

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680050

研究課題名(和文)細胞外動的硬さ環境のインビトロ構築とその細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)Development of in vitro models of extracellular environments and their applications to cell function study

研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50551173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞外環境が細胞機能に与える影響を定量評価するための新しい実験系の構築を目指した。まず種々の機能性材料(ハイドロゲル、脂質膜など)を駆使し、硬さや接着分子密度などが制御可能な細胞外環境モデル基板を構築した。そのモデル基板上で起こる様々な細胞応答(接着力、細胞膜形状など)を、独自の光技術により定量計測できることを示した。さらに、この新しい実験系を駆使することで、組織形成やがんの転移を誘導する細胞-外部環境間の力学的相互作用について定量的知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：New experimental platforms for the quantitative evaluation of the influence of extracellular environments on cell functions have been developed. This platform utilizes hydrogel or lipid membrane substrate with tunable mechanical and biochemical cues. It was successfully demonstrated that various cell responses (e.g., adhesion strength and local cell membrane structure) to the substrate as in vitro models of extracellular environments could be evaluated by using our original optical methods. Finally, the systematic measurements by using the experimental platform could provide quantitative insights into the cell-environment mechanical interactions that promote cancer metastasis and tissue formation.

研究分野：生物物理化学

キーワード：細胞接着 細胞力学 光計測 高分子基板 がん細胞 細胞組織形成 ソフトマター 脂質膜

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、細胞が接着を介して、周辺環境の生化学的特性や“硬さ”を敏感に認識し、その機能(分化・走行性など)を決定していることが明らかとなってきている。実際、生体内の細胞外環境は動的に変化しており、それにより細胞の様々な振る舞いが誘導されている。例えば、酵素による細胞外基質の分解は腫瘍細胞が移動する際のキーステップである。他にも、心筋梗塞や肝硬変など、疾病において細胞外環境の変化が細胞機能に影響を与えるケースは多岐に渡る。このような細胞外環境が細胞機能に与える影響を理解するために、これまで、生物から抽出した材料(例:ゼラチン、マトリゲル)がインビトロでの細胞足場基板として盛んに使用されてきた。しかし、これら生物由来の材料の場合、硬さや接着分子など、細胞機能に影響を与える環境因子を厳密に制御することが困難であるため、外部環境が細胞機能に与える影響を定量評価することはできない。また、細胞は接着を介して外部環境の特性を感知するため、細胞-外部環境間接着を定量評価することは、細胞の力学知覚から機能発現へ至るプロセスを理解する上で重要である。しかし、細胞レベルでの接着性を定量的・系統的に評価する実験手法が欠けていたため、細胞-外場間の力学的相互作用と、それにより発現する細胞機能との間にどのような相関があるかは殆どわかっていない。以上の背景から、外部環境が細胞機能に与える影響を定量的に理解するためには、従来法の枠組みを超えた新しい実験システムの構築が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、種々の機能性材料を駆使して細胞外環境のモデルをインビトロで構築し、その上での様々な細胞応答を光技術により定量計測する新しい実験系の構築を目指した。特に、環境因子として硬さ(ヤング率, E)や接着分子の密度などを自在に制御できる細胞外環境モデルの開発に取り組んだ。また、先端的光技術による細胞接着の定量評価法の開発も行った。以上の細胞外環境モデルと光計測法を組み合わせ、単細胞から多細胞系まで、外部環境が関与する様々な細胞応答を定量評価することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 機能性材料による軟組織および硬組織のインビトロモデルの構築

本研究では、軟組織と硬組織の硬さ(ヤング率, E)を模倣可能な、細胞外環境のインビトロモデル基板の設計・構築に取り組んだ。それぞれの硬さ領域を模倣するために、軟組織モデルにはハイドロゲル、硬組織化モデルには疎水性ポリマーを用いた。また、それぞれの基板表面には、接着分子を化学修飾または物理吸着させ、硬さと接着分子を独立に制

御するための手法の確立を目指した。

(2) 細胞接着を定量評価するための新規光計測法の開発と応用

細胞は、接着を介して外部環境と力学的に相互作用しつつ、単細胞から多細胞に至る組織形成を成し遂げている。これまで、このような細胞接着機構を理解するために、主に要素還元的アプローチにより、様々な接着分子やモータータンパク質が同定されてきた。しかし、生体内の細胞には、引力だけでなく斥力も含めた力学的相互作用が協同的・競争的に働いており、その総和として細胞組織化に最適な接着強度が決定されている。しかし、細胞組織化に資する細胞レベルでの接着強度は、定量測定技術の欠如から明らかになっていない。そこで本研究では、1細胞レベルでの接着強度の定量評価するための光技術の開発を目指した。具体的には、細胞-基板間の物理接触を可視化する光干渉法の開発に取り組んだ。また、近年筆者が開発したレーザー衝撃波による細胞-基板間の接着強度測定法を様々な細胞外環境モデル上での細胞計測に応用することを試みた。

