

機関番号：10101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20680024

研究課題名（和文） 多孔性シートとレーザーピンセットを用いた人工生体組織の構築

研究課題名（英文） Fabrication of the artificial tissue by using porous sheets and laser tweezers

研究代表者

角南 寛 (SUNAMI HIROSHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・研究員

研究者番号：50374723

研究成果の概要（和文）：

組織サイズの細胞集団を設計するために、細胞集団を形成することに起因する細胞内シグナル伝達および脂肪滴の蓄積を調べた。細胞をそれぞれパターン基材上に 2・8 個の細胞集団を形成するように播種した。低分子量 G タンパク質の活性化を調べた結果、細胞どうしの接合部位でこれら低分子量 G タンパク質が強く活性化していることが分かった。更に、単一の細胞集団内で比較した場合、より多くの細胞と接合した細胞ほど脂肪滴の蓄積量が増すことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

In order to design cell clusters as large as a small tissue, I investigated the cellular signaling and the lipid droplet accumulation depending on the formation of cell clusters. Cells were plated on a pattern substrate so that cell clusters with 2・8 cells could be formed, respectively. It was observed that small G-proteins activated strongly in the joined part between cells. Moreover, it was observed that the amount of accumulated lipid droplets increased with an increase in the number of joined cell in a single cell cluster.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	20,100,000	6,030,000	26,130,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器工学・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

細胞は生体内でさまざまな細胞の隣人に囲まれている。これらの隣人どうしの関係が、生体組織を正常な状態に保っている。細胞どうしは相互に刺激し合い、この刺激に基づいて正常な分化や増殖、機能発現などを行う。細胞の配置が、いかに重要であるかは実際の生体組織の構造からも理解できる。肝臓は、肝機能を発現する肝細胞を数十マイクロメートルの間隔で内皮細胞が被う事で、正常な肝機能を維持している。この肝細胞と内皮細胞の相互作用を調節することにより肝機能を高めた報告もある。

人工肝臓を含め、人工臓器を含め、現在までに様々な人工臓器や生体代替材料が考案され、実用化あるいは試験的に運用されているが、課題が残されているものが多い。その原因の一つとして、このような生体内の複雑な共培養系を十分再現できていないことがあげられる。現在の細胞組織工学で用いられている数々の手法をもってしても、生体内のように細胞どうしの相互作用を制御することは容易ではない。このことは、我々が細胞同士の相互作用を完全に理解しきれていないためである。

本研究課題は、このことを細胞組織工学がさらに発展するために避けては通れない大きな山と考え、細胞を自在に配置し、細胞集団の機能を生体内のように調節することを狙っている。

これまでの研究で、細胞サイズ以上の三次元パターン基材上で細胞を培養した場合、三次元パターン基材にはまった状態で動くことなく長期間生存する細胞が多数観察されていた。このような三次元パターン基材とマニピュレーション技術を組み合わせて、数種類の細胞の配置を自在に制御し、生体の微細構造を模倣した共培養系の構築および評価ができないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題は複数の細胞を正確に配置する技術の開発および、細胞同士の相互作用を評価する技術の開発を目指している。

まず、細胞の配置および相互作用を制御するための基材の開発を行う。さまざまな細胞サイズ以上の三次元パターン基材を作製し、その三次元的な形状と細胞マニピュレーション技術を利用して細胞を配置する。これらの三次元形状によって細胞は移動が抑制され、隣接する細胞とのみ接合し、強く相互作用をする。パターンの形状や間隔を調節することによって、この細胞間接合を調節可能と考えている。次に、接合させた細胞間に働く相互作用を、細胞内シグナル伝達を顕微鏡観察することによって明らかにする。最終的には器官を構成する細胞を、三次元パターン基材を用いて最適に配置し、生体内と同じように正常に機能する細胞組織の構築を目指している。本研究課題で得られた技術と知見はより複雑な人工生体組織の作製に利用できると考えている。

3. 研究の方法

組織サイズの細胞集団を設計するために、細胞集団を形成することに起因する細胞内シグナル伝達および脂肪滴の蓄積を調べた。実験には COS-1 細胞、HUVEC、MEF、HepG2 細胞が用いられた。細胞集団の形成には、MEMS を用いてシリコン基板上に作製された三次元パターン基材、正立型蛍光顕微鏡に取り付けられたマイクロマニピュレーターが用いられた。

三次元パターン基材は、新たに開発された正三角柱および四角柱が細密充填したもの、あるいは格子状の形状のものが用いられた。これらの三次元パターン基材は MEMS を用いて 1 cm 角のシリコンウェハー上に掘られており、細胞サイズ以上の大きさの凹みを有

している。また、これらの凹みどうしの間に細胞が通り抜けられない程度の間隔が設けられている。

マイクロマニピュレーターのキャピラリー先端に蛍光色素を塗布し、先端の位置を蛍光観察できるように改良した。配置する細胞は PKH67 により生細胞染色されたものが用いられた。マイクロインジェクターを備えたマイクロマニピュレーターによって、これらの細胞をそれぞれパターン基材上に 2・8 個の細胞集団を形成するように播種した。このとき、培養開始までの細胞へのダメージを軽減する目的で、パターン基材を浸漬した培地と細胞懸濁液を氷冷した。24 時間培養後、隣合わせに播種された細胞どうしの接合を、カドヘリン染色によって確認することを試みた。

