

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360341

研究課題名(和文) 培養組織を用いた薬効評価系の構築

研究課題名(英文) In vitro assay system for evaluating curative effect of myoblast sheet transplantation

研究代表者

紀ノ岡 正博(KINO-OKA, Masahiro)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40234314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：患者から筋芽細胞群を単離し，増幅，シート形成した後，拡張型心筋症等の心疾患へ移植する再生医療が注目される．再生医療製品の製造工程において薬効評価手法は未熟であり，産業化を妨げる．本研究では移植場における筋芽細胞群と血管内皮細胞のコミュニケーション(パラクライン)による血管新生イベントを解析可能なバイオアッセイ系の構築を行った．移植場を模倣した共培養系を用いることで，移植材形成時の細胞播種密度，シート積層数，繊維芽細胞の混入比率などが，移植材内部の細胞流動性，内皮細胞の伸展，遊走，衝突，接着頻度，接着能などの変化を介して，移植材内部での血管内皮ネットワーク形成に影響を及ぼすことが明らかになった．

研究成果の概要(英文)：Autologous transplantation of myoblast sheet has attracted attention as a new technique for curing myocardial infarction. Myoblast sheet has the ability to secrete cytokines which improve heart function via the facilitation of angiogenesis on affected part. To understand in vivo phenomena and evaluate curative effect after transplantation such as cytokine secretion from transplant and its angiogenesis capability, a multi-layered cell sheet of human skeletal muscle myoblasts (HSMMs) was constructed by originally equipped gelatin stamp system. In the HSMM sheet, active cellular migration occurred in the horizontal and vertical directions anywhere, revealing the sheet fluidity. Dynamic behavior including collective migration and spatial habitation of heterogeneous cells, such as human skeletal muscle fibroblasts (HSMFs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), in the fluidic scaffold was clarified.

研究分野：工学

キーワード：細胞シート 筋芽細胞 血管新生 細胞アッセイ 流動性

1. 研究開始当初の背景

「再生医療」は、従来の薬物治療や臓器移植医療では治療できなかった組織・臓器の損傷並びに難病の根本的な修復・再生を行うこととして期待されている。しかし、細胞製造に関する工程管理ならびに品質管理に関する技術構築が不十分で、より一層の技術構築が望まれている。特に、再生医療製品としての移植材に対する薬効評価手法が未熟で、品質での薬効が曖昧であるため、産業化を妨げている。一方、移植材をを新規薬剤の薬理的応答可能な生体素子としてみならず、創薬スクリーニングへも期待でき、工学的観点からの貢献が不可欠である。

2. 研究の目的

移植材として注目されている培養組織の機能(薬効)評価可能な方法論の構築を目指す。動物個体への移植評価(*in vivo*系評価)では、細胞レベルでの評価が困難であり、解析能の限界を補う動物代替法(*in vitro*系評価)が注目されている。しかし、従来法の多くは、創薬スクリーニングのためのバイオアッセイであり、移植材(培養組織)と被移植部位のクロストークなど、*in vivo*および*in vitro*系評価の解析ギャップを埋める新規な薬効評価動物代替モデルが望まれている。そこで、本研究では、移植部(移植材として有望な筋芽細胞積層シート)と培養床(血管内皮細胞を含む繊維芽細胞積層シート)からなる培養フォーマットにて、血管ネットワーク形成の広範囲かつ時空間的解析法による検証法の構築を試みる。

特に、心疾患を対象とした筋芽細胞シートを対象に行う。このシートは、患者の骨格筋から筋芽細胞群(骨格筋筋芽細胞および骨格筋線維芽細胞からなる)を単離し、増幅、シート形成した後、心臓患部へ移植する再生医療である。その際、移植材としての筋芽細胞群シートの薬効は、図1上に示すように、移植後、血管新生を促進するサイトカイン群(Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)やHepatocyte Growth

Factor (HGF))が移植材から分泌され、いわゆる、そのパラクライン効果により、血管新生が促進され、疾患部における血流改善を経て、結果、心機能が回復すると考えられている。よって、筋芽細胞群シート移植の治療効果には、血管内皮細胞の遊走性が促進、健全部(移植床側)から患部や移植材へと初期ネットワーク形成といった一連の内皮細胞挙動が重要と考えられる。本研究では、筋芽細胞群と血管内皮細胞のコミュニケーション(パラクライン)を解析可能なテンプレートを対象とし、患部での環境を模倣したバイオアッセイ系構築、つまり、移植材(充填細胞)と被移植部位(床)のパラクラインを考慮した“培養フォーマット”と、その解析手法としての“解析

