

# 組織内細胞挙動を理解し複雑組織設計に活かすための培養・解析雛型としての積層細胞シート

長森 英二

## はじめに

将来、より高度な再生医療や創薬スクリーニングを実現するためには、血管などの複雑な構造を有する組織・臓器をできるだけ簡便な行程にて製造するプロセスが必要である。現在、これらのプロセスの開発は、トップダウン方式とボトムアップ方式の両面で進められている(図1)<sup>1)</sup>。トップダウン方式は二次元あるいは立体的な足場材を含む三次元的な培養場、細胞集塊培養などにおいて、生体内微小環境や組織発生時の機序・順序を再現した培養条件にて分化や組織構造の形成を促し、成功例を見いだす条件探索型のストラテジーである。トライ&エラーの繰り返しにより至適条件を探索するため開発スピードは速いが、原理探究や体系化がスキップされがちで、たとえば、用いる細胞の株間に存在する性質の差(株間差)により再現性が得られないケースが生じるなど、生産プロセスとしての頑強性に問題を生じる頻度が高いと想像される。ボトムアップ方式は微細加工技術などを細胞操作や生物材料加工に展開し、ビルディングブロックである単一細胞あるいは細胞集塊の初期位置を制御することで複雑組織の形成を目指すものである。三次元印刷技術を応用した細胞印刷技術はその代表格であり、他にも、細胞シート積層化法(平面の積み重ね)などが知られる<sup>1)</sup>。一方で、生体組織においては複数の細胞種が接着や遊走の特徴や周囲の細胞外マトリクスの存在に応じて自律的に動き、棲み分け、不均一な組織を形成する“自己組織化”によって組織形成が行われ、秩序だった機能や構造を発揮・維持している。

## 培養・解析雛型としての積層細胞シート

筆者らはこれまでに、前述のボトムアップ方式とトップダウン方式の間を取り持つ技術として、“自己組織化現象を細胞の自律的挙動に基づくプロセスとして体系的に理解し、組織設計に活かす技術”が欠かせないと考え、積層細胞シートを三次元培養や解析の雛型として用いる方法論の開発に取り組んできた。

生体内における自己組織化現象を理解するためには、まず組織内における細胞の動的挙動を時空間的な解像度

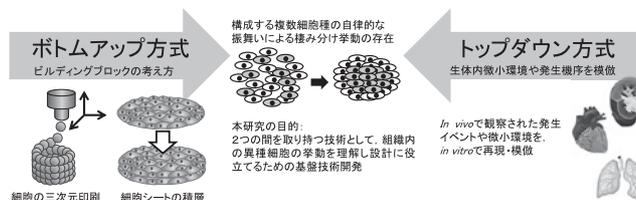


図1. 複雑組織製造に向けた工学的アプローチと本研究の位置付け

|                           | 観察                                       | 解析                            |
|---------------------------|--|-------------------------------|
| 球状細胞集塊<br>(Cell spheroid) | 組織内観察は難<br>(厚さ~数mm).<br>定点観測が難.          | 3-D<br>(X-Y-Z)<br>解析が複雑       |
| 板状細胞集塊<br>(Cell sheet)    | 共焦点レーザー顕微鏡<br>が可能(厚さ~50 μm).<br>定点観測が容易. | 2D + 1D<br>(X-Y + Z)<br>解析が容易 |

図2. 培養雛型としての球状集塊と板状集塊の特徴

で観察することが必須と考えられる。しかしながら *in vivo* では個々の細胞挙動を経時的に観察することは困難であり、*in vitro* においても評価系を構築することは容易ではない。図2に示すように、たとえば *in vitro* 研究で多用される球状細胞集塊(スフェロイド)は、その形成手段は簡易であるものの集塊に厚み(数百μmオーダー)があり、二光子励起レーザー走査型顕微鏡などの最先端技術を用いなければ集塊深部の細胞挙動を動的かつ時空間的解像度により観察することは不可能で、また、集塊は培養面に非接着(浮遊状態)であるため定点観察が難しい。一方で、筆者らが培養雛型として用いている積層細胞シート(板状集塊)は、組織の厚みが数十μm程度と薄く、集塊は培養底面に接着しているため、集塊内の細胞の動的挙動を継時的にタイムラプス型共焦点レーザー走査型顕微鏡により捕えることが可能である<sup>2)</sup>。

