

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650071

研究課題名(和文) 三次元培養における形態を限定する加工培養基質の開発

研究課題名(英文) Development of cell culture substratum that restrict morphology of cell aggregate during 3D-morphogenesis

研究代表者

米村 重信 (Yonemura, Shigenobu)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・チームリーダー

研究者番号：60192811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：金属製の山形の鋳型を微細加工により作成し、V字溝のあるPDMSを成型した。それに上皮細胞を入れることで、細長い初期集合形態の上皮細胞塊を作ることができた。V字溝の深さ、幅などを調節し、低倍のレンズである程度の本数の溝を観察できるようになった。その結果、細胞集合のある時期で、細胞塊の縦横比が急に小さくなる(丸に近くなる)現象が見られ、上皮細胞がその接着を行いながら全体形状を丸く補正していく機構を持つことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To restrict the initial morphology of epithelial cell aggregates is the purpose of this study. I designed a metal mold to make PDMS which has V-shaped grooves. The initial morphology of epithelial cell aggregates was successfully restricted by seeding cell onto this PDMS. By tuning the depth or width of V-shape grooves, observation of several number of V-shaped grooves was possible. As a result, during cell adhesion, the aspect ratios of the cell aggregates became low quickly in a special time window, indicating that epithelial cells have a mechanism to correct their aggregate shape to ball during their adhesion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 細胞接着 形態形成 微細加工

### 1. 研究開始当初の背景

胚発生においては丸い卵細胞が球殻状の卵膜、受精膜に覆われ、基本的に上皮細胞が集まった丸い胚が発生してくる。上皮細胞を細胞外マトリクスのゲルの中で培養するとほぼ丸い形のスフェロイドが形成される。これらの場合、上皮細胞が丸い形を作る性質があるのか、一個の細胞が分裂すれば確率的に丸くなるのが自然なのか、外側を硬い殻で覆われているから受動的に丸くなるのかわからない。そのようなことを明確にしようと、細胞非吸着性の丸底のプレートで上皮細胞を集合させながら培養しても元々初期の細胞集合が丸い形から始まるので細胞塊が丸くなるのが受動的か能動的かはっきりせず、定量的に計測することも困難だった。

### 2. 研究の目的

上皮細胞の形態形成について、初期の集合の形態を規定することで、それから起こる細胞間接着などを経た自律的な三次元形態形成の様子を定量的に解析する基盤とするのが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 金属製の山形の鋳型を微細加工により作成し、V字溝のあるPDMSを成型する。理研の先端光学素子開発チームの協力を得て、金属は無電解NiPとし、デザインしたV字溝の深さ、長さ、幅、溝間隔となるように微細加工を依頼する。

(2) 作成したPDMS上に乖離させた上皮細胞(R2/7細胞に-カテニンを発現させた細胞)を蒔き、それぞれ縦横比の異なるV字溝において細胞が接着、細胞塊を作っていく様子を観察する。その過程において問題点があれば形状のデザインにフィードバックする。

### 4. 研究成果

#### (1) 金属の鋳型作成とPDMS成型

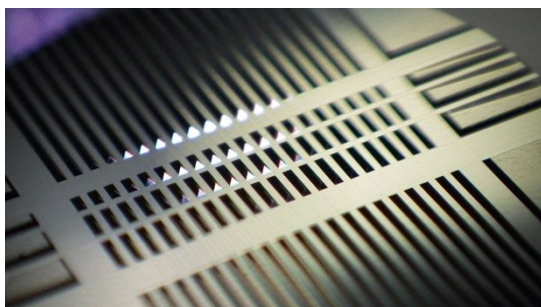


図1 微細加工された金属の鋳型

V字溝のサイズ、間隔をデザインし、鋳型の作成を依頼した。出来上がった鋳型から、PDMSを成型した。このPDMS成型法も理研先端光学素子開発チームから学んだ。鋳型に入れて成型したPDMSを滅菌し、上皮細胞を入れることで、細長い初期集合形態の上皮細胞塊を作ることができた。V字溝の深さが浅く、溝の間隔が狭いと、隣接する溝の細胞、溝の

間のあぜ道当たる部分に載った細胞などが接着を起こしてしまい、忠実に形を制限できなくなることがわかり、V字溝の深さ、幅などを調節した。また、低倍のレンズ(2.5倍)であ程度の本数の溝を観察できるようになった。

