

令和 3 年 4 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16177

研究課題名（和文）管状構造と物理的因子が誘導する上皮立体構造形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of development of epithelial structure induced by ductal structure and physical factors

研究代表者

中島 忠章（Nakajima, Tadaaki）

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：40631213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子やタンパク質に因らず、周囲環境の物理的因子が腸の凹凸などの複雑な上皮立体構造形成に関与していると考えられている。細胞をピースに見立てて任意の形で配置して培養する、ボトムアップ組織工学手法を用いて、腸・血管・膣の足場の硬さや構造を変化させて培養した。腸上皮は平面ではなく管状に培養することで自然とひだ状になった。血管内皮は管状で培養することで分岐して伸長し、足場が硬いとその現象は促進された。膣上皮は足場が硬いことで多層化した。このように組織に因らず、周囲環境の物理因子が上皮立体構造形成を制御していることを直接的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複雑な生物の形を決定するには遺伝子の数はあまりにも少なく、生物の形づくりにはなるべくしてなる物理因子の関与が必要はなすである。本研究結果により、周囲環境の物理因子が上皮立体構造形成を制御していることを直接的に証明された。本研究が基点となり、物理法則が支配する形態形成の制御機構の解明がさらに発展すると予想される。

また、組織の形づくりにおける物理法則を解明することで、組織を培養系で構築する際に、その物理法則を制御することで組織の形をデザインできるようになると考えられる。例えば本研究で樹立されたヒト3D腸モデルは、より生体に近い吸収試験系として、食品や薬の検査に用いることができる。

研究成果の概要（英文）：Recent studies demonstrated that the three-dimensional epithelial structure in the several tissues may be induced by physical factors in the surrounding environment. Using the bottom-up tissue engineering techniques in which the cells are mimicked as blocks, the gut, microvessel, and vagina were reconstructed with modification of the structure and stiffness in the scaffolds. The restricted ductal scaffold induced the buckling structure in the 3D human gut model, but not in 2D. In the 3D human microvessel model, the ductal scaffold induced angiogenesis and the stiffer scaffold stimulated the elongation of the angiogenesis. The vaginal epithelial stratification was induced by the stiffer scaffold in the 3D mouse vaginal model. Taken together, we directly demonstrated that surrounding physical factors regulate the three-dimensional epithelial structure using the bottom-up tissue engineering techniques.

研究分野：発生生物学

キーワード：腸 血管 膣 足場 硬さ 応力 組織工学 上皮立体構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの三胚葉由来組織は、様々な機能を有した上皮と、それを支える間質からなる。その上皮が正しく機能するためには、適切な構造を取っている必要がある。例えば、腸上皮は内腔側に突出した微絨毛構造を取り、栄養吸収の為に上皮表面積を増やす役割がある。

この上皮の立体構造は、腎臓の分岐構造のように、間質や近傍上皮などのオーガナイザーがタンパク質等の化学的因子を分泌することで誘導されると考えられている。一方、物理的な作用も形態形成に重要な役割を持つ。ショウジョウバエの気管形成において、内腔側の細胞膜形成量の増加と、細胞外マトリックスによる張力によって波打ち構造が形成される。マウス、ニワトリ、アフリカツメガエルの腸の微絨毛は、平滑筋層による上皮層伸長領域の制限によって発生する応力によって形成され、その形状は上皮の細胞増殖パターンによって決まる。マウス副精巣においては、上皮細胞増殖率と間質の硬さが、上皮の間質内への陥入構造形成に寄与する。このように、種と胚葉を超えて、上皮立体構造は物理的因子によって自然と形作られている。しかしながら、どの物理的因子が、どのような上皮の形に、どれくらい寄与しているのかを統一した培養系で実証した例は存在しない。

