

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06244

研究課題名（和文）細胞と足場の物性変化フィードバック機構の解明と上皮立体構造形成への影響

研究課題名（英文）Feedback signaling mechanism between cells and scaffold in the epithelial development

研究代表者

中島 忠章（Nakajima, Tadaaki）

横浜市立大学・理学部・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）：様々な種類の上皮立体構造は外環境由来の物理的因子によって自然に形作られる共通性を持つと考えられる。一般的な組織において足場となる間質組織の環境は、基底膜を除いて、間葉系細胞が調節していると考えられている。一方で、上皮細胞と足場の力学的特性は、細胞の牽引力や足場の網目構造変化などを介して、互いにフィードバックして制御されていると考えた。本研究では、in vitro系を用いて各種上皮細胞と足場の力学的特性をデザインし、細胞と足場の力学的特性のリアルタイムモニタリング手法を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞と足場の力学的特性のリアルタイムモニタリング手法は、今回主に用いたミューラー管上皮のみならず、三胚様性の全ての上皮と足場の相互作用に応用可能であり、特に上皮構造が複雑な組織に適応することで、in vitroで上皮の形を再現することが可能になると考えられる。上皮が適切な形を取ることは、上皮の機能にも密接に関わっているため、平面での細胞培養系や、オルガノイドなどの単純な三次元培養系に比べて、より生体に近い評価系を提供できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Various types of epithelial three-dimensional structures are formed spontaneously by physical factors derived from the external environment. The components and structure of the stromal tissue which serves as the scaffold in tissues are regulated by stromal cells, except for the basement membrane. However, we consider that the mechanical properties of epithelial cells and scaffolds reciprocally communicated each other via cell traction and changes in the mesh structure of the scaffold. In this study, we designed the mechanical properties of various epithelial cells and scaffolds using in vitro systems and developed real-time monitoring methods for the mechanical properties of cells and scaffolds.

研究分野：発生学

キーワード：三次元デバイス 細胞外マトリックス 牽引力 応力 足場物性 相互作用 生殖器 子宮腺

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子工学手法が発展して以来、タンパク質などの生物学的シグナルが発生と形態形成へ与える影響について研究されてきた。近年、バイオエンジニアリング手法によって、細胞外環境の力学的特性を自在に変化させることが可能となってきた。例えば、細胞を一つのピースに見立てて足場成分と形状を自在に設計するボトムアップ組織工学手法により、管状の血管新生を模倣したり、皮膚の層構造を形成できる (Pauty et al., EBioMedicine, 2017; Yang et al., Biomaterials, 2005)。これらの方法を利用して発生現象の中核となる物理法則を発見することで、遺伝子制御以外での発生と形態形成の共通性の理解に繋がることが期待される。しかし、これら研究の多くは独立しており、ある組織の発生現象“ただ一つ”に適応することがほとんどである。

多くの組織では、様々な機能を有した上皮と、それを支える間質からなる。上皮が正しく機能するためには、適切な構造を形成している必要がある。例えば、腸上皮は内腔側に突出した絨毛構造を取り、栄養吸収の為に上皮表面積を増やす役割がある。この上皮立体構造は、近傍組織がオーガナイザーとなり、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。一方、外環境の物理作用も上皮立体構造形成に重要な役割を持つ。マウス、ニワトリ、アフリカツメガエルの腸上皮の絨毛は、平滑筋層が上皮層領域を制限し、その足場で上皮細胞が増殖した際に発生する互いに押し合う応力によって形成される (Shyer et al., Science, 2013)。また、マウス副精巣と卵管などの上皮嚢形成を数理モデル化し、上皮立体構造形成が上皮領域制限によって発生する応力に支配的であることが示されている (Hirashima, Devel cell, 2014; Koyama et al., Biophys Physicobiol, 2019; Inoue et al., Biomech Model Mechanobiol, 2020)。我々は新たにボトムアップ組織工学手法を用いて、腸上皮細胞や血管内皮細胞を *in vitro* で三次元 (3D) 的に管状に配置して培養する系を確立し、管状で培養するだけで腸の絨毛様の突起や血管新生様の陥入を誘導できることから、細胞で発生する応力が上皮立体構造形成の誘導に十分であることを証明している。このように、上皮立体構造は外環境由来の物理的因子によって自然に形作られる共通性を持つと考えられる。

