

弾性体としての細胞外マトリクスと細胞との力学的相互作用

東京工業大学 生命理工学研究科

原田伊知郎

§1 緒言：細胞と細胞外マトリクス

生体組織は細胞だけで構成されているのではなく、組織にある細胞は細胞外マトリクスと呼ばれる高分子群によって周辺環境が整えられている。巨大高分子から構成される細胞外マトリクス繊維群は、それぞれの部位に応じて水を多く含んだゲル状であったり整頓されたシート状であったりと様々であり、一昔前までこれらECMはその組織構造維持のための単なる支持体と考えられていた。しかし、近年では細胞外マトリクスの種類も豊富に存在することが明らかになり、それらは各種組織の適材適所に存在するだけでなく、細胞はそれらの種類を識別・認識し生理的機能が制御されていることが分かってきている。

ECMの生理的な意義やそれに接着するメカニズムが明らかになってくると同時に多くのECM成分とそれを認識する細胞側のレセプター（例えば各種インテグリン）の同定も活発に行われるようになったが、ここで一つの”疑問”が生じる。それは、「組織に固有のECM培養皿にコートし、貼り付けるだけで細胞の機能を十分に引き出すことが可能であろうか？」というものである。このことは大きく二つの点で不十分であることが想像できる。一つはシャーレ上での培養はいつも2次元平面状であるということと関係がある。特に結合組織と呼ばれている組織では、ECMは組織中の体積の大部分を占め、細胞は疎でありECMに包まれた状態で存在している。もう一点は生体環境と培養シャーレ上で異なる点はECMの物理的な状態である。ほとんどのECM繊維群は多くの水を含むゲル状の状態であり、シャーレのように硬いECM群は骨を除き殆どない。上皮組織と呼ばれる組織では2次元状に細胞が敷き詰められている形で存在する場合があり、これらの細胞は基底膜と呼ばれる薄い膜状のECMに接着しているが、そこでのECM群も直下にある結合組織との物質をやりとりするための透過性を可能にしている弾力性に富んだ不織布のような構造である場合がほとんどである。また、ECMを構成している分子群の種類やその組成が異なってくれば、当然ECMの物理的性質も変化すると考えられ、むしろそのことを生命は有効利用しているという考え方も否定できないであろう。ECMが細胞制御の鍵となることが明らかになってきて以来、ますますECMと細胞との相互作用を体系的に捉える必要がある。すなわち生体中でのECMは”単なる維持体”ならびに”単なる細胞認識部位の提供”ではなく、細胞に情報を伝え、細胞によって再構築され、さらにそのことが新しい情報となるなど細胞と自己無撞着的

に相互作用するものである。本テーマでは、生体環境を模倣したゲルを基質とした従来の培養法に見られる細胞の特異的な現象について、細胞外マトリクスと細胞の巧みな相互作用の一面を紹介したい。

§2 コラーゲンゲルと細胞との相互作用

上述のような支持体及び生理的認識リガンドの両観点からゲルを培養基質として用いる研究として、ECMの主成分であるコラーゲンを用いた方法が古くから行われている¹⁾。Type Iコラーゲンは生体中に豊富に存在し、これらを酸性溶液として抽出し、生理条件下で再度ゲル化させたものを培養基質とすることができる(図1)。コラーゲンゲルを培養基質としたとき、もっとも顕著に観察される現象は、このゲル内で繊維芽細胞を培養するときに見られるゲル自体の収縮であり、通常培養開始から数日間で数分の一にまで収縮する。収縮したゲルの濃度や細胞の形態は真皮とほぼ等価なものになり、すでに人工皮膚として実用化されている。特に興味深い点は、ゲル上にあるときの細胞の運動的振る舞いである。ゲル上にある繊維芽細胞は伸展や移動に伴い接着基質に牽引力を及ぼし、ゲルを構成しているコラーゲン繊維をたぐり寄せる。この力が、コラーゲンゲルの収縮の主要因であるが、細胞の牽引力に伴い繊維がたぐり寄せられると、コラーゲン繊維の配向現象が生じる。繊維芽細胞は接着している基質上の接着可能な点(リガンド)の密度を検知するシステムが備わっており、自らの牽引力によって生じた配向繊維上を移動するようになる。このような、細胞の牽引力→コラーゲン繊維の配向→配向した繊維の密度勾配を検知した細胞の移動という一連のプロセスによって細胞分布にパターンが発生する。この一連の細胞運動は、あたかも細胞が基質の修復の為に移動して組織そのものの形態形成を行っているように見える。Harrisらは、このようなメカニズムによって細胞分布にパターンが生じることを見だし²⁾、細胞運動とECM繊維の再構築が組織形成に重要な因子になりうることを示唆している。さらにMurrayらはこれらの一連の過程を数学的に表現している。「細胞の運動によってECMに構造変化が生じ、その変化に細胞が応答して運動制御され、さらにその細胞の運動に応答してECMが再構築される」という自己無撞着的な組織形成システムは、細胞が備えていなくてはならない機能を最小限にし、非常に効率が良いことは明らかである。また、ここで見られる現象はECMが弾性基質であるということと、細胞の力によってリガンド密度が変化しやすいような繊維状で構成されているということであり、細胞はその物性を巧みに利用しているということが重要なポイントである。

