培養における自公転式攪拌技術の活用（軟骨細胞の初代培養への適用）

ラット肋軟骨を約 1mm 片に細断後、37 条件下にて約 0.4g 相当量の軟骨組織を 0.1 mg/mL リベラーゼ TH 10mL で 4 時間消化した。このとき、酵素消化のプロセスは 2 群の 50mL 遠沈管で行い（各 n=3）、一方は自公転式遊星式攪拌機にて、他方は通常の巡回振とう機にて行った（各 120 rpm）。組織の消化効率は、消化前後の軟骨組織の質重量測定から算出し、単離された生細胞数を比較した。また、それら細胞を初代培養し、細胞の特性を増殖性（DNA 定量）と遺伝子発現解析（RT-PCR 法）にて評価した。

#### (2) 自公転式攪拌技術を活用した流体環境における白血球機能の解析

血液細胞の動的環境（攪拌刺激）は、自公転式攪拌装置を活用して作りだした。ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 およびヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 の両細胞に対し、それぞれ動的環境および静置環境で予備培養を行った後、PMA で刺激を行った。これら各細胞をマイクロプレートのウェル内へ播種し、接着性細胞数やトランスウェルを用いた遊走活性等を比較した。さら

に動的環境と静的環境の違いにおける接着特性の変化を解明するため、THP-1 細胞を用いて RT-PCR 法による接着性分子の遺伝子発現の比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織培養における自公転式攪拌技術の活用（軟骨細胞の初代培養への適用）

軟骨組織の消化効率および細胞回収効率は、図 1 に示すように自公転遊星式攪拌群の方がいずれも優れていた。また、自公転式攪拌装置で単離された軟骨細胞は、増殖性やマーカー分子の発現レベルにおいて旋回振とう法と同等以上であり、一般的手法で単離された細胞の特性との違いは全く確認されなかった。以上の結果より、自公転式攪拌技術は細胞に与える物理的ダメージを抑えることが示された。言い換えれば、自公転式攪拌装置は細胞に対するダメージが少ない攪拌装置であり、浮遊細胞の動的培養法に活用できる可能性が示された。

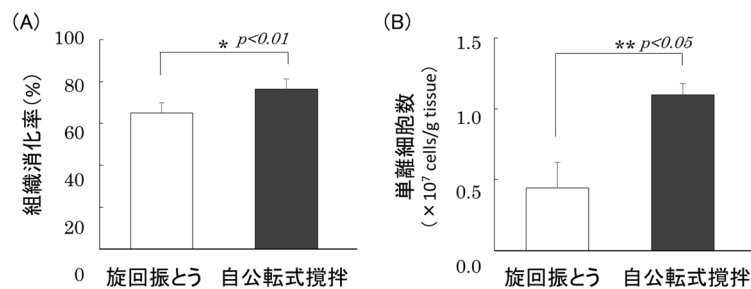


図 1. 異なる攪拌方式で酵素消化された(A)軟骨組織の消化率および(B)単離された生細胞数の比較. データは平均値 ± 標準誤差 (各 n=3) で示した. \* $p<0.01$ , \*\* $p<0.05$ .

##### (2) 自公転式攪拌技術を活用した流体環境における白血球機能の解析

HL-60 および THP-1 とともに、動的刺激を受けた細胞群において PMA 依存的な接着細胞数の増加が認められた。また、初期接着の差に基づく遊走細胞数の変化も確認された。

より詳細な検討を行うため、動的環境による THP-1 細胞の接着分子の発現変化を解析したところ、特にローリング現象に関与する L-セレクチンや PSGL-1 に加えて、強固な接着に関与する VLA (インテグリン 1) の mRNA 発現が亢進された。この現象は株化細胞に限定された挙動ではなく、ラット骨髄より単離した正常な単核性白血球集団においても同様の傾向を示した。

これら結果は、末梢血循環中に受ける流体刺激が血液細胞の刺激感受性の向上に寄与する内在的要因となる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Akinori Oda, Ryota Takamiya, Rin Kaneko, Haruna Yoshida, Yuta Yanagita, Hatsumi Sekiguchi, Yoshihito Nobe, Kazuaki Muramatsu.	4. 巻 128
2. 論文標題 Utility of a rotation/revolution-type agitator for chondrocyte isolation during preparation of engineered cartilage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 117-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.12.010	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 -

〔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 池田 光悦, 高橋 美裕, 小田 彰恭, 野辺 善仁, 村松 和明.
2. 発表標題 白血球の粘着活性の亢進に及ぼす流体環境の影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田 彰恭, 池田 光悦, 高橋 美裕, 野辺 善仁, 村松 和明.
2. 発表標題 複雑な流体環境は単球の生理的機能を亢進する.
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田 彰恭, 池田 光悦, 高橋 美裕, 柳田 湧太, 野辺 善仁, 村松 和明
2. 発表標題 流体環境は単球が血管内皮へ粘着する能力を増強する
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村松和明, 高宮良太, 金子凜, 吉田春菜, 関口はつ美, 柳田湧太, 小田彰恭, 野辺善仁
2. 発表標題 自公転式攪拌技術を利用した組織培養
3. 学会等名 TIRIミーティング2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田 彰恭, 吉田 春菜, 関口 はつ美, 柳田 湧太, 金子 凜, 高宮 良太, 野辺 善仁, 村松 和明
2. 発表標題 自公転遊星式攪拌技術を活用した組織培養の有用性
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 池田光悦, 吉田春菜, 柳田湧太, 関口はつ美, 小関愛子, 小田彰恭, 野辺善仁, 村松和明
2. 発表標題 流体環境が単球分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------