同じ皮膚でも、曲率の小さい背中では波打ち構造が小さく、曲率の大きい手では波打ちが大きく、上皮が間質方向へ陥入した乳頭構造を形成する。このように、複雑な上皮構造を持つ組織は、全て発生期に管状または大きな曲率を持つ形態をしている。さらに、発生途中に器官培養して管状構造を球形にしてしまうと、マウス卵管などにみられる上皮突出構造が平滑になって発生する。このことから、発生期に生まれる上皮での物理的な力は、曲率があることで突出または陥入へと変換され、上皮の立体構造が形成される可能性があるが、その寄与は不明である。

2. 研究の目的

管状構造と周囲環境の物理的因子が、各種組織の上皮発生における立体構造の形成に与える影響の解明と、その共通性の探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト結腸癌由来上皮株細胞 (CACO-2)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)、*p53* ノックアウトマウス由来胎生期卵管未分化上皮株細胞 (E1)、新生仔期腔間質バルク株細胞 (P3VS)、またはそのクローン性株細胞 (M2, M6) を、それぞれ適切な培養条件で培養した。M2, M6 細胞においては網羅的解析より絞り込まれた腔上皮多層化に関与する候補遺伝子のノックダウンまたは強制発現を行った。

(2) 三次元 (3D) 培養

腔における 3D 平面培養では、酸抽出コラーゲン溶液を中性化して M2, M6 細胞を混合し、セルカルチャーインサート上に添加した。細胞含有コラーゲン溶液をゲル化後、上部に E1 細胞を播種して培養した。腸と血管における 3D 管腔培養では、中性化コラーゲン溶液をポリジメチルシロキサン製デバイスのチャンパー内に添加し、鍼灸針 (直径: 200-300 μm) を挿入した。コラーゲン溶液をゲル化後、鍼灸針を除去することで内腔を作製し、内腔内に CACO-2 または HUVEC を播種して培養した (図 1: 例として腸モデルを図示)。

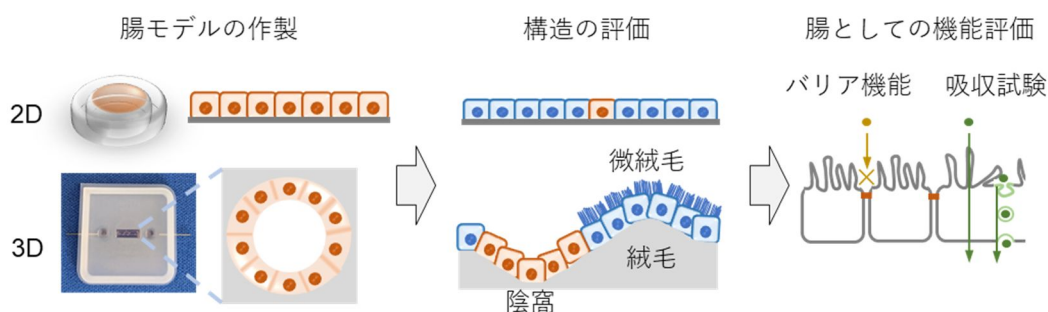


図 1: 腸モデルの作製と評価方法の概要図

一般的な 2D 腸モデルは、プラスチック製のフィルター上に平面的に CACO-2 細胞を培養するが、3D 腸モデルでは管状のゲル上で腸上皮を培養する。その後組織学的に構造を評価し、組織としての機能を評価した。

(3) 構造・機能評価

作成した腸・血管・腔モデルにおいて、組織学的に構造の詳細を評価した。また共焦点レーザー顕微鏡や光干渉断層撮影法を用いて 3D 的な構造評価も行った。上皮細胞に吸収されない蛍光標識したデキストランを内腔より処理することで上皮のバリア機能の評価を行い、上皮細胞に吸収される リポ酸を用いて吸収試験を行った。

