

細胞集団移動における集団間相互関係の数理解析

日大生産工 ○久保 朝美 日大生産工(院) 深山 達也 千葉大工(院) 半澤 拓海
 千葉大工(院) 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

細胞集団移動は、複数の細胞が細胞間接着を保ったまま移動する運動形態である。この運動形態は、人体の形成や傷の治癒などの生命現象や、ガン細胞の転移などの病態に関与していることが知られている。¹⁾これまで、我々のグループでは紫外線照射に応じて細胞接着を制御できる光応答性基板で幾何学的に制限された細胞集団内の細胞移動挙動の粒子画像流速(PIV)法による解析を進めてきた。²⁾³⁾しかし、これまでの研究では個々の細胞集団内の現象のみに着目しており、距離が少し離れた集団同士がどのような影響を与え合うかについては十分な解析が進められていなかった。そこで本研究では、光応答性基板を用いて幾何学形状と位置を任意に設定した細胞集団を作製した上で、その移動挙動をPIV解析することで集団間相互関係の影響を検証した。

2 実験方法

光応答性基板の原理とパターンニングした細胞集団のイメージを図1および図2に示す。文献⁴⁾にしたがって光応答基板を作成した。直径105 μm の円形で、集団間の中心間の距離が200,400,600,1000 μm となるフォトマスクを蛍光顕微鏡の絞りの位置に挿入し、光応答基板に対して紫外線でパターン照射した。その後、血清培地中で培養している上皮細胞株のMDCK細胞を濃度 0.8×10^6 個/ cm^2 で播種し、2~3時間後に培地交換を行い、浮遊細胞を除去することで任意のパターンに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°C, CO₂5%)に保ち、5分ごとに細胞の位相差画像を16時間撮影し細胞の移動を画像で記録した。得られた画像をMATLAB上で作成したプログラムを用いてPIV解析を行い、細胞の移動を解析した。

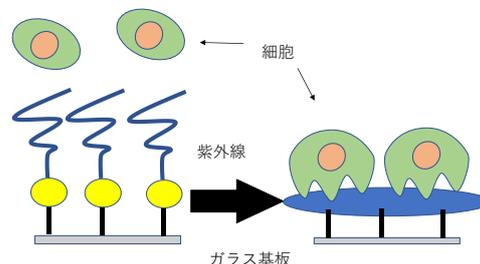


図1 光応答性基板の原理。光照射前は細胞が接着できないが、紫外線照射に応じて細胞が接着するようになる為細胞集団の幾何学制御が可能となる。

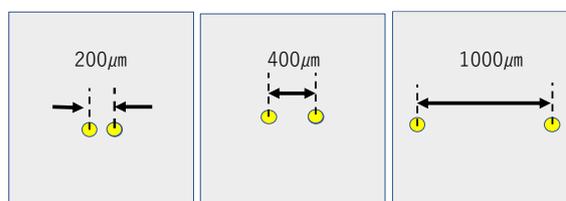


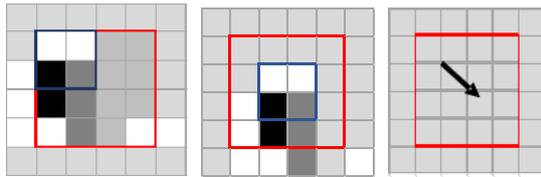
図2 パターンニングした細胞集団のイメージ。

3 PIV解析

PIVの原理を図3に示す。PIV法は、連続する画像から物体の速度や移動量等の情報を抽出する手法である。⁴⁾すなわち、図3のように1時相目の検査領域と2時相目の解析領域で最も似ている領域を探し、1時相目の検査領域の中心を始点、2時相目の解析領域で発見した領域の中心を終点とするベクトルを求めるという原理に基づいている。この時、解析する時相間隔が長すぎると細胞の動きを正しくベクトルで表すことが出来なくなる。反対に時相間隔が短すぎると解析に時間がかかり効率が悪くなってしまう。その為、時相間隔をデータに合わせて設定する必要がある。本研究では5時相間隔で解析を行った。

