細胞集団の形状制御と画像流速解析を用いる上皮間葉転換の定量化

日大生産工	(院)	○深山達也	千葉大工(院)	菰田貴文, 菅原路子
物材機構		中西淳	日大生産工	野々村真規子

1 まえがき

一般に上皮細胞は、細胞が集団となって移 動し機能することが知られているが,時として 集団性が変化することで体の病態発生と密接 に関係している。例えば、上皮管腔組織は、上 皮組織から発生する段階で、図1のように上皮 間葉転換 (EMT) というプロセスを経て周囲の 細胞との集団性を失い, 間葉系細胞のようにば らばらに移動していく。一旦ばらばらになった 細胞は,適切な位置へ到達すると逆反応の間葉 上皮転換(MET)を受けて再び集団に戻る¹⁾。 この過程がうまく行われないと体への病態が 発生してしまうため, 細胞の動きを解明するこ とは生物学や医学的に重要と考えられる。細胞 の動きの解明には、動きの特徴を定量化する必 要がある。そこで、本研究では、細胞移動の動 きを捉える為に、光応答基板と粒子画像流速 (PIV)解析を用いて、上皮間葉転換における細 胞集団性の定量化を行った。細胞集団の大きさ や,光応答基板上での幾何学制御による細胞集 団性についても検討した。



図1. 上皮間葉転換(EMT)。集団細胞が時間経 過によってEMTを起こし,集団性を失う様子 を示す。

2 実験方法

2-1. 基板調整

エタノール洗浄および UV-O3処理によって 表面清浄化した金基板に対して,細胞接着性、 非接着性,及び光分解性を示す三種類の分子を 1:999:9000の比率で溶かしたメタノール溶液 を作用させることで図2のような光応答基板を 調製した。この基板上にさまざまなパターンを 形成するために, 蛍光顕微鏡の視野絞りに円形 のフォトマスクを挿入した状態で紫外光をパ ターン化照射した(図3)。この際, 幾何学制 約の効果を調べるために, 全面を光照射した基 板も別途作製した。

2-2. 細胞播種

培養上皮細胞株であるMDCK細胞を増殖因 子TGF-β (10ng/mL)を含む培地中にて2日間培 養してEMTを誘導した。一方でTGF-βを含まな い条件で培養した細胞(未処理群)も用意し, 対照試料とした。これらの細胞を光応答基板上 に播種(無血清培地中)し,1時間後に血清培 地を添加,2時間後に培地交換による浮遊細胞 の除去を行うことで,幾何学形状の制御された 細胞集団を形成した。顕微鏡に付属した培養装 置で細胞を培養環境(37℃,5%CO₂)に保ちな がら,5分ごとに細胞の位相差画像を撮影した。



図2. 光応答基板の作動原理。光分解性基を介 して細胞接着抑制作用があるポリエチレング リコール (PEG)を修飾した金基板であり,光 を照射した部分だけがPEGが分解され細胞が 付着する性質を示す。



Quantification of epithelial-mesenchymal transition by using photoactivatable substrates and particle image velocimetry

Tatsuya Miyama, Takafumi Komoda, Michiko Sugawara, Jun Nakanishi, and Makiko Nonomura

2-3. PIV解析および相関係数・集団性の指標(λ 値)の計算

実験で得られた画像を, PIV解析し, 細胞の 動きの可視化・定量化を行った。PIV解析とは, 図4のように探査領域を設定し,連続する2つの 時相での画像ファイルから最も近似している 輝度値の場所へ移動ベクトルを表記する手法 である。細胞移動にも用いられるようになって きている²⁾。得られた移動ベクトルから相関距 離などの集団性を表す指標を求めることがで きる。以下に、本研究で用いた相関関数を示す ³⁾。

$$C(r) = \mathbb{C}\sum_{i,j,I,J} \frac{\vec{a}_{ij} \cdot \vec{a}_{i+I\,j+J}}{|\vec{a}_{ij}| |\vec{a}_{i+I\,j+J}|} \delta_{I^2 + J^2, r^2} \cdots \neq (1)$$

 $\delta_{i,j}$ はクロネッカーのデルタ, \tilde{a}_{ij} はピクセル(i,j) における移動ベクトルである。C(r)の値が正で あれば正の相関,負であれば逆相関であること を示す。集団性の指標 λ は,相関関数式を指数 関数 $e^{-\lambda r}$ でフィッティングすることによって 求めることが出来る。



図4. PIVの原理。赤枠が検査領域,緑枠が探索 領域を示す。

3 実験結果

3-1. 光応答基板における細胞集団の幾何学制 御の効果

パターニングによって円形領域に閉じ込め た細胞集団,および基板全面を覆っている細胞 から円形パターンに相当する領域を抜粋した TGF-8未処理群での細胞集団のPIV解析の結 果を図5A, Bに示す。ここから2-3に則ってλ値 を求めた。また、λ値における変動係数(=標準 偏差/平均)について図5Cに示す。Cの右は観察 初期,左は観察後期を表しており、ともにAの 値の方が小さく、λ値の時間変動(ばらつき) はいずれも少ないことが明らかとなった。ま た,TGF-8処理群においても同様な結果を示し た(データ省略)。以上より、パターニングによ って幾何学制御をすることで、細胞のランダム な動きに制約が設けられ、より精確に集団性を 評価できることが分かった。



図5. 円形Aと全面BにおけるPIV解研,およい 観察初期(右),観察後期(左)におけるλ値の変動 係数C。

3-2. EMT誘導・非誘導細胞の集団性の比較

次に、EMT誘導・非誘導の細胞間での集団性 の違いを比較検討した。観察初期では、両者は 似たようなλ値の値を示したが、観察後期では、 TGF処理群の方が有意に高い値を示した(デー タ省略)。TGF-8処理したMDCKは時間ととも にEMTが進行していく事実⁴⁾を踏まえると、こ の結果は細胞の動態解析からEMTによる集団 性の変化を評価できたことを強く示唆してい る。

4 まとめ

PIV解析と光応答基板を組み合わせること で、EMTのプロセスを定量化することが出来た。 さらに、定量化する上で形状を制御した系の方 が精確に動きの違いを捉えられることが出来 た。また、TGF-β処理群は未処理群よりも相関 係数の値が小さくなっているため集団性が失 われていることが言える。今後は、基質の接着 力の影響や前培養条件の影響を調べ、知見を増 やしていく予定である。

「参考文献」

Y. Shimizu, H. Boehm, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, J. Nakanishi, Plos One, 9: e91875 (2014).
L. Petitjean, M. Reffay, et al, "Velocity Fields in a Collectively Migrating Epithelium", Biophysical Journal, 98, 1790-1800 (2010).

3) T.E. Angelini, E. Hannezo, X. Trepat, J.J. Fredberg, D.A. Weitz, Phys. Rev. Lett., 104: 168104 (2010).

4) Philip A. Gregory, Andrew G. Bert, Emily L. Paterson, et al, Nat. Cell Biol, 593-601(2008).