§3 コラーゲンゲル上に発生する細胞分布パターン

上述のようにコラーゲンゲルを培養液に浮遊した状態で繊維芽細胞をゲル内に封

入して培養するとゲルは収縮する。また、培養開始前にコラーゲンゲルをシャーレに固定化し、収縮を妨げてゲル上に細胞を培養すると繊維芽細胞の分布に濃淡が出現する。その結果を図2に示す。得られた結果はHarrisらが観察したものとほぼ同様であり、細胞の凝集が島状になって出現する。また、細胞の凝集した島と島の間にはコラーゲン繊維が顕著に配向している。このメカニズムは既に説明したように細胞がコラーゲン繊維に接着・伸展するときにコラーゲン繊維に発生させる牽引力がトリガーになっている。勿論シャーレ上に繊維芽細胞を培養してもこのような現象は見られない。むしろ、繊維芽細胞は接触障害という効果、すなわち互いに接触することを避けるように移動するため、シャーレ上に培養すると細胞はむしろ均一に存在している。

このように、ゲル上に発生する独特の細胞分布の詳細を調べるために2つのことを行った。まず一つはゲル上に発生している分布の周期的特徴を捉えるために直径5cmの大きなゲルを作製し、そこへ細胞を培養して2cm四方の大きな面積で細胞分布の撮影を行った。低倍率顕微鏡で広域観察すると細胞を一つ一つとらえられなくなってしまう。そのためまず高倍率で各部分を分割し、細胞分布情報を二値化した画像へ変換し縮小した画像（細胞を1pixelのサイズまで縮小）を作製し画像解析用のデータとした（図3）。次にゲル上の細胞がどのようなパラメータに依存して分布をどのように変化させるかを見るために作製するコラーゲンゲルのコラーゲン濃度、及び播種する初期細胞数依存性について検討を行った。それぞれの結果を図4に示す。興味深いことに、コラーゲンゲルの濃度が低い場合、ゲル上に発生する細胞分布は網目状のになりHarrisらの報告とは異なる形状のものであった。また、コラーゲン濃度が高い場合、従来報告されているものと同様に島状の細胞凝集分布が確認された。またこれらの画像をそのまま二次元フーリエ変換(FFT)すると特異的な波長にピークが出現するパターンであることが確認された。さらに、ゲル上に播種する初期細胞数を増やしていくと、ゲル上に発生する細胞分布は同様にコラーゲン濃度が低い場合網目状のまま、コラーゲン濃度が高い場合は島状と形状を維持したまま波長の小さなパターンが出現することが分かった。

§4 コンピュータシミュレーションによる分布パターンの解析

Murrayらが示したゲル上に発生する細胞分布パターンの理論はパラメータが多く、そのまま理論により解析を進めることは難しい。そこで、得られた結果として1. ゲルのコラーゲン濃度に依存してパターンの形状が変わること、2. 初期細胞密度に依存してパターンを特徴づける波長が変化すること、に焦点をあててこれらが相互作用のどのようなパラメータに支配されているのかを簡単なコンピュータシミュレーションによって検討を行った。

