

研究報告書

「三次元パターンを利用した新規細胞走性の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 角南 寛

1. 研究のねらい

ほとんどの動物細胞は何かに着着していなければ生きていけない。そして、生物の体の中で細胞は三次元的に着着している。こういった三次元的な細胞の接着状態を生体外で再現すべく、三次元的な細胞足場が開発されてきた。三次元的な細胞足場の研究が本格的に始まったのは1990年代前半のことである。これまでに細胞の足場の形状が、細胞の形態や、増殖、代謝、分化などを左右することが多くの研究者によって報告されてきた。私は、これらに加えて、三次元形状が細胞の遊走を大きく変化させることを明らかにした。

細胞の遊走は代謝や分化、増殖などと並んで、細胞の最も基本的かつ重要な機能である。細胞の遊走に関する研究の歴史は古く、19世紀に最初の論文が報告されて以降、現在までに多くの研究者の関心を集め続けている。今日でも、さまざまな方法で細胞の遊走を制御し、その遊走のメカニズムを解明する研究が行われている。特に、何らかの刺激によって生ずる、方向性を持った遊走は走性と呼ばれ、化学物質の刺激による走化性を筆頭に現在でも盛んに研究されている。ただし、既存の走性は、遊走方向の精緻な制御が困難であり、適用範囲が狭いものが多い。そこで、本研究は、既存の走性よりも、精緻な遊走方向の制御が可能で、適応範囲が広い新規な走性を、三次元形状を用いて開発した。

三次元形状は細胞機能を調節する主役ともいえるべき存在であるにも関わらず、この上での細胞遊走はほとんど調べられて来なかった。そこで、私は三次元形状の上で新規な走性を発現させると同時に、細胞遊走を広く調べた。得られた知見は、細胞分離や、人工臓器開発などへの応用が期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

私は、ランダムな三次元形状の上で細胞を培養したとき、細胞が集まりやすい場所があることに気づいた。それと同時に、こういった三次元形状をうまく配置してやることで、細胞の遊走方向を調節する新しい技術を創り出せるのではないかと考えた(Fig. 1)。そこで、さまざまな三次元パターンを作製し、これらの上で細胞の遊走を観察した。その結果、方向性を持った細胞遊走が起こるパターンをいくつか見だし、三次元パターンの鋭いエッジの向きと間隔が方向性を持った細胞遊走を起こすのに必要であることを明らかにした。私は、こういったパターン形状から細胞がどのようなシグナルを受け取っているのかを調べることで、未だ解明されていない

細胞接着と細胞遊走の関係を明らかにできると考えている。本研究によって得られた知見は、細胞を分離する技術や、動きによって細胞を診断する技術、あるいは必要な細胞が自発的に目的の場所に集まり組織を再生するような再生医療用材料への応用が期待される。

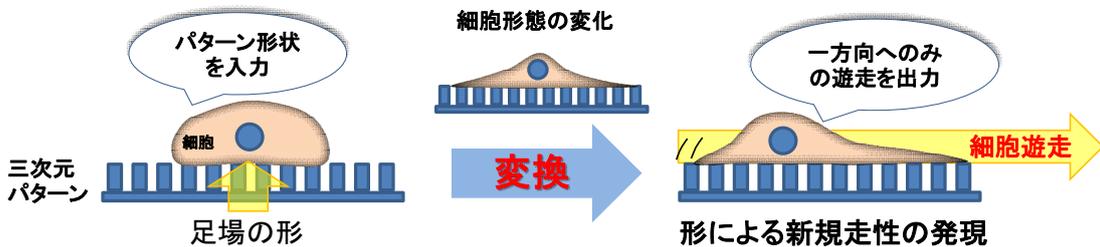


Fig. 1 三次元パターンを利用した細胞の遊走方向制御

(2) 詳細

私は、三次元形状をうまく配置してやることで、細胞を一方方向にのみ遊走させる新しい技術を創り出せるのではないかと考えた。そこで、さまざまな三次元形状をシリコン基板上に作製し、これらの上で細胞遊走を観察した。その結果、以下の発見をした。

研究テーマ「さまざまな三次元パターン上での細胞遊走の評価」

まず、細胞がターンする角度が、三次元形状の基本単位の形に依存することを明らかにした。細胞サイズ以下の鱗状、市松状、ストライプ状のパターンの上で細胞培養を行った結果、細胞は三次元パターンのユニット形状を反映してターンすることが分かった。このことは、細胞が三次元形状の連続する方向に伸び、なおかつエッジに沿って突起を伸長する性質があるためと考えられる。

