

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04515

研究課題名（和文）細胞機能検出プローブを用いた3次元組織の動態・機能イメージング技術の開発

研究課題名（英文）Development of dynamic and functional imaging technology for constructed 3-dimensional tissue using probes to detect cellular biological functions

研究代表者

城 潤一郎（Jo, Jun-ichiro）

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60511243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：再生医療、疾患研究、および創薬研究への応用を目的として、体外での3次元組織構築が行われているが、構築した3次元組織を評価する技術の開発は限られており、組織を生かしたままでの評価は未だ確立されていない。本研究では、構築した3次元組織中の細胞の動態と機能を“組織を生かしたまま”連続的に見る技術（3次元組織の動態・機能イメージング技術）を開発した。これまでにわれわれが開発してきた細胞機能検出プローブ（モレキュラービーコン）の細胞内導入・細胞内徐放による細胞機能イメージング技術を基盤として、最新の3次元組織構築技術を有機的に融合、3次元組織の動態・機能イメージング技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
われわれが開発してきた細胞機能イメージング技術を基盤として構築した3次元組織の動態・機能イメージング技術は、あらゆる3次元組織構築法に適用可能であるため、基盤となる細胞機能イメージング技術の汎用性の高さも相まって、非常に汎用性の高い技術が得られる。得られた3次元組織の動態・機能イメージング技術は、構築した3次元組織の新しい非侵襲的評価手法を創出し、再生医療、疾患研究、および創薬研究に大きな進展をもたらすことは疑いない。

研究成果の概要（英文）：Construction of 3-dimensional tissue has been performed aiming at the application for regenerative medicine, disease research, and drug screening research. However, the development of evaluation technologies for constructed 3-dimensional tissues is limited and evaluation methods of tissues under living condition have not established yet. This study attempted to develop a “dynamic and functional imaging technology for constructed 3-dimensional tissue” which visualizes the dynamics and biological function of cells in constructed 3-dimensional tissue under living condition. The dynamic and functional imaging technology for constructed 3-dimensional tissue was developed based on the cell function imaging technology which was developed by the application of intracellular delivery technology for a molecular beacon to sequence-specifically detect an mRNA.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：モレキュラービーコン イメージング 細胞機能 ナノ粒子 3次元組織

1. 研究開始当初の背景

細胞は、組織内で周辺の細胞あるいは細胞外マトリックスと相互作用し、ダイナミックに動きながらその機能を発揮していることが明らかになってきた。この環境を忠実に模倣、体外で再現するため、体外で3次元組織を構築する研究が行われている。体外での3次元組織の構築は、再生医療、疾患研究、および創薬研究への応用が考えられるため、様々な構築手法が活発に開発されている。このような体外での3次元組織の構築において問題となってくるのが、構築した3次元組織の評価である。現在は、既存の細胞生物学あるいは組織学を踏襲した評価(ウエスタンブロットティング法、酵素結合免疫吸着法、ポリメラーゼ連鎖反応法、in situハイブリダイゼーション法、免疫組織化学染色法)あるいは透明化技術や次世代シーケンス技術に限られている。これらの評価は、組織・細胞の破壊や固定を伴う侵襲度が高い方法である。破壊や固定の過程で、組織内での細胞の位置情報が奪われ、同じサンプルの経時的評価が不可能となるという問題が生じる。これらの問題点は、構築した3次元組織中の細胞の動態や機能を詳細に理解する上で大きな障壁となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、体外で構築した3次元組織の評価に立ちはだかる障壁を超えるため、構築した3次元組織中の細胞の動態と機能を“組織を生かしたままで”連続的に見る技術(3次元組織の動態・機能イメージング技術)を開発することである。これまでに応募者は、細胞内の機能性核酸(メッセンジャーRNA(mRNA)あるいはマイクロRNA(miRNA)など)の検出を介して、細胞を生かしたままでその生物機能を連続的に可視化する細胞機能イメージングの開発を行ってきた。すなわち、機能性核酸を配列特異的に蛍光検出できるモレキュラービーコン(MB)を、カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いて細胞内へ導入・徐放化させる技術を開発してきた。

