

# 培養細胞長時間イメージング記録システムの研究開発

郷原 一寿 [北海道大学大学院工学研究科／教授]

永山 昌史 [北海道大学大学院工学研究科／助手]

平 敏夫 [株式会社プライマリーセル／代表取締役社長]

## 背景・目的

1953年のワトソン・クリックによるDNAの構造解明を契機として、生物学の急速な進展は50年を経た現在においてもその勢いは留まるところを知らず、さらに大きな発展と新たな展開を見せようとしている。約30億もあるヒトのDNA塩基配列が完全に解き明かされ、一人一人の違いが分子の並びの違いとして数量化されるような時代に入った。この分子の並びの違いは、近い将来、医療に応用されると言われている。DNAの次はこれもとに構成されるタンパク質、それらと相互作用する糖鎖・脂質に関心がシフトしている。これらの要素は全て細胞の中でお互いにダイナミックに相互作用している。バイオに関する研究開発の対象は、DNA・タンパク質・糖鎖・脂質などのナノスケールからのボトムアップの方向性と、再生医療に代表されるように組織・個体レベルのマクロスケールからのトップダウンの方向性の2つがあり、バイオにおける世界的な潮流であるといえる。細胞は両者のちょうど接続点にあたり、非常に重要な位置を占めており、このことは、医学・理学・工学など既存の学問の枠組みを超えて、さらに産業界をも含めて、細胞に関する研究開発が急速に活発化することを予想させる。

このようなバイオ分野の将来的な動向を踏まえて、研究代表者の郷原は、光・電場・磁場などの物理的手法による計測によって細胞内外で生じている現象を科学的に解明し、工学的な応用に結び付けることを目標にした研究室を立ち上げ、研究を行っている。研究代表者はこれまで、レーザー・X線・電子顕微鏡などを用いた物性物理学的な実験的研究と、複雑系の観点から動的な自然現象を解明するためのニューロンのネットワークダイナミクスを対象に、理論的研究を行ってきており、これらは、現在ではナノテクノロジーとライフサイエンスに関わる研究であると言える。これらの研究経歴を生かしあつ今後のバイオ系における動向を考慮して、細胞に関する計測・制御を研究の一つの柱として位置付けて培養細胞実験室を整備した。細胞計測はレーザー、電子顕微鏡、放射光X線、SPMなどを応用した研究を進めている。また、本研究の共同研究者である(株)プライマリーセルとは細胞に関する研究開発を目的として产学の共同体として道内を中心に活動を行っている。本研究で目的とする『培養細胞長時間イメージング記録システム』は、平部長との产学共同活動の中でその必要性、重要性が明らかとなってきた

たもの一つである。

細胞に関する研究開発の基本的方法の一つが培養細胞の計測である。計測法は多くの方法が既に存在しつたな手法が研究されているが、中でも光学顕微鏡による観察は最も簡便かつ基本的な計測であり、細胞の種類に関わらず必ず行われる。培養細胞は、単一細胞から分裂を繰り返して数が増え、お互いに接着するコンフルエントと呼ばれる状態に達して細胞集団としての活動を示す。この一連の過程は細胞の種類に関わらず共通しており、短いものでも2日から3日、長いものでは半年から1年間の観測を必要とする。現在は、これらの計測には各研究者・技術者が個別にシステムを開発して対応している。本研究で目指すのは、この一連の過程を光学顕微鏡像として記録できる、汎用的なシステムであり、細胞の研究開発に重要な必須の計測システムとなり得る。さらに、創薬のスクリーニング、再生医療への応用、他の計測法との組み合わせなど多くの可能性があり、今後のバイオテクノロジーの発展に大きく寄与する。

本研究開発では、基本的かつ重要な細胞計測法の一つとして、培養中の細胞の成長過程を光学顕微鏡によって長時間に渡って観察することを可能とする、汎用的かつ安価なイメージング記録システムの構築を目的とする。