フォーマット”を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

基本とする培養フォーマットは、骨格筋筋芽細胞群(充填細胞、骨格筋筋芽細胞(Human skeletal muscle myoblasts, HSMM)および骨格筋線維芽細胞(Human skeletal muscle fibroblasts, HSMF)を含む)からなる移植材としての「細胞シート(充填細胞の板状集塊)」, 患部を模倣した移植先の床としての「培養面」、床に存在する血管を模倣した培養面上の「ヒト臍帯血由来血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, ターゲット細胞)」, 床における血液等の培養環境を模倣した「培地」の4要素からなる(図1下)。ここでターゲット細胞は挙動を追跡・解析する対象によりHSMMおよびHSMFとする場合もある。培養フォーマットは、図2に示すように、スタンプを含む種々の治具と手順により形成した論文<sup>3</sup>。まず、ゼラチンスタンプ作成として、シリコン製シートを下に敷いた型枠にゼラチン溶液を流し込む、スタンプを配置しゼラチンを固定化、型抜き台を使い、型抜き、ゼラチンスタンプを形成した積層細胞シートの形成のために、予めCell Tracker Orangeで染色した筋芽細胞群を24ウェル温度応答性培養皿(UpCell, セルシード)

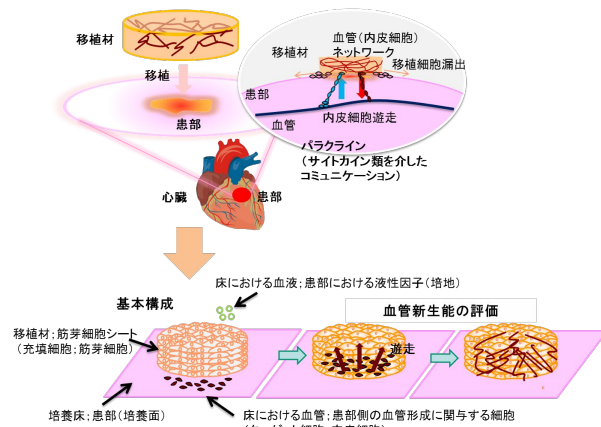


図1 積層筋芽細胞シートを用いた培養フォーマット

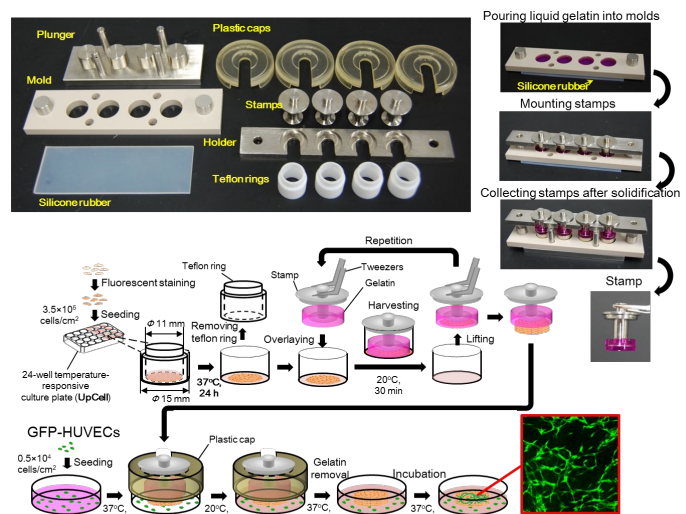


図2 積層筋芽細胞シートを用いた培養フォーマット

内に播種し培養し、前述のゼラチンスタンプをウェル上に置き、20 の低温インキュベータにて、静置した。引き揚げたスタンプを別のウェルに移し、これを繰り返すことで、積層細胞シートをスタンプ底面に形成した。最期に直径 35 mm のディッシュ上に転写用ふたを用いて重ねた。ここで必要に応じて GFP を恒常発現する、あるいは Cell Tracker Green 染色されたターゲット細胞を予め播種し培養した。この容器を 20 にて放置し、細胞シートを培養面へ接着させた後、37 にてゼラチンを溶解、溶解したゼラチンを含む溶液を除去し、新鮮培地を添加し培養を開始した。