本研究では、この細胞機能イメージング技術を基盤に、3次元組織の動態・機能イメージング技術を構築する(図1)。カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いて、MBを3次元組織の構成細胞あるいは細胞シートへ導入する。MBを導入した細胞あるいは細胞シートを3次元組織化する。細胞特有の性質を示すmRNAあるいは3次元組織への刺激によって発現量が変化するmRNAを検出するMBを用いることによって、組織内の細胞の特異的標識と機能検出が可能となる。カチオン化ゼラチンナノ粒子によるMBの細胞内徐放により、MBによる3次元組織中の細胞の動態と機能の時間変化を長期にイメージングできる。これが本研究のシナリオである。

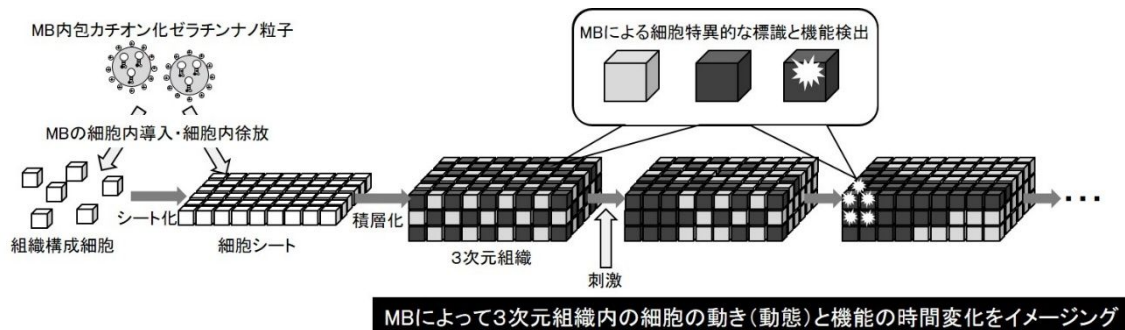


図1. 本研究で開発する3次元組織の動態・機能イメージングの概要

3. 研究の方法

3次元ヒト心筋組織は、ヒトiPS細胞から分化誘導して得られた心筋細胞と間葉系細胞からなるシートを積層化して得られる。3次元ヒト心筋組織に伸展刺激を与えることによって、心筋細胞と間葉系細胞の組織内動態が変化し、心筋細胞が成熟化することがわかってきた。そこで本研究では、この3次元ヒト心筋組織の成熟化刺激に対する動態・機能イメージング技術を開発し、その有効性を評価することとした。本研究を着実に遂行するため、3つの研究項目(MBの設計、MBデリバリーの検討、および3次元ヒト心筋組織に対する動態・機能イメージング)を設定した。

研究項目 1では、3次元ヒト心筋組織を構成するヒトiPS細胞由来心筋細胞および間葉系細胞を機能的に特徴づけるmRNAならびに心筋細胞の成熟化によって変化するmRNAを検出するMBを設計し、その検出能を評価する。研究項目 2では、カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いた各細胞あるいは細胞シートへのMB取り込み挙動を調べる。細胞あるいは細胞シートの3次元組織化および刺激に至るまでの時間を考え、MBの細胞内徐放期間の最適化を行う。また、複数種のMBのカチオン化ゼラチンナノ粒子への内包についても検討する。研究項目 3では、MBを導入したヒトiPS細胞由来心筋細胞および間葉系細胞のシート化および積層化を行う。得られたMB導入3次元ヒト心筋組織に対して成熟化刺激を行い、各細胞の組織内の動態と機能を観察し、3次元ヒト心筋組織の動態・機能イメージング技術の有効性を評価する。