シミュレーションモデルとして以下のようなモデルを採用した。実際の現象とし

て、繊維芽細胞がコラーゲン繊維をたぐり寄せるところからスタートするわけだが、一個の細胞がコラーゲン繊維を均等方向にたぐり寄せても細胞の移動現象としては何も変化しない。2つの細胞が”互いに”コラーゲン繊維を引き合い、その部分のコラーゲン繊維が配向し、その繊維の配向を細胞が認識して、コラーゲン繊維密度の高い方へ移動する。したがって、シミュレーションモデルとして、細胞が繊維をたぐり寄せて出来る密度勾配を細胞が発生させるポテンシャル関数と見立てて、互いのポテンシャル関数の重なり合いを単純に相加的に計算し、そのポテンシャル関数の総和の勾配に従って細胞を移動させる方法を採用した。またポテンシャル関数として細胞の移動方向に対して等方的でない場合についても検討を行った。細胞によってたぐり寄せられたコラーゲン繊維は等方的ではなく図5に示すように殆ど異方的である。また特徴として、細胞の前方は広範囲の繊維をたぐり寄せているが、後方は細胞の移動に伴って引っ張られてきた一点の部分の配向のみが良く観察される。このような繊維の配向性の異方性をポテンシャル関数の異方性とみだててシミュレーションを行った。細胞の移動速度、分裂、応答性など様々なパラメータが存在するが、これらは基本的に出現するパターンに大幅な影響を与えなかった。細胞が分裂せず、基本的にポテンシャル関数の勾配のみを認識して移動し、その勾配の度合いに無関係に1ステップずつ細胞が移動するものとして計算した結果を図6に示す。シミュレーションの結果に示すようにポテンシャル関数の非対称性が大きいほどパターンは島状のものから網目状へのものに近づき、コラーゲン濃度依存性に見られた結果を再現していくようにみられた。すなわち、コラーゲン濃度が低いゲルほど、細胞の牽引力によってたぐり寄せられたコラーゲン繊維の配向性が顕著になり、その結果コラーゲン濃度の低いゲル上ほど細胞分布パターンは網目状のものになったものと考えられる。しかしながら、シミュレーションに用いたパラメータをどのように変動させても初期細胞数に依存したパターンを特徴づける波長の変化は現れず、パターンを特徴づける波長はポテンシャル関数の大きさに決まってしまう。実際の培養系と比較して、細胞によるコラーゲン繊維のたぐり寄せを一定の関数系に設定することは現実的ではないのは当然の結果ともいえる。

§5 細胞とコラーゲン繊維間の相互作用の新しい要素の可能性

2つの細胞間において互いにコラーゲン繊維を引っ張り合うと、一つの細胞から伝搬するコラーゲン繊維の配向はそこで遮蔽される。従って、その効果をポテンシャル関数に導入することは有効であると考えられる。しかし、このことを考慮して例えば周辺の平均細胞密度に合わせてそのままポテンシャル関数の有効距離を変動したシミュレーションを行うと、うまく細胞凝集パターンが発生しなくなってしまう。このような遮蔽効果を効果を導入しつつ、実験を再現するようなシミュレーションを行うことが出

来れば、コラーゲン・細胞間の相互作用に見落とされていた効果を見出すことが出来るかもしれない。そこで別の実験を行いコラーゲン繊維の配向性と細胞の発生する力の大きさについて検討を行った。すると、コラーゲン繊維の配向性を培養系全体で一軸方向に制限する方法を試みたところ興味深い結果が得られた。細胞は配向したコラーゲン繊維の方へ移動するだけでなく、繊維の密度の高い方へ接着すると、ますます大きな力を発生させコラーゲンをより大きく収縮させることが分かった。この結果をシミュレーションへ反映させる方法は、細胞がたぐり寄せる繊維を表現したポテンシャル関数の広さだけではなく強さを広さに応じて変動させる効果になると考えられる。しかしながらこの効果をどの程度考慮すればよいか現時点では明瞭に導入することは出来ない。まず、細胞が配向したコラーゲン繊維にますます大きな力を加えているという現象論をどのように捉えるのかということを考慮して実験的なデータを取得する必要があると考えた。

配向した方向へ細胞は移動し、そこに接着するとますます大きな力を発生させるようになる。しかし、単に一つの細胞が繊維をたぐり寄せるだけでは繊維の顕著な配向は生じない。繊維の顕著な配向は2点の力点が必要であり、それは2つ以上の細胞がコラーゲン繊維を互いに引き合うことによって生じる。すると細胞は、その配向した繊維へ足を伸ばしてますます強く繊維を引き寄せるようになる。このようなポジティブフィードバック的な機構は、あたかも細胞内に機械刺激に応答するセンサーが備わっているように見える。すなわち、細胞は接着した足場に力を加えるが、その力が緩和せず自分が発生させる力に拮抗した力が存在すればますます力を印可するメカノセンサーのような機構が存在すると考えられる。このような細胞の効果は従来から研究されてきたコラーゲン－細胞相互作用について言われていなかった現象であり、生物学的な現象としても非常に興味深い。

現在では、細胞外マトリクスの弾性率などの物理的な要素を認識するメカニズムが備わっているという考え方は普及しつつあるが、その分子機構に迫る方法論が確立しておらず、まだそのメカニズムの詳細は不明のままである。今回の動的システム情報論では、このような細胞の集団運動のような大域的な現象から、細胞が備えている分子メカニズムに迫る方法論を議論させていただいた。

1) E. Bell *etal.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 1274 (1979)

2) A. K. Harris *etal.*, *J. Embryol. exp. Morphol.* 80, 1 (1984)