

2019年5月8日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成30年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属： 慶應義塾大学理工学部

職名： 准教授

氏名： 須藤 亮

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： 三次元組織形成プロセスにおけるハイドロゲル力学的特性の役割
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 安達泰治、須長純子、仲尾信彦
3. 研究期間： 平成30年4月1日～平成31年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

細胞や組織を取り巻く周囲組織への浸潤や立体組織の構築といった細胞集団による三次元組織形成プロセスを解明することは、がんのメカノバイオロジーや組織工学の観点から重要である。特に、細胞の足場となるハイドロゲルは、その組成に起因する生化学的要因のみならず、構造や強度に起因する力学的要因も重要である。そこで、本研究では、原子間力顕微鏡を用いてハイドロゲルの弾性率を測定し、これらの力学的特性が三次元組織形成プロセスに与える役割を検討した。

がん細胞の浸潤プロセスを調べる実験では、マウス由来のグリオーマ幹細胞を使用して、細胞が三次元ゲルの内部へ浸潤するプロセスを解析した。実験にはコラーゲンの濃度やゲル化する際の pH を調節することで様々なゲルを作製し、原子間力顕微鏡を用いてこれらのゲルの弾性率を測定した。原子間力顕微鏡のカンチレバーには、細胞と同程度の大きさのガラスビーズを接着したものを使用し、これをゲルに押し込んだ際のカンチレバーのたわみ量と力の関係（フォースカーブ）を解析することによって弾性率を算出した。これらのゲル弾性率とグリオーマ幹細胞の浸潤プロセスの関係を調べると、ゲル弾性率が高い条件ではグリオーマ幹細胞が集団で浸潤する現象が起こり、ゲル弾性率

が低い条件ではグリオーマ幹細胞が単独で浸潤する現象が起こることがわかった。

また、グリオーマ幹細胞は分化状態の異なる不均一な細胞集団を形成するが、未分化なグリオーマ幹細胞の方が高い浸潤能力を有することを示唆する実験データが得られた。さらに、このような浸潤能力の高いグリオーマ幹細胞は、細胞核を柔軟に変形させながらゲルの内部を浸潤していることがわかった。そこで、グリオーマ幹細胞の分化状態と細胞核の柔軟性の関係についても原子間力顕微鏡で調べたところ、幹細胞条件でのグリオーマ幹細胞は、分化誘導した条件に比べて核近傍の細胞体の弾性率が低いことがわかった。以上の結果は、グリオーマ幹細胞の有する高い浸潤能力には、低い細胞体弾性率が関係していることを示唆している。

立体組織の構築プロセスを調べる実験では、ラット初代培養胆管上皮細胞を用いて、胆管構造の形成プロセスとゲル弾性率の関係を検討した。この実験では、同じ濃度のコラーゲン溶液を用いて、ゲル化する際の pH を調節することでゲル弾性率を制御した。原子間力顕微鏡によるゲル弾性率の測定によって、pH 9 でゲル化したコラーゲンゲルは、pH 5 でゲル化したコラーゲンゲルよりも弾性率が有意に大きくなることがわかった。これらのゲルを用いて胆管上皮細胞を培養すると、弾性率の高いゲルにおいて胆管上皮細胞がより大きなコロニーを形成することがわかった。さらに、胆管上皮細胞コロニーの上にゲルを重層することで胆管形成を誘導した。弾性率の異なるゲルを重層した場合、いずれの条件においても胆管は形成されたが、形成された胆管の管腔サイズには有意な差が認められなかった。

以上より本研究では、グリオーマ幹細胞による浸潤プロセスおよび胆管上皮細胞による胆管形成プロセスの 2 つの現象を対象として、ハイドロゲルの力学的特性が三次元組織形成プロセスに与える影響を検討した。実験結果はハイドゲルの力学的特性が組織形成プロセスにおいて重要な役割を有することを示唆しているが、今後の研究においてさらなるメカニズムの検討が必要である。これらの研究が、三次元細胞動態のメカノバイオロジーとして展開されることが期待される。

5. 研究成果の公表

【学会発表】

Ryo Sudo, In vitro tissue engineering using 3D microfluidic devices, International Symposium on SSS Laser Processing, 2019 年 2 月 27 日～3 月 1 日, Keio University, Yokohama, Japan

Ryota Kaku, Yasuaki Tokunaga, Ryo Sudo, Analysis of morphology and function of cholangiocytes cultured on soft and rigid substrates, 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2019 年 3 月 7 日～8 日, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan

須藤亮, 微小血管網と三次元肝細胞組織を組み合わせた組織工学的手法, 第 18 回 日本再生医療学会総会 シンポジウム 18 「Ex vivo での機能的な肝組織の再構築」, 2019 年 3 月 21 日～23 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)