上記研究項目に加えて、3次元ヒト心筋組織以外の3次元組織に対する細胞機能イメージングについても検討する（研究項目）。

4. 研究成果

(1) 研究項目：MB の設計

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に対しては、Human cardiac troponin-T (TNNT2) mRNA、ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞に対しては、Human Calponin (CNN1) mRNA をターゲットとした。定量 PCR を行った結果、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞においては TNNT2 mRNA の発現レベルが有意に高く、ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞においては CNN1 mRNA の発現レベルが有意に高いことを確認した。それぞれのターゲット mRNA に対する MB (2 候補) を Beacon Designer で設計・合成し、構造予測ツール (Integrated DNA Technologies の UNAFold ツール) にて得られた塩基配列がステムループ構造を取ることを確認した (図 2)。1 部の MB については、合成 DNA を用いてその配列特異性についても確認した。

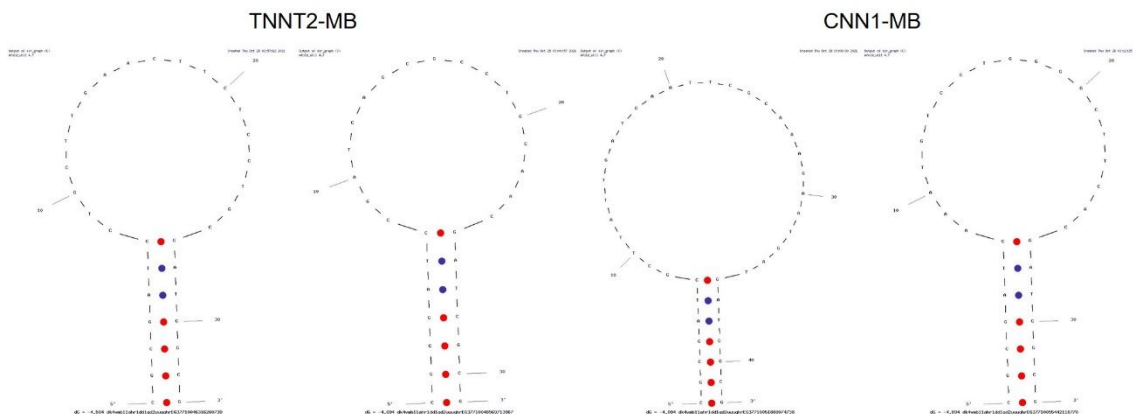


図2. 本研究で設計したMB (TNNT2-MBおよびCNN1-MB)の配列および構造

(2) 研究項目：MB デリバリーの検討

コアセルベーション法を用いて、カチオン化ゼラチンナノ粒子を作製した。細胞内で恒常的に発現している、グルセルアルデヒド 3リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA に対する MB (GAPDH-MB) とカチオン化ゼラチンナノ粒子とを水溶液中で混合、15分間室温で静置し、遠心洗浄することで複合体を得た。本検討では、マウス骨芽前駆細胞株の MC3T3-E1 細胞およびマウス間葉系幹細胞株の KUM6 細胞を用いてシートを形成させ、細胞シートへの MB デリバリー効率について検討を行った。それぞれの細胞シートへ複合体を添加し、経時的に共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。その結果、時間経過とともに蛍光強度の上昇が観察された。これは、細胞内徐放された MB がターゲットの mRNA と徐々に相互作用して発光しているためと一部考えられる。その他に、シート形成により産生した細胞外マトリクスの影響も考えられるため、今後の検討が必要である。加えて、MB 取り込みに伴うシート内の細胞毒性は検出されなかった。

