

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650256

研究課題名（和文）

光ピンセットを利用した細胞間相互のメカノバイオロジー

研究課題名（英文） Mechanobiology of Cell Interaction using Optical Tweezers

研究代表者

益田 泰輔 (TAISUKE MASUDA)

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：30431513

研究成果の概要（和文）：本研究では、基板に接着している細胞群を隣同士の結合状態を維持したまま剥がして基板との接着力の影響を排除し、光ピンセットを使って細胞-細胞間へ純粋に力学刺激を与える方法を提案することを目的としている。ここでは、ナノオーダーの細胞外マトリックス（ECM）膜を単一細胞表面に形成し、細胞同士の結合状態を維持させた積層細胞構造体を新たに提案し、その操作および力学刺激方法について検討した。

研究成果の概要（英文）：A rapid construction process is necessary for building up numerous cell modules into three-dimensional (3D) tissues that retain the tissue geometries and initial conditions of the cells. We proposed a new 3D assembly technique using water transfer printing to fabricate a hollow tubular tissue structure. By utilizing this assembly technique, we discuss the relationship between the 3D transcriptional body of a gel matrix and the developed shape of transferred tissue, and then fabricate a hollow tubular tissue. Simulation of the 3D environment in which tissues normally develop and function is crucial for the engineering of in vitro models that can be used for the formation of complex tissues. These artificial hollow tubular tissues could be used as in vitro simulators for drug efficiency evaluation and operative training.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：バイオ MEMS

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学，生体材料学

キーワード：バイオメカニクス，力学刺激応答，細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞を取り巻く周辺環境や細胞相互のコミュニケーションは細胞の増殖・分化・死の制御・調節をつかさどっている。生体内において細胞は運動，血流，拍動などによる力学刺激（圧縮，引張，せん断，液流，静水圧）に晒されている。細胞はこの力学刺激を感知し，応答することで組織形成および機能維持を示すことが知られている。細胞に対して力学刺激を負荷する培養方法は既に多くのものが提案され，細胞の力学刺激応答の把握に

貢献している。図1に示すように研究代表者らも，独自にメカニカルストレス培養装置を開発し，未分化軟骨細胞における分化調節機構を報告してきた（T.Masuda et al, J Biotechnol, 2008）。しかしながら，いずれの培養装置においても細胞群を播種した2次元基板を変形させ，その基板の変形量を力学刺激のひずみ量と見積もるものがほとんどである。また，それらの力学刺激は基板と細胞の接着に依存しており，隣り合った細胞同士が純粋に変形量に相当する力を受けて

いるかは不明である。本研究では、基板に接着している細胞群を隣同士の結合状態を維持したまま剥がして、細胞-細胞間に力学刺激を与える方法（細胞-細胞間力学刺激モデル）を提案することを目的とする。また、力学刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度計測および細胞骨格の変形から、細胞-細胞間の相互応答の評価を行う。

2. 研究の目的

(1) 細胞-細胞間力学刺激モデルの確立

力学刺激は組織レベルでは組織形成や機能維持に影響を与え、細胞レベルでは分化方向や代謝を変化させることが知られている。間葉系細胞の分化においても、個々の遺伝的発現へ影響を与え、種々の個体差を生み出す一要因であると考えられている。本研究では、ナノオーダーの細胞外マトリックス (ECM) 膜を単一細胞表面に形成し、細胞同士の結合状態を維持させた積層細胞構造体を新たに提案することを目的とする。

(2) 循環培養系を用いた細胞のメカニカルストレス (力学刺激) 応答

心臓、肺、食道など生体内の組織には中空構造を持った組織が多くみられる。中でも生体内の管状中空構造体として代表的な血管は、酸素や栄養分、老廃物を全身へ輸送させるための単なる仲介組織 (器官) ではなく、血行不良や血管病変が循環器系疾患に直結する健康の指標になる組織である。その管壁や管径の大きさは様々であるが、昨今の BioMEMS やマイクロ流体チップを用いた研究の発展により、毛細血管レベルのマイクロメートル径の血管新生は生体外環境で実現している。しかしながら、ミリメートルを超える血管組織構造体を作製する技術は散見されない。ミリメートルを超え、多層構造を有する血管組織構造体を構築するためには、従来のようなビルドアップの組織構築法ではなく、新規の三次元アセンブリ技術が期待されている。本研究では、新たに提案する積層細胞構造体を管状構造にアセンブリし、作製した管状組織構造体による循環培養システムの構築、ならびに管状細胞構造体に対する加圧ならびにせん断力などの機械的力学負荷による力学刺激応答評価系の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞-細胞間力学刺激モデルの確立