解析フォーマットとして、充填細胞およびターゲット細胞の組織内挙動を定性的・定量的に解析することを目的とし、HUVEC、HSMM、HSMF の挙動(細胞形態、遊走速度、集塊形成、組織内局在)を蛍光顕微鏡や共焦点レーザー走査型顕微鏡で継時的に観察するとともに、それらの細胞挙動を定量的に解析可能とするため、細胞シート内におけるターゲット細胞の鉛直方向分布を求める方法<sup>論文2</sup>、細胞シート内における充填細胞の鉛直方向への流動性を分子拡散とのアナロジーにて見かけの拡散係数として算出する方法<sup>論文2</sup>、形成された内皮細胞ネットワークの長さや端点数からネットワーク成熟度を算出する方法<sup>論文4</sup>、シート内における充填細胞の実細胞密度を算出する方法、などをそれぞれ画像処理により構築した。また充填細胞のサイトカイン産生能を、ELISA によって定量した単位時間当たりの培地中蓄積濃度を存在細胞数で割ることで評価した。

#### 4. 研究成果

まず充填細胞である HSMM 群シートの特性を把握するため、タイムラプス共焦点レーザー走査型顕微鏡観察を行ったところ、組織は細胞遊走を源とする流動性を有していることが明らかになった。この“動く足場”の流動性を見かけの拡散係数を用いて評価したところ、HSMM 群に含まれる繊維芽細胞の比率に応じて流動性が変化した。特に、線維芽細胞比率 25 % では 0 % よりもシート全体としての流動性が高くなり、50 % では低下した。次に、これらの条件下における HSMM と繊維芽細胞のそれぞれの見かけの拡散係数を算出したところ、HSMM の拡散係数は繊維芽細胞比率に影響されない一方、繊維芽細胞では比率 25 % では拡散係数が高く、比率 50 % では拡散係数が低下していた。つまり、繊維芽細胞の組織内遊走速度がその混入比率に応じて大きく変化することで、組織全体の流動性の変調が引き起こされていることが示唆された(紀ノ岡ら)。次にシート形成の際の HSMM の播種密度の変化が流動性に与える影響を評価した。播種密度が大きいほど、形成された組織内の単位空間当たりの実細胞密度は上昇することが見出され、また、この実細胞密度の上昇に伴いシートの流動性

が低下することも明らかになった。

HSMM 群シート内に含まれる異種細胞(HSMF, HUVEC)の挙動(遊走、接着、棲み分け)をよ

り詳細に把握することを試みた。充填細胞底部に配置するターゲット細胞の播種密度を変化させることで、ターゲット細胞が単独で存在する条件と周囲の細胞と接着して存在する条件をそれぞれ準備し、上部に HSMM 群シートを配置することで共培養を開始した。ターゲット細胞の種類および初期細胞密度により異なった空間的な棲み分けが観察された。HSMF は、播種密度に応じてシートの上下部、下層部にそれぞれ局在し、下層部への局在は HSMF 同士が XY 方向に密に結合した集団形成を伴った。シート上部に達したターゲット細胞は、他細胞と連結しない単独状態で Z 方向へ速やかに直線的に遊走し、シート上部に達する極めて特徴的な挙動を示すことが明らかになった(図 3)<sup>論文2</sup>。HSMM 群シート内における HSMF の挙動の理解は、前述の線維芽細胞比率が異なるシートで見出された流動性の変調に関する解釈も補完するものであった。

HUVEC は HSMM シートの配置(共培養開始)直後から細胞形態が伸展し始め、近傍の HUVEC との接着・連結を伴いながら Z 方向へ緩やかに遊走し、初期細胞密度に応じて、積層 HSMM シートの上部、中層部にそれぞれ局在し、上部の細胞は島状の細胞集塊を、中層では XY 方向に広がった内皮ネットワークの形成を伴った(図 4)。積層中間層に達するまで網状構造を形成した HUVEC は Z 方向への物理的な抵抗が生じ中層部への局在に