## 内容・方法

細胞を培養するためには、培養液の塩濃度、温度そしてpHを一定に保つことが必須条件である。この条件を実現するため、通常はCO<sub>2</sub>インキュベーターを用いて細胞培養を行う。このCO<sub>2</sub>インキュベーターは、その内部の湿度(100%)、温度、CO<sub>2</sub>濃度が一定になるように制御されているある種の“箱”(閉鎖系)である。湿度100%は蒸発による培養液の塩濃度の上昇を防ぎ、CO<sub>2</sub>濃度一定は緩衝作用によって培養液のpHを一定に保つ。しかしながら、細胞を観察するためには、培養シャーレを開放系である顕微鏡のステージ上にセットしなければならない。したがって、『培養細胞長時間イメージング記録システム』構築のカギは、CO<sub>2</sub>インキュベーターを用いることなく、顕微鏡下で細胞培養の必須条件を実現できるかどうかにある。そこで、我々は顕微鏡と培養シャーレに以下に記述した改良を加えることで、培養条件の実現を目指した。

細胞観察のために、4×,10×,20×,60×の対物レンズを搭載した倒立型光学顕微鏡と微分干渉ユニットを導入した。光源は、通常の微分干渉観察用の光源に加え、蛍光観察への応用を考慮した水銀ランプ光源の2種類を準備した。この2系統の照明系は電動によって切り替えることが可能である。細胞の長時間培養を可能にするための改良点は、顕微鏡の対物レンズ、ステージ、微分干渉素子をすっぽりと囲うことのできるアクリルシールドを追加した点である。アクリルシールド内は温度モニター用

熱電対とヒーターからなる温度コントローラーによって一定温度に保つことができる。顕微鏡画像はカラーCCDカメラを用いて撮影し、PCに取り込む。PCには①CCDカメラや顕微鏡の制御、②画像の取り込み、そして③簡単な画像処理を統合したソフトウェアを導入した。本ソフトウェアでは、画像取り込みのコマ間隔を1/30秒から24時間までの範囲で設定できる。また、最長で6ヶ月間もの長期にわたる画像取得が可能である。今回セットアップした顕微鏡システムを写真1に示す。

次に、培養シャーレに加えた改良について述べる。通常用いられる培養シャーレを温度コントロールされた顕微鏡のステージ上にセットすると、室温で放置した場合よりも培養液の蒸発が激しい。結果として急激な塩濃度上昇をもたらし、1時間程度で細胞が死んでしまう。そこで、培養液の蒸発を防ぐため、密閉式の“細胞培養セル”をガラスリング(Φ30mm、高さ8mm)とカバーガラスとをエポキシ樹脂で接着(もしくは真空グリスで密着)することで製作した。アクリルシールドと密閉式細胞培養セルによって温度と塩濃度一定の条件が実現できたので、最後に残されたのはpH一定の条件である。インキュベーター内とは異なり、顕微鏡上では培養液のpHをCO<sub>2</sub>濃度による緩衝作用によって保つことは不可能である。そこで、この細胞培養セルにあらかじめpH調整を行った培養液を細胞数に対し十分な量(セル内を満たすように)封入することとした。培養液にはフェノールレッドが添加されているので、その色によってpHの変化をモニターすることができる。以下に、細胞培養セルとその使用法についての模式図(Fig1)を示す。

以上の顕微鏡システムと密閉式細胞培養セルによって、光学顕微鏡下でCO<sub>2</sub>インキュベーター内と同様に細胞の長期間培養が可能となった。これにより、培養細胞を生きたままで長時間に渡ってデジタル的に記録可能な『培養細胞長時間イメージング記録システム』を実現した。

## 結果・成果

温度コントロールは細胞培養に必須の条件であるため、今までも顕微鏡ステージ上にセットした培養シャーレを温める様々な方法が考案され、試されてきた。しかしながら、培養シャーレだけを温める手法では、顕微鏡付近の温度揺らぎが大きくなり、顕微鏡筐体の金属膨張・収縮の原因となる。この膨張・収縮にともなって光学距離が物理的に変わってしまうことで、長時間観察においてはピントのズレが大きな問題となっていた。本研究では、アクリルシールドと温度コントローラーの導入により、顕微鏡全体を37±0.2°Cの精度で温度コントロールすることを可能とした。温度制御下で顕微鏡画像をover nightに渡って撮影し続けたところ、4~20×の対物レンズの場合ではほとんどピントのズレが生じなかった。実際には1日1回のピント合わせとPCの動作確認そして細胞状態の確認等は必要であるが、顕微鏡画像の無人自動取り込みが可能となったといえる。但し、60×の対物