細胞同士の結合状態を維持させた積層細胞構造体は、Layer-by-Layer (LBL) 法を用いて作製した。LBL 法とは、正および負電荷を有する物質に対して、静電相互作用を利用して交互に積層する方法であり、常温・常圧下において数ナノメートルオーダーで均一

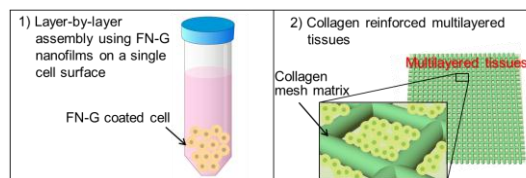


図1 細胞同士の結合状態を維持させた積層細胞構造体の作製コンセプト。

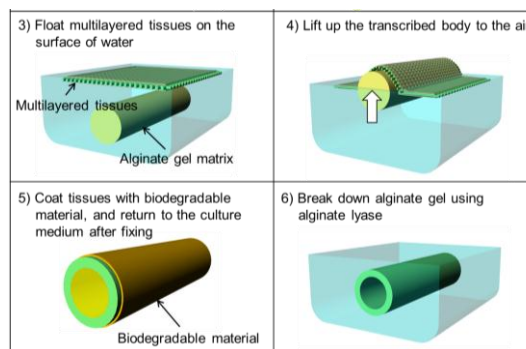


図2 水圧転写技術を利用した管状組織構造体の作製コンセプト。

な膜が得られる。ここでは、積層細胞を構成する一つ一つの細胞表面にナノオーダーの細胞外マトリックス (ECM) 膜を形成し、細胞間相互作用を促進するために用いた。ECM 膜はフィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) から構成されており、0.04 mg/ml FN/Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH=7.4) 及び 0.04 mg/ml G/Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に細胞を交互に浸漬することにより細胞表面に形成した。(図1) 細胞は、正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (NHDF) を使用し、 1.9×10^6 cells/well の細胞密度で約 50 μ m 程度の積層細胞を得られるように播種した。NHDF はメッシュタイプのコラーゲンマトリックスと同時に使用することにおいて、強度の維持ならびに収縮の抑制を期待した。作製した積層細胞は、4日間培養後にメンブレンから剥離し回収した。

(2) 循環培養系を用いた細胞のメカニカルストレス (力学刺激) 応答

まず、管状組織構造体は、水圧転写技術を利用して作製した。水圧転写技術は、特殊フィルムを水面に浮かべた後、被転写体をその上方から押し入れることにより、表面張力や水圧を利用して成形体表面に印刷模様層を転写する方法である。この方法を用いることにより、凹凸を持つ複雑な三次元曲面を有する形状の成形体に均一に模様を転写できる。上記 (1) で作製した、積層細胞構造体を三次元曲面に転写し、管状組織構造体をアセン

ブリするコンセプトを図2に示す。従来の水圧転写法は、疎水性の印刷模様層を持つ特殊フィルムを液面に浮かべ、上方から被転写体を押し入れるものがほとんどである。一方、我々が提案する積層細胞転写法は、細胞表面が親水性であることや積層細胞の剛性を考慮し、水圧転写とは逆に液面から転写体である積層細胞を引き上げるものとする。まず、積層細胞を気液界面に広げた状態で浮かべ、アルギン酸ナトリウムを塩化カルシウムによりゲル化させ被転写体を作製し液中へと沈める。そして、被転写体を液体中から空気中へと引き上げることで、積層細胞を三次元的な曲面を持つ被転写体の表面に転写させる。次に再び液体中にアセンブリした組織を戻した際、積層細胞が剥がれてしまうことがないように積層細胞表面に生分解性高分子材料を被覆する。これにより、積層細胞を転写した状態で固定する。最後に、アセンブリした組織を培地中へと戻し、一定期間培養することで積層細胞の端に位置する細胞をもう一方の端の細胞と接着するのを待つ。その後、アルギン酸ゲルで作製した被転写体を犠牲層としてアルギン酸リアーゼで分解し、管状組織構造体を作製する。