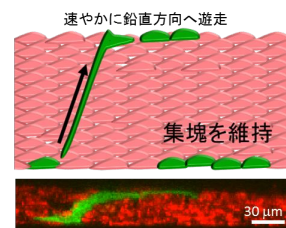


図3 HSMFの棲み分け挙動

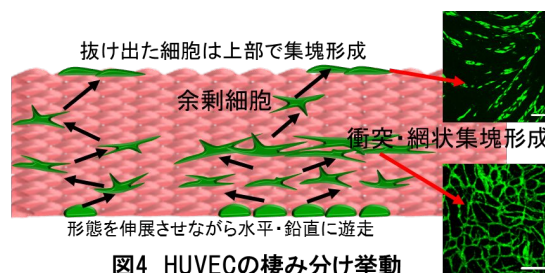


図4 HUVECの棲み分け挙動

至ったと解釈された。一方、周囲の細胞と連結しなかった HUVEC は上部に抜け出したものと考えられた<sup>論文4</sup>。細胞シートの積層数を変えることで組織厚みを変化させたところ、シート厚みが十分でない場合には HUVEC は素早く上部へ抜け出し(図 5)組織内で HUVEC 同士が接触・接着するまでの時間を細胞密度や組織の厚みにより確保することが重要であることが示された<sup>論文3</sup>。前述した HSMM 群の播種密度を変えたシートにおいて、流動性が高い条件では HUVEC の伸展が活発になり、鉛直方向への遊走速度は高く、シート上部に

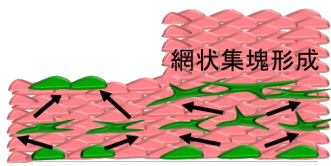


図5 シートの厚みの影響

は低下すると共に、HUVEC の伸展が少なく網状集塊がシートの底部に局在することが明らかになった。

HSMM 群シート内部における HUVEC の網状集塊の形成プロセスは、一般的な血管新生モデルとして広く用いられているマトリゲルやコラーゲンゲルの上面や内部で観察される内皮細胞ネットワーク形成プロセスとは大きく異なり、HUVEC の伸展、遊走、衝突、接着、脱接着の繰り返しを伴うダイナミックな挙動からなっていた。長期間の共培養では HUVEC 同士が脱接着し、単独状態となった HUVEC は再び上方向への遊走を開始し、網状集塊の崩壊をもたらすことが明らかになった。内皮細胞間接着を強固にすることが知られる bFGF(basic fibroblast growth factor)を培地中に添加したところ、より長く連結した網状集塊の形成・維持が観察された。

移植剤の形成において、HSMM 群に混在す HSMM と HSMF の混在比率は採取部位や患者間、培養の過程で変動する。HSMF 比率を変化させた結果、VEGF 生成能は、HSMF が混入することで急激に上昇し、混入比率 15% をピークに減少に転じることが明らかになった(図 6)。HSMM 間では細胞間接触阻害による VEGF 生成能の低下が発生しており、微量に混入した HSMF のシート内での速く活発な遊走がこの接触阻害の解除に寄与していることが示唆された。HSMM 群シートは移植時に積層されるため、この層数によって移植材としての性能に差異を生じるかを検討した。積層数が増えるに従い VEGF 生成能は上昇するのに対して、HGF 生成能は低下し、異なる傾向を示した(図 7)。同時に、培地中乳酸濃度の上昇が観察され、シート積層により低酸素応答が生じている事が示唆された。

以上の実験により得られた結果を、移植材性能評価の観点で考察する(図 8)。血管新生は安定血管に対して血管新生因子が作用し、血管内皮細胞の接着がルーズになる初期過程に続き、内皮細胞の増殖、虚血部への連結を伴った遊走、内皮細胞同士の接着安定化・遊走停止からなる。つまり、内皮細胞同士の接着の緩和と安定化の相反するプロセスが秩序だてて行われる。筋芽細胞群シート移植に伴う血管新生プロセスにおいて、内皮細胞を移植材内部に引き込む初期プロセスでは、移植材の流動性(内皮細胞の走り込みやすさ)および血管新生因子の分泌量(内皮細胞の遊走活性化)が影響を与えると考えられ、その足場の流動性には線維芽細胞の混在比