(3) 細胞外環境モデル上での細胞および組織機能の定量計測

上記(1)(2)で開発した実験システムを用いて、物理的・化学的に定義された環境下での細胞応答の計測を行った。特に外部環境が細胞機能に顕著な影響を与える生命現象として、臓器形成とがん転移に着目し、医学研究者との連携の元そのメカニズムに迫った。

4. 研究成果

(1) 機能性材料による軟組織および硬組織のインビトロモデルの構築

軟組織環境のモデルについては、合成高分子であるポリアクリルアミド、または生体高分子であるゼラチンをベースとしたハイドロゲル基板を構築した。ポリマー間の架橋を制御することで、約3桁の硬さ領域($E=0.1$ kPa~100 kPa)が実現可能であることを示した。また、ゲル表面には化学架橋または物理吸着を利用して、タンパク質をはじめとした各種生体分子(フィブロネクチン、ラミニン、マトリゲルなど)を修飾可能であることを示した。また、硬組織環境のモデルについては、ドイツの研究者との国際連携により、疎水性ポリマー(poly(*n*-butyl acrylate))を用いてヤング率を0.1 MPa~10 MPaの範囲で制御可能な細胞培養基板を構築した。実際に骨肉種細胞を播種したところ、その細胞接着様式がモデル基板の硬さに依存することを見出した(発表論文)。以上により、軟組織から硬組織に及ぶ広範囲な硬さ環境($E=0.1$

kPa~10 MPa) のモデル化に成功した。

(2) 細胞接着を定量評価するための新規光計測法の開発と応用

細胞 基板間接着面の高コントラスト定量可視化法の開発

細胞は、接着斑などの局所構造を介して外部と強く接着する。よって、接着強度の空間分布を得るためには、力の情報だけでなく、接着面の大きさや形状の情報も極めて重要である。そこで本研究では、光干渉法を駆使した細胞-基板界面の高コントラスト定量的可視化法を開発した。本手法では、細胞膜からの反射光 I_1 と、基板からの反射光 I_2 による光干渉を利用した、反射型干渉顕微鏡法(Reflection Interference Contrast Microscopy)と呼ばれる方法をベースとしている。本研究では、RICMに高輝度単色光や共焦点光学系など導入することで、干渉像のコントラストを飛躍的に向上させることに成功した(図1)。また、この改良により、従来法では不可能であった、細胞膜とゲル基板との間の物理的接触を直接計測することに成功した(業績論文)。

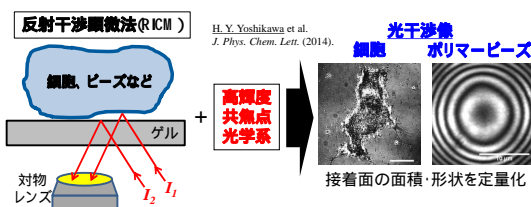


図1: 改良した反射型光干渉法システム

細胞 基板間接着力の定量測定法の開発と応用

近年筆者が開発したレーザー圧力波による細胞 基板間接着力の測定法と、ゲルや脂質膜による様々な細胞外環境モデルと組み合わせ、細胞と外部環境因子(硬さ、接着分子密度など)との定量相関の解明を行った。実際これまでに、筋芽細胞、骨肉種細胞、マラリア感染赤血球、造血幹細胞などの細胞の接着力を定量測定し、外部環境因子が細胞接着に及ぼす影響について系統的に明らかにした(業績論文)。特に、筋芽細胞では、接着力がハイドロゲル基板の硬さに対して非線形的に増加することを見出した(業績論文)。このような非線形な力の振る舞いは、力の協同性や競争性から生まれるものであり、分子同定による要素還元的アプローチだけでは見出すことができないと考えられる。さらに興味深いことに、横紋筋形成に最適なゲルの硬さと、接着力の相転移の中心がほぼ一致($E \sim 10$ kPa)することがわかった。この結果は、筋肉の組織形成には、大き過ぎも小さ過ぎもない適度な細胞接着力が必要であることを明確に示しており、臓器再生に最適な細胞接着強度を与える知見として注目している。