研究テーマ「さまざまな三次元パターン上での細胞遊走の評価」

まず、細胞がターンする角度が、三次元形状の基本単位の形に依存することを明らかにした。細胞サイズ以下の鱗状、市松状、ストライプ状のパターンの上で細胞培養を行った結果、細胞は三次元パターンのユニット形状を反映してターンすることが分かった。このことは、細胞が三次元形状の連続する方向に伸び、なおかつエッジに沿って突起を伸長する性質があるためと考えられる。

研究テーマ「新規な走性を発現する三次元パターンの開発」

次に、細胞が一方方向にのみ遊走する三次元形状を見いだした。私は、三次元的に鋭いエッジが一方方向にのみ向いたパターンをいくつか作製し、これらの表面で培養された線維芽細胞 (NIH3T3、MEF) が、鋭いエッジの向いた方向にのみ遊走していくことを発見した (Fig. 2)。私はこの現象を形状刺激による新規な走性 (走形性) の発現と

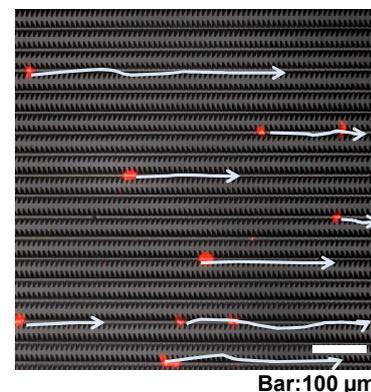


Fig. 2 三次元形状の上を一方方向にのみ動く NIH3T3 細胞 (72 h 連続定点観察)

とらえ、その技術を確立することを目指した。走形性が発現する形状要素を入念に絞り込み、効率の良い走形性を発現する形状を決定した(Fig. 3)。最終的に完成した形状の上では、ほとんどの細胞が一方方向にのみ遊走し、逆走する細胞はほとんど見られなかった。

更に、細胞が一方方向にのみ遊走するメカニズムの一端を明らかにした。一方方向にのみ遊走する細胞を観察した結果、三次元的に鋭いエッジの向きと間隔が、突起の伸張を一方方向に誘導していることが分かった(Fig. 3)。私は、こういった突起の伸長方向が規制されたことが、細胞を一方方向にのみ遊走させる原動力だと考えている。また、方向性を持った細胞遊走が起こるとき、細胞が三次元パターンのエッジ部分に沿って伸びやすいこと、溝(孔)の上を水平に移動すること、溝の部分に核を置くこと、パターンの深さが浅くなると遊走速度が低下することなどが明らかになった。更に、三次元的なエッジの連続性が遊走速度を向上させることも明らかにされ、遊走細胞の接着斑がエッジに沿って動くこと及びエッジ密度の高い部分に留まりやすいことが突きとめられた。以上の結果から、私は三次元的に鋭いエッジの向きと間隔が、細胞遊走の方向性を決定していると結論づけた。現在、細胞を一方方向にのみ遊走させるこの新しい技術を応用して、細胞の分離に成功している。複数種の細胞を、細胞が一方方向にのみ遊走する基板上に同時に播種し、細胞分離を試みたところ、NIH3T3 細胞と HeLa 細胞、あるいは HaCaT 細胞、PC12 細胞、Hek293A、Cos-1 細胞などを分離できることが分かった。