抜け出る細胞の割合は高まった。流動性が低い条件では HUVEC の伸展は抑制され、遊走速度

率や組織内の実細胞密度が、血管新生因子の分泌には繊維芽細胞の混在比率や移植組織の厚みが影響することを明らかにした。移植材内部に内皮細胞の網状構造が構築されプロセスにおいては、移植材内部での内皮細胞同士の接触頻度が重要であり、内皮細胞の細胞密度、形態の伸展、近傍細胞と接触するまでの時間の確保(組織厚み)等が必要である。形成された内皮細胞の網状集塊では内皮細胞の遊走は活性な状態が続いており、安定した集塊を形成するには内皮細胞の遊走を抑えるため、例えば内皮細胞間接着を強める因子や組織流動性を低下させる因子の作用は有効である。以上のように、移植組織内における細胞挙動やこれに伴う液性因子の分泌量の変化を詳細に理解し、現象の解明・設計を行うことが有効である。一方で、関与する

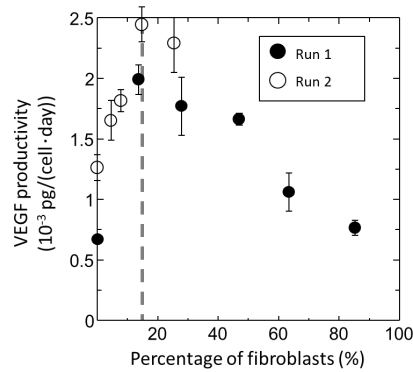


図6 HSMFの混在比率がVEGF生成能に与える影響

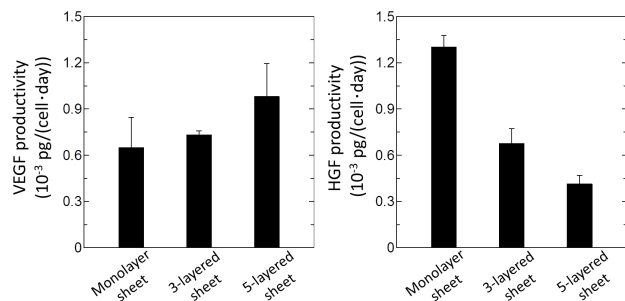


図7 シート積層数がVEGF, HGF生成能に与える影響

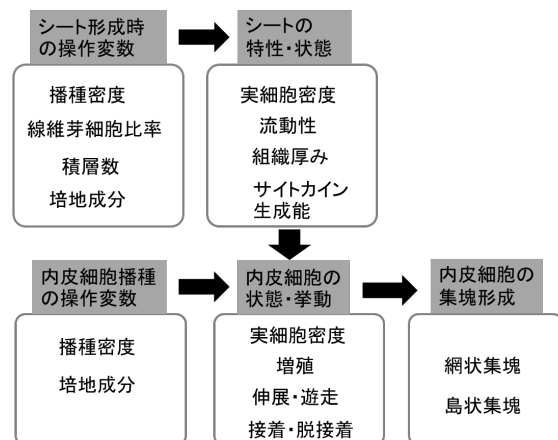


図8 HSMM群シート・内皮細胞の特性・挙動に関わる因子

因子は多岐にわたり、複雑なプロセスとなる。以上のように、組織内における異種細胞の遊走や細胞間接着を理解することは、自己組織化現象からなる生体組織を模倣することにつながり、移植材や創薬スクリーニングツールとして活用へも期待できる。本研究で構築した培養および解析フォーマットはパワフルなツールとして機能することが期待される。図9に示すように、球状集塊は、その形成手段は簡易であるものの、集塊に厚み（数百 $\mu\text{m}$  オーダー）があり、集塊内での血管ネットワークなど複雑な（無秩序な）模様を解析する際、3次元解析が必須となる。一方、積層細胞シートなどの板状集塊は、秩序をもつ培養フォーマットであり、組織の厚みが数十 $\mu\text{m}$ 程度と薄く、内部での細胞挙動は3次元であるものの、解析的には厚み方向（Z方向）と平面方向（XY方向）の1+2次元と次元を下げ解釈できるため、定量解析に強みを有していると考えられる。評価テンプレートの構築には、培養フォーマットと解析フォーマットを合わせて構築する必要があり、今回提案した技術は、今後、簡便な手法として広く活用されることを期待できる論文<sup>1</sup>。