(3) 細胞外環境モデル上での細胞および組織機能の定量計測

本研究では上記で開発した細胞外環境モデルと光計測法を駆使して、生命科学における命題として、がん転移と臓器形成に関する研究課題にも挑んだ。以下にその詳細を述べる。

外部環境の硬さががん細胞の接着に与える影響の解明

がん転移において、がん細胞の外部環境の硬さは不均一かつ動的に変化する。例えば、酵素による細胞外基質の軟化や、がん組織の硬化(しこり)はその代表例であり、外部環境の硬さの変化が様々ながん細胞の転移プロセスに影響を与えることが示唆されている。そこで本研究では、外部環境の硬さががん細胞の接着に与える影響について定量知見を得るために、筆者が開発した光干渉法を用いて、がん細胞 ゲル基板間界面の観察を行った。細胞は、埼玉県立がんセンターの菅沼博士からご提供いただいた転移性のマウスメラノーマ細胞(B16-F10)を用いた。その結果、細胞接着面の大きさがゲル基板の硬さに対して単調増加することを見出した(業績論文)。一方、がん細胞の運動性はゲル基板の硬さに対して単調増加ではなく、ある中間の硬さ領域で極大を示すことがわかった。この結果は、がん細胞の運動に最適な接着強度が存在することを示しており、外部環境の制御がその鍵となることを暗示している。現在この知見を元として、がんの接着性と転移能との定量相関を解明するべく更に研究を進めている。

臓器の種となる細胞集合体形成に最適な外部環境因子の解明

上記までの実験系は全て単細胞系であったが、次のステップとして外部環境が多細胞系でどのような影響を与えるか調べることを目指し、横浜市立大学・臓器再生学の武部准教授のグループとの共同研究を行った(業績論文)。近年武部らは、肝細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞の3種類の細胞をゲル基板上で共培養すると、細胞が自発的に集合し、ミリメートルサイズの巨大な細胞集合体が形成できることを発見した。驚くべきことに、この細胞集合体をマウスに移植すると、血管構造を有する肝臓組織(肝芽)に成長することが明らかとなった。しかし、どのような因子が集合体形成のトリガーとなるかなど、そのメカニズムに関しては不明な点が多かった。そこで筆者らは、分子生物学的手法、細胞外環境モデルの設計、細胞動態の数理解析などを組み合わせ、細胞集合体形成を誘導するために必須となる細胞外部、および内部環境の要件の解明を試みた(業績論文)。まず、細胞集合体形成過程で連続的に取得した画像データの解析を行った結

果、細胞組織が力学的に収縮することにより立体組織形成が誘発されていることが示唆された。実際に、この収縮現象を阻害する薬剤を培養系に添加すると、細胞集合体が形成されなくなるを見出した。そこで、このような収縮現象を引き起こすために重要な細胞の種類を特定するべく、様々な細胞種の組み合わせで共培養実験を行ったところ、間葉系幹細胞の存在が細胞集合体形成に必須であることを見出した。一方、細胞外環境の因子を調べるために、異なる硬さを有するゲル基板を用いて、細胞の共培養を行った。その結果、このような巨大な細胞集合体の形成はある硬さのゲル基板上でのみ起こるを見出した。ゲルの硬さは、細胞の接着力や収縮力など力学的相互作用に強く影響を与える環境因子であり、この結果は細胞集合現象が複数の力の競争により誘起されていることを示している。以上の結果をまとめると、巨大細胞集合体を形成するためには、間葉系幹細胞を共培養に用いること、および培養系の硬さ環境を至適条件に設定すること、の双方による細胞の収縮現象の誘発が必須であることが明らかになった。

<引用文献>

A. J. Engler et al., Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell*, Vol. 126, 2006, pp.677-689.

K. Wolf et al., Compensation mechanism in tumor cell migration mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis, *J. Cell Biol.*, Vol. 160, pp.267-277.