## 筋芽細胞シート内での同種及び異種細胞の挙動

本稿で紹介する研究に用いた培養雛型(共培養系)の概略を図3に示す。ヒト骨格筋筋芽細胞群(ヒト骨格筋筋芽細胞(human skeletal muscle myoblasts, HSMM))を主とし、ヒト骨格筋線維芽細胞(human skeletal

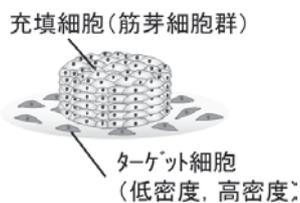


図3. 用いた共培養の雛型

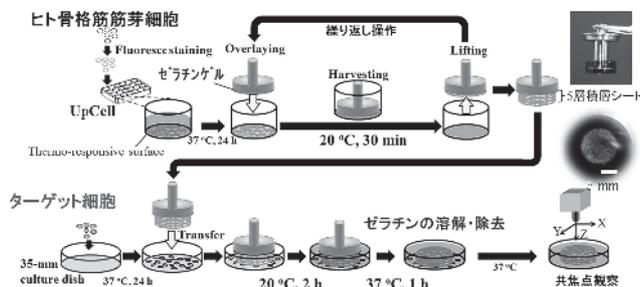
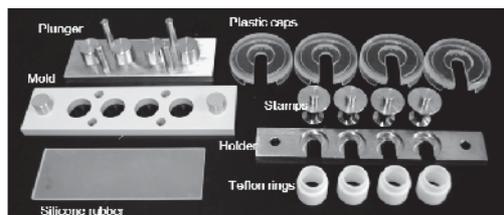


図4. 細胞シートを積層するゼラチンスタンプシステム

muscle fibroblasts, HSMF) が一定比率で混入している細胞群) からなる培養場としての「細胞シート(充填細胞)」と、挙動を解析する主たる対象であるターゲット細胞(HSMC, HSMF, ヒト臍帯血由来血管内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)), 培養面, 培地, から成る。この培養雛型を再現性高く実現するために, 細胞シート積層システム(図4)<sup>3)</sup>が構築された。まずゼラチンスタンプを作製する工程として, シリコン製シートを下に敷いた型枠にゼラチン溶液を滴下し, スタンプを配置, 冷蔵によるゼラチン固化後に型抜き台にて離型した。積層細胞シートの形成のために, あらかじめCell Tracker Orangeで染色したHSMC群を24ウェル温度応答性培養皿(UpCell, セルシード)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配置, 20°Cに維持された低温炭酸ガスインキュベーターにて静置することで培養面から剥離した細胞シートをゼラチンスタンプの底面に転写した。このスタンプを引き揚げ次のウェルに移し, この作業を5回繰り返すこ