一般的な組織において足場となる間質組織の環境は、基底膜を除いて、間葉系細胞が調節していると考えられている。対して、申請者の新たな 3D 管状腸モデルを用いて、上皮シートにおける応力の不均衡を生じさせると、上皮細胞はアクチンストレスファイバーを足場側に強く発現することがわかった。このことより上皮細胞が足場を牽引して足場物性を変化させると考え、管状足場の力学的特性をリアルタイムでモニタリングするシステムを開発して測定したところ、腸上皮細胞は足場のゲルの硬さを柔らかくした。このことより、上皮立体構造形成には外環境より発生する物理作用が重要であるが、外環境の物性もまた上皮細胞自身が能動的に制御している可能性が考えられる。そこで、細胞と足場の力学的特性は、細胞の牽引力や足場の網目構造変化などを介して、互いにフィードバックして制御されていると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* 系を用いて各種上皮細胞と足場の力学的特性をデザインし、細胞と足場の力学的特性のリアルタイムモニタリングを樹立することで、上皮と足場のフィードバック機構が様々な上皮立体構造形成へ与えるの影響を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 上皮細胞の作製

本研究では主に中胚葉由来であるミユラー管上皮細胞を用いた。上皮細胞にかかる力をリアルタイムで間接的に計測するためには、細胞の形を非侵襲的に観察する必要がある。*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) に、レトロウイルスを用いて膜型 EGFP を恒常的に発現させた mGE1 細胞を作製した。

ミユラー管上皮細胞を多能性幹細胞から誘導するために、iPS 細胞からミユラー管細胞への効率的な誘導方法を探索した。

#### (2) 力学特性を操作可能な 3D 培養法の構築

生体由来のメタクリロイル化ゼラチン (GelMA) を用いてゲルを作製し、GelMA に各種生体マトリックス因子を包含させてゲル化させることで、足場の組成/硬さ/物性/形を変化させる。形は平面と管状の足場を作製した。

#### (3) 上皮の立体構造と足場の力学特性の評価法の確立

膜型 EGFP を発現する上皮細胞を観察することで、上皮組織としての立体構造を観察し、上皮の凹凸を 3D 画像から評価した。細胞の形から上皮細胞にかかる力を推定した。作製したゲルにコラーゲンを包含させることで、第 2 高調波発生またはコラーゲンの免疫蛍光染色によってコラーゲンファイバーの形状を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 上皮細胞の作製

本研究では雌性生殖器官の原基となるミューラー管上皮細胞を主に用いた。そこで多能性幹細胞から雌性生殖器官原基のミューラー管と雄性生殖器官原基のヴォルフ管を誘導するために、iPS 細胞からミューラー管細胞への効率的な誘導方法を探索した。発生的な類似組織である腎臓の誘導を参考したところ、レチノイン酸を添加し、Wnt シグナルを活性化することによって、安定的に iPS 細胞よりミューラー管の前駆細胞である中間中胚葉細胞株が誘導でき、中間中胚葉細胞株の SMAD2/3 シグナルを抑制することでヴォルフ管細胞を誘導した。さらに細胞の凝集による圧力が、ミューラー管への分化に関与していることを解明し、iPS 細胞よりミューラー管上皮細胞の誘導方法を樹立した (Fig. 1; Nakajima et al., FEBS Open Bio, 2024)。