T. Takebe et al., Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, Vol. 499, 2013, pp.481-484.

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 9件)

T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa, M. Kimura, H. Koike, U. Yasuharu, T. Matsuzaki, T. Yamazaki, T. Toyohara, K. Osafune, H. Nakauchi, H. Y. Yoshikawa, H. Taniguchi, Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation, *Cell Stem Cell*, 査読有, Vol.16, 2015, pp. 556-565.
DOI:10.1016/j.stem.2015.03.004

A. Burk, C. Monzel, H. Y. Yoshikawa, P. Wuchter, R. Saffrich, V. Eckstein, M.

Tanaka, and A. D. Ho, Quantifying Adhesion Mechanisms and Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cells, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.5 (2015) 9370 (8 pages).
DOI: 10.1038/srep09370

H. Rieger, H. Y. Yoshikawa, K. Quadt, C. P. Sanchez, M. Tanaka, and M. Lanzer, Cytoadhesion of *P. falciparum*-Infected Erythrocytes to Chondroitin-4-Sulfate is Cooperative and Shear-Enhanced, *Blood*, 査読有, Vol.125, 2015, pp.383-391.

T. Matsuzaki, G. Sasaki, M. Suganuma, T. Watanabe, T. Yamazaki, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, High Contrast Visualization of Cell-Hydrogel Contact by Advanced Interferometric Optical Microscopy, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 査読有, Vol.5, 2014, pp. 253-257.
DOI:10.1021/jz402463u

M. Mizuno, S. Kobayashi, T. Takebe, H. Kan, Y. Yabuki, T. Matsuzaki, H. Y. Yoshikawa, S. Nakabayashi, L. JeongIk, J. Maegawa, H. Taniguchi, Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage, *Stem Cells*, 査読有, Vol.32, 2014, pp. 816-821.
DOI: 10.1002/stem.1529

H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori, Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding, *Chemical Society Reviews*, 査読有, Vol. 43, 2014, pp. 2147-2158.

H. Y. Yoshikawa, T. Kawano, T. Matsuda, S. Kidoaki, M. Tanaka. Morphology and Adhesion Strength of Myoblast Cells on Photocurable Gelatin under Native and Non-native Micromechanical Environments, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, Vol.117, 2013, pp. 4081-4088.
DOI: 10.1021/jp4008224

H. Y. Yoshikawa, J. Cui, K. Kratz, T. Matsuzaki, S. Nakabayashi, A. Marx, U. Engel, A. Lendlein, and M. Tanaka, Quantitative Evaluation of Adhesion of Osteosarcoma Cells to Hydrophobic

Polymer Substrate with Tunable Elasticity, Journal of Physical Chemistry B, 査読有, Vol.116, 2012, pp.8024-8030.
DOI: 10.1021/jp212385p

H. Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, G. Sazaki, T. Kitatani, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, S. Nakabayashi, Y. Mori, and H. Masuhara, Spatially Precise, Soft Microseeding of Single Protein Crystals by Femtosecond Laser Ablation, Crystal Growth & Design, 査読有, Vol.12, 2012, pp.4334-4339.
DOI: 10.1021/cg300018t

[学会発表](計2件)

T. Yamazaki, T. Matsuzaki, Y. Shimokawa, K. Sato, M. Suganuma, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Yoshikawa, Evaluation of the Impact of Stiffness on Adhesion and Migration of Cancer Cells, 第52回日本生物物理学会年会(BSJ2014), 2014.9.25-27, 札幌コンベンションセンター, 札幌市, 北海道.

武部 貴則, 吉川洋史, 谷口英樹. 多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成, 第66回日本生物工学会大会, 2014.9.9-11, 札幌コンベンションセンター, 札幌市, 北海道.

H. Yoshikawa, Quantitative evaluation of cancer cell adhesion by functional substrate and optical interferometric technique, The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2014.6.21, Saitama Cancer Research Center, Saitama, Japan.

T. Yamazaki, T. Matsuzaki, Y. Shimokawa, M. Suganuma, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Yoshikawa, Evaluation of the impact of stiffness on cancer cell adhesion, The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2014.6.19-21, Saitama Cancer Research Center, Saitama, Japan.

Y. Shimokawa, T. Matsuzaki, M. Suganuma, S. Nakabayashi, H. Yoshikawa, Evaluation of impact of extracellular stiffness on cancer cell aggregation, The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2014.6.19-21, Saitama Cancer Research Center, Saitama, Japan.

H. Yoshikawa, Quantitative Evaluation of Cell Adhesion by Advanced Optical Techniques, WPI iCeMS- "Bio Assembler" International Joint Symposium, 2014.5.16, iCeMS, Kyoto, Japan.

坂本留実, 益田顕太郎, 柿沼瑛介, 伊藤耕作, 池滝健太郎, 松崎賢寿, 吉川洋史, 中林誠一郎, 山本英明, 佐藤裕子, 谷井孝至, マイクロパターン上への細胞接着過程のタイムラプス解析 - 緑茶カテキンを含む培養液中でのがん細胞と正常細胞の比較 -, 第61回応用物理学会春季学術講演会, 2014.3.17-20, 青山学院大学相模原キャンパス, 相模原市, 神奈川県.