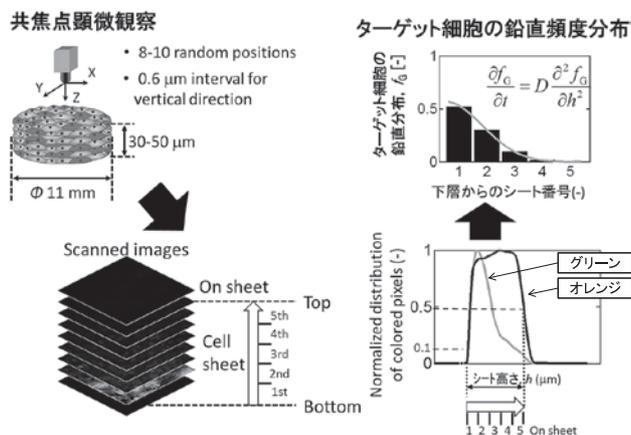


図5. ターゲット細胞のシート内鉛直頻度分布 ( $f_G$ ) の算出

とで, 5層積層細胞シートをスタンプ底面に形成した。最後に直径35 mmの薄底培養皿上にこのゼラチンスタンプを特製のふたを用いて配置した。ここでは必要に応じて, GFP (green fluorescent protein) 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事前に35 mm薄底培養皿上に播種・培養してある。この35 mm薄底培養皿とスタンプに適量の培地を加え20°Cにてさらに放置することで, 積層細胞シートを培養面へ十分に接着させた後, 37°Cの炭酸ガスインキュベーターに移動してゼラチンを溶解させ, 溶解したゼラチンを含む培地を除去し, 改めて新鮮培地を添加することで共培養を開始した。充填細胞およびターゲット細胞の組織内挙動を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて継時的に観察した。水平方向だけでなく, 鉛直方向への遊走挙動を定量的に捉えるため, 得られた三次元画像を画像処理し(図5), 5積層細胞シート内におけるターゲット細胞の鉛直方向への存在頻度分布 ( $f_G$ ) を求めた<sup>3)</sup>。

まずターゲット細胞を用いず, 充填細胞(HSMC群シート)を観察したところ, この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<sup>3)</sup>。次に, HSMC群シートの下部に初期配置されたターゲット細胞(HSMC, HSMF, HUVEC)の挙動(遊走, 接着)を理解することを試みた。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を有する存在する条件をそれぞれ準備し, 共培養を開始した。結果, ターゲット細胞の種類および初期細胞密度により異なる挙動, 空間的な棲み分けが観察された。充填細胞と同種であるHSMCをターゲット細胞とした場合は, 共培養開始後にHSMCは鉛直上方向に遊走し, 共培養48時間において, 分子拡散現象のアナロジーと見なせる鉛直方向分布

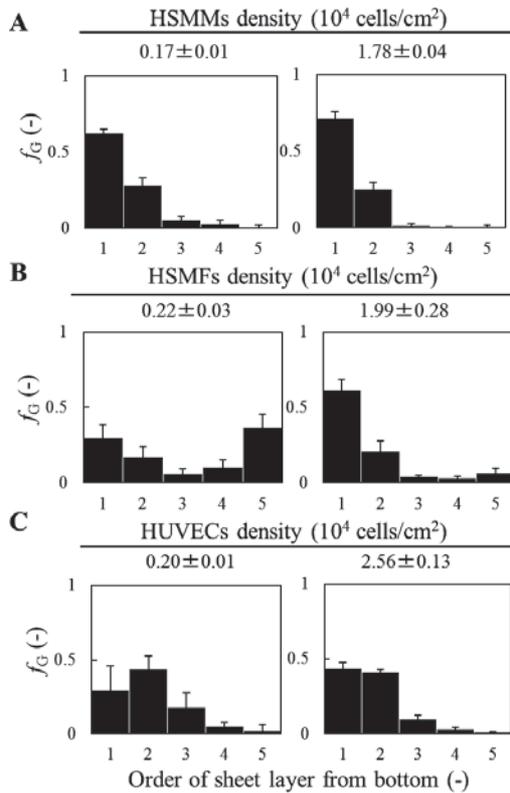


図6. 共培養48時間におけるターゲット細胞の鉛直方向頻度分布

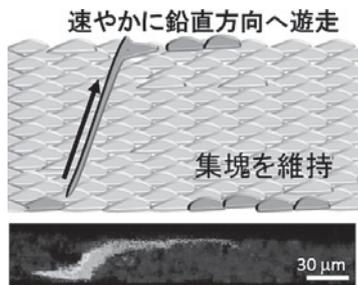


図7. HSMMシート内における混入HSMFの遊走・棲分け挙動

を示した(図6A)。播種密度によらずHSMMは均一に混合することが確認された<sup>4)</sup>。

HSMFをターゲット細胞とした場合、共培養48時間において、それぞれの播種密度において頻度が異なるものの総じてシートの上下部、下層部に局在が偏り(図6B)、前述のHSMMとは異なる特徴的な頻度分布を示した。シート下層部への局在はHSMF同士がXY方向に密に結合した集団形成を伴っていた。一方、シート上部に達したHSMFは周囲の細胞と連結しておらず、培養面から離れると同時に紡錘形の形状を伴いながらZ方向へ速やかに遊走し、シート上部に達していた(図7)<sup>4)</sup>。以上の挙動によって前述の特徴的な鉛直頻度分布は説明