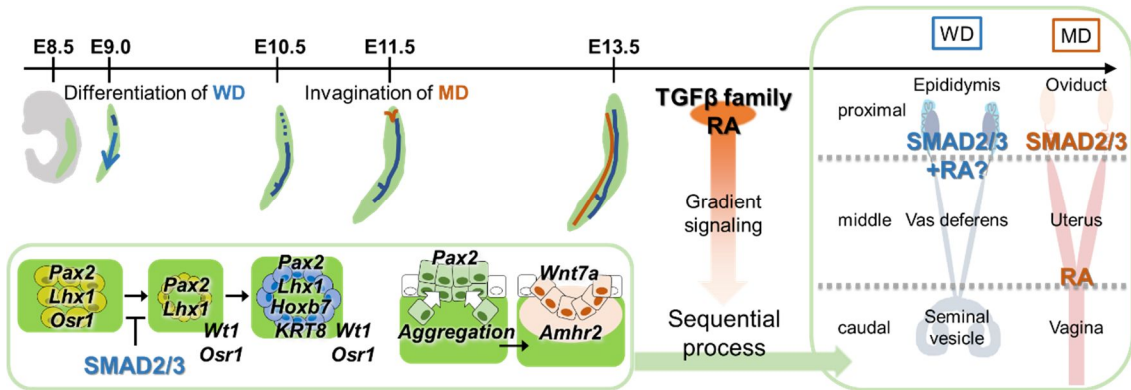


Fig. 1 ヴォルフ管とミューラー管の発生様式

##### (2) 力学特性を操作可能な 3D 培養法の構築

GelMA に対してコラーゲンを含有させることで、第 2 高調波発生またはコラーゲンの免疫蛍光染色によってコラーゲンファイバーをゲル中で検出する方法を確立し、ゲル網目構造の変化を可視化した。本研究で用いた雌性生殖器官は、同一のミューラー管から主に子宮と膣に分化する。生体組織の子宮と膣の硬さと物性を押し込み試験により測定し、GelMA の合成方法を調整することによってそれらの足場の硬さと物性を模倣することに成功した。

さらに GelMA に間質細胞を含有させると、より上皮と足場のフィードバックを観察できると考えた。しかし、間質細胞を GelMA に含有させると、間質細胞の牽引力とタンパク質分解酵素によってゲルが崩壊する。そこで表面化学的にゲルをデバイスに接着させ、タンパク質分解酵素の働きを抑制することでゲルの崩壊を抑制し、上皮と間質細胞の共培養系を樹立した。

これらの手法はガラス材料上の平面ゲル作製のみならず、シリコンデバイス上の管状ゲル作製にも応用可能であることを確認した。

##### (3) 上皮の立体構造と足場の力学特性の評価法の確立

膜型 EGFP を発現する上皮細胞を観察することで、上皮組織としての立体構造を観察し、上皮の凹凸を 3D 画像から自動で評価する画像解析手法を樹立した。間質にかかる力の測定は、コラーゲンファイバーの構成から間接的に推定可能である。

これらの結果より、ミューラー管上皮細胞を持ちいた上皮-間質のフィードバック機構を解明する手法を樹立することができた。今後は、この系を利用して各種フィードバック機構が上皮立体構造形成に与える影響を詳細に解明する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakajima Tadaaki, Imai Akihiro, Ishii Chihiro, Tsuruyama Kota, Yamanaka Risa, Tomooka Yasuhiro, Saito Shinta, Adachi Noritaka, Kohno Satomi, Sato Tomomi	4. 巻 14
2. 論文標題 SMAD2/3 signaling regulates initiation of mouse Wolffian ducts and proximal differentiation in Mullerian ducts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 37～50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13729	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島忠章、能勢咲希、松田紀香、鶴貝優梨花、佐藤友美
2. 発表標題 ER ノックアウトマウスの加齢にともなう子宮の形態変化過程の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第94 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島忠章、佐藤友美
2. 発表標題 マウス雌性生殖腺附属器官の押込応力測定による物性の推定と模倣
3. 学会等名 第47回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島忠章
2. 発表標題 ER ノックアウトマウスの加齢にともなう子宮構造の変化
3. 学会等名 日本動物学会 第93 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島忠章
2. 発表標題 三次元マウス子宮モデルを用いた子宮内腔上皮と子宮腺発生機構の解明
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021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