武部貴則, 吉川洋史, 谷口英樹, 臓器原基創出法を活用した多細胞系からなる複雑な立体組織の人為的構成, 第13回日本再生医療学会, 2014.3.4-6, 国立京都国際会館, 京都市, 京都府.

松崎 賢寿, 佐崎 元, 菅沼 雅美, 渡邊 達郎, 山崎 喬, 下川 裕子, Tanaka Motomu, 中林 誠一郎, 吉川 洋史, 光干渉法を用いた細胞-ハイドロゲル間接着の定量評価, 第51回日本生物物理学会年会, 2013.10.28-30., 国立京都国際会館, 京都市, 京都府

T. Matsuzaki, G. Sazaki, M. Suganuma, T. Watanabe, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, High contrast visualization of cell-hydrogel contact by advanced interferometric optical microscopy, The 4th "Physics of Cancer" symposium, 2013.9.24-27, University of Leipzig, Germany.

K. Ito, E. Kakinuma, K. Masuda, T. Matsuzaki, M. Suganuma, M. Tanaka, S. Nakabayashi, T. Tani, H. Y. Yoshikawa, Quantitative evaluation of cancer cell adhesion to organosilane monolayer by reflection interference contrast microscopy, The 4th "Physics of Cancer" symposium, 2013.9.24-27, University of Leipzig, Germany.

伊藤耕作, 松崎賢寿, 柿沼瑛介, 益田顕太郎, 坂本留実, 菅沼雅美, 中林誠一郎, 谷井孝至, 吉川洋史, 光干渉法を用いたがん細胞 - 有機シラン単分子膜間接着の定量評価, 第74回応用物理学会秋季学術講演会, 2013.9.16-20., 同志社大学 京田辺キャンパス, 京都府.

柿沼 瑛介, 益田 顕太郎, 坂本 留実,

伊藤 耕作, 松崎 賢寿, 吉川 洋史, 中林 誠一郎, 山本 英明, 佐藤 裕子, 品田 賢宏, 谷井 孝至, 有機シラン単分子膜パターン基板を用いた癌細胞の接着能評価, 第 74 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013.9.16-20., 同志社大学 京田辺キャンパス, 京都府.

吉川洋史, 光技術による細胞接着の定量評価, バイオアセンブラ第 5 回シンポジウム, 2013.7.18, 東京大学 先端技術研究センター ENEOS ホール, 東京都.

水野満, 小林眞司, 武部貴則, 鈴木啓, 村田駿介, 矢吹雄一郎, 安村和則, 松崎賢寿, 吉川洋史, 中林誠一郎, 前川二郎, 谷口英樹, 自己耳介由来軟骨前駆細胞を用いた関節軟骨再構築, 第 12 回日本再生医療学会総会, 2013.3.21-23, パシフィコ横浜, 神奈川県.

T. Matsuzaki, M. Suganuma, T. Watanabe, G. Sazaki, M. Tanaka, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, Visualization of Cell-Hydrogel Interfaces by Advanced Interferometric Contrast Microscopy, 9th International Gel Symposium -Gelsympo 2012-, 2012.10.9-12, つくば国際会議場, Ibaraki, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

H. Y. Yoshikawa, Quantitative Evaluation of Cell-Hydrogel Adhesion by Advanced Optical Techniques, Chapter 13, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems (Ed. T. Arai, F. Arai, M. Yamato), Springer, in press.

松崎賢寿, 吉川洋史, 細胞-ゲル間接着の定量的可視化, 三次元ティッシュエンジニアリング ~細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで~, 第 1 編 第 1 章 第 2 節 pp.21-26, 株式会社エヌ・ティイー・エス, 2015 年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 自己組織化用細胞集合体の作製方法

発明者: 武部貴則, 谷口英樹, 吉川洋史
権利者: 武部貴則, 谷口英樹, 吉川洋史
種類: 特許

番号: PCT/JP2015/55695

出願年月日: 2015 年 2 月 26 日

国内外の別: 外国

名称: 自己組織化用細胞集合体の作製方法

発明者: 武部貴則, 谷口英樹, 吉川洋史
権利者: 武部貴則, 谷口英樹, 吉川洋史
種類: 特許
番号: 特願 2014-37341
出願年月日: 2014 年 2 月 27 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)
埼玉大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 50551173