レンズについてはピントのズレが大きく、1時間おきのピント合わせが必要であった。60×レンズのみ油浸で使用するため、レンズ-カバーガラス間を満たしているオイルの緩やかな流動がピントのズレを引き起こすものと考えられる。

細胞に見られる様々なダイナミクスはそれぞれ特徴的な時間スケールを持っている。例えば、細胞運動時の仮足の伸長は分オーダーの現象であるし、纖維芽細胞の細胞分裂はおよそ1日周期である。さらに、神経ネットワークの成熟といった年オーダーのダイナミクスも存在する。今までよく用いられてきたビデオ録画という方法では、2時間ごとにテープの交換が必要になる。また、このビデオレート(1/30sec)で録画されたデータを画像処理のためPCに取り込むとデータ量が膨大(10分で約2GB)になってしまう問題点があった。今回、顕微鏡システムに導入した顕微鏡制御・画像取り込み用のソフトウェアは、画像の取り込み間隔を変えることができる(1/30秒から24時間まで)。そのため、注目する現象にあわせた時間間隔で画像を取り込むことで、分オーダーから年オーダーまでの現象に対しての長時間観察が可能となった。

培地交換の不可能な密閉式の培養セルでは、長期培養にともなって細胞の代謝による培養液のpH変化と栄養欠乏が生じる。つまり、セル内で細胞の培養が可能な期間は、セル底面の表面積(張り付いている細胞の数)に反比例して短くなり、封入できる培養液の量に比例して長くなると予想される。我々がΦ30(内径Φ26)のガラスリングで作成した細胞培養セルについて、細胞が接着可能なセルの底面積とセル内に封入できる培養液の量を計算すると、それぞれ530mm<sup>2</sup>、4.25mLとなった。このセルに株化細胞を培養し、pH変化と細胞の様子を観察した。pHは2週間程度で緩やかに低く、つまり酸性側へ変化した(7.3→7.0)。この時、細胞の様子はコンフルエントに達する10日目以降で細胞死が目立つようになった。この結果は、ライン化された株化細胞では密閉式のセル内で少なくとも1週間以上の培養が可能であることを示す。一般に、細胞はpH変化に対して敏感に反応し、場合によっては細胞死を引き起こすとされているが、今回の結果から緩やかなpH変化に対してはある程度対応できるのではないかと考える。また、ガン細胞を用いて同様の観察を行ったところ、1ヶ月程度に及ぶ長期培養が可能であった。この結果は、ガン細胞はよりpH変化に耐えられる、もしくは適応できるということを示唆している。

以下に示したのは、細胞の持つ重要な機能のひとつである“分化”的過程を本システムによって長時間観察した結果である。実際には、各時間間隔で取り込んだすべての画像をもとに動画を作成した。これにより、分化の様子を詳細に検討することが可能となった。細胞は実験動物から取り出した初代細胞を用いた。その理由は、株化細胞よりも培養が難しいといわれている初代細胞を本システムで培養できるかどうか?またその期

間は?という点についても確認するためである。

## ①初代腸間膜脂肪細胞の分化

ラットの腸間膜より採取した細胞が脂肪細胞へと分化する様子を撮影した。画像は5 min間隔で取り込み、トータル3日間にわたる観察を行った。対物レンズは20×を使用した。結果をFig2に示す。

左から観察開始時、24時間後、48時間後の画像である。観察開始時において、脂肪前駆細胞は株化纖維芽細胞などと同様にうすく広がり、極性を持って細長く伸びた形態を示す。その後、細胞は運動と増殖を繰り返しながら、底面を細胞で覆っていく。コンフルエントに近い状態まで細胞数が増えると、いくつかの細胞の内部に脂肪球が現れる(矢印、24h)。さらに培養・観察を続けると、ほとんどの細胞の内部に脂肪球が現れ、その脂肪球一つ一つが巨大化していく(矢印、48h)。以上のようなプロセスを経て、脂肪細胞へと分化することが明らかとなった。また、この細胞は脂肪球を蓄積し始めた後にも分裂や運動を繰り返すことと、脂肪球が巨大化すると分裂や運動が停止することが分かった。この結果は、長時間撮影し続けた画像を元に動画を作成することで初めて明らかとなった結果である。このことが、本システムの有用性を端的に表している。