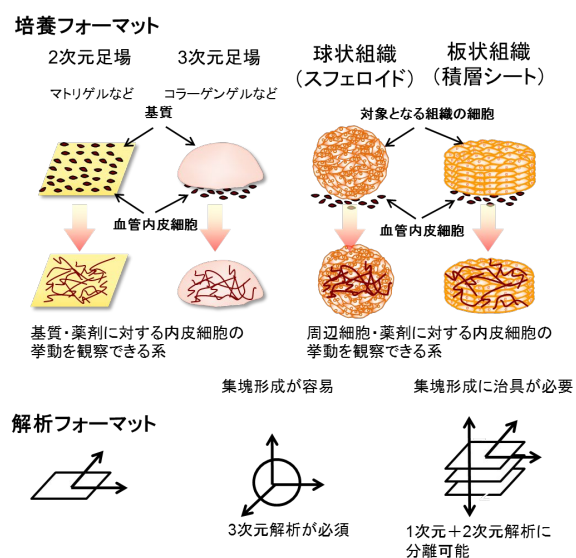


図9 三次元挙動理解のための培養および解析フォーマット

## 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4件)

Trung Xuan Ngo, Eiji Nagamori, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Masahito Taya and Masahiro Kino-oka, In vitro models for angiogenesis research: a review, International Journal of Tissue Regeneration, 査読有, Vol. 5, No. 2, pp. 37-45, (2014)

Eiji Nagamori, Masashi Oda, Tadashi Nakamura, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano and Masahiro Kino-oka, Spatial habitation of heterogeneous cell population in a multi-layered myoblast sheet due to the differences in their behaviors of migration and cell-cell connection, Curr. Nanosci., 査読有, Vol. 10, No. 2, pp. 173-178, (2014) DOI:10.2174/1573413709666131128235413

Trung Xuan Ngo, Eiji Nagamori, Tetsutaro Kikuchi, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Masahito Taya and Masahiro Kino-oka, Endothelial cell behavior inside myoblast sheets with different thickness, Biotechnol. Lett., 査読有, Vol. 35, No. 7, pp. 1001-1008, (2013) DOI:10.1007/s10529-013-1174-x

Eiji Nagamori, Trung Xuan Ngo, Yasunori Takezawa, Atsuhiko Saito, Yoshiki Sawa, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Masahito Taya and Masahiro Kino-oka, Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet, Biomaterials, 査読有, Vol. 34, No. 3, pp. 662-668, (2013) DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.08.055

[学会発表](計26件)

長森英二, 岩田利彦, 紀ノ岡正博, 移植用筋芽細胞群シート形成時に存在する変数がサイトカイン生成能に与える影響, 化学工学会第80年会, 2015.3.19-21, 芝浦工業大学豊洲キャンパス(東京都・江東区), 口頭発表

Trung Xuan Ngo, Eiji Nagamori and Masahiro Kino-oka, Endothelial cell behavior inside myoblast sheets with different thickness, Termis 2014EU Chapter Meeting, June 10-13, 2014, Genova, Italy, Poster presentation

長森英二, 大澤堯輝, 紀ノ岡正博, bFGF添加による細胞シート内における内皮ネットワーク形成の結合安定化と伸長, 第65回日本生物工学会大会, 2013.9.18-20, 広島国際会議場(広島県・広島市), ポスター発表

Eiji Nagamori, Masashi Oda and Masahiro Kino-oka, Spatial habitation of umbilical vein endothelial or fibroblast cells in multi-layered myoblast cell sheet, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Nov 27-30, 2012, Nagoya, Japan, Poster presentation

Trung Xuan Ngo, Eiji Nagamori, Masahito Taya and Masahiro Kino-oka, Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Nov 27-30, 2012, Nagoya, Japan, Poster presentation

長森英二, 紀ノ岡正博, 積層細胞シート内の血管内皮ネットワーク形成や局在に影響を与える物理的要素, 化学工学会第44回秋季大会, 2012.9.19-21, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市), ポスター発表

〔図書〕(計2件)

紀ノ岡正博, 長森英二, シーエムシー出版, 幹細胞医療の実用化技術と産業展望, pp. 143-148, (2013)

紀ノ岡正博, 学研メディカル秀潤社, 細胞工学, Vol. 32, No. 1, pp. 108-115, (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

紀ノ岡正博 (Masahiro KINO-OKA)

大阪大学大学院工学研究科

研究者番号: 40234314