細胞を一方方向にのみ遊走させる新技術の創出

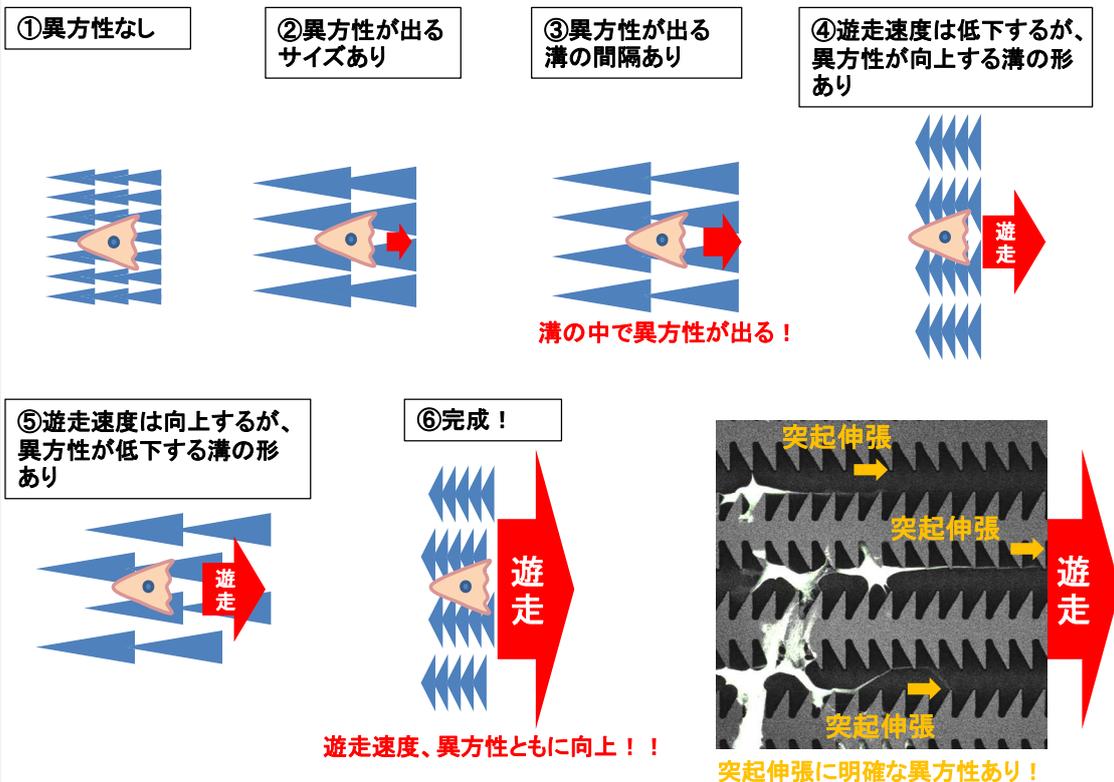


Fig. 3 細胞を一方方向にのみ動かす形状要素の決定

本研究において、さまざまな三次元パターン上での細胞遊走が観察された。その結果、異方的な細胞遊走を効率良く起こす形状は、三次元的に鋭いエッジに方向性があり、そのエッジの間隔は細胞サイズから細胞サイズ以下であることが分かった。また、三次元パターン上での接着斑の動きや突起の伸長が鋭いエッジに沿っていることも明らかになった。以上の結果から、細胞が三次元的なエッジから強いメカニカルストレスを受けていることが示唆された。私は、この**メカニカルストレスの異方性**が細胞の遊走方向を制御しているのではないかと予想している。

研究テーマ「三次元パターン上で培養された細胞が感じるメカニカルストレスの検討」

現在、細胞が受けるメカニカルストレスを直接評価する方法は確立されていない。そこで、三次元パターン上で培養された細胞の挙動（形態形成、増殖、遊走、F-アクチン発現など）を、弾性率を変えた基材上の細胞挙動と比較することで、三次元パターン上のメカニカルストレスの増減を評価した。その結果、私は、細胞足場の三次元パターンのサイズを変えることで、細胞の受けるメカニカルストレスを調節できることを明らかにした。三次元パターンのサイズを小さくすると、細胞は軟らかい基材の上で培養したときのような形態形成、増殖、遊走、F-アクチン発現を示した。逆にこのパターンのサイズを大きくすると、細胞は硬い基材の上で培養したときのような形態形成、増殖、遊走、F-アクチン発現を示した。すなわち、細胞の足場の三次元パターンのサイズを小さくすると、細胞の受けるメカニカルストレスが減少し、大きくすると増大することが分かった。

3. 今後の展開

私は、細胞を一方向にのみ遊走させる三次元培養基材を用いて、新規な細胞分離技術を提案する。表面の形状だけで細胞を自発的に分離できれば、簡便で低コストかつ細胞の代謝や増殖、分化などを阻害しない分離技術になる(Fig. 4)。同時に、この技術は、細胞集団から病気の細胞を見つけ出すような細胞診断技術へも応用できる。本研究で得られた知見を用いれば、生体内に埋め込まれた医用材料の表面において、効率良く必要な細胞だけを集めたり、あるいは必要の無い細胞をよそへ逃がしたりできると考えている。医療用ステントや人工心臓などは長期間、管が詰まらないことが非常に重要である。現在は表面に細胞増殖を抑制する薬剤を塗ったものが使用されているが、薬剤が保持できる期間が限られている。表面の三次元的な形によって細胞が集まらないようにできれば、長期間にわたって管の狭窄が起こらない人工組織ができるのではないかと考えられる。本研究成果は、人工的な臓器を生体外・生体内で自発的に構築するような用途にも応用可能である。