腸間膜脂肪細胞(内臓脂肪)の蓄積は内臓型肥満の原因であり、生活習慣病の発症と深く関わっている。しかしながら、これまでin vitroでの分化誘導系が確立されていなかつたことが、分化のメカニズムに関する研究や薬剤のスクリーニングに対し大きな障壁となっていた。昨年、共同研究者である(株)ホクドーはこの腸間膜脂肪細胞の分化誘導系の開発に世界で初めて成功し、我々は『培養細胞長時間イメージング記録システム』を用いることでその分化の様子を詳細に観察することに成功した。この業績は既に大きな反響を呼んでおり、各種メディア(新聞、TV)にも取り上げられた。

## ②破骨細胞の分化(細胞の多核化)

分化マクロファージが多核化をともなって破骨細胞へと分化する様子を撮影した。画像は2 min間隔で取り込み、トータル5日間にわたる観察を行った。対物レンズは10×を使用した。結果をFig3に示す。

左から観察開始時、24時間後、48時間後の画像である。24時間後には多核化した巨大細胞(破骨細胞)が現れている(矢印)。また48時間になると破骨細胞の数が増加し、一匹の大きさもより大きくなることが分かる(白囲みは一匹の破骨細胞)。これらの結果は、今までの他のグループによる実験結果からも示唆されていた。しかしながら、本システムを用いた実験によって、一匹のマクロファージが仮足を伸ばす速度より多核化細胞が仮足状の構造を伸ばす速度の方が明らかに大きいという新しい知見が得られた。この結果は、多

核化細胞の性質が、単純に個々のマクロファージの性質を足し合わせただけでは記述できないことを示している。

## 今後の展望

本研究で実現したシステムは細胞の研究開発に重要な基本的な必須の計測システムであり、細胞の研究開発のみならず、創薬のスクリーニング、再生医療への応用、他の計測法との組み合わせなど多くの可能性があり、今後のバイオテクノロジーの発展に大きく寄与する。そのため、細胞の長時間観察を可能とする顕微鏡のステージ設置型のCO<sub>2</sub>インキュベーターが最近になって数社から発売された。しかしながら、非常に大掛かりな装置で、かつ高価である。一方、我々の製作した密閉式培養セルの制作費はほとんどガラスリングの加工費のみであり単価は数100円である。使用後は、電気炉でエポキシ樹脂を燃やすことで、ガラスリングの再利用も可能である。つまり、非常にリーズナブルでありながら、実験結果が示すように非常に高い効果を得られるシステムといえる。

今後は、以下に記述したテーマを中心にして、さらに長時間の培養を可能にするための改良と腸間膜脂肪細胞の分化メカニズムについての研究を並行して進めていく。

### ①長時間の培養を可能にするための改良

現在のシステムでは、初代細胞においても1週間程度の培養が可能である。より長時間の培養を可能とするためには、細胞の代謝による培養液のpH変化と栄養欠乏がボトルネックとなっている。この問題は、密閉式培養セル内の培養液を新しいpH調整済みの培養液と交換できさえすれば解決できるだろう。そこで、密閉式セルに培養液の流入・流出経路を確保するための加工を施す。この新しい密閉式セルと送液ポンプとを組み合わせることで、セル内の培養液の置換が可能となる。これにより、さらに長時間(目標は月~年オーダー)の培養と観察が実現できるだろう。

### ②分裂能や運動能と分化の関係

今までの研究で、初代内臓脂肪細胞の分化は分裂能や運動能の低下をともなって進行していくことが分かった。今後は、細胞を細胞分裂や運動に関与するシグナル伝達経路に対する亢進薬もしくは阻害薬で処理した後、その細胞の分化の様子を長時間観察する。これにより、分化と運動や分裂との関係を明らかにしていく。

### ③反射干渉顕微鏡を用いた接着点パターンの観察

細胞運動には基盤との接着点の形成と分解が必須である。そこで、現在使用している微分干渉顕微鏡の光学系に改良を加えることで、反射干渉顕微鏡との同時観察を可能とする。この顕微鏡を用いて、生細胞における接着点分布の時空間変化と細胞の運動そして分化との関係を明らかにする。さらに、今までよく分からなかったコンフルエント状態が分

