

三次元再生組織の形態変化の動力学に与える コラーゲンの構造の影響

古澤和也*, 土田雅之**

* 北海道大学 先端生命科学研究院 [〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目]

**北海道大学 生命科学院

1. 緒言

我々の体は発生という生命現象を経て形作られる。正常な発生が引き起こされる条件の下では、ヒトの体の形づくりの再現性は驚くほど高く、ヒトの形や部品となる組織や臓器の形はだいたい同じ形をしている。しかしながら、再現性良く同じ形が作られる機構についてはわからないことが多い。

発生生物学の分野ではこの謎を解き明かすために、モデル生物の実際の発生過程を追跡し、各発生過程にける時空間的な遺伝子の発現パターンを解析する方法などによって研究が進められてきた。しかしながら、遺伝子の時空間的な発現パターンなどが、どのように生き物の形づくりにつながるのかについてはほとんど未解明である。このことに対して、最近、組織や臓器の形づくりを試験管内で再現する方法に注目が集まっている。例えば、胚性幹細胞塊の浮遊培養により眼杯の構造を自己組織的に再現した例などが報告されている¹。一方で、組織や臓器の形づくりに細胞だけでなく細胞外基質も重要な働きを持つことが知られている。

本研究では、細胞を構造の異なるコラーゲンゲル中に埋め込むことで様々な三次元再生組織を構築する。それぞれの再生組織の形や大きさ、および組織内部の細胞の数や形が培養期間においてどのように変化するかを追跡することで、組織や臓器の形づくりに関する細胞外基質の役割を明らかにする。以上より、発生過程における組織や臓器の再現性のよい形づくりの謎を解き明かすための手がかりを得ることが本研究の目的である。

2. 実験方法

本研究では、ヒト肝がん由来株化細胞 (HepG2)、肝類洞内皮細胞 (HSEC)、および肝星細胞 (HSC) を実験に用いた。それぞれの細胞を 280mM のグリセリンを含むアテロコラーゲン水溶液 (IPC-50、KOKEN co. ltd.) に Table 1 に示されている細胞密度の組み合わせで懸濁した。この細胞懸濁液を 20 mM の Na_2HPO_4 と 13 mM の KH_2PO_4 を含む pH7.1 のリン酸緩衝液中に電動式マイクロピペットを用いて一定の排出速度 (166.7 $\mu\text{L/s}$) で排出することで、球形の三次元再生組織を構築した。構

築した再生組織は EGM2 中で培養し、その直径 (D_T) の時間変化を追跡した。

Table 1 試料の調製条件

細胞の種類	細胞密度 (10^6 cells/mL)		
	試料1	試料2	試料3
HepG2	1.0	1.0	1.0
HSEC	0	0.5	0.2
HSC	0	0.5	0.5

3. 結果と考察

HSC および HSEC を含む試料 (試料 2 と試料 3) では培養時間の経過とともに直径が収縮した。一方で、HepG2 だけの試料 (試料 1) では直径はほとんど変化しなかった。試料 2 と試料 3 の直径の培養時間に伴う変化には、試料の直径がほとんど変化しないラグタイムとその後の収縮過程とから成ることが明らかとなった。この収縮過程は、次の実験式を用いて表すことができた。

$$D_T = D_M \exp\left(-\frac{t - t_{\text{lag}}}{\tau}\right) + D_{\text{inf}}$$

ここで、 D_M 、 t_{lag} 、 τ 、および D_{inf} は収縮の大きさ、ラグタイム、組織収縮の時定数、および最終的な組織の大きさをそれぞれ表す。HSC の細胞密度が高い方が、 t_{lag} と τ が短く、 D_M が大きく、そして D_{inf} が小さくなった。これは、HSC の数が多いほどコラーゲンゲルを収縮させようとする力が大きくなることに起因していると考えられる。また、HSC の細胞密度が高いほど HSC どうしが接着しやすくなることも原因として考えられる。

4. 結言

三次元再生組織の収縮過程を実験式で表すことにより形態形成過程を特徴づけるパラメーターを得ることができた。今後は、それぞれのパラメーターにコラーゲンゲルの構造が与える影響を明らかにすることで、形態形成における細胞外基質の構造の役割を明らかにする。

5. 文献

- 1) Ikeda *et al.*: Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *PNAS*, **102**, 11331-11336, 2005.