積層細胞転写法によって形成した積層細胞を転写させる場合、被転写体には剛性が必要である。そこで、二重構造にしたガラス管を用いた。積層細胞転写法によって外側の2本のガラス管を連結させるように気液界面より積層細胞を引き上げた後、内側のガラス管を引き抜くことによって、管状組織構造体を作製した。構築した管状組織構造体は形状を維持したまま外部ポンプならびに培養器と接続され、循環培養を行った。培養器は、実態共焦点顕微鏡による蛍光観察、圧力センサによる組織内圧制御を可能とし、循環培養と同時に組織内細胞の観察及び評価が可能なシステムを構築した(図3)。アセンブリされた管状構造はコラーゲンゲルで包埋され生理的環境に近い3次元状態を維持した。

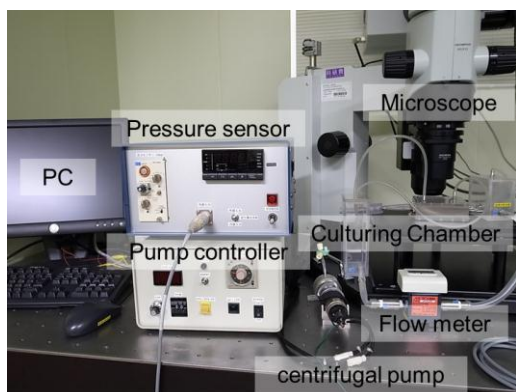


図3 拍動ポンプならびに圧力センサを搭載した循環培養システムプラットフォーム

4. 研究成果

(1) 細胞-細胞間力学刺激モデルの確立

培養後、メンブレンから積層細胞を剥離する前と剥離した後の写真を図4に示す。作製した積層細胞の形状を計測した結果、メンブレンから剥離する前の形状が10 mm×6.2 mmに対し、実際に回収できた積層細胞の形状は平均9.5 mm×6 mmであった。わずかな収縮がみられるものの大きな変形はみられなかった。LBL細胞積層法にて細胞外マトリクスであるフィブロネクチン-ゼラチンのナノ薄膜を表面に被覆した細胞は、薄膜を介した細胞間相互作用を顕在化し、多層構造を有する積層細胞を構築することができた。

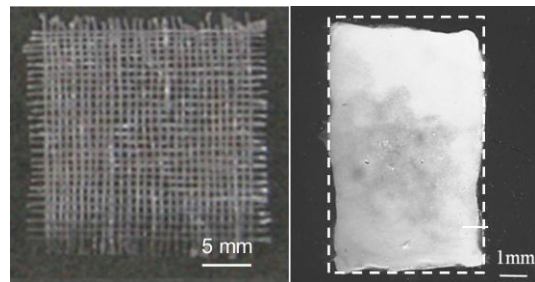


図4 LBL法による細胞同士の結合状態を維持させた積層細胞構造体。

(2) 循環培養系を用いた細胞のメカニカルストレス(力学刺激)応答

作成した15 mm×15 mmのサイズの積層細胞を気液界面に移し、自動ステージ(SIGMA工機, SGSP20-85(Z))を用いて25 mm/secの一定速度で被転写体を液面垂直方向に引き上げる。こうすることで、図5に示すように積層細胞を被転写体に転写した。積層細胞を用いることによって、ミリメートルオーダーの大きさを有する多層構造の管状組織を短時間で作製することができた。

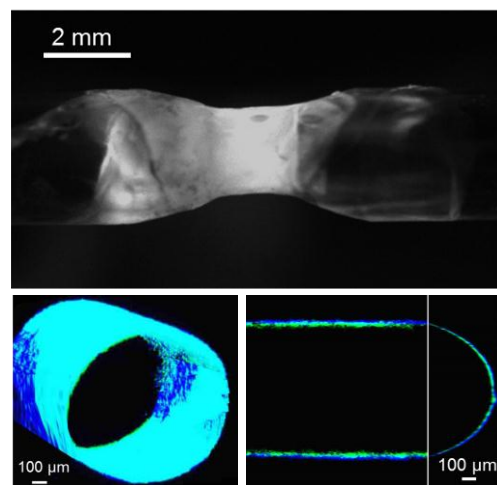


図5 水圧転写技術を利用した管状組織体の作製。直径1.8 mm, 長さ3 mm.