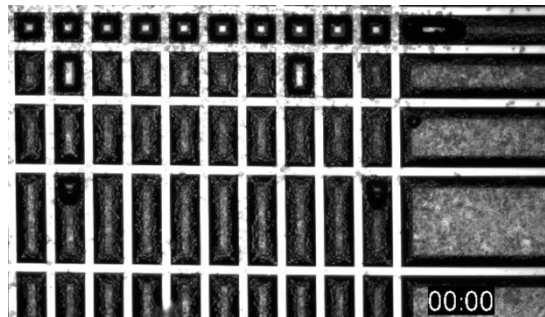


図2 それぞれ縦横比の異なるV字溝とそれを満たす解離した上皮細胞。時間はゼロでこれから細胞接着が開始する。

その結果、細胞集合のある時期で、細胞塊の縦横比が急に小さくなる(丸に近くなる)現象が見られ、上皮細胞がその接着を行いながら全体形状を丸く補正していく機構を持つことが明らかになった。



図3 17時間後の様子。長方形の初期形状であったものも基本的には丸い形の細胞塊に変化している。縦横比がある程度より大きいと一つの細胞塊にならず、2、3に分離することが起こる。

初期の形態の縦横比がかなり大きい場合、細胞塊は2、3の塊にちぎれる事もあった。これも長軸を短くしようとする力が働いていることの反映であると考えられる。このような、初期の形状にかかわらず、全体を丸くしようと形を補正していく現象が、どのような構造形成や力の感受を伴うのかなどの実験を今後この系を利用して明瞭にしていきたい。PDMSへの「サイトップ」コートにより細胞のPDMSへの接着を極力防いでいるが、現在のところ、やや効果にブレがある。それでも細胞集合の初期形態を限定する加工培養基質に関しては概ね実用レベルのものできたと考えている。

### 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 8 件)

Ozone C, Suga H, Eiraku M, Kadoshima T, Yonemura S, Takata N, Oiso Y, Tsuji T, Sasai Y. Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. Nat Commun. 査読有 vol. 7、2016、10351. doi: 10.1038/ncomms10351.

Takeuchi M, Yamaguchi S, Yonemura S, Kakiguchi K, Sato Y, Higashiyama T, Shimizu T, Hibi M. Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish. PLoS Genet. 査読有 Vol.11(10), 2015. e1005587. doi: 10.1371/journal.pgen.

Nagai H, Sezaki M, Kakiguchi K, Nakaya Y, Lee HC, Ladher R, Sasanami T, Han JY, Yonemura S, Sheng G. Cellular analysis of cleavage-stage chick embryos reveals hidden conservation in vertebrate early development. Development. 査読有 Vol. 142, 2015 1279-86. Doi: 10.1242/dev.118604.

Yoshida M, Kajikawa E, Kurokawa D, Tokunaga T, Onishi A, Yonemura S, Kobayashi K, Kiyonari H, Aizawa S. Conserved and divergent expression patterns of markers of axial development in eutherian mammals. Dev Dyn. 査読有 Vol. 245(1), 2016, 67-86. doi:10.1002/dvdy.24352.

Nakanishi K, Kakiguchi K, Yonemura S, Nakano A, Morishima N. Transient Ca<sup>2+</sup> depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation. FASEB J. 査読有 Vol. 29, 2015, 2137-49. doi: 10.1096/fj.14-261529.

Kasahara K, Kawakami Y, Kiyono T, Yonemura S, Kawamura Y, Era S, Matsuzaki F, Goshima N, Inagaki M. Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. Nat Commun. 査読有 Vol. 5, 2014, 5081. doi: 10.1038/ncomms6081.

Sato Y, Hayashi K, Amano Y, Takahashi M, Yonemura S, Hayashi I, Hirose H, Ohno S, Suzuki A. MTCL1 crosslinks and stabilizes non-centrosomal microtubules on the Golgi membrane. Nat Commun. 査読有 Vol. 5, 2014, 5266. doi:

10.1038/ncomms6266.

Yonemura S. Differential sensitivity of epithelial cells to extracellular matrix in polarity establishment. PLoS One. 査読有 Vol. 9(11)、2014, e112922. doi: 10.1371/journal.pone.0112922.

[学会発表](計 1 件)

米村重信(2015年7月1日)上皮極性形成におけるECMに対する感受性の細胞腫による違い 第67回日本細胞生物学会大会 タワーホール船堀(東京都江戸川区)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www2.clst.riken.jp/cm/g/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米村 重信 ( YONEMURA, Shigenobu )

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・チームリーダー

研究者番号: 60192811

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：