化のトリガーとして働く機構について、②の結果と併せることで物理的・化学的側面から解明していく。

#### ④蛍光顕微鏡を用いた3次元構造観察

細胞の形態は細胞膜直下に張り巡らされたアクチン骨格系によって保持されていると考えられている。今後は、分化の各過程におけるアクチン骨格系の免疫蛍光染色を行い、細胞骨格の3次元構造と分化の関係を明らかにする。将来的にはGFPを導入することで、分化に起因する細胞骨格の構造変化についての長時間観察も試みる。

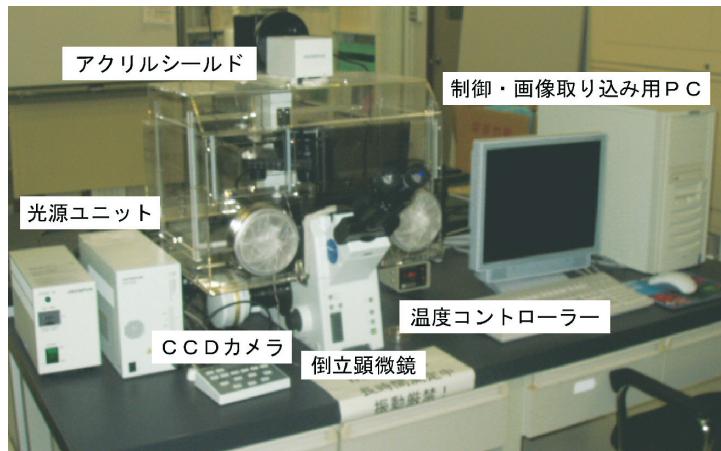


写真1 顕微鏡システム

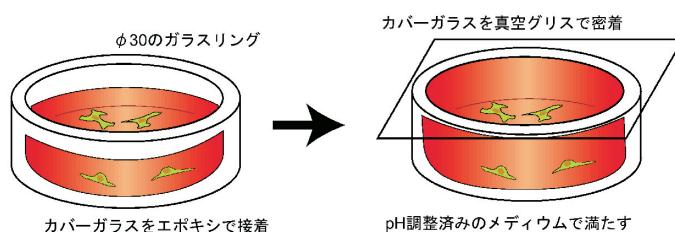


Fig1 細胞培養セルとその使用法

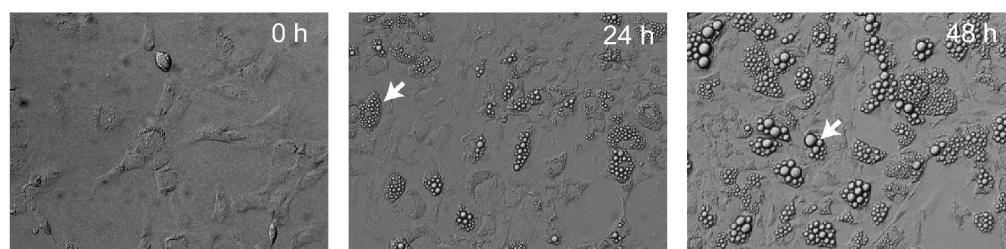


Fig2 ラットの腸間膜より採取した細胞が脂肪細胞へと分化する様子

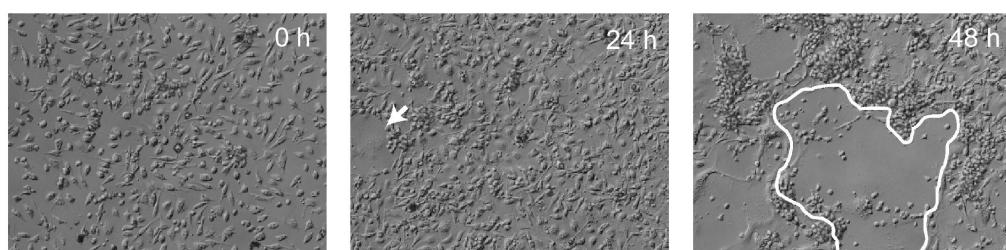


Fig3 分化マクロファージが多核化をともなって破骨細胞へと分化する様子