4. 研究成果

(1) 3D 腸モデルを用いた、管状構造と応力が腸上皮発生に与える影響の解析

内胚葉由来の腸上皮細胞を管状のコラーゲンゲル上で 3D 的に培養し、光干渉断層撮影法を用いて非侵襲的に 3D 画像を取得したところ、培養 16 日目において 2D 培養では形成されなかったひだ状の構造を確認できた (図 2 左)。細胞が押し合う応力が強い際に細胞内に形成される、細胞質内のアクチンファイバーが 3D 培養においてのみ観察されたことから、このひだ状構造は生体のように細胞が押し合う応力によって形成されたと考えられる。また通常、2D 培養では上皮のシートが形成された場合は細胞増殖が停止するが、このひだ状構造の凹んだ部分においては細胞増殖が盛んであり、実際の腸の陰窩と同様の性質を持っていた (図 2 右)。さらに腸上皮細胞はその頂端部に微絨毛を形成するが、3D 培養した細胞において微絨毛が密集して林立して形成されていた。

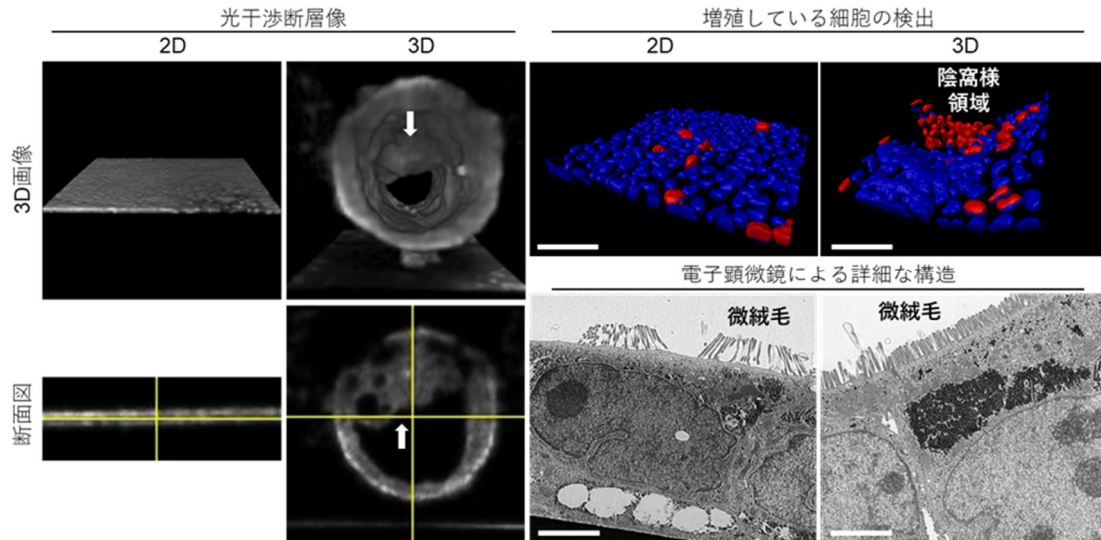


図 2: 腸チップにおける腸上皮の構造評価

(左図) 光干渉断層撮影による非侵襲 3D 画像。管状のゲルを用いた 3D 培養では、ひだ状の構造が確認できる (白矢印)。(右図上段) 3D 培養においてのみ、増殖が盛んな陰窩様領域が確認できる (赤: 増殖細胞)。(右図下段) 透過型電子顕微鏡による細胞の断面図。3D 培養によって、細胞の頂端部に生える微絨毛が密に、林立して形成されている。

この 3D 腸モデルは内腔からのみ溶液を添加することができるため、内腔からの腸のバリア機能と吸収機能を評価することができる。吸収されないデキストランが内腔から外側に漏出しなかったことから、この 3D 腸モデルは完全なバリア機能を有していた。吸収される リポ酸を内腔より添加して吸収量を測定したところ、2D 培養と比較して 3D 培養では吸収量が劇的に増加した。これらの結果より、管状の足場制限による腸上皮細胞にかかる応力のみで、生体様の上皮分化を誘導できたことが示唆された。