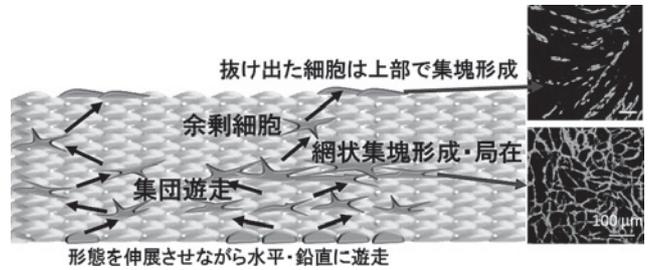


図8. HSMMシート内における混入HUVECの遊走、棲み分け挙動

された。また、これ以前の検討において、“動く足場”であるHSMM群シートの流動性を見かけの拡散係数 $D$ (図5)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することが見いだされていた<sup>3)</sup>。具体的には線維芽細胞混入比率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%では流動性が低下した。この線維芽細胞混入比率が異なるシートで見いだされた流動性の変調は、前述の共培養実験で明らかにされたHSMM群シート内におけるHSMFの単独および集団としての動的挙動により説明することが可能であった。

充填細胞(HSMM群)とは異種であるHUVECをターゲット細胞とした場合には、播種密度(周囲の同種細胞との接着の有無)によらず共培養開始直後から細胞形態が伸展し始め、Z方向へ緩やかに遊走し、共培養48時間では集団的に遊走したことを示す鉛直頻度分布が得られた(図6C)<sup>4)</sup>。共培養96時間では、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(網状集塊)の形成を伴った<sup>5)</sup>(図8)。ここで、積層中間層に達するまでに周囲の同種細胞と衝突・接着・結合することで網状構造を形成することができたHUVECはZ方向への物理的な抵抗が生じ中層部に局在したものと考えられた。一方、周囲の細胞と連結できなかった余剰なHUVECは単独状態となり、上部に抜け出したものと考えられた。組織内部におけるHUVECの衝突頻度や接着力を高めることが、密に張り巡らされた網状集塊を形成するためには重要であり、これは初期播種密度や培地成分に依存する。HSMM群シートの積層数を変え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すことが観察された。つまり組織内でHUVEC同士が伸展・衝突・接着するまでの時間(遊走距離)を十分に確保することが重要であることが示された<sup>6)</sup>。

以上のことから、板状集塊である積層細胞シートを組

織培養・解析雛型として用いることで、HSMM群組織内部におけるHSMM, HSMF, HUVECの挙動を、定量性を伴って明らかにすることができた。これら理解した挙動を活かして、今後は複雑な構造を有する機能的骨格筋組織の構築を目指していきたい。

### まとめ

不均一な複雑組織の設計において、組織という場における細胞の自律的な遊走・接着といった挙動に由来する物理的な影響は、従来より注目されてきたサイトカインなど化学的因子による影響と同様に十分に考慮されることが必要である。今後、さまざまな臓器の製造を可能とすべく行くためには、前述の紹介例と同様に、目的臓器内に存在する細胞種のさまざまな組合せにおける動的挙動の体系的な理解を行っていくとともに、シミュレーターなどを用いた新しい設計手法の創出が必要と考えられる。

### 謝 辞

本研究は、総合科学技術会議により制度設計され日本学術振興会を通して助成された最先端研究開発支援プログラム (FIRST) および科学技術振興機構 (JST) の再生医療実現拠点ネットワークプログラム、疾患・組織別実用化研究拠点 (拠点A) 「iPS細胞を用いた心筋再生治療創成拠点」、文部科学省および日本学術振興会が交付する科学研究費助成事業 (No. 24360341, 24760650, 15K06580) により支援され、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コース生物プロセスシステム工学領域 (紀ノ岡正博教授の主宰研究室) において得られた研究成果である。ここに格別の謝意を表す。

### 文 献

- 1) 尾上弘晃ら：生物工学, **4**, 161 (2014).
- 2) Ngo, T. X. *et al.*: *Int. J. Tissue Regen.*, **5**, 37, (2014).
- 3) Kino-oka, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 128 (2012).
- 4) Nagamori, E. *et al.*: *Curr. Nanosci.*, **10**, 173 (2014).
- 5) Nagamori, E. *et al.*: *Biomaterials*, **34**, 662 (2013).
- 6) Ngo, T. X. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **35**, 1001 (2013).