(3) 研究項目：3次元ヒト心筋組織に対する動態・機能イメージング

TNNT2 および CNN1 mRNA に対する MB (TNNT2-MB および CNN1-MB) をカチオン化ゼラチンナノ粒子にて複合化し、ガラスボトムディッシュへ播種したヒト iPS 細胞由来心筋細胞あるいはヒト iPS 細胞由来間葉系細胞へ添加した。添加 1 時間後に培地交換し、さらに 24 時間培養後、蛍光顕微鏡にて蛍光挙動を観察した。期待通り、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞においては TNNT2-MB、ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞においては CNN1-MB の蛍光発光が観察された。しかしながら、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞においては CNN1-MB、ヒト iPS 細胞由来間葉系細胞においては TNNT2-MB の蛍光発光も観察される結果となった。この結果は、設計、合成した他の TNNT2-MB および CNN1-MB についても同様であった。上記の通り、MB 自体の配列特異性については確認しているため、この結果の原因については、MB が結合する mRNA の配列が、TNNT2 と CNN1 において相同性が高かったことが考えられるが、この原因の妥当性についてはこれ以上追及できていない。以上のように、この研究において、MB を用いてヒト iPS 細胞由来心筋細胞とヒト iPS 細胞由来間葉系細胞を遺伝子発現特異的に区別する (“染め分ける”) ことは現在できていない。

一方、細胞の分化状態と代謝特性が密接に関係していることが報告されている。すなわち、未分化状態では解糖系が、分化状態では酸化リン酸化がエネルギー産生として優位となる。そこで解糖系および酸化リン酸化を司る因子 (それぞれピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDK1) およびペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター 共役因子-1 (PGC-1)) の mRNA に対する MB (PDK1-MB および PGC-1-MB) を設計、合成した。PDK1-MB および PGC-1-MB をカチオン化ゼラチンナノ粒子にて複合化し、マウス胚性幹細胞およびその神経分化細胞へ添加した。PDK1-MB の蛍光発光レベルは、未分化性を維持しているマウス胚性幹細胞において高く、神経分化が進行するにつれて低くなった。一方、PGC-1-MB の蛍光発光レベルは、未分化性を維持してい

るマウス胚性幹細胞において低く、神経分化が進行するにつれて高くなった。以上の結果より、細胞の未分化性および分化機能を代謝特性に関わる MB で “ 染め分ける ” ことに成功した。