(2) 3D 血管モデルを用いた、管状構造と応力が血管新生に与える影響の解析

中胚葉由来の血管内皮細胞を管腔状のコラーゲンゲル足場に播種すると、逆方向にコラーゲンゲルに侵入する血管新生を誘導できる。この血管新生は、コラーゲンゲルに線維芽細胞を含有させることで促進され、老化線維芽細胞を含有させることで正常線維芽細胞よりもさらに促進された。老化線維芽細胞は正常なものよりも強い牽引力を有していることもわかり、線維芽細胞の牽引力によって誘導されたコラーゲンゲルの凝集により、足場が硬くなることによって、血管新生が強く誘導された可能性が示唆された。

(3) 3D 膈モデルを用いた、足場構成因子と硬さが膈上皮発生に与える影響の解析

中胚葉由来の膈上皮は発生によって単層上皮から多層上皮へと分化する。この膈上皮の多層化は間質からの分泌因子によって誘導されることが分かっており、その分泌因子群も同定されている。多層化に関わる周囲環境因子を同定するために、発生中の膈間質でのみ高発現する遺伝子を網羅的に解析して候補遺伝子を絞り込み、その候補遺伝子を M6 細胞でノックダウンした後に 3D 膈モデルを作製することで、間質細胞における *Fmod* 遺伝子が膈上皮多層化に必要であることがわかった。FMOD はコラーゲン分子を結合させる際に必要な因子であり、膈上皮多層化を誘導する因子の一つである BMP4 を膈間質細胞が発現する際に、この FMOD が必要であることがわかった。さらに、上皮の足場となるコラーゲンゲルがある程度硬いことが、膈上皮の多層化に重要であることがわかった (図 3)。



図 3: 腔上皮多層化に必要な間質環境因子

これらの結果より、腸・血管・腔という別々な組織において、凹凸に違いは存在するが複雑な 3D 的上皮立体構造形成には管状の足場制限が重要であり、上皮の足場が硬いことによって、血管新生や腔上皮多層化といった分化が誘導されるという共通性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakajima Tadaaki, Sasaki Katsunori, Yamamori Akihiro, Sakurai Kengo, Miyata Kaori, Watanabe Tomoyuki, Matsunaga Yukiko T.	4. 巻 8
2. 論文標題 A simple three-dimensional gut model constructed in a restricted ductal microspace induces intestinal epithelial cell integrity and facilitates absorption assays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 5615 ~ 5627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0BM00763C	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 Pauty Joris, Nakano Shizuka, Usuba Ryo, Nakajima Tadaaki, Johmura Yoshikazu, Omori Satotaka, Sakamoto Naoya, Kikuchi Akihiko, Nakanishi Makoto, Matsunaga Yukiko T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A 3D tissue model-on-a-chip for studying the effects of human senescent fibroblasts on blood vessels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 199 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0BM01297A	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 Nakajima Tadaaki, Kozuma Miyabi, Hirasawa Tomoko, Matsunaga Yukiko T, Tomooka Yasuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Extracellular matrix components and elasticity regulate mouse vaginal epithelial differentiation induced by mesenchymal cells†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaab041	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 中島 忠章, 松永 行子	4. 巻 30
2. 論文標題 三次元人工微小血管モデルによる血管内皮細胞のフェノタイプ解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 512-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.30.512	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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中島忠章、佐々木克典、山森明弘、櫻井研吾、宮田かおり、渡辺知幸、松永行子
2. 発表標題 三次元ヒト腸管モデルを用いた、管状領域制限が上皮形態形成に与える影響の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第91 回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadaaki Nakajima, Yukiko T. Matsunaga
2. 発表標題 Visualization of vascular dynamics using artificial microvessel model
3. 学会等名 Neuro2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島忠章、上妻雅、平澤朋子、友岡康弘、松永行子
2. 発表標題 足場の硬さが制御する腔間質細胞由来の上皮運命決定因子の発現機構
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島忠章、松永行子
2. 発表標題 三次元人工微小血管モデルを用いた血管動態の可視化とフェノタイプ解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 3次元腸組織モデルの作製方法	発明者 松永・中島・佐々木	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020 62445	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------