Mathematical analysis of intergroup relationships in cell population migration

Asami KUBO, Tatsuya MIYAMA, Takumi HANZAWA, Michiko SUGAWARA,
 Jun NAKANISHI and Makiko NONOMURA



(a) 1時相目 (b) 2時相目 (c) ベクトル
 図3 PIVの原理。青枠が検査領域、赤枠が解析領域を示す。

4 結果と考察

解析結果を図4に示す。過去の報告より、円形領域に閉じ込めた細胞は、回転運動を示すことが知られている。⁶⁾これに対して、2つの円形領域の領域間距離が200や400 μm と近接している場合、円形内にある細胞は、回転運動に加えて、最寄りの細胞集団に接近する様子を頻繁に観察された(図4 A,B)。一方で600 μm の場合は、時々集団同士が接近するものの、その頻度は顕著に低下していた(データ省略)。さらに集団間距離を1000 μm まで伸ばすと、細胞は通常通り単なる回転運動を示した。(図4 C) このことにより集団間距離が200 μm および400 μm の時には、集団間で液性因子などを介した相互作用が存在しお互いの移動挙動に影響を与え、集団間の距離を伸ばすにつれ影響が小さくなり、1mmまで離れると、ほとんど影響がなくなるものと考察できる。

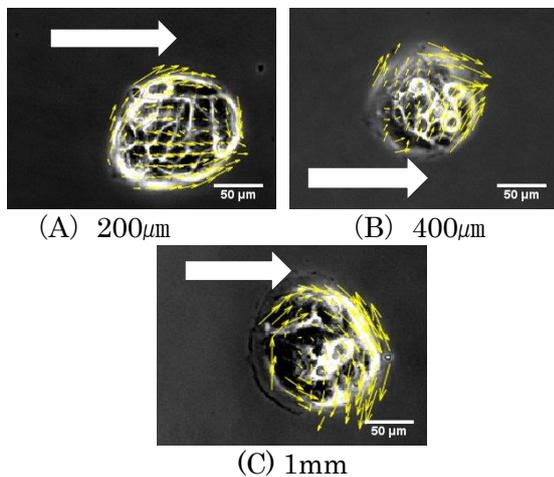


図4 PIV解析結果。集団間の距離が(A)200 μm , (B)400 μm , (C) 1000 μm の解析結果から、それぞれ特徴的な動きを示す時相を抽出した。全てにおいて、矢印で示す方向に近接する細胞が存在する。

5 まとめ

以上より、集団間距離に応じて集団間相互関係は細胞集団移動に影響を与えていることを示唆する結果が得られた。今後は、この影響

を定量化したうえで、周囲にある細胞集団の個数を変化させたケースや異なる種類の細胞を同じ容器内で培養する共培養を行い細胞の種類が異なる細胞集団間における影響などを解析していきたいと考えている。

「参考文献」

- 1) Y. Shimizu, H. Boehm, K. Yamaguchi, J.P. Spatz, J. Nakanishi, A Photoactivatable Nanopatterned Substrate for Analyzing Collective Cell Migration with Precisely Tuned Cell-Extracellular Matrix Ligand Interactions, Plos One, 9:e91875 (2014).
- 2) 深山達也, 菰田貴文, 菅原路子, 中西淳, 野々村真規子, 光応答基板上で形状を制御した細胞集団の粒子画像流速解析, 日本大学生産工学部卒業論文(2016).
- 3) J. Nakanishi, Photoactivatable substrates: a material-based approach for dissecting cell migration, Chem. Rec. 17 (6) : 611-621 (2017).
- 4) 菅原路子, 狩野達也, 劉浩, 武居昌宏, テンプレート・マッチング法による異なる基質上の集団細胞遊走解析, ライフサポート, 27,p97-104(2015).
- 5) C. R. Rolli, H. Nakayama, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, R. Kemkemer, J. Nakanishi, Switchable adhesive substrates: Revealing geometry dependence in collective cell behavior, Biomaterials, 33 (8): 2409-2418 (2012).
- 6) 難波大輔, 回転するヒト表皮幹細胞 <http://skinstem.exblog.jp/24469969/>