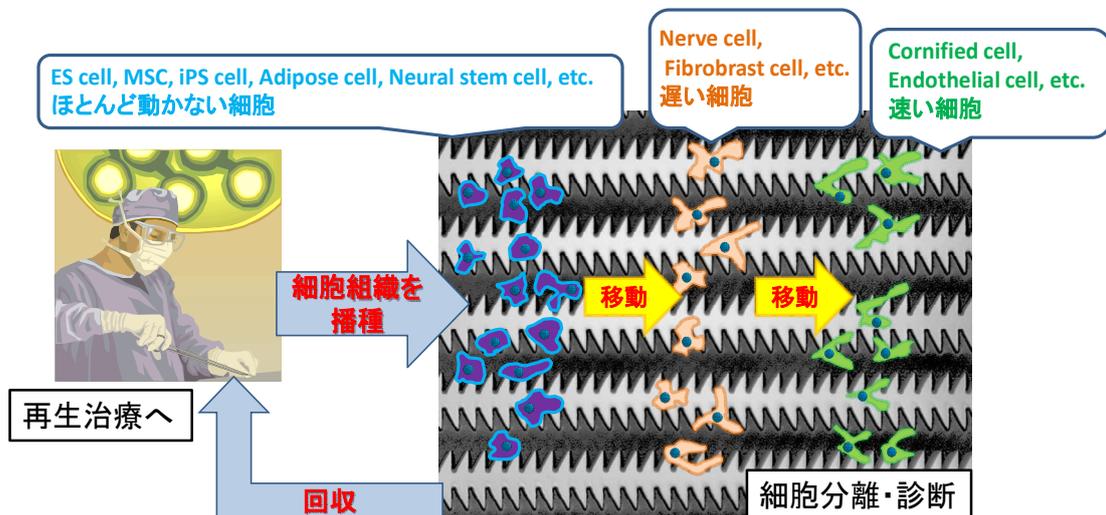


Fig. 4 三次元的な形状を利用した自発的な細胞分離技術

4. 評価

(1) 自己評価

研究開始段階では、細胞を一方向にのみ遊走させる形状要素は曖昧であった。研究期間中に、細胞を一方向にのみ遊走させる形状を段階的に絞り込んだ結果、当初の目的であった一方向にのみ細胞を動かす三次元形状を明らかにすることができた。

また、本研究を遂行した結果、細胞培養用シリコン基材の表面改質技術や、不透明な基材上の細胞の長時間タイムラプス観察技術といった、今後の医用基材の開発に大きく貢献できる基礎技術を開発した。更に、細胞分離や、細胞の受けるメカニカルストレスの調節、医用高分子材料の弾性の調節といった応用技術も開発した。これらの新技術は再生医療分野の発展に大きく貢献できると確信している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

細胞の遊走は代謝や分化、増殖などと並んで、細胞の基本的かつ重要な機能であるが、これまで、三次元形状変化による細胞遊走制御はほとんど調べられて来なかった。そこで、研究者は、さまざまな三次元パターンを作製し、これらの上で細胞遊走を広く調べた。その結果、方向性を持った細胞遊走が起こるパターンをいくつか見だし、特に三次元パターンの鋭いエッジの向きと間隔によって細胞がターンする角度が依存することを明らかにした。

この知見のもとに、三次元的に鋭いエッジが一方向にのみ向いたパターンを作製し、これらの表面では細胞が鋭いエッジの向いた方向にのみ遊走していくことを発見し、弾性率を変えた基材上の細胞挙動と比較することで、三次元パターン上のメカニカルストレスの増減によって遊走性を評価できるものと推測した。

得られた現象は興味深く、それ自身オリジナリティに富むものであるが、それらが細胞の知覚や代謝系とどのように関連づけられるかといった、生物運動の基本問題にまで議論を発展できれば細胞運動に関するより深い情報が得られたものと思われ、今後の進展に期待したい。このような三次元パターンや、弾性率変化を利用した材料表面による細胞遊走制御に関する知見は今後、細胞分離や、人工臓器開発などへの応用が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. H. Sunami, I. Yokota, Y. Igarashi, Influence of the pattern size of micropatterned scaffolds on cell morphology, proliferation, migration and F-actin expression, *Biomaterials Science*, 2013, Nov. 28 published on web.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者: 角南寛、横田育子

発明の名称: 動物細胞の運動方向の制御基材、当該基材を用いた細胞の識別方法及び細胞の分離方法

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 2013/11/6(非公開希望)

出願番号: 特願 2013-229898

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 角南寛, 光武進, 五十嵐靖之, 三次元パターンを利用した細胞遊走の制御, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(2010年12月9日)
2. 角南寛, 光武進, 五十嵐靖之, 三次元パターンを利用した細胞分離, 第10回日本再生医療学会総会(2011年3月2日)
3. H. Sunami, S. Mitsutake, Y. Igarashi, Effect of three-dimensional patterns on cell adhesion and cell migration, The 17th IUPAB International Biophysics Congress (2011年11月1日)
4. H. Sunami, I. Yokota, Y. Igarashi, Influence of the pattern size of three-dimensional micropatterned scaffolds on cell functions, 7th International Symposium on Nanomedicine (2013年11月8日)