三次元パターン基材に播種され、24 時間培養された上記の細胞に活性化した低分子量 G タンパク質 (Ras, Rho, Rac) をモニターするプローブを導入した。プローブを発現させながら 24 時間培養 (5% CO₂, 37°C) 後、Ras、Rac、Rho の活性化を蛍光顕微鏡および共焦点レーザー走査型顕微鏡によって観察した。EGF やインスリン刺激の前後における低分子量 G タンパク質の活性化についても観察を行った。また、MEF および HepG2 に関しては脂肪滴の蓄積に関しても調べた。更に、これらの細胞集団にパルミチン酸を添加し、24 時間培養後に 4% ホルマリン PBS 溶液で固定し、蓄積された脂肪滴を Nile Red で染色した。各細胞集団の脂肪滴蓄積量は蛍光顕微鏡観察によって評価された。

最後に、細胞集団を自発的に形成するパターン基材を作製すれば、高速かつ省エネルギー的に人工生体組織を作製できると考え、細胞播種のみで数種類の細胞の配置を制御できるパターン基材の開発を行った。特定の部

位に細胞を集める工夫をした数種類のパターン基材が MEMS を用いて作製された。これらのパターン基材上での細胞の挙動が蛍光顕微鏡によってタイムラプス観察された。

4. 研究成果

作製された三次元パターン基材上で培養された細胞は平坦な表面上で培養された細胞と比べて運動性が大きく抑制されることが分かった。また、細胞サイズ以下の三次元パターン基材上で培養された細胞は大きく伸展するが、細胞サイズ以上のものの上で培養された細胞は孔にはまった状態を維持しやすく、伸展を抑制されていることが分かった。更に、最初に孔の外にあった細胞も孔の中に入り込みやすいことが分かった。このことは、孔の外と中の微細なラフネスの差に起因しているのではないかと考えている。孔の外は平坦であるが、孔の中は孔を掘るときに出来た微細な凹凸があり、これが細胞の接着性を向上させている可能性がある。

正立型蛍光顕微鏡に取り付けられたマイクロマニピュレーターを用い、明視野反射像で血清培地に浸漬した三次元パターンの形状を確認しながら、蛍光像でキャピラリー先端と PKH67 で染色された細胞を確認し、細胞を特定の場所に配置した。この方法で細胞が生存している (接着伸展できる) 時間内に 10 個前後の細胞を特定の場所に配置できることが分かった。

2・8 個の細胞集団を形成させた細胞どうしの接合部位でこれら低分子量 G タンパク質 (Ras, Rho, Rac) が強く活性化していることが分かった。また、活性化の強さは接合した細胞の数が多いものの方がより強いことが分かった。EGF 刺激に対する応答性に関しては、細胞集団を構成する細胞の数が増えるにつれて Ras の活性化に顕著な遅れが現れた。細胞集団の中でも接合している細胞の数

が多いもの（中心のもの）が遅れて活性化することが分かった。

また、単一の細胞集団内でも接合している細胞の数が多細胞ほど脂肪滴のサイズと数が増すことが分かった。パルミチン酸を添加して培養すると、この傾向がより強まることが分かった。更に、脂肪滴蓄積の程度は接合する細胞の数が多いものの方がより強いことが分かった。

本研究課題を遂行する上で細胞集団を形成することにより細胞内シグナル伝達や脂肪滴蓄積に明確な差を確認できた意義は大きい。特に細胞集団の中でも接合している細胞の数によりシグナル伝達や脂肪滴蓄積に差が見られたことは大変興味深い。このことは同種の細胞でも集団内での位置を調整してやることで、機能発現を制御できる可能性を示唆している。

細胞播種のみで数種類の細胞の配置を制御できるパターン基材の開発に関して、さまざまな三次元パターン基材上での細胞のタイムラプス観察を行った。その結果、三次元パターンの形状によって、細胞を特定の部位に集めることができることが分かった。また、細胞の種類によってこの集まり方に差があることから、数種類の細胞を播種するだけで、複雑な細胞集団を作製できると期待される。

細胞集団の形成形態、細胞集団を自発的に形成するパターン基材については特許出願を予定しているので触れることができない。今後も細胞内シグナル伝達を一つの指標としながら、パターン基材とマニピュレーション技術を用いて細胞集団の形成を制御し、より細胞の機能発現を向上・維持できる人工生体組織を開発する。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計3件）

- ① 角南寛, 光武進, 五十嵐靖之, 三次元パ

ターンを利用した細胞分離, 第10回日本再生医療学会総会, 2011年3月2日, 京王プラザホテル (東京)

- ② 角南寛, 光武進, 五十嵐靖之, 三次元パターンを利用した細胞遊走の制御, 第33回分子生物学会年会・第83回日本生化学大会合同大会 (BMB2010), 2010年12月9日, 神戸国際会議場 (神戸)
- ③ 座間宏太, 林遥, 光武進, 角南寛, 山下匡, 渡辺研, 岡崎俊郎, 五十嵐靖之, 細胞内スフィンゴミエリン量の細胞増殖及び糖脂質合成に与える影響, 第82回日本生化学会, 2009年10月22日, 神戸国際会議場 (神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角南 寛 (SUNAMI HIROSHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・研究員

研究者番号: 50374723

(2) 研究分担者 なし

(3) 研究連携者 なし