(4) 研究項目 : 3次元組織に対する細胞機能イメージング

MB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子

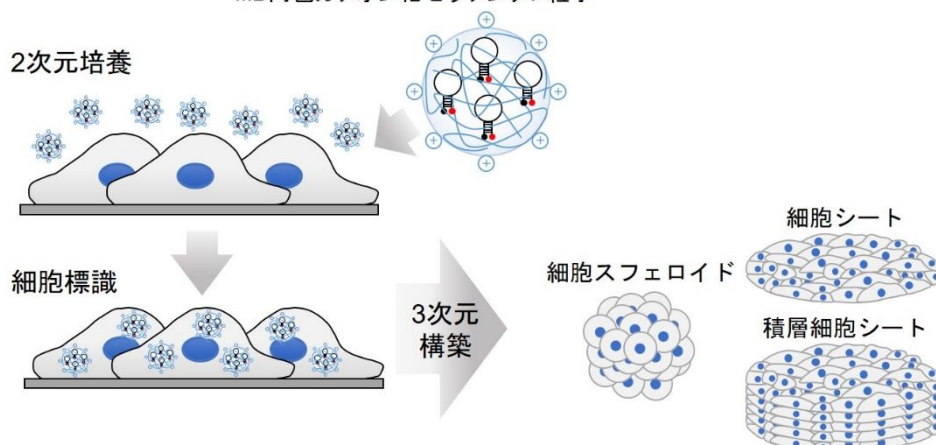


図3. 3次元組織に対する細胞機能イメージングの開発

3次元組織のイメージングの問題点は、プローブが組織内部まで浸透しにくく、均一な細胞標識が困難であることである。今回、我々は、これまでの2次元細胞機能イメージング技術を応用して、3次元組織に対する細胞機能イメージング技術を開発した。すなわち、まず2次元基材上で細胞をMBで標識した後、標識されたMBを含む細胞を3次元構築することで3次元組織に対する細胞機能イメージングを目指した(図3)。本研究では、細胞スフェロイドに対して実施し、スフェロイド内部の細胞まで均一に標識されていること、細胞スフェロイドに対するアポトーシス挙動を、スフェロイドを分解することなく、生かしたままで可視化することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang W., Jo J., Tabata Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 A Reverse Transfection System with Cationized Gelatin Nanospheres Incorporating Molecular Beacon as a Tool to Visualize Cell Function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	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) 10.1021/acsabm.2c00944	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 城潤一郎、村田勇樹、田畑泰彦	4. 巻 40(4)
2. 論文標題 モレキュラービーコンを用いた細胞機能イメージング技術の開発と3次元細胞集合体への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオマテリアル - 生体材料 -	6. 最初と最後の頁 300-305
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 Murata Y., Jo J., Tabata Y.	4. 巻 27(9-10)
2. 論文標題 Molecular Beacon Imaging to Visualize Ki67 mRNA for Cell Proliferation Ability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 526-535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2020.0127	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 Takehana S., Murata Y., Jo J., Tabata Y.	4. 巻 16
2. 論文標題 Complexation design of cationized gelatin and molecular beacon to visualize intracellular mRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0245899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦	4. 巻 14
2. 論文標題 モレキュラービーコンとドラッグデリバリーシステムを組み合わせた細胞機能イメージング技術の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSMI Report	6. 最初と最後の頁 18-25
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 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 Murata Y., Jo J., Tabata Y.	4. 巻 27(4)
2. 論文標題 Visualization of apoptosis in three-dimensional cell aggregates based on molecular beacon imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C: Methods	6. 最初と最後の頁 264-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEC.2020.0338	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Jo J., Murata Y., Tabata Y.
2. 発表標題 Development of a novel cell labelling method by the substrate-mediated intracellular delivery of molecular beacon.
3. 学会等名 International Dental Material Congress (IDMC) 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yang W., Jo J, Tabata Y.
2. 発表標題 Design of reverse transfection system with cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon to visualize cell functions.
3. 学会等名 2022KIPS 若手高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wenxuan Yang, 城潤一郎, 田畑泰彦.
2. 発表標題 細胞機能可視化のためのモレキュラービーコンの細胞内徐放とリバーストランスフェクションの組み合わせ
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦
2. 発表標題 モレキュラービーコンを用いた細胞機能イメージング技術の開発
3. 学会等名 第38回医用高分子研究会講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城潤一郎
2. 発表標題 近未来歯科細胞医療を支える細胞機能イメージング技術の開発
3. 学会等名 日本歯科理工学会近畿・中四国地方会令和3年度冬期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦
2. 発表標題 モレキュラービーコンを用いた未分化・分化細胞のエネルギー代謝経路の可視化
3. 学会等名 日本分子イメージング学会（WEB開催臨時大会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦
2. 発表標題 モレキュラービーコンによる未分化・分化細胞のエネルギー代謝経路イメージング
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城潤一郎、村田勇樹、田畑泰彦
2. 発表標題 細胞機能イメージングに必要なドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会（WEB開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y.
2. 発表標題 Molecular beacon imaging for energy metabolic pathway of cells.
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress, Virtual（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹花祥、村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦
2. 発表標題 モレキュラービーコン カチオン化ゼラチン複合体の調製
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会（紙上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹花祥、村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦
2. 発表標題 モレキュラーピーコン カチオン化ゼラチン複合体の作製
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会（ハイブリッド開催）
4. 発表年 2020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
研究分担者	山下 潤 (Yamashita Jun) (50335288)	東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601)	

	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
研究協力者	田畑 泰彦 (Tabata Yasuhiko) (50211371)	京都大学・医生物学研究所・教授 (14301)	

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