また、ポンプシステムにより管状組織構造体内を循環させることによって生体内の流れを再現し、管空構造が培養チャンバ内において長期維持されることを確認した(図6)。培養チャンバに接続された管状組織構造体に対して、直径方向への伸びから血管様管状組織構造体に印加される内圧を計測することによって、チューブ組織のヤング率を見積もったところ、作製した管状組織構造体のヤング率は約45 KPaであることが示された(図7)。このことから、構築した循環培養システムにおいて定量的な力学刺激を負荷し得ることを意味し、それと同時に三次元アセンブリした組織の機械的・生物学的特性の評価系として有用であることが示された。

血管、なかでも動脈は、その力学的特性が循環系に大きな影響を与えることが知られている。従来、様々な部位や病態における力学的特性が様々な方法で調べられてきた。一方、血管は血流や血圧の変化に応じて能動的に自らの形態や力学特性を変化させる力学的適応現象を示すため、そのメカニズムを探る研究も少なからず行われてきた。そして円周方向応力や壁せん断応力が血管の形態と力学特性の維持に密接に関連していることが明らかとなってきた。本研究では、ミリメートルを超え、血管同様の多層構造を有する管状組織構造体を構築し、従来の力学刺激培養とは異なる手法を提案した。当初予定していた、光ピンセットを利用した力学刺激培養法から管状組織に対して力学刺激を与えることにより、より生体環境に類似した環境場を提供できるようになり、これまで見落とされていた力学刺激による細胞応答への発見につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Y. Yamagishi, T. Masuda, N. Takei, et al, Three-Dimensional Assembly of Multilayered Tissues, *Procedia CIRP*, 5 (2013) 201-204, 査読有.
- ② T. Masuda, N. Takei, T. Nakano, et al, A microfabricated platform to form three-dimensional toroidal multicellular aggregate, *Biomedical Microdevices*, 14 (2012) 1085-1093, 査読有.

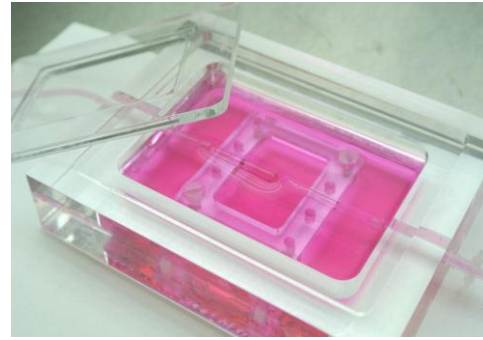


図6 循環培養システムの構築. 管状組織構造体に繋がるガラス管接続したペリスタポンプを用いて送液 20 μ L / min.

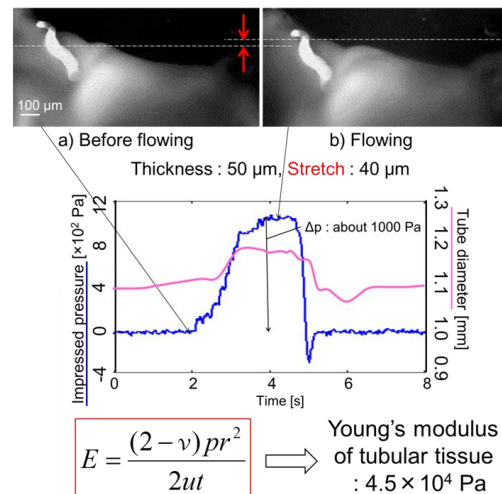


図7 循環培養システムの構築. 管状細胞構造体への印加圧による機械的特性評価.

[学会発表] (計4件)

- ① T. Masuda, et al, Rapid construction of multilayered tissues on curved substrate by water transfer printing, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (2012.11.1) Okinawa, Japan.
- ② 益田泰輔, バイオ MEMS を用いたマルチスケール細胞操作, 第9回バイオレオロジーリサーチフォーラム(招待講演), (2011.6.2) 大阪府.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

益田 泰輔 (MASUDA TAISUKE)
名古屋大学・大学院工学研究科・特任